

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGIA E TERAPÊUTICA
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

GISLENE GONÇALVES DIAS ZAGHI

Efeitos da Atorvastatina (Citalor®) sobre as sequelas neurohistológicas e comportamentais induzidas por hipoperfusão cerebral crônica em ratos de meia-idade.

Maringá
2015

GISLENE GONÇALVES DIAS ZAGHI

Efeitos da Atorvastatina (Citalor®) sobre as sequelas neurohistológicas e comportamentais induzidas por hipoperfusão cerebral crônica em ratos de meia-idade.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Centro de Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Humberto Milani

Maringá
2015

GISLENE GONÇALVES DIAS ZAGHI

Efeitos da Atorvastatina (Citalor®) sobre as sequelas neurohistológicas e comportamentais induzidas por hipoperfusão cerebral crônica em ratos de meia-idade.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Centro de Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas pela Comissão Julgadora composta pelos membros:

COMISSÃO JULGADORA

Prof. Dr. Humberto Milani
Presidente

Dra. Cássia Valério Romanini
1º Membro

Prof. Dra. Maria Angélica Raffaini Covas Pereira
2º Membro

Aprovado em ___/___/___

Dedico este trabalho

A todos que contribuíram para a sua realização e Àquele que me permitiu tudo isso, ao longo de toda a minha vida: meu DEUS. Reconheço em todos os meus momentos, que Você é o maior Mestre que uma pessoa pode conhecer e reconhecer.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, ao meu esposo, Gabriel, principalmente por todo o amor, carinho, compreensão, respeito e apoio incondicional e a Isabela o segundo coração batendo dentro de mim eternamente.

Aos meus companheiros de laboratório, principalmente à Doutouranda Emilene Dias, que sempre me ajudou quando eu precisei, com todo carinho e dedicação.

Aos técnicos, Marcos Alberto Trombelli e a Solidalva Caruso de Oliveira pelo apoio amizade e principalmente por compartilhar seus conhecimentos.

À secretária Francisca Helena Mesquita de Carvalho por toda atenção, dedicação e trabalho exemplar.

Ao Professor Dr. Humberto Milani, meu orientador, os meus sinceros agradecimentos. Seu esforço, dedicação, paciência, tornou possível a realização deste trabalho. Muito Obrigada por tudo.

À Professora Dra Rubia M. M. W de Oliveira, por abrir as portas do laboratório e me ajudar nas dicas e ensinamentos que me auxiliaram durante a realização deste trabalho.

LISTA DE ABREVIATURAS

2-VO	Oclusão dos 2 vasos
4-VO	Oclusão dos 4 vasos
ACC	Artéria carótida comum
ACI	Artéria carótida interna
AV	Artéria vertebral
AVE	Acidente Vascular Encefálico
DA	Doença de Alzheimer
DOV	Demência de origem vascular
FSC	Fluxo sanguíneo cerebral
EAC	Endarterectomia da artéria carótida
HCC	Hipoperfusão cerebral crônica
HMG-CoA redutase	hidroxi-metil-glutaril coenzima-A redutase
IEO	Intervalo entre as oclusões
LRA	Labirinto radial aversivo de 8 braços
Enos	Óxido nítrico sintase endotelial
Nnos	Óxido nítrico sintase neuronal
OACM	Oclusão da artéria cerebral média
TCE	Traumatismo crânio encefálico
TM	Teste de Memória
FPP	Farnesilpirofosfato
GPP	Geranilpirofosfato
GTP	Guanosinatrifosfato

Efeitos da Atorvastatina (Citalor®) sobre as sequelas neurohistológicas e comportamentais induzidas por hipoperfusão cerebral crônica em ratos de meia-idade.

RESUMO

Introdução: Hipoperfusão cerebral crônica (HCC) pode estar envolvida na patofisiologia de doenças neurodegenerativas associadas com o envelhecimento, tais como a doença de Alzheimer e demência de origem vascular. A prevenção ou tratamento de alguns fatores de risco (por exemplo, hipertensão crônica, aterosclerose, doenças cardíacas crônicas, etc.) é a principal recomendação para reduzir a prevalência de doenças neurodegenerativas associadas com a insuficiência vascular cerebral crônica. No entanto, uma vez que a condição de HCC tenha sido instalada, uma questão é se a progressão de sequelas neuropatológicas e funcionais podem ser atenuadas por um tratamento farmacológico. As estatinas são inibidores da enzima HMG-CoA redutase, reduzindo a velocidade da biossíntese de colesterol. Além do seu efeito de redução dos níveis de colesterol, as estatinas exercem efeitos pleiotrópicos incluindo melhoria da função endotelial, redução do stress oxidativo e inflamação, supressão da apoptose das células endoteliais e estimulação da angiogênese. Tem se sugerido que estes efeitos pleiotrópicos das estatinas são responsáveis pela redução da dimensão do infarto e dos déficits neurológicos em modelos animais de acidente vascular cerebral. No entanto, se as estatinas podem ser benéficas em condições de HCC ainda não foi investigado. **Objetivo:** investigar se o tratamento com atorvastatina (Citalor®) atenua o déficit de memória e a neurodegeneração causada por HCC em ratos de meia-idade. **Métodos:** ratos, de meia-idade (12-15 meses de idade), intactos, foram treinados durante 15 dias para aprender uma tarefa no labirinto radial, em seguida, submetidos ao modelo de hipoperfusão cerebral crônica que consiste na oclusão permanente dos quatro vasos (4-VO/ICA), em três fases. Atorvastatina (10 mg / kg, v.o) foi administrada durante 43 dias ou 15 dias, começando cerca de 5 horas após a primeira fase de oclusão. O desempenho da memória retrógrada foi medido 7, 14, 21, 28 e 35 dias após 4-VO/ICA. No final dos testes comportamentais, o cérebro foi analisado para verificar a neurodegeneração hipocampal e cortical. **Resultados:** a hipoperfusão cerebral crônica causou amnésia retrógrada persistente que foi revertida pela atorvastatina tanto no tratamento a longo prazo e a curto prazo. Esta atividade antiamnésica da atorvastatina foi sustentada durante todo o experimento, mesmo após a descontinuação do tratamento (grupo de tratamento de 15 dias). Este efeito ocorreu na ausência de neuroproteção histológica. Os presentes dados sugerem que a atorvastatina (e talvez outras estatinas) representam uma estratégia potencial para o tratamento de sequelas cognitivas associadas com HCC.

Palavras-chave: ratos de meia idade, de hipoperfusão cerebral crônica, amnésia retrógrada, neurodegeneração, atorvastatina, recuperação da memória.

Effects of Atorvastatin (Citalor®) on the behavioral and neurohistological sequelae after chronic cerebral hypoperfusion in middle-aged rats.

ABSTRACT

Background: Chronic cerebral hypoperfusion (CCH) may be involved in the pathophysiology of neurodegenerative diseases associated with aging, such as Alzheimer's disease and dementia of vascular origin. Prevention or treatment of some risk factors (e.g., chronic hypertension, atherosclerosis, chronic heart diseases, etc.) is the primary recommendation to reduce the prevalence of neurodegenerative diseases associated with chronic cerebrovascular insufficiency. However, once a condition of CCH has been installed, one issue is whether the progression of neuropathological and functional sequelae can be attenuated by some pharmacological treatment. Statins are inhibitors of the enzyme HMG-CoA reductase, the rate-limiting step for the biosynthesis of cholesterol. Apart from their cholesterol-lowering effects, statins exert pleiotropic effects including improvement in endothelial function, reduction of oxidative stress and inflammation, suppression of apoptosis in endothelial cells, and stimulation of angiogenesis. This statin-mediated pleiotropism has been suggested to underly the effects of statins in reducing both infarct size and neurological deficits in animal models of stroke. However, whether statins can be beneficial under conditions of CCH has not been investigated. **Objective:** to investigate whether the treatment with atorvastatin (Citalor®) attenuates the neurodegeneration and memory deficit caused by CCH in middle-aged rats. **Methods:** Intact, middle-aged rats (12-15 months of age) were trained for 15 days to learn a radial maze task, then subjected to 3-stage, 4-vessel occlusion/internal carotid artery (4-VO/ICA) model of chronic cerebral hypoperfusion. Atorvastatin (10 mg/kg, p.o.) was administered for 42 days or 15 days, beginning approximately 5 hours after the first occlusion stage. The performance of retrograde memory was measured 7, 14, 21, 28 and 35 days of 4-VO/ICA. At the end of behavioral tests, the brain was examined for hippocampal and cortical neurodegeneration. **Results:** Chronic cerebral hypoperfusion caused persistent retrograde amnesia, which was reversed by atorvastatin after both long-term and short-term treatment. This anti-amnesic effect of atorvastatin was sustained throughout the experiment, even after discontinuing treatment (15-day treatment group). This effect occurred in the absence of histological neuroprotection. The present data suggest that atorvastatin (and perhaps other statins) represent a potential strategy for the treatment of cognitive sequelae associated with CCH.

