

Crises convulsivas associadas à hipóxia neonatal e o potencial uso terapêutico do neuropeptídeo NAP

Hypoxia-associated neonatal seizures and potential therapeutic use of neuropeptide NAP

SAMUEL GREGGIO¹
JADERSON COSTA DA COSTA²

RESUMO

Objetivo: apresentar dados de revisão sobre os aspectos clínicos e fisiopatológicos das crises convulsivas neonatais associadas à hipóxia, as bases celulares e moleculares envolvidas neste processo e as evidências experimentais e clínicas da possível utilização terapêutica do neuropeptídeo NAP nesta condição.

Fonte de dados: para a captação dos artigos utilizou-se a base de dados PubMed, inserindo os termos NAP, neonatal seizures e perinatal hypoxia. O critério de seleção de artigos foi a especificidade em relação ao tema estudado, preferencialmente a partir do ano de 1990. Além disso, foram utilizados também artigos clássicos de anos anteriores que se aplicavam ao propósito desta revisão.

Síntese de dados: o risco de apresentar crises convulsivas está aumentado no período neonatal. Existem dificuldades no diagnóstico das crises, eficácia limitada do tratamento e potenciais efeitos adversos, dos anticonvulsivantes utilizados correntemente, no desenvolvimento cerebral dos recém-nascidos. Frente à urgência de novas estratégias para o tratamento das complicações resultantes de crises convulsivas neonatais associadas à hipóxia, o peptídeo NAP torna-se um forte candidato, considerando sua ação neuroprotetora em diversos modelos animais

ABSTRACT

Aims: To review clinical aspects, physiopathological data, cellular and molecular processes of hypoxia-associated neonatal seizures, and experimental and clinical evidences for the possible therapeutic use of neuropeptide NAP in this condition.

Source of data: A PubMed search was conducted to retrieve studies using the terms NAP, neonatal seizures and perinatal hypoxia. The criterion for article selection was the specificity to the subjects, mainly from 1990 to 2008. Besides, earlier classical studies were also used.

Summary of the findings: Risk for seizures is higher during the neonatal period. There are difficulties in seizure diagnosis, limited efficacy of treatment, and potential adverse effects, of currently used anticonvulsants, on the brain development of neonates. Given the necessity of new interventions for the neurological consequences of hypoxia-associated neonatal seizures, peptide NAP has become a promising candidate due to its neuroprotective action in a variety of animal models and clinical trials. With additional studies, peptide NAP could be employed as a new therapeutic agent for the prevention of cerebral hypoxia and neonatal seizures sequelae in pediatric patients.

Conclusions: Although there are positive evidences for the use of peptide NAP in animal models of neurological diseases and preliminary success in clinical trials has been reported, further studies must be taken to understand its

¹ Biomédico. Mestrando em Saúde da Criança, Faculdade de Medicina da PUCRS.

² Professor Titular de Neurologia da Faculdade de Medicina da PUCRS. Diretor do Instituto de Pesquisas Biomédicas, PUCRS.

e em ensaios clínicos. Com estudos adicionais, o peptídeo NAP poderá ser empregado como novo agente terapêutico para a prevenção da hipóxia cerebral e das seqüelas das crises convulsivas em recém-nascidos.

Conclusões: apesar dos indícios positivos da aplicação do peptídeo NAP em modelos animais de neuropatologias e de seu sucesso preliminar em ensaios clínicos, são necessárias pesquisas adicionais a fim de entender particularidades desse composto, tais como mecanismo de ação e viabilidade clínica para o tratamento das crises convulsivas neonatais.

DESCRITORES: SISTEMA NERVOSO/efeitos de drogas; CONVULSÕES; RECÉM-NASCIDO; HIPÓXIA FETAL; MODELOS ANIMAIS; NEUROPEPTÍDEOS/uso terapêutico; AGENTES NEUROPROTETORES.

peculiarities, such as mechanism of action and clinical viability for patients who suffered from hypoxia-associated neonatal seizures.

KEYWORDS: NERVOUS SYSTEM/drug effects; SEIZURES; INFANT, NEWBORN; FETAL HYPOXIA; MODELS, ANIMAL; NEUROPEPTIDES/therapeutic use; NEUROPROTECTIVE AGENTS.

ASPECTOS CLÍNICOS DAS CRISES CONVULSIVAS ASSOCIADAS À HIPÓXIA NEONATAL

É crescente a fundamentação clínica e experimental que avalia as bases celulares, moleculares e funcionais do desenvolvimento do cérebro da criança ou do animal em crescimento comparadas com as do cérebro do adulto. Sabe-se que o cérebro imaturo é particularmente suscetível a uma grande variedade de lesões. Algumas doenças neurológicas manifestam-se com diversos fenótipos ao longo de diferentes estágios da infância e, talvez, o fato mais intrigante seja a variedade de manifestações clínicas observada no período neonatal.¹