Keywords: Middle-aged rats, Chronic cerebral hypoperfusion, Retrograde amnesia, Neurodegeneration, Atorvastatin, Memory recovery.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
1.1 Hipoperfusão Cerebral crônica.....	10
1.2 Por que estatinas?	12
1.2.1 Estatinas e óxido nítrico	13
1.2.2 Estatinas e inflamação	14
2 OBJETIVO	16
3 METODOLOGIA	16
3.1 Animais	16
3.2 Protocolo experimental	16
3.3 Treinamento para aprendizagem da tarefa no labirinto radial aversivo (LRA) antes da cirurgia	17
3.3.1 Aparato de teste.....	17
3.3.2 Procedimento.....	18
3.4 Divisão dos grupos.....	19
3.5 Indução da Hipoperfusão Cerebral Crônica (HCC)	19
3.6 Tratamento.....	20
3.7 Testes de memória após 4-VO/ACI.....	20
3.8 Análise Histológica.....	20
3.9 Análise Estatística.....	22
4 RESULTADOS	22
4.1 Taxa de mortalidade.....	22
4.2 Desempenho de aprendizagem e memória	23
4.3 Análise histológica	26
5 DISCUSSÃO	27
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	33

1 INTRODUÇÃO

1.1 Hipoperfusão Cerebral Crônica

A hipoperfusão cerebral crônica (HCC) infere que a quantidade de sangue que supre o cérebro encontra-se reduzida a um ponto minimamente crítico, as necessidades metabólicas do tecido cerebral deixam de ser atendidas, quando então se instala uma crise metabólica/energética em termos do suprimento de glicose e oxigênio (DE LA TORRE, 2000, 2004). Uma vez atingido esse limiar de redução do FSC (Fluxo sanguíneo cerebral), mormente em estruturas como o hipocampo e o córtex entorrinal, surge então os primeiros sinais de disfunções cognitivas, caracterizados primariamente por uma síndrome amnésica, incluindo déficits de atenção e memória (DE LA TORRE, 2009).

Evidências clínicas e experimentais indicam que um estado de HCC deve estar primariamente envolvido na fisiopatologia e, talvez, na etiopatogenia de certas doenças neurodegenerativas associadas ao envelhecimento, cujo desfecho é um amplo espectro de disfunções cognitivas, configurando um quadro de demência. Neste quadro inclui-se os dois tipos mais comuns de demências, ou sejam, a doença de Alzheimer (DA) e a demência de origem vascular (DOV) (DE LA TORRE, 1994; FARKAS E LUITEN, 2001).

Algumas patologias existentes em humanos, como por exemplo, hipertensão, arteriosclerose, estenose da artéria carótida e infartos cerebrais silenciosos podem causar uma HCC regional e severa, principalmente em pacientes idosos que estão mais sujeitos a fatores de riscos tais como a hiperlipidemia, o diabetes, o tabagismo, entre outros (BRETELER, 2005). A prevenção contra os fatores de risco relacionados à HCC, principalmente a hipertensão e cardiopatias crônicas, representa a recomendação primária com vistas a reduzir a prevalência de doenças neurodegenerativas associadas à HCC (DE LA TORRE, 2009).

Entretanto, uma vez instalado o quadro de HCC, a questão pertinente é se a progressão das sequelas neuropatológicas e funcionais poderiam ser atenuadas. Em algumas patologias pode-se restabelecer o FSC normal, como no caso da estenose da artéria carótida. O restabelecimento da perfusão sanguínea cerebral após a endarterectomia da artéria carótida (EAC), mostrou

melhorar a função cognitiva, mensurada pelos testes cognitivos: Mini exame do estado mental e o *Montreal Cognitive Assessment* (MoCA), realizados antes e depois da EAC, em pacientes sintomáticos e assintomáticos. (WATANABE et al., 2014)

Pode-se também, expor os grupos de risco, como a população idosa, à estimulação ambiental, que envolve a combinação do aumento da interação social, exercício físico e exposição contínua a tarefas de aprendizagem, estas mostraram ter o efeito de prevenir ou reverter os déficits cognitivos em modelos animais de HCC, devido ao fato de reduzir o stress oxidativo e a lipoperoxidação no hipocampo, e ao recuperar a plasticidade sináptica. (ZHU et al., 2011, ZHANG et al., 2013).

Atualmente não há tratamento farmacológico aprovado para reverter os déficits cognitivos em pacientes com HCC já estabelecida, porém, há estudos em modelos animais que mostraram resultados promissores como alternativa para estes casos. Kwak et al., em 2012, demonstrou que Renexin (25 mg/kg de cilostazol (inibidor da PDE3) + 20 mg/kg de Ginko Biloba (propriedades anti-inflamatórias e anti-oxidantes)) promoveu efeitos neuroprotetores e induziu a melhora cognitiva em animais submetidos à cirurgia 2-VO. A Rosiglitazona (agonista sintético dos receptores ativados pelo proliferador de peroxissoma – PPAR- γ), reduziu os danos neuronais e aumentou os níveis de glutathione reduzida em animais submetidos à ligação permanente das artérias carótidas por 30 dias. (SAYAN-OZACMAK H. et al., 2012).

Em estudos anteriores, mostramos que o tratamento com sildenafil (inibidor da fosfodiesterase tipo 5, PDE5) reduziu consideravelmente o grau de neurodegeneração hipocampal e cortical medido após 118 dias de HCC. O sildenafil não atenuou, contudo, o déficit de aprendizagem causado pelo 4-VO/ACI, provavelmente por conta da curta duração do tratamento (FERREIRA et al., 2013). Entretanto, o tratamento com cilostazol, administrado desde a instalação da HCC até o término dos testes comportamentais, se mostrou eficaz para reverter o quadro de amnésia retrógrada causado pela 4-VO/ACI, porém não reverteu a neurodegeneração (GODINHO et al., 2015). No presente estudo nós questionamos se o tratamento com uma droga do grupo das estatinas poderia amenizar o déficit de memória e a neurodegeneração em um modelo animal de HCC.

1.2 Por que Estatinas?

As estatinas são medicamentos consagrados para o tratamento da hipercolesterolemia. Este efeito é atribuído inteiramente à inibição da enzima hidróxi-metil-glutaril coenzima-A redutase (HMG-CoA redutase) que é responsável pela produção do L-mevalonato, um produto intermediário na síntese do colesterol (Figura 01).

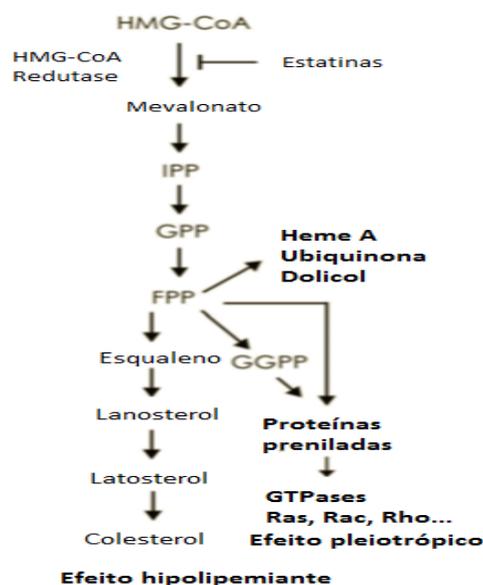


Figura 1 - Via da biossíntese do colesterol. A inibição da HMG-CoA redutase por estatinas reduz a produção de colesterol e interfere com a formação de isoprenóides a partir do mevalonato. A redução de isoprenóides como o farnesil-pirofosfato (FPP) e geranyl-geranylpirofosfato (GGPP) diminui a prenilação de proteínas biologicamente ativas (ex., Ras, Rac, Rho). Adaptado de Mendoza-Oliva et al. 2014

Entretanto, é sabido, que as ações das estatinas vão muito além da redução dos níveis de colesterol. As estatinas estão no grupo das chamadas substâncias pleiotrópicas, pois exercem várias ações farmacológicas que podem ser importantes no tratamento de outras doenças, incluindo aquelas de natureza vascular, mormente a doença cerebral isquêmica (LIAO e LAUFS, 2005; WIERZBICKI, et al., 2005). Estas ações celulares incluem: (i) melhoria da função endotelial, (ii) redução do estresse oxidativo, (iii) inibição de respostas inflamatórias, (iv) aumento dos níveis de óxido nítrico endotelial (eNO), (v) estabilização da placa aterosclerótica e (vi) redução da apoptose celular. As ações pleiotrópicas são dependentes da via dos isoprenóides, principalmente FPP e GGPP. (LIAO e LAUFS, 2005; MENDONZA-OLIVA,

2014).