Uma enorme parcela das crises convulsivas em humanos acontece no primeiro ano de vida, com maior prevalência no período neonatal. Estas constituem um dos mais freqüentes eventos clínicos observados nos berçários e/ou unidades de tratamento intensivo neonatal, ocorrendo em 0,2% a 1,4% dos recém-nascidos, com maior predominância nos de baixo peso. Enquanto que a incidência de crises convulsivas neonatais varia de 1 a 4/1000 nascidos vivos, 14% dos recém-nascidos internados na unidade de tratamento intensivo neonatal do Hospital São Lucas da PUCRS apresentaram pelo menos um episódio clínico compatível com crise convulsiva. A mortalidade foi em torno de 15% e aproximadamente 1/3 dos casos evoluiu com seqüelas neurológicas.^{2,3}

Diversos são os fatores que distinguem as crises convulsivas neonatais daquelas caracte-

rísticas de crianças e adultos. A grande maioria delas é sintomática, 1/4 criptogênica e poucas ficam na categoria idiopática. Estas podem ser sutis, com discretas manifestações clínicas, e o padrão eletroencefalográfico comumente reflete um processo multifocal. A dificuldade diagnóstica é acentuada quando os neonatos apresentam movimentos ritmados e estereotipados sem correlação com alterações nos registros de eletroencefalograma (EEG). Isto pode caracterizar um evento não-convulsivo ou eventualmente convulsivo, ocorrendo em recém-nascidos com grandes lesões encefálicas. Assim, o diagnóstico das crises convulsivas neonatais dependerá da observação por um clínico experiente, da investigação por imagem e laboratorial e do EEG seriado.⁴

A relação entre crises neonatais e lesões hipocampais subseqüentes ainda não está totalmente esclarecida, tanto em ensaios clínicos como em estudos experimentais.⁵ Enquanto que estudos epidemiológicos prospectivos não encontraram uma ligação etiológica específica entre crises convulsivas na tenra idade, epilepsia crônica e danos cerebrais causados por esse processo, estudos retrospectivos demonstraram associação entre convulsões na infância, perda acentuada de neurônios hipocampais e gliose em pacientes com epilepsia refratária do lobo temporal.⁶⁻¹¹

O prognóstico dos recém-nascidos com crises convulsivas é muito variável. Em geral, metade dos casos evolui para óbito ou seqüelas graves – paralisia cerebral, epilepsia, déficits neurofuncionais a longo prazo sobre a memória, compor-

tamento e cognição – e a outra metade fica com seqüelas mínimas ou são normais. Basicamente, todas essas complicações são decorrentes de uma perturbação da conectividade neuronal e mudanças na composição de receptores e da estrutura dendrítica.²

Muitos dos processos epileptogênicos ocorrem somente durante uma janela de desenvolvimento crítica para o aprendizado, sinaptogênese e plasticidade neuronal. Os eventos transitórios, tais como febre, hipóxia e traumatismo cranioencefálico, em determinadas fases do desenvolvimento, podem gerar um insulto pró-convulsivante.¹²⁻¹⁴ Enquanto as convulsões geradas por hipóxia ocorrem mais freqüentemente nos neonatos, crises febris têm maior incidência em crianças entre 6 meses e 6 anos de idade, e as crises convulsivas conseqüentes a traumatismo cranioencefálico são mais freqüentes em crianças maiores.^{15, 16}

A hipóxia perinatal é um dos principais distúrbios associados às crises convulsivas neonatais.¹⁶ Acima de 70% das crianças que sofreram crises comprovadas por EEG – induzidas por hipóxia decorrente de complicações no parto – apresentam seqüelas, que podem variar de leves disfunções comportamentais até risco aumentado para o desenvolvimento de epilepsia, retardo mental e/ou paralisia cerebral na fase adulta.^{17, 18}

Processos hipóxicos graves podem resultar em crises freqüentes na primeira semana de vida, mesmo sob diversas intervenções farmacológicas. Geralmente, estas são recorrentes e prolongadas, requerendo politerapia associada à intensa sedação com barbitúricos e benzodiazepínicos. Um estudo randomizado concluiu que a administração combinada de fenobarbital e fenitoína controla em torno de 60% das crises convulsivas neonatais. No entanto, quando administradas separadamente, apesar de possuírem efeito anticonvulsivante semelhante, esses fármacos são eficazes em menos da metade dos neonatos.¹⁹ Portanto, as crises neonatais podem ser refratárias às drogas anticonvulsivantes disponíveis, determinando maior risco para seqüelas neurológicas.

Dados disponíveis indicam que o fenobarbital permanece sendo a terapia de primeira linha para o tratamento das crises neonatais, existindo poucas evidências na literatura médica que sustentem o emprego da maioria dos fármacos anticonvulsivantes nessa faixa etária.²⁰ Estudos experimentais demonstram, também, potenciais

efeitos adversos, no cérebro em desenvolvimento, de anticonvulsivantes usados atualmente, além de pobre eficácia sobre o controle das crises.²¹ A preocupação é com o risco-benefício do tratamento das crises convulsivas neonatais, assim, o desejável é que este seja o mais breve possível. Para que se possa definir a duração do tratamento, deve-se levar em consideração a etiologia das crises, o tipo de crise, e os resultados de EEG e de neuroimagem. Assim, a tendência atual é tratar por período menor os pacientes neurologicamente intactos, e por tempo maior aqueles com alterações neurológicas ou do desenvolvimento neuropsicomotor.³