Estes isoprenóides, são reconhecidos por uma preniltransferase que catalisa a ligação covalente dos mesmos com o resíduo de cisteína na sequência de consenso CAAX (C= cisteína, A= terminais alifáticos, X= serina, treonina, metionina, leucina, alanina ou glicina) de certas proteínas intracelulares, processo este denominado isoprenilação. Este processo promove a interação daquelas proteínas presentes no citosol com a membrana celular, e posterior ativação das mesmas (PECHLIVANIS E KUHLMANN, 2006). Duas das famílias de proteínas que necessitam desta isoprenilação para funcionarem corretamente são as proteínas da subfamília Rho e Rac, as quais são membros da superfamília Ras (*Rat sarcoma*), que por sua vez compreendem um importante grupo de pequenas proteínas G (GTPases), isto é, proteínas acopladas ao nucleotídeo guanosina (*guanine nucleotide-binding proteins*). Esta classe de proteínas está envolvida na transmissão de sinais celulares alterando-as de um estado inativo, quando ligadas a uma guanosina difosfato (GDP), para um estado ativo, quando ligadas a uma guanosina trifosfato (GTP) (ZHOU E LIAU, 2010).

O funcionamento destas proteínas permite regular diferentes processos celulares, como o crescimento celular, a morfogênese, a migração celular e a cinética celular. Evidências indicam que os efeitos pleiotrópicos das estatinas se deve, pelo menos em parte, à inibição da isoprenilação da proteína Rho (POSADA et al., 2013).

1.2.1 Estatinas e Óxido Nítrico

O radical óxido nítrico (NO) funciona como uma molécula sinalizadora no sistema vascular, melhorando o fluxo sanguíneo através da indução de uma resposta vasodilatadora potente, e é produzido por três enzimas: óxido nítrico sintase endotelial (eNOS), óxido nítrico sintase neuronal (nNOS) e a forma induzível (ex. por estímulos inflamatórios) expressa por macrófagos (iNOS). Imediatamente após um insulto isquêmico, a eNOS é ativada e exerce um efeito protetor, que é, pelo menos em parte, devido aos seus efeitos vasodilatadores. No entanto, insultos isquêmicos excessivos ativam superprodução de NO que leva ao dano oxidativo (ENDRES et al., 2004; MORO et al., 2004).

As estatinas inicialmente aumentam a produção de eNOS. Essa ação pode ocorrer de três maneiras. Em primeiro lugar, ela aumenta a ativação da proteína quinase B (PKB / Akt), que por sua vez ativa eNOS (KUREISHI et al., 2000). Em segundo lugar, as estatinas aumentam a expressão de eNOS pelo alongamento da meia-vida de seu RNA mensageiro. Este efeito parece ser mediado pela inibição da Rho GTPase e seu efetor ROCK (*Rho kinase C*), e os seus efeitos sobre o citoesqueleto (RIKITAKE e LIAO, 2005). A superprodução de óxido nítrico pela iNOS é inibida pelas estatinas através da regulação negativa desta enzima (MORO et al., 2004).

O terceiro mecanismo pelo qual as estatinas regulam a atividade da eNOS é através dos seus efeitos sobre a caveolina-1. A caveolina-1 é uma proteína da membrana celular que ao se ligar à molécula de eNOS inibe a produção do óxido nítrico. Estudos demonstram que as estatinas reduzem a abundância de caveolina-1 na membrana celular, aumentando a quantidade de eNOS com o consequente aumento de óxido nítrico (LIAO E ZHOU, 2010). Em modelos animais de isquemia cerebral focal (ou acidente vascular encefálico – AVE) tem-se observado que as estatinas melhoram o FSC, reduzem o tamanho de infarto cerebral e o déficit neurológico resultante (BARYAN, et al., 2012). Outros estudos indicam que as estatinas protegem contra a lesão isquêmica através da supra regulação da (eNOS) (AMIN-HANJANI, et al., 2001), melhorando o FSC (YAMADA, et al., 2000).

1.2.2 Estatinas e Inflamação

O papel da inflamação na lesão cerebral isquêmica é bem documentado em modelos animais de isquemia cerebral focal, bem como em humanos vítimas de AVE (FRIJINS E KAPELLE, 2002). A cascata pró-inflamatória, muitas vezes, inicia-se com um aumento da expressão de moléculas de adesão celular tais como ICAM-1 (Molécula de adesão intracelular 1) que participa na adesão dos neutrófilos às células endoteliais e na migração extra vascular dos neutrófilos, P-selectina e E-selectina, responsáveis pelo acúmulo de neutrófilos e plaquetas na parede do vaso. Micróglia ativada, astrócitos, macrófagos e leucócitos migram para a região isquêmica, onde, junto ao aumento da produção de espécies reativas de oxigênio, ativam fatores de transcrição, tais como, o NF-kB (Fator nuclear kB) e geram a superprodução de

mediadores inflamatórios, incluindo iNOS, ciclooxigenase-2, citocinas como as interleucinas (IL1, IL6, IL8), TNF α , e ainda quimiocinas (classe de citocinas pró-inflamatórias, capazes de atrair e ativar leucócitos) (CIMINO et. al. 2007).

Evidências experimentais indicam uma ação anti-inflamatória das estatinas frente à lesão isquêmica do cérebro. Por exemplo, tem sido demonstrado que a administração de estatina reduz os níveis de marcadores moleculares de inflamação, tais como NF-kB, ICAM-1, iNOS, interleucinas e citocinas (SIRONI et. al. 2006).

Em conjunto, a literatura referida acima sugere que as estatinas podem ter valor terapêutico no campo da doença cerebral isquêmica, circunstância esta investigada em modelo animais de isquemia cerebral focal ou AVC. Até onde sabemos, contudo, não há estudos propondo averiguar se as estatinas poderiam ser úteis em outras condições de hipóxia/isquemia cerebral. Considerando estudos anteriores do nosso laboratório sobre o desenvolvimento do modelo *4-VO/ICA* (*four-vessel occlusion/internal carotid artery model*) (NETO et al., 2005; BARROS et al., 2009; ROMANINI et al., 2010; FERREIRA et al., 2011; PEREIRA et al., 2012), perguntamos se o tratamento com estatinas poderia reduzir os prejuízos de aprendizagem e memória após HCC.

A importância da HCC vem à tona quando consideramos que a população global de pessoas idosas aumenta consideravelmente. Em pessoas idosas, um estado de hipoperfusão cerebral crônica e progressiva é o denominador comum de uma série de fatores de risco tais como hipertensão arterial crônica, doenças cardíacas crônicas, aterosclerose da artéria carótida interna, diabetes, hipercolesterolemia, sedentarismo, dentre outros. Como já mencionado anteriormente, HCC desempenha papel importante na fisiopatologia e, talvez, na etiogenia dos estados de demência senil, inclusive a Doença de Alzheimer (DE LA TORRE, 2009, GORELICK et al., 201). Em pessoas idosas, déficits cognitivos de deficiência cerebrovascular são ocorrências comumente associadas. (OSAWA et al., 2004; RUITENBERG et al., 2005; LUCKHAUS et al., 2008).

2 OBJETIVO

No presente estudo propusemos avaliar se a atorvastatina pode atenuar a amnésia retrógrada persistente causada por 4-VO/ICA em ratos de meia idade. Uma sequência de experimentos foi realizada para responder as seguintes questões:

- (i) O tratamento a longo prazo com atorvastatina impede a amnésia retrógrada causada por HCC?
- (ii) O efeito da atividade antiamnésica da atorvastatina é evidente depois de redução da duração do tratamento?
- (iii) A atorvastatina é capaz de reduzir a neurodegeneração cortical e hipocampal causada pela HCC nos dois regimes de tratamento?
- (iv) Qual o efeito da atorvastatina sobre a taxa de mortalidade de ratos de meia idade após 4-VO/ICA?

3 METODOLOGIA

3.1 Animais

Foram utilizados ratos machos (Wistar) com idade média entre 12 a 15 meses e pesando entre 450 a 550g, Os animais permaneceram em condições padrões de alojamento, com ciclo de luz claro/escuro (12 h), temperatura controlada ($22 \pm 1^{\circ}\text{C}$) e suprimento de água e ração à vontade. Os procedimentos experimentais utilizados no presente estudo respeitam os princípios éticos do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Estadual de Maringá, Paraná, Brasil (autorização número 038/2013).

3.2 Protocolo experimental

A Figura 2 ilustra o decurso temporal dos procedimentos experimentais praticados ao longo desse estudo.

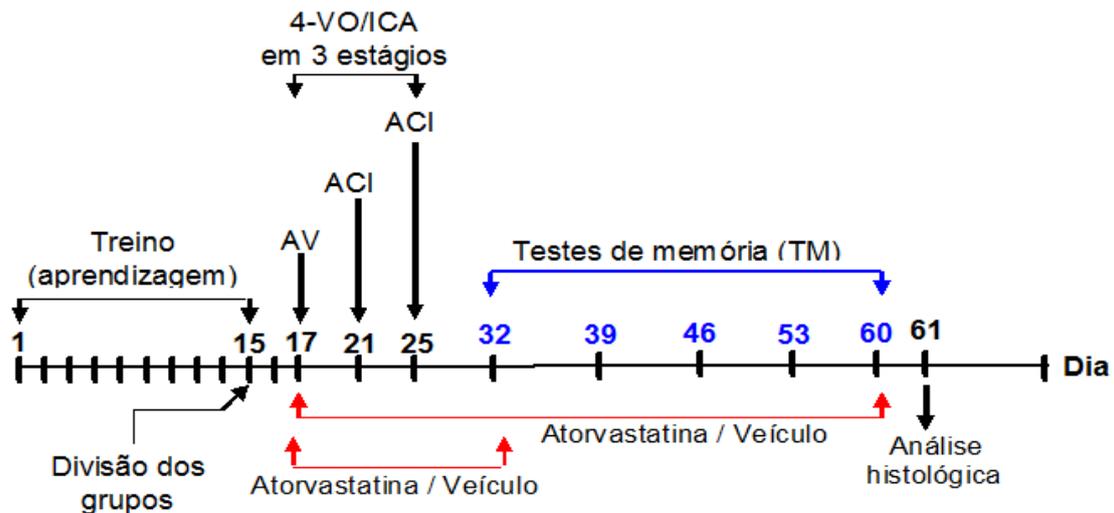


Figura 2. Representação esquemática do protocolo experimental que delinea as fases de: a) treino pré-operatório para aprendizagem da tarefa no teste do labirinto radial, b) oclusão das artérias vertebrais (AV) e das artérias carótidas internas (ACI) (*4-VO/ICA, four-vessel occlusion/internal carotid artery*), com intervalo de 4 dias entre as oclusões, c) os períodos de administração do medicamento atorvastatina ou veículo (tratamento 1 e tratamento 2), d) os testes de memória (TM) pós-operatórios, e e) análise histológica dos cérebros.

3.3 Treinamento para aprendizagem da tarefa no labirinto radial aversivo (LRA) antes da cirurgia.

3.3.1 Aparato de teste

A figura 3 ilustra o LRA e descreve suas características e princípio de funcionamento.

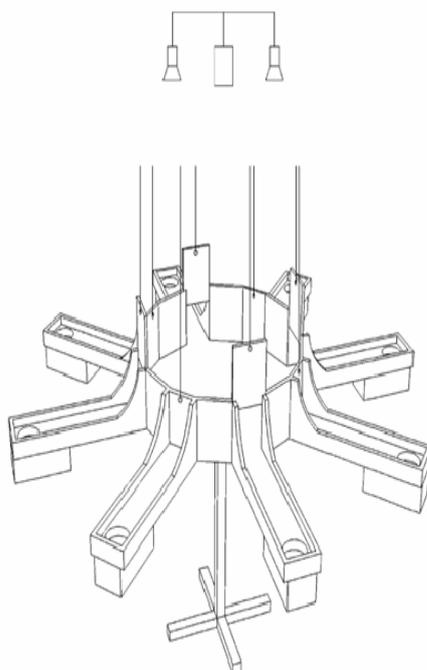


Figura 3. Representação esquemática do LRA. Oito braços radiais se projetam da área central, os quais são separados entre si por uma parede de acrílico transparente. A partir da zona central, o animal tem acesso aos braços através de portas-guilhotina, operado pelo experimentador através de um sistema de roldana. Na extremidade distal de cada braço encontra-se uma caixa, sendo que somente uma delas contém um fundo (esconderijo). Nas outras sete, o fundo é falso. Fora isto, todas as caixas são iguais. Um orifício na extremidade dos braços permite o acesso do animal ao interior do esconderijo. A tarefa consiste em o animal aprender a localização espacial do esconderijo, a qual é fixa em relação às pistas extra-labirinto. Duas lâmpadas fluorescentes encontram-se cerca de 1 metro acima da superfície do LRA, cuja luminosidade torna-se aversiva para o rato. Para fugir deste ambiente, o animal procura por algum lugar 'seguro'. A capacidade de aprendizagem e memória é medida pelo tempo que o animal gasta para encontrar o esconderijo, e pelo número de erros que ele comete ao longo do treinamento.

Ratos intactos foram submetidos ao teste do labirinto radial aversivo para treinamento da tarefa (fase de aquisição ou aprendizagem da cirurgia para 4-VO/ACI), por um período de 15 dias (ou até atingir o nível máximo de performance). A execução diária do treino seguiu conforme a rotina do nosso laboratório (PAGANELI et al 2004, FERNANDES et al 2000, BACARIN et al 2013). O desempenho de aprendizagem e memória no LRA foi medido por três parâmetros: (i) latência para encontrar o esconderijo, (ii) número de erros de memória de referência e, (iii) número de erros de memória operacional (ou memória de trabalho). Computa-se um erro de referência quando o animal entra, pela primeira vez, em um braço falso. Portanto, em cada tentativa, ele poderá cometer, no máximo, sete erros de referência (sete braços com esconderijo falso).

Acredita-se que seja através da memória de referência que o animal se lembra de “COMO” realizar a tarefa (por exemplo, que ele deve caminhar até a extremidade dos braços para, talvez, encontrar o esconderijo). A memória de referência é de longo prazo, e se consolida ao longo das várias sessões (dias) e tentativas (3/sessão) de teste. Em contraste, um erro de memória operacional é registrado quando, dentro de uma mesma tentativa, o animal retorna a um braço falso já visitado, ou seja, ele repete o erro.

A memória operacional é um fenômeno contexto-dependente, relevante para um dado momento; portanto, é de curto prazo, perdendo a relevância depois que o objetivo é alcançado. É através da memória operacional que o animal se lembra de “O QUE” fazer (por exemplo, que um determinado braço já foi visitado e o esconderijo não se encontra nele, devendo, portanto procurar em outro lugar). Em outras palavras, a memória operacional implica na utilização correta da informação que seja relevante para um momento e/ou propósito específico (DUDCHENKO, 2004).

Os animais foram testados quanto a sua capacidade de aprendizagem (aquisição) e memória (retenção) de tarefas espaciais medida no labirinto radial aversivo (LRA).

3.4 Divisão dos grupos

No dia seguinte ao período de treino, os animais foram divididos em grupos conforme o tratamento farmacológico: Grupo 1, animais falso operados (*sham*), Grupo 2 (4-VO/ACI + veículo) e Grupo 3 (4-VO/ACI + Atorvastatina). O regime de tratamento com veículo ou Atorvastatina 10mg/kg, em relação à hipoperfusão e aos testes comportamentais, são mostrados na Figura 2. Um comprimido de 20 mg de Atorvastatina (Citalor®, Pfizer do Brasil Indústria e Comércio Ltda.) foi prontamente diluído em 2ml de água destilada, obtendo a concentração final de 10mg/ml e administrada por via oral (gavagem) na dose de 10 mg/kg, sendo a primeira dose dada 4 a 5 hs após o primeiro estágio de oclusão (AV, ver Figura 2). As administrações subsequentes foram dadas 1x/dia, entre às 12 hs e 14 hs e continuado por 43 dias no tratamento de longo prazo (tratamento 1) e por 15 dias no tratamento de curto prazo (tratamento 2).

3.5 Indução da Hipoperfusão Cerebral Crônica (HCC)

O modelo 4-VO/ICA foi realizado de acordo com o proposto por Neto *et al.* (2005). Os animais foram anestesiados por administração de ketamina (60mg/kg, Agner União) + xilazina (10mg/kg, Bayer) via intra muscular. Mediante incisão longitudinal na região dorsal do pescoço, as artérias vertebrais (AVs) foram ocluídas através de eletrocoagulação ao nível da primeira vértebra cervical. Para tanto, um eletrodo unipolar foi inserido através do forâmen alar, e gentilmente manipulado até provocar sangramento vigoroso, assegurando o rompimento da AV. A hemorragia foi prontamente estancada por meio de eletrocoagulação. Na próxima etapa, uma incisão na região ventral do pescoço deu acesso às ACIs, que foram ocluídas mediante fio de sutura. O intervalo de tempo entre as oclusões (IEO) das AVs e das ACIs foi de 4 dias, seguindo a sequência AV → ACIs → ACIs. Entre um estágio e outro de oclusão, o peso dos animais foi monitorado.

Animais *sham* sofreram o mesmo procedimento cirúrgico, entretanto não houve a oclusão das artérias (AVs e ACIs).