As principais causas de hipóxia perinatal são complicações na gestação e no trabalho de parto, com sofrimento fetal, prematuridade e suas complicações.⁵ Infelizmente, não existe intervenção para recém-nascidos com encefalopatia hipóxica que possa prevenir os prejuízos cerebrais e as seqüelas neurológicas, mesmo quando não há lesão evidente de estruturas cerebrais.²² Além disto, a grande variabilidade de tentativas terapêuticas reflete a falta de padronização diagnóstica e de protocolos de tratamento, principalmente nos casos de refratariedade imediata à terapia com fenobarbital.²

BASES CELULARES E MOLECULARES DAS CRISES CONVULSIVAS INDUZIDAS EXPERIMENTALMENTE POR HIPÓXIA NEONATAL

Embora o progresso recente seja sutil em relação aos tratamentos efetivos para crises convulsivas neonatais – sejam elas atribuídas a hipóxia perinatal ou a qualquer outro insulto – tem havido avanço considerável acerca do entendimento de sua fisiopatologia. Alguns estudos, em especial, contribuíram para a identificação de fatores que influenciam o mecanismo epileptogênico, a responsividade aos anticonvulsivantes e o impacto das crises neonatais e da hipóxia sobre a integridade do sistema nervoso central (SNC).²¹

A maior facilidade do cérebro imaturo em desenvolver crises convulsivas deve-se a um desequilíbrio entre os sistemas excitatório e inibitório. Além disso, existe maior densidade sináptica e de espinhos dendríticos do nascimento até os primeiros meses de vida. O entendimento da maior suscetibilidade dos recém-nascidos em desenvolver eventos ictais foi reforçado a partir da constatação de que a

expressão idade-dependente de determinadas subunidades de receptores glutamatérgicos ionotrópicos dos tipos N-metil-D-aspartato (NMDA) e ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol-propiónico (AMPA) é acentuada entre o 7º e 14º dias de vida pós-natal, enquanto que de receptores de kainato tem pico de expressão mais tardio. Outro fator que contribui para a excitabilidade fisiológica do recém-nascido é a resposta despolarizante de receptores tipo ácido γ -aminobutírico (GABA) quando estimulados, ao passo que no cérebro de adultos ocorre resposta hiperpolarizante. Além disso, neurônios corticais neonatais contêm altas concentrações intracelulares de cloreto devido à pouca expressão do cotransportador KCC2 e à grande prevalência do cotransportador NKCC1. Assim, quando estimulados, ocorre um fluxo reverso de íons cloreto para o meio extracelular, contribuindo conseqüentemente para a despolarização neuronal. De forma semelhante à que ocorre em neonatos humanos, em muitos modelos de roedores o ponto máximo de suscetibilidade à crise ocorre na segunda semana pós-natal.²³

A hipóxia cerebral resulta em depleção de compostos altamente energéticos por mecanismos metabólicos dependentes de energia em neurônios e células gliais. Embora as conseqüências da hipóxia perinatal possam ser observadas clinicamente no período pós-natal, os processos patológicos agudos precedentes ao início do dano cerebral ainda não estão totalmente esclarecidos. Estudos sugerem que não é apenas uma simples reação, mas uma complexa seqüência de eventos. No entanto, tais fenômenos não são exclusivos da fase aguda do processo hipóxico, mas também abrangem o processo de reoxigenação pós-hipóxia.²⁴

A hipóxia cerebral é comprovadamente capaz de induzir a geração de espécies reativas de oxigênio, como óxido nítrico, a partir da ativação de receptores NMDA. Com aumento do Ca^{2+} intracelular, são ativadas diversas vias enzimáticas para geração de radicais livres, tais como: fosfolipase A2, metabolismo do ácido aracdônico pela ciclooxigenase e lipooxigenase, conversão da xantina desidrogenase a xantina oxidase através de proteases, e ativação de óxido nítrico sintetase (NOS). O aumento na produção desses compostos promove peroxidação lipídica de membranas, e diminuição da atividade da Na^+,K^+ -ATPase, podendo induzir à necrose.²⁵

Adicionalmente, há ativação de receptores nucleares (IP_3 e Ca^{2+} -ATPase de alta afinidade)

que promovem aumento do influxo celular de cálcio, ocorrendo estimulação da CaM cinase IV e fosforilação da proteína ligante ao elemento de resposta ao AMP-cíclico (CREB). Ao passo que o processo hipóxico não interfere na expressão gênica da proteína Bcl-2, há intensa estimulação da expressão de Bax, alterando a razão anti-apoptose/pró-apoptose que favorece a morte celular programada. Sendo assim, ocorre fragmentação do DNA nuclear, que pode ser resultante da ativação de endonucleases dependentes de Ca^{2+} , ativação das caspases 9 e 3 mediadas pela Bax, e/ou reações dependentes de radicais livres.²⁵

Levando em consideração todos os mecanismos celulares envolvidos na hipóxia, aceita-se que exista um papel central do óxido nítrico na lesão cerebral mediada por hipóxia. O que justifica esta hipótese é que, quando administrado um inibidor enzimático específico, como N-nitro-L-arginina (NNLA; inibidor da NOS), ocorre prevenção de diversos mecanismos próprios da hipóxia cerebral, como geração de radicais livres, nitração das subunidades de receptores NMDA, ativação da CaM quinase IV, aumento da fosforilação da CREB no sítio Ser133, expressão aumentada da proteína apoptótica Bax e fragmentação do DNA nuclear.²⁶