3.6 Tratamento

Seguindo o delineamento mostrado na figura 2, os seguintes grupos de animais foram testados em função do tratamento recebido:

Experimento 1:

Grupo 1: *sham* (n = 11)

Grupo 2: 4-VO/ACI + veículo (n = 11)

Grupo 3: 4-VO/ACI + Atorvastatina por 43 dias (10 mg/kg, n = 11)

Experimento 2:

Grupo 1: *sham* (n=13)

Grupo 2: 4-VO/ACI + veículo (n = 08)

Grupo 3: 4-VO/ACI + Atorvastatina por 15 dias (10 mg/kg, n = 09)

3.7 Testes de memória após 4-VO/ACI

Passados 7 dias de 4-VO/ACI para indução de hipoperfusão cerebral crônica (HCC), os animais foram submetidos novamente ao teste do LRA, agora, para medição da capacidade de retenção (memória) da tarefa que haviam aprendido durante o treino (antes da cirurgia). Trata-se de avaliar se o tratamento com a Atorvastatina reduz o déficit de memória (amnésia retrógrada) provocado pela HCC. Os testes de memória (TM) foram realizados 1 vez/semana, durante 5 semanas.

3.8 Análise Histológica

No dia seguinte ao término do último teste de retenção de memória os animais foram anestesiados profundamente com 50 mg/kg de tiopental (Thiopentax®, Cristália, Itapira – SP) e submetidos à perfusão transcardíaca com solução salina 0,9 %, seguida pela solução fixadora de Bouin (ácido pícrico 750 mL; paraformaldeído 100 mL; ácido acético 50 mL; e água q.s.p. 1000 mL) (velocidade/tempo de perfusão: 22 mL/min, durante 3 e 5 min, respectivamente). Após a perfusão, os animais foram decapitados e as cabeças imersas em gelo picado (1-2 °C) por 2 horas, para evitar o aparecimento de células negras. Os encéfalos foram cuidadosamente removidos dos crânios e o cerebelo foi retirado e descartado, conservando-se,

assim, o restante na mesma solução fixadora de Bouin por 24 horas, à temperatura ambiente. Após a fixação, o cérebro foi submetido à desidratação em uma série gradual de etanol, diafanizados em xilol e emblocados em parafina (56 °C). Posteriormente, procedeu-se secção semi-seriada onde, seis secções coronais, com espessura de 7 µm e separadas 70 µm entre si, (micrótomo LEICA mod. RM2445) foram retiradas de cada encéfalo ao nível médio do hipocampo (3,6 mm a 4,16 mm em relação ao bregma, (PAXINOS e WATSON,1998). As secções foram coradas pelo método do cresil violeta (Nissl).

Três secções foram escolhidas para contagem bilateral dos neurônios aparentemente normais, no estrato piramidal dos subcampos CA1, CA2, CA3 e CA4 do hipocampo e em 4 campos do córtex, compreendendo os córtex retrosplenial (RS) e o córtex de associação parietal (PtA) (figura 4). As células piramidais gigantes exibindo núcleo e nucléolo distintos, bem como, citoplasma basofílico, foram consideradas como neurônios viáveis. Os neurônios que tinham corpos celulares encolhidos e/ou com espaços vazios circundantes foram considerados destinados a morrer e então excluídos. Para cada animal, o número de neurônios aparentemente normais contados no hipocampo e córtex cerebral foi dado pela média dos valores obtidos nos três cortes coronais.

A média de cada animal foi transformada em porcentagem, sendo que a média do grupo *sham* foi considerada 100%. Cada valor individual foi então normalizado para a média do *sham*. Assim o grau de perda neuronal induzida por HCC foi obtida a partir da redução do número de células piramidais de aparência normal em comparação com os grupos falso-operados.

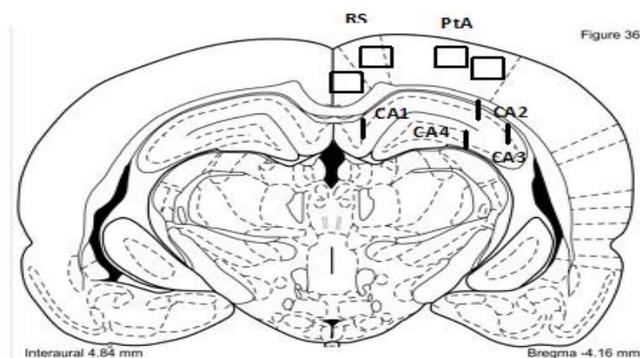


Figura 4 – Coordenadas encefálicas da quantificação neuronal de células viáveis no hipocampo e córtex.

3.9 Análise Estatística

A memória retrógrada, analisada através dos cinco testes pós-operatórios, não obedeceu uma distribuição normal (teste de D'Agostino e Pearson ou Shapiro-Wilk), e não houve homocedasticidade (teste de Levene) entre os grupos. Neste caso, foi utilizada a análise de variância de Kruskal-Wallis para quantificar diferenças entre os grupos. Em seguida, o pós-teste de Dunn foi aplicado para verificar onde o déficit de memória ocorreu. O teste Z de proporção, foi utilizado para quantificar os dados de mortalidade. Para as análises estatísticas, a significância foi definida como $p \leq 0,05$.

Os dados foram expressos como médias \pm erro padrão das médias (EPM). Para os dados histológicos quantificados no hipocampo (CA1, CA2, CA3 e CA4) e córtex (RS e Pta) considerando que os dados seguiram distribuição normal, foi empregada ANOVA paramétrica de uma via (*one-way*) seguida pelo teste *post-hoc* de Bonferroni.

4 RESULTADOS

4.1 Taxa de mortalidade.

A Tabela 1 resume a taxa de mortalidade sob duas diferentes circunstâncias: (i) quando a morte ocorreu antes da recuperação da anestesia, e (ii) quando a morte ocorreu após a recuperação da anestesia, indicando, talvez, o efeito fatal de uma HCC severa.

O efeito da anestesia é destacado pela taxa de mortalidade de 22,5% após cirurgia nos animais *sham*, 17,1% no grupo atorvastatina, e apenas 3,4% no grupo veículo. Em comparação entre os grupos, 29,6% dos animais tratados com veículo e 31% dos animais tratados com Atorvastatina morreram após a recuperação da anestesia, provavelmente refletindo o efeito da oclusão dos vasos. A mortalidade após a recuperação da anestesia foi maior nos animais tratados com Atorvastatina ou veículo em comparação ao grupo *sham* ($p < 0,001$), porém, não houve diferença significativa na mortalidade entre animais tratados com veículo e Atorvastatina submetidos à HCC ($p > 0,05$). A maior taxa de mortalidade observada após a recuperação da anestesia nos animais

que foram submetidos à HCC reflete o impacto da 4-VO/ACI sobre a sobrevivência de ratos de meia-idade.

Tabela 1

Número de ratos (n) que foram submetidos ao procedimento cirúrgico, mortalidade e o número de animais que terminaram os experimentos. A mortalidade foi avaliada em dois momentos: (i) os animais que morreram, durante qualquer etapa de oclusão, antes da recuperação da anestesia, e (ii) os animais que morreram após a recuperação da anestesia.

Tratamento	“n” inicial de animais	Morte durante a anestesia	Morte após a anestesia	“n” final de animais
Veículo	28	1/28 (3,5%)	8/27 (29,6%) **	19
Atorvastatina	35	6/35 (17,1%)	9/29 (31,0%) **	20
<i>Sham</i>	31	7/31 (22,5%)	0/24 (0%)	24
Total	94	14/94 (14,8%)	17/80 (21,2%)	63

** $p > 0,05$

4.2 Desempenho de aprendizagem e memória.

A figura 5 mostra o efeito do tratamento com Atorvastatina ou veículo nos animais submetidos à HCC em comparação com os animais (*sham*). Os quadros à esquerda mostram a distribuição temporal do desempenho de memória, expressa como a latência, o número de erros de memória de referência e número de erros de memória de trabalho, avaliadas em cada dia de (TM) após 4-VO/ACI. Os parâmetros de latência total e a somatória do número total de erros (de todos os TM) são mostrados nos quadros à direita. O desempenho de memória durante a fase de testes (TM) indica a capacidade dos ratos lembrarem (ou não) a tarefa aprendida durante a fase de treinamento (T).

Quando o desempenho de memória foi expresso em cada dia de teste (quadros à esquerda; dias 15, 22, 29, 36 e 42), para ambos os regimes de tratamento (43 ou 15 dias), a análise não-paramétrica de Kruskal-Wallis revelou um efeito de tratamento (ou grupo) durante a maioria dos testes, para todos os três parâmetros, ou sejam, ‘latência’ (KW= 13.12 – 5.19, $p = 0.001 - 0,05$), ‘número de erros de memória de referência’ (K=15.98 – 5.90 $p = 0,0003 - 0,05$), e ‘número de erros de memória operacional’ (KW= 19.98- 6.18, $p = 0,0001 - 0,045$). Resultado semelhante foi observada quando o desempenho de memória foi medido cumulativamente (quadros à direita; soma dos 5 dias de

testes), ou sejam, 'latência total' (KW = 14.57 – 16.67, $p < 0.001$), 'número total de erros de referência' (KW = 13.92 – 14.72, $p < 0.001$), e 'número total de erros operacionais' (KW = 13.03 – 14.05, $p < 0.001 - 0.01$).

Para ambos os regimes de tratamento (43 ou 15 dias), a análise *post hoc* de Dunn mostra que os grupos com HCC tratados com veículo apresentaram maior latência e cometeram mais erros de memória de referência e erros de memória operacional, em comparação aos grupos *sham* ($p < 0,001 - 0.05$). Essa perda de memória provocada pela HCC também fica evidente quando os resultados são apresentados como 'latência total' e 'número total de erros' (quadros à direita, $p < 0.001 - 0.01$, veículo vs. *sham*). Esses resultados indicam que os animais com HCC se esqueceram da tarefa aprendida durante o treino, um efeito que se manteve durante todos os dias de testes, indicando um estado de amnésia retrógrada persistente. Esta amnésia provocada pela HCC foi significativamente reduzida pelo tratamento com atorvastatina, seja quando medido em cada dia de teste (quadros à esquerda, $p < 0.01 - 0.05$, atorvastatina vs. veículo), ou quando expresso cumulativamente (quadros à direita, $p < 0.01$). Esse efeito da atorvastatina não atingiu significância estatística, entretanto, para o parâmetro 'número total de erros operacionais' após 15 dias de tratamento.

Este efeito da HCC, bem como o efeito antiamnésico da Atorvastatina pode ser confirmado de maneira mais contundente nos quadros à direita da figura 5, onde os dados cumulativos podem ser analisados. Esta análise revelou que os três parâmetros aumentaram significativamente na fase de TM nos grupos de ratos submetidos à 4-VO/ACI e tratados com veículo (tratamento de longo prazo: KW= 15.93 – 12.92, $p= 0,0003 - 0,001$; tratamento de curto prazo: KW= 14.57 – 14.03, $p= 0,0007 - 0,0009$). A análise *post hoc* de Dunn revelou prejuízo na retenção de memória no grupo tratado com veículo ($p < 0,001 - 0,05$ veículo vs *sham*) e a Atorvastatina anulou o efeito amnésico da HCC, os animais apresentaram o desempenho comportamental semelhante ao grupo *sham* ($p < 0,001 - 0,05$ Atorvastatina vs veículo) em ambos os regimes de tratamento. Isto indica que a atividade antiamnésica foi mantida ao longo da experiência, até mesmo após a descontinuação do tratamento (grupo de tratamento de 15 dias).

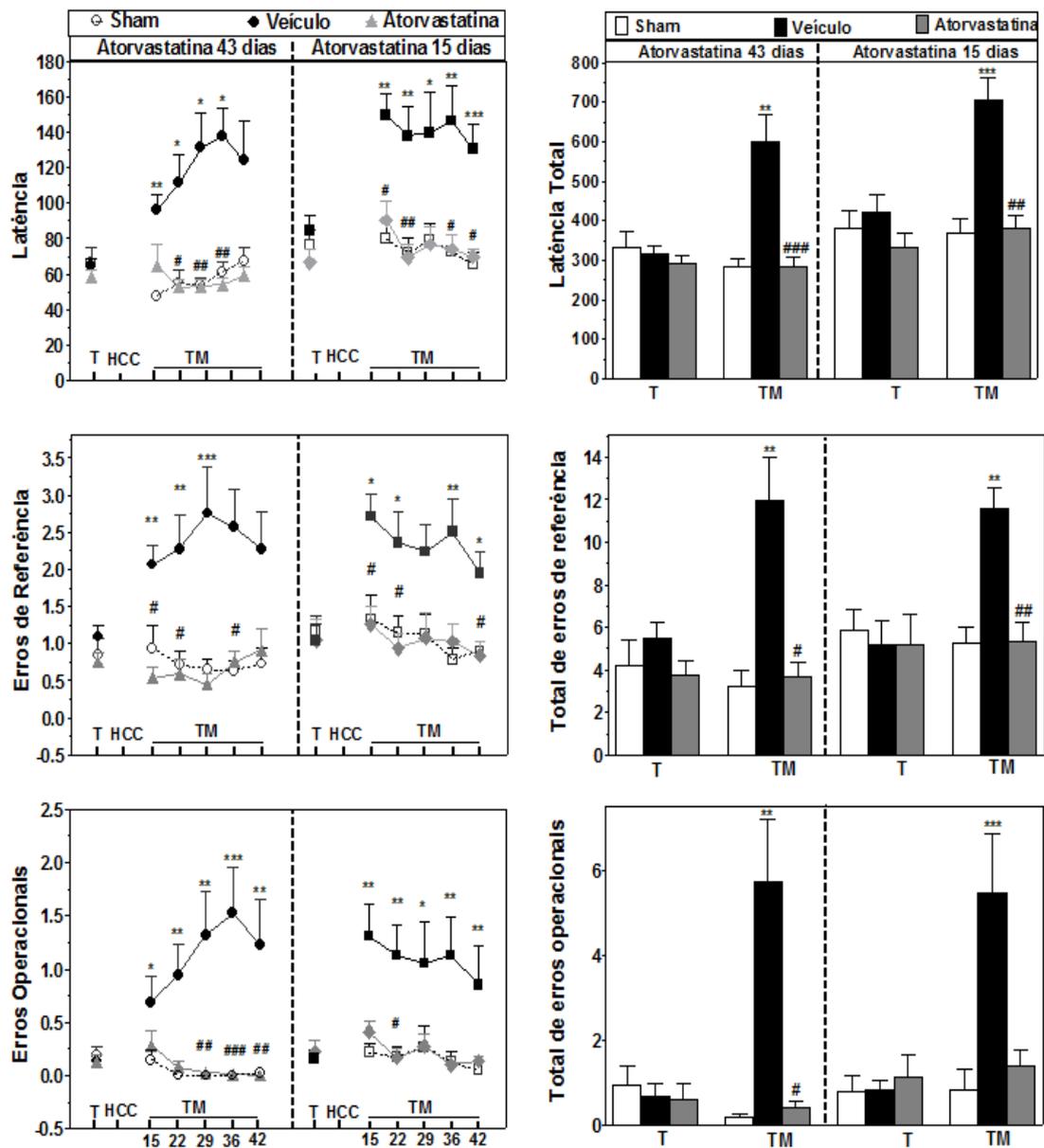


Figura 5 - Amnésia retrógrada induzida após 4-VO/ACI e o efeito da Atorvastatina mostradas de acordo com o regime de tratamento. Ratos ingênuos aprenderam a tarefa no LRA por 15 dias de treinamento (T), após os animais foram submetidos à operação simulada ou 4-VO/ICA. Testes de memória (TM) foram realizados uma vez por semana durante 5 semanas após HCC. Os quadros à esquerda mostram a distribuição temporal do desempenho de memória ao longo dos vários dias de testes dos grupos tratados com manipulados por 43 ou 15 dias. A "latência total", o "número total de erros de referência" e o "número total de erros operacionais" de ambos os regimes de tratamento estão apresentados nos quadros à direita. O tratamento com veículo ou atorvastatina foram iniciados entre 4 e 5 horas após o primeiro estágio de oclusão (AV). A amnésia retrógrada induzida por HCC foi claramente evidente no grupo tratado com veículo, efeito este reduzido pelo pela Atorvastatina em ambos regimes de tratamento. ***, **, * $p < 0,001-0,05$ veículo vs sham; ###, ##, # $p < 0,001-0,05$ veículo vs atorvastatina. Os valores são expressos como média do grupo \pm EPM. Tratamento longo: sham n= 11; veículo n= 11; atorvastatina n= 11. Tratamento curto: sham n= 13; veículo n= 08; atorvastatina n= 9.