AMPLIANDO OS ESTUDOS EXPERIMENTAIS: UTILIZAÇÃO DE UM MODELO DE CRISES CONVULSIVAS NEONATAIS INDUZIDAS POR HIPÓXIA

Frente às dificuldades diagnósticas e terapêuticas das crises convulsivas neonatais, a complexidade dos estudos em humanos torna a pesquisa, neste enfoque, passível de variabilidade. Sendo assim, modelos animais permitem investigações controladas e prospectivas, assim como a utilização de intervenções e desdobramentos dos mecanismos envolvidos. Esses modelos são adequados quando conseguem mimetizar a dependência entre a idade e o fenômeno em questão, e também desenvolver complicações agudas e crônicas que possam ser observadas clinicamente.⁵

Embora uma correlação precisa do perfil de desenvolvimento entre humanos e roedores seja ainda um foco de discussão, observações sobre crescimento cerebral e processos de mielinização sugerem que as primeiras duas semanas de desenvolvimento pós-natal dos roedores sejam

compatíveis com o período de transição de lactente para criança em humanos.²⁷ É exatamente nesse período que os roedores apresentam maior suscetibilidade a crises convulsivas induzidas por hipóxia, mais precisamente entre os dias 10 a 12 de vida pós-natal (P10-12). No entanto, roedores com menor tempo de vida (P5-7), ou mais velhos (P15-60) não apresentaram resposta convulsivante quando submetidos a um episódio de hipóxia global (5-7% de oxigênio por 15 minutos). As respostas características desses animais foram crises tônico-clônicas acompanhadas de descargas alteradas de EEG, com foco epileptogênico no hipocampo e no neocórtex.^{28,29}

Roedores expostos à hipóxia com 10 a 11 dias de vida pós-natal (P10-11) demonstraram latência diminuída para geração de crises, na fase adulta, quando estimulados com fluorotil, ácido kaínico e pentilenotetrazol.^{22,30,31} Acerca do dano tecidual nesse modelo animal, constatou-se que apenas a região do mesencéfalo apresentou diminuição significativa do número de células neuronais, enquanto que o hipocampo e o córtex temporal não foram prejudicados pela hipóxia cerebral.³⁰ A princípio, sabe-se que crises prolongadas e *status epilepticus* em roedores com pouco tempo de vida causam mínima lesão cerebral, ao contrário do que é observado comumente nas extensas lesões hipocampais e límbicas no cérebro de ratos adultos. Estas distintas constatações não estão relacionadas à morte neuronal induzida por crise convulsiva, mas são atribuídas à conectividade neuronal alterada e à expressão de receptores específicos.³²

No trabalho de Chen et al.,³³ foi observada redução crônica dos níveis de fosforilação da CREB no sítio Ser133, da proteína pós-sináptica de densidade 95 (PSA-95), e do complexo PSA-95 acoplado às subunidades dos receptores NMDA (NR1, NR2A e NR2B), mesmo na ausência de perda neuronal na área hipocampal de CA1 de animais previamente expostos a hipóxia no décimo dia de vida (P10). Além disto, os animais apresentaram desempenho prejudicado no labirinto aquático de Morris, evidenciando alteração crônica da memória de longa duração. No entanto, a ativação dos receptores dopaminérgicos D1/D5 – através da administração contínua do agonista A68930 em P17-24 – resultou em melhora significativa no desempenho cognitivo, assim como aumento da expressão do complexo PSA-95/NMDA e CREB^{Ser133} fosforilada.

A partir de estudos eletrofisiológicos de fatias hipocampais de ratos – tanto após hipóxia em

P10, como em animais adultos previamente expostos – verificou-se a confirmação dos achados comportamentais de aumento da excitabilidade hipocampal e da suscetibilidade a crises convulsivas. Em ambos os casos a amplitude e duração da potenciação de longa duração na área hipocampal de CA1 estavam acentuadas em comparação aos animais controle. Registros extracelulares nas áreas de CA1 e CA3 apresentaram duração pós-disparo significativamente aumentada em resposta ao *kindling* de ratos hipóxicos. Verificou-se, também, maior indução de descargas ictais em CA1 de fatias hipocampais provenientes de animais hipóxicos, quando estas foram perfundidas com meio livre de magnésio. Estes dados sugerem que, mesmo na ausência de lesão morfológica ou morte neuronal evidente, houve alteração funcional da excitabilidade hipocampal de maneira aguda e crônica, devido a um insulto convulsivo breve e induzido por hipóxia cerebral durante um período crítico do desenvolvimento do SNC.³⁴

Utilizando esse mesmo modelo animal, crises convulsivas induzidas por hipóxia foram relativamente refratárias à administração de antagonistas de receptores NMDA (lorazepam ou MK-801), mas não de receptores AMPA (topiramato e NBQX).^{22, 35} Partindo destas constatações, concluiu-se que as crises convulsivas são dependentes da ativação de receptores AMPA, verificando também expressão diminuída de subunidade GluR2 – limitador do influxo de Ca²⁺ pelo canal iônico – no hipocampo e neocórtex, em até 72-96 horas após hipóxia, em ratos P10.³⁶ Ao contrário do que ocorre na morte neuronal decorrente da excessiva ativação de receptores NMDA em animais adultos, o influxo de Ca²⁺ através de receptores AMPA pobres em subunidades GluR2 em ratos imaturos produz resultados histológicos benignos, embora ainda patológicos.

Recentemente, constatou-se que a estimulação de receptores AMPA pelo processo epileptogênico da hipóxia resulta na ativação imediata da fosfatase calcineurina (CaN) na região hipocampal de CA1. Além disso, demonstrou-se que a defosforilação das subunidades b2/3 de receptores GABA_A e conseqüente diminuição da funcionalidade são dependentes da ativação de CaN, resultante de níveis elevados de Ca²⁺ intracelular. Em contrapartida, quando os animais foram pré-tratados com a droga immunossupressora FK-506 (inibidor de CaN), houve prevenção da ocorrência de crises induzidas por

hipóxia. Adicionalmente, através de registros eletrofisiológicos de fatias cerebrais preparadas imediatamente após indução de crise por hipóxia em ratos P10, observou-se diminuição da amplitude e frequência de correntes pós-sinápticas inibitórias espontâneas (sIPSCs) e em miniatura (mIPSCs) de neurônios hipocâmpais de CA1. Sendo assim, os dados sugerem que receptores AMPA permeáveis a Ca^{2+} e CaN tem influência sobre a supressão inibitória aguda da transmissão sináptica, contribuindo assim para a hiperexcitabilidade hipocâmpal decorrente das crises convulsivas induzidas por hipóxia cerebral.³²

Conforme Sanchez et al.,³⁷ observou-se que mesmo após 3-5 dias da indução de crises por hipóxia em ratos P10, pode-se ainda verificar diminuição de frequência e amplitude de sIPSCs e diminuição de amplitude de mIPSCs de neurônios piramidais de CA1. Curiosamente, uma semana após o insulto inicial, apenas a frequência de sIPSCs no grupo hipóxico permaneceu diminuída. Enquanto que as modificações agudas podem ser justificadas pela atividade da CaN e pela rápida desregulação de componentes pré e pós-sinápticos da transmissão inibitória, os dados sugerem que a diminuição persistente da frequência de sIPSCs possa resultar da diminuição do disparo espontâneo de interneurônios inibitórios pré-sinápticos.

Todas estas informações são de extrema importância, pois através delas pode-se identificar alvos terapêuticos celulares ou moleculares que irão viabilizar estratégias de reversão das consequências a longo prazo, e não apenas controle anticonvulsivo. Estudos com modelos animais e ensaios clínicos devem manter sintonia, a fim de possibilitar o entendimento sobre o quão segura e eficazmente os dados de roedores podem prever as respostas em humanos. É essencial a colaboração interdisciplinar entre neurocientistas e neurologistas para garantir sucesso nesses estudos.²¹

Ao mesmo tempo em que os achados e deduções dos modelos animais dão suporte à idéia de que as crises neonatais provocam epileptogênese e déficits cognitivos, estas constatações contrastam com investigações clínicas, as quais sugerem que as crises neonatais são marcadores sintomáticos de neuropatologias ou transtornos metabólicos pré-existentes ou em desenvolvimento. Mesmo com diversos trabalhos de alta qualidade em modelos animais de crises convulsivas – oferecendo enorme contribuição para

o entendimento e reformulação de tradicionais conceitos na epileptologia – ainda não há evidências convincentes de que crises neonatais *per se* são a causa original da epileptogênese. Acredita-se também que exista um fator de predisposição envolvido nas crises neonatais e suas consequências, visto que um mesmo insulto é capaz de gerar distintas reações entre os neonatos. Desta forma, um grande número de crises neonatais demonstra ser multifatorial, sendo este um fator de confusão entre pesquisas clínicas e experimentais. Segundo Lombroso,²³ o mais importante a ser destacado é que sempre o pior desfecho das crises convulsivas neonatais está correlacionado com a etiologia mais grave, e não com a duração ou com a frequência do fenômeno ictal.

NEUROPEPTÍDEO NAP: RELAÇÃO COM HIPÓXIA E POTENCIAL TERAPÊUTICO

Muitos são os fatores que contribuem para a falta de progresso na terapêutica das crises convulsivas neonatais. Estudos rigorosos confirmaram a impressão clínica de eficácia limitada, sobre os neonatos, das drogas anticonvulsivantes mais usadas. Até o presente momento, não foi desenvolvido um composto especialmente para o controle de crises convulsivas neonatais. Outros desafios referentes à melhora na terapêutica e no desfecho desses pacientes incluem a diversidade etiológica, as comorbidades e a complexidade diagnóstica das crises.²¹