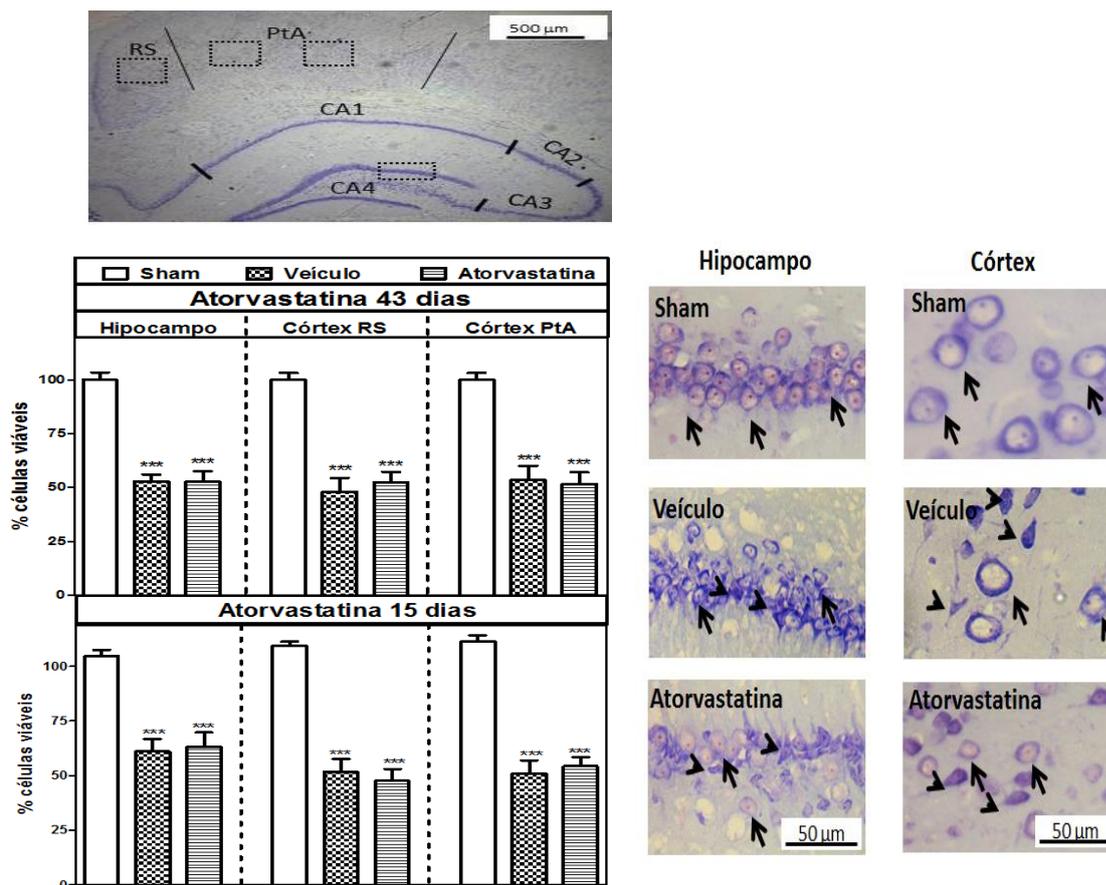


Figura 6 – (Painel superior, aumento de 50x) mostra uma secção coronal do cérebro de um animal *sham* para ilustrar onde os neurônios piramidais viáveis foram contados nos segmentos CA1, CA2, CA3 e CA4 do hipocampo, e nas áreas RS e PtA do córtex cerebral (3.60 – 4.30 mm em relação ao bregma). (Painel inferior, esquerda) Número (%) de células piramidais aparentemente intactas no segmento CA1-CA4 do hipocampo, e nos córtices RS e PtA. (Painel inferior, direita) Microfotografias (aumento 400x) representativas da região CA1 do hipocampo e do córtex (RS/PtA) para os grupos experimentais *sham*, veículo e Atorvastatina. Os neurônios piramidais viáveis, possivelmente intactos, apresentam-se em forma arredondada bem definida, com núcleo e nucléolo facilmente visíveis (flechas). Em contraste, os neurônios em vias de degeneração provocada pela HCC mostram-se encolhidos, hiper cromáticos (acidófilos) e/ou escuros (ponta de flecha). Os valores são expressos como média \pm EPM. *** $p < 0,0001$ vs. *sham*. Os cérebros de dois animais (veículo = 1, sham = 1) foram excluídos da análise histológica por problemas metodológicos. Tamanho da amostra: Tratamento longo: *sham* n= 11; veículo n= 10; atorvastatina n= 11. Tratamento curto: *sham* n= 12; veículo n= 08; atorvastatina n= 9.

4.3 Análise histológica

A figura 6 apresenta os resultados quantitativos da histologia cerebral e foto microfotografias dos neurônios corados pela técnica de Nissl (cresil violeta) ao longo do segmento CA1-CA4 do estrato piramidal do hipocampo, bem como no córtex restroesplênico (RS) e córtex parietal de associação (PtA). A extensão da neurodegeneração induzida por HCC foi deduzida com base no número de neurônios piramidais de aparência normal, em comparação ao grupo *sham*. No

grupo veículo a HCC causou uma diminuição significativa de neurônios piramidais, tanto no hipocampo (Tratamento de longo prazo: $F_{2,29}= 48.64$, $p < 0,0001$; Tratamento de curto prazo: $F_{2,26}= 28.04$, $p < 0,0001$, vs. *sham*), quanto no córtex cerebral RS (Tratamento de longo prazo: $F_{2,29}= 35.14$, $p < 0,0001$; Tratamento de curto prazo: $F_{2,26}= 75.52$, $p < 0,0001$, vs. *sham*) e no córtex PtA (Tratamento de longo prazo: $F_{2,29}= 27.49$, $p < 0,0001$; Tratamento de curto prazo: $F_{2,26}= 22,42$, $p < 0,0001$, vs. *sham*).

O teste post hoc de Bonferroni demonstrou que a Atorvastatina não reduziu a morte neuronal no hipocampo ou córtex cerebral em ambos os regimes de tratamento, não sendo estatisticamente diferente do grupo tratado com veículo ($p > 0,05$ vs veículo) e sim do grupo *sham* ($p < 0,0001$ vs *sham*), demonstrando que a Atorvastatina não apresentou efeito neuroprotetor nestas condições experimentais.

5 DISCUSSÃO

O presente estudo mostrou que a Atorvastatina (10mg/kg) pode amenizar os efeitos amnésicos causados pela HCC. De fato, em trabalhos anteriores, ratos de meia-idade submetidos à cirurgia 4-VO/ACI em 3 estágios sofreram déficits de memória retrógrada, efeito do qual eles não se recuperaram espontaneamente até o final do teste comportamental (FERREIRA et. al, 2011; FERREIRA et al. 2013). Este efeito da 4-VO/ACI em ratos pode ser comparado à amnésia normalmente observada em humanos que sofrem, por exemplo, de demências de origem vascular. Por isso, o uso de ratos de meia-idade faz com que as condições experimentais tornem-se mais clinicamente relevantes para reproduzir o comprometimento cognitivo associada à HCC (HUANG et al 2007; LUCKHAUS et al 2008).

O uso de Atorvastatina, na dose de 10mg/kg, impediu a amnésia retrograda persistente após 4-VO/ACI, independentemente da duração do tratamento (43 ou 15 dias), efeito este expresso pela diminuição da latência e redução do número de erros registrados no teste do labirinto radial aversivo (LRA). Em que pese a variabilidade individual dos resultados comportamentais, a capacidade de memória retrógrada dos grupos tratados com atorvastatina foi recuperada (ou preservada) ao nível dos animais *sham*, independente da

duração do tratamento. Isto indica que a ação durante as primeiras horas ou dias após a HCC pode ser a base do efeito antiamnésico sustentado da Atorvastatina (figura 5). Esse resultado está de acordo com os dados obtidos por outros investigadores que relatam a administração de estatinas em modelos animais. Foi demonstrado, por exemplo, em um modelo de isquemia focal, que a administração de sinvastatina, pré e pós-isquemia, aumenta o fluxo sanguíneo cerebral, reduz o volume da lesão e diminui a progressão de danos nos tecidos (SIRONI et al., 2003). Laufs et al., (2002), relataram que duas semanas de pré-tratamento com sinvastatina, lovastatina, atorvastatina ou mevastatina, em camundongos, reduz o tamanho do infarto e déficits neurológicos causados pela isquemia.

Ainda, a sinvastatina e a atorvastatina atenuaram o déficit de memória induzido pela administração de alprazolam, escopolamina ou dieta rica em gordura em ratos testados no labirinto em cruz elevado (PARLE E SINGH, 2007). Outro estudo também relatou que o tratamento com a sinvastatina ou atorvastatina por 14 dias, e iniciado um dia após traumatismo crânio-encefálico (TCE), melhora a aprendizagem espacial avaliada no labirinto aquático de Morris 35 dias após a lesão, além de reduzir a perda neuronal, indicando que o tratamento com estatina pode amenizar as sequelas funcionais e estruturais após TCE (LU et al., 2007).

No presente estudo, a administração de Atorvastatina (10mg/kg) durante o tratamento de curto prazo (15 dias após 4-VO/ACI) foi tão eficaz quanto o tratamento de longo prazo (43 dias após 4-VO/ACI) e esse efeito persistiu por pelo menos 28 dias após a interrupção do tratamento, mas, não foi capaz de impedir a neurodegeneração de células piramidais do hipocampo e do córtex cerebral, em ambos regimes de tratamento (figura 6), mesmo sendo notável sua atividade antiamnésica sustentada mesmo após sua descontinuação.