A indução de proteínas neurotróficas é uma parte fundamental da resposta do SNC a uma grande variedade de insultos que afetam a integridade neuronal. Geralmente, os neurônios, quando estimulados por processos danosos, enviam sinais extracelulares a astrócitos e microglia que os intermedeiam, induzindo à liberação de neurotrofinas específicas.³⁸ A proteína neuroprotetora atividade dependente (ADNP; *activity-dependent neuroprotective protein*) foi identificada em células gliais e pode ser secretada por estas e controlada pelo peptídeo vasoativo intestinal (VIP; *vasoactive intestinal peptide*).³⁹ No entanto, a ADNP contém um sítio ativo denominado NAP – peptídeo de apenas 8 aminoácidos de sequência NAPVSIPQ – que já se demonstrou *in vitro* proteger células neuronais da toxicidade associada com peptídeo beta amiloide, NMDA, bloqueio elétrico (tetrodotóxina), glicoproteína gp120 (vírus do HIV), fator

de necrose tumoral alfa (TNF- α), dopamina, H₂O₂, privação de nutrientes e sobrecarga de zinco. Na maioria dos casos, a neuroproteção torna-se evidente em concentração de NAP na ordem de femtomolar e picomolar. Já em estudos *in vivo*, NAP tem ação protetora contra colinotoxicidade, deficiência de apolipoproteína E, traumatismo craniano, oclusão da artéria cerebral média, síndrome alcoólica fetal, hipóxia-isquemia, esclerose múltipla (encefalomielite autoimune) e disfunções cognitivas e de ansiedade associadas à meia idade.⁴⁰

Demonstrou-se que o peptídeo NAP liga-se especificamente à tubulina, principalmente com a subunidade β -tubulina cérebro específica, após internalização neuronal. Esta propriedade – condizendo com função de chaperona – facilita a reunião de microtúbulos que aumentam a sobrevivência e a integridade celular e atuam na manutenção da funcionalidade.⁴¹ Tais resultados sustentam a hipótese de um mecanismo de ação que não requer receptores neuronais de superfície nem ação dependente da quiralidade desse peptídeo.⁴² Como o NAP é solúvel em membranas lipídicas, atinge o SNC minutos após a administração intraperitoneal, intravenosa ou intranasal, sendo capaz de ultrapassar facilmente a barreira hematoencefálica. Acerca do potencial imunogênico do peptídeo, foram realizados testes em coelhos e não houve detecção de anticorpos contra NAP no soro destes animais. Após uma bateria de testes toxicológicos em ratos e cães, incluindo toxicidade de doses repetidas, testes cardiopulmonares e ensaios de função comportamental, não foram observados efeitos adversos com concentrações de NAP até 500 vezes acima da considerada biologicamente ativa.⁴⁰

Rotstein et al.⁴³ avaliaram o potencial neuroprotetor do peptídeo NAP na lesão hipóxico-isquêmica neonatal, através da exposição à hipóxia global pós-natal de camundongos deficientes em apolipoproteína E (ApoE). Após hipóxia e subsequente administração diária de solução contendo NAP (injeção subcutânea em P1-14; 25 μ l/mg), pôde-se constatar efeitos positivos nos desfechos cognitivos e nas habilidades motoras avaliadas. Recentemente, Kumral et al.⁴⁴ verificaram que uma única administração intraperitoneal de solução contendo NAP (0,3 μ g) foi capaz de diminuir significativamente a formação de óxido nítrico, resultando na preservação da densidade neuronal e na redução de neurônios em processo de apoptose nas áreas

hipocâmpais e no giro denteado de ratos recém-nascidos com lesão cerebral hipóxico-isquêmica.

O neuropeptídeo NAP está sob proteção conferida por patente e licenciada exclusivamente para estudos clínicos desenvolvidos pela empresa canadense Allon Therapeutics Inc. (TSX: NPC), The Neuro Protection CompanyTM. Este grupo de biotecnologia visa o desenvolvimento de drogas para o tratamento de uma grande variedade de patologias neurodegenerativas. As formulações intranasal (AL-108) e intravenosa (AL-208) do peptídeo NAP estão sendo submetidas a ensaios clínicos. Conforme informações disponíveis no endereço eletrônico da empresa, um ensaio clínico humano de fase Ia já foi finalizado, utilizando AL-108 em pacientes com Doença de Alzheimer e esquizofrenia, havendo planejamento para a realização de outros estudos em populações de risco para o desenvolvimento dessas patologias. Acerca do AL-208, está sendo desenvolvido um ensaio clínico humano de fase Ib a fim de avaliar segurança, tolerabilidade e farmacocinética em indivíduos saudáveis e diabéticos. Além desse, outro ensaio clínico de fase IIa está em andamento para verificar a eficácia de uma única dosagem de AL-208 em pacientes com déficit cognitivo leve após cirurgia de revascularização do miocárdio com circulação extracorpórea. A companhia também utiliza variações dessas formulações – como por exemplo, AL-209, AL-309 e AL-408 – em estudos pré-clínicos com modelos experimentais de Doença de Alzheimer, síndrome alcoólica fetal e esclerose amiotrófica lateral.⁴⁵

CONCLUSÕES

Crises convulsivas neonatais associadas à hipóxia são prejudiciais para o desenvolvimento normal do SNC, provavelmente ocasionando complicações futuras que poderão comprometer a qualidade de vida do indivíduo. Em face da variabilidade no diagnóstico e nas condutas terapêuticas, que dependem das condições do atendimento neonatal, esses casos demandam uma nova abordagem de tratamento, mais específica e que não comprometa o desenvolvimento normal do SNC.

O peptídeo NAP é um fármaco altamente potente e, pelas evidências científicas revisadas neste artigo, parece ser uma alternativa terapêutica promissora no tratamento das crises convulsivas neonatais associadas à hipóxia. Por ser uma droga de fácil administração, grande

ação neuroprotetora contra uma variedade de neuropatologias e que atinge facilmente o SNC, o NAP apresenta características que o tornam uma droga conveniente para pacientes pediátricos. Além disso, como foi demonstrado em diversos estudos, tanto em modelos animais como em ensaios clínicos, as propriedades farmacológicas do NAP formam a base do seu potencial terapêutico único: atividade em concentração de fentomolar e aparente estabilidade *in vivo*.

Embora seu mecanismo de ação não esteja completamente esclarecido, a ação neuroprotetora abrangente do NAP pode ser justificada por sua capacidade de estabilizar a estrutura neuronal, agindo diretamente no citoesqueleto microtubular, e por sua ação anti-oxidativa, seja pela redução do acúmulo intracelular de espécies reativas de oxigênio ou na manutenção da atividade mitocondrial. Apesar do entusiasmo do uso versátil do peptídeo NAP para o tratamento de várias doenças neurológicas, ainda são necessários mais estudos experimentais e clínicos para garantir segurança e viabilidade de sua administração.

REFERÊNCIAS

- Jensen FE. Developmental factors regulating susceptibility to perinatal brain injury and seizures. *Curr Opin Pediatr*. 2006;18:628-33.
- Bartha AI, Shen J, Katz KH, et al. Neonatal seizures: multicenter variability in current treatment practices. *Pediatr Neurol*. 2007;37:85-90.
- Dacosta J, Palmini A, Yacubian, EM, et al. Crises convulsivas no recém-nascido. São Paulo: Lemos; 1998.
- Dacosta J, Nunes, ML, Fiori, RM. Convulsões no período neonatal. *J Pediatr (Rio J)*. 2001;77:115-22.
- Jensen FE, Baram TZ. Developmental seizures induced by common early-life insults: short- and long-term effects on seizure susceptibility. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev*. 2000;6:253-7.
- Annegers JF, Hauser WA, Shirts SB, et al. Factors prognostic of unprovoked seizures after febrile convulsions. *N Engl J Med*. 1987;316:493-8.
- Berg AT, Shinnar S. Do seizures beget seizures? An assessment of the clinical evidence in humans. *J Clin Neurophysiol*. 1997;14:102-10.
- Cendes F, Andermann F, Dubeau F, et al. Early childhood prolonged febrile convulsions, atrophy and sclerosis of mesial structures, and temporal lobe epilepsy: an MRI volumetric study. *Neurology*. 1993;43:1083-7.
- Falconer MA, Serafetinides EA, Corsellis JA. Etiology and pathogenesis of temporal lobe epilepsy. *Arch Neurol*. 1964;10:233-48.
- Harvey AS, Grattan-Smith JD, Desmond PM, et al. Febrile seizures and hippocampal sclerosis: frequent and related findings in intractable temporal lobe epilepsy of childhood. *Pediatr Neurol*. 1995;12:201-6.
- Nelson KB, Ellenberg JH. Predictors of epilepsy in children who have experienced febrile seizures. *N Engl J Med*. 1976;295:1029-33.
- Dinner D. Posttraumatic epilepsy. Philadelphia: Lea & Febiger; 1993.
- Shinnar S. Prolonged febrile seizures and mesial temporal sclerosis. *Ann Neurol*. 1998;43:411-2.
- Westmark KD, Barkovich AJ, Sola A, et al. Patterns and implications of MR contrast enhancement in perinatal asphyxia: a preliminary report. *AJNR Am J Neuroradiol*. 1995;16:685-92.
- Jennett WB, Lewin W. Traumatic epilepsy after closed head injuries. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1960;23:295-301.
- Volpe JJ. Neurology of the newborn. 4th ed. Philadelphia: WB Saunders; 2000.
- Legido A, Clancy RR, Berman PH. Neurologic outcome after electroencephalographically proven neonatal seizures. *Pediatrics*. 1991;88:583-96.
- Bergamasco B, Benna P, Ferrero P, et al. Neonatal hypoxia and epileptic risk: a clinical prospective study. *Epilepsia*. 1984;25:131-6.
- Painter MJ, Scher MS, Stein AD, et al. Phenobarbital compared with phenytoin for the treatment of neonatal seizures. *N Engl J Med*. 1999;341:485-9.
- Booth D, Evans DJ. Anticonvulsants for neonates with seizures. *Cochrane Database Syst Rev*. 2004(4): CD004218.
- Silverstein FS, Jensen FE. Neonatal seizures. *Ann Neurol*. 2007;62:112-20.
- Koh S, Tibayan FD, Simpson JN, et al. NBQX or topiramate treatment after perinatal hypoxia-induced seizures prevents later increases in seizure-induced neuronal injury. *Epilepsia*. 2004;45:569-75.
- Lombroso CT. Neonatal seizures: gaps between the laboratory and the clinic. *Epilepsia*. 2007;48(Suppl 2): 83-106.
- Parker J, Ashraf QM, Akhter W, et al. Effect of post-hypoxic reoxygenation on DNA fragmentation in cortical neuronal nuclei of newborn piglets. *Neurosci Lett*. 2007;412:273-7.
- Mishra OP, Zubrow AB, Ashraf QM, et al. Effect of nitric oxide synthase inhibition during post-hypoxic reoxygenation on Bax and Bcl-2 protein expression and DNA fragmentation in neuronal nuclei of newborn piglets. *Brain Res*. 2006;1101:20-8.
- Mishra OP, Fritz KI, Delivoria-Papadopoulos M. NMDA receptor and neonatal hypoxic brain injury. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev*. 2001;7:249-53.
- Gottlieb A, Keydar I, Epstein HT. Rodent brain growth stages: an analytical review. *Biol Neonate*. 1977;32: 166-76.
- Jensen FE, Applegate CD, Holtzman D, et al. Epileptogenic effect of hypoxia in the immature rodent brain. *Ann Neurol*. 1991;29:629-37.
- Jensen FE, Wang C. Hypoxia-induced hyperexcitability in vivo and in vitro in the immature hippocampus. *Epilepsy Res*. 1996;26:131-40.
- Chen WF, Chang H, Huang LT, et al. Alterations in long-term seizure susceptibility and the complex of PSD-95 with NMDA receptor from animals previously exposed to perinatal hypoxia. *Epilepsia*. 2006; 47:288-96.

31. Jensen FE, Holmes GL, Lombroso CT, et al. Age-dependent changes in long-term seizure susceptibility and behavior after hypoxia in rats. *Epilepsia*. 1992;33:971-80.
32. Sanchez RM, Dai W, Levada RE, et al. AMPA/kainate receptor-mediated downregulation of GABAergic synaptic transmission by calcineurin after seizures in the developing rat brain. *J Neurosci*. 2005;25:3442-51.
33. Chen WF, Chang H, Wong CS, et al. Impaired expression of postsynaptic density proteins in the hippocampal CA1 region of rats following perinatal hypoxia. *Exp Neurol*. 2007;204:400-10.
34. Jensen FE, Wang C, Stafstrom CE, et al. Acute and chronic increases in excitability in rat hippocampal slices after perinatal hypoxia *In vivo*. *J Neurophysiol*. 1998;79:73-81.
35. Jensen FE, Blume H, Alvarado S, et al. NBQX blocks acute and late epileptogenic effects of perinatal hypoxia. *Epilepsia*. 1995;36:966-72.
36. Sanchez RM, Koh S, Rio C, et al. Decreased glutamate receptor 2 expression and enhanced epileptogenesis in immature rat hippocampus after perinatal hypoxia-induced seizures. *J Neurosci*. 2001;21:8154-63.
37. Sanchez RM, Justice JA, Zhang K. Persistently decreased basal synaptic inhibition of hippocampal CA1 pyramidal neurons after neonatal hypoxia-induced seizures. *Dev Neurosci*. 2007;29:159-67.
38. Zemlyak I, Manley N, Sapolsky R, et al. NAP protects hippocampal neurons against multiple toxins. *Peptides*. 2007;28:2004-8.
39. Furman S, Steingart RA, Mandel S, et al. Subcellular localization and secretion of activity-dependent neuroprotective protein in astrocytes. *Neuron Glia Biol*. 2004;1:193-9.
40. Gozes I, Morimoto BH, Tiong J, et al. NAP: research and development of a peptide derived from activity-dependent neuroprotective protein (ADNP). *CNS Drug Rev*. 2005;11:353-68.
41. Divinski I, Holtser-Cochav M, Vulih-Schultzman I, et al. Peptide neuroprotection through specific interaction with brain tubulin. *J Neurochem*. 2006;98:973-84.
42. Busciglio J, Pelsman A, Helguera P, et al. NAP and ADNF-9 protect normal and Down's syndrome cortical neurons from oxidative damage and apoptosis. *Curr Pharm Des*. 2007;13(11):1091-8.
43. Rotstein M, Bassan H, Kariv N, Speiser Z, Harel S, Gozes I. NAP enhances neurodevelopment of newborn apolipoprotein E-deficient mice subjected to hypoxia. *J Pharmacol Exp Ther*. 2006;319(1):332-9.
44. Kumral A, Yesilirmak DC, Sonmez U, Baskin H, Tugyan K, Yilmaz O, et al. Neuroprotective effect of the peptides ADNF-9 and NAP on hypoxic-ischemic brain injury in neonatal rats. *Brain Res*. 2006;1115:169-78.
45. Allon Therapeutics Inc. The Neuroprotection Company™ [Internet] Vancouver (BC): Allon Therapeutics; c2005. [acesso 2008 Abr 7]. Disponível em: www.allontherapeutics.com/index.htm

Endereço para correspondência:
JADERSON COSTA DA COSTA
Av. Ipiranga, 6690, 2º andar
CEP 90610-000, Porto Alegre, RS, Brasil
Fone: (51) 3320-3000 ramal 2173
E-mail: jcc@pucrs.br