Os dados obtidos neste estudo reforçam outros de nosso laboratório, nos quais, após a lesão isquêmica ocorreu a preservação da função cognitiva, porém, sem neuroproteção, levando a crer que a recuperação funcional não depende necessariamente da proteção neuronal (GODINHO et al., 2015, FERRERIRA et al. 2011, BACARIN et al., 2013).

No entanto, a presença de lesão neuronal persistente, contrasta com outros relatos da literatura. Por exemplo, o pré-tratamento com Atorvastatina

(10mg/kg, via oral) reduziu efetivamente as convulsões induzidas por ácido caínico em ratos e inibiu a perda neuronal nas regiões CA1 e CA3 do hipocampo (LEE et al., 2008). Em um estudo similar, o pré-tratamento com Atorvastatina (10 mg/kg) reduziu convulsões induzidas por ácido quinolínico em camundongos, impediu a morte celular e promoveu a redução da captação de glutamato no hipocampo (TETSADË et al., 2009).

Uma variável que pode explicar a falta de neuroproteção da Atorvastatina no presente estudo refere-se ao tempo de sobrevivência após a HCC. Todos os estudos citados acima demonstraram que a análise histológica foi realizada 7 dias após a indução das convulsões. E os autores não avaliaram se tal efeito antiapoptótico da Atorvastatina poderia ser sustentado por semanas ou meses. Em nosso estudo, os ratos sobreviveram por até 43 dias após a isquemia. A sustentação do efeito neuroprotetor por semanas ou meses é um aspecto importante a ser considerado no contexto da neuroproteção experimental, pois, uma droga pode postergar o curso da neurodegeneração, porém, não evita-la (CORBETT E NURSE, 1998).

Outra resposta para a falta de neuroproteção, talvez, esteja na capacidade que o SNC tem de recuperar e exercer suas funções mesmo com intensa perda neuronal. A restauração da função perdida após lesão isquêmica é atribuída, em certo grau, à capacidade inerente de compensação do SNC para reorganizar os mapas sinápticos formando novos axônios, dendritos e sinapses (KAAS, 1991; NUDO et al., 1996; MITTMANN E EYSEL, 2001; ZEPEDA et al., 2004).

Não podemos descartar, também, a possibilidade da Atorvastatina promover neuroproteção em outras estruturas cerebrais. Por exemplo, a HCC induzida pelo modelo 2-VO leva a uma lesão na substância branca cerebral que parece ser mais severa e consistente de que a neurodegeneração hipocampal (WAKITA et al., 2002). Também, é importante ter em mente que a avaliação da neuroproteção somente com base em procedimentos histológicos convencionais (por exemplo, coloração de Nissl) não é a mais adequada. Utilizar métodos adicionais, tais como, imunohistoquímica, poderia melhorar o valor da análise histológica. Além de que, para analisar a disfunção neuronal o mais importante são as avaliações funcionais, pois, o mais relevante clinicamente é o resultado funcional a longo prazo. Qualquer teste

comportamental deve ter sensibilidade para revelar deficiências em animais isquêmicos, não tratados, meses após o insulto inicial (CORBETT E NURSE, 1998).

Como mencionado anteriormente, o efeito antiamnésico consistente da Atorvastatina, pode ser devido a regulação de isoprenóides - classe de lipídios sintetizados através da via do mevalonato a partir do acetil-CoA - responsáveis, principalmente, pela síntese de esteróides, e também podem estar envolvidos na fisiopatologia de doenças neurodegenerativas (SANOSSIAN N., OVBIAGELE B., 2008).

A diminuição na produção desses isoprenóides, aumenta a expressão e atividade da óxido nítrico sintase endotelial (eNOS), sintetizado na parede vascular, que regula uma grande variedade de funções, incluindo a adesão leucócito-endotelial, agregação de plaquetas, trombogênese, e conseqüentemente aumentando o FSC, podendo ser o principal mecanismo de proteção contra lesões isquêmicas no cérebro (LAUFS et al., 2002; ENDRES, 2004).

A maneira que a Atorvastatina promoveu a recuperação da memória após a HCC não é clara. O presente estudo não abordou esta questão especificamente, mas outros resultados, bem estabelecidos na literatura, nos permite especular sobre alguns mecanismos possíveis. Um dos dados mais importantes refere-se ao efeito vascular desta droga. A terapia com estatinas tem sido demonstrada, em animais e em estudos clínicos, por ser associada com a restauração dos efeitos normo-vasodiladores, que é parcialmente devido ao aumento da formação de óxido nítrico por meio de eNOS (EGGERMONT et al., 2006).

A ação do NO induz uma resposta vasodilatadora potente, melhorando o FSC. Assim, a vasodilatação pode reduzir lesões funcionais (EGGERMONT et al., 2006; RIDKER et al., 1998), no entanto, o insulto isquêmico pode levar a superprodução de NO causando danos oxidativos. Estudos demonstram que as estatinas agem aumentando a produção de eNOS e reduzem a superprodução de nNOS e iNOS (ENDRES et al., 2004).

Outros autores demonstram que as estatinas também podem proteger o cérebro ao interferir com a cascata de coagulação em vários pontos. Em primeiro lugar, as estatinas aumentam a conversão do plasminogênio em

plasmina, que degrada a fibrina (ASAHI et al., 2005). Além disso, as estatinas inibem a ativação de várias outras proteases da cascata de coagulação, incluindo protrombina em si (PUCCETTI et al. 2005).

Um efeito bem documentado das estatinas, que pode estar associado ao efeito protetor da memória após a HCC, é a capacidade de restaurar a lesão isquêmica cerebral através da promoção de angiogênese, melhorando assim o suprimento de sangue colateral. Sabe-se que a proteína quinase Akt regula a célula endotelial e o desenvolvimento dos vasos sanguíneos (KUREISHI et al., 2000). A sinvastatina dose-dependente promove a fosforilação Akt em células cultivadas *in vitro*. Este efeito também ocorre com pravastatina, sugerindo um efeito da classe das estatinas. Outras experiências em cultura de células mostram que a sinvastatina reduz a morte de células endoteliais (RIDKER et al., 1998).

Além disso, têm sido observadas ações anti-inflamatórias das estatinas. O uso de atorvastatina foi associado com uma alteração significativa do perfil lipídico e do tamanho da aterosclerose induzida experimentalmente. Além disso, a infiltração de macrófagos e monócitos arteriais foi essencialmente eliminado pelo tratamento com estatinas (BUSTOS et al., 1998).

Em resumo, o efeito preventivo das estatinas pode ser atribuído, também, ao seu efeito sobre a vascularização cerebral. Visto que o presente estudo não investigou o mecanismo pelo qual a Atorvastatina reverte a amnésia retrógrada induzida após 4-VO/ACI, outros estudos são necessários para esclarecer esta matéria.

Ao demonstrar que o uso de estatina pode reverter o efeito amnésico da HCC após 4-VO/ACI, surgiu a questão se o uso deste medicamento poderia reduzir a taxa de mortalidade em ratos de meia-idade. Apesar de ser considerada como uma limitação, a mortalidade deve ser vista como um parâmetro útil para verificar a eficácia da droga testada. Por exemplo o tratamento com sildenafil (Viagra®), diariamente, desde o primeiro até o último dia de oclusão, diminuiu a taxa de mortalidade observada após 4-VO-ACI em ratos jovens (ROMANINI et al., 2010). No presente estudo, não houve diferença significativa na taxa de mortalidade entre os animais tratados com Atorvastatina e tratados com veículo ($p > 0,05$), sugerindo que a droga não interferiu sobre este parâmetro.

Em conclusão este estudo demonstrou que a Atorvastatina reverte a amnésia causada pela HCC em ratos de meia-idade, independentemente do tempo de tratamento, porém não reverte os danos neurohistológicos hipocampal e cortical após 4-VO/ACI. Dada a robustez e sustentabilidade do efeito antiamnésico, o presente estudo sugere que as estatinas podem representar uma estratégia terapêutica para o tratamento de sequelas cognitivas resultantes de insuficiência cerebral crônica. No entanto, mais estudos são necessários para determinar em que medida essa ação “pleiotrópica” das estatinas contribuem para seus possíveis efeitos antiamnésicos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMIN-HANJANI, S.; STAGLIANO, N. E.; YAMADA, M.; et al., Mevastatin, an HMG-CoA reductase inhibitor, reduces stroke damage and upregulates endothelial nitric oxide synthase in mice. **Stroke; a Journal of Cerebral Circulation**, v. 32, n. 4, p. 980–986, 2001.

ASAHI, M.; HUANG, Z.; THOMAS, S.; et al., Protective effects of statins involving both eNOS and tPA in focal cerebral ischemia. **Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism: Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism**, v. 25, n. 6, p. 722–729, 2005.

BARROS, C. A.; EKUNI, R.; MORO, M. A.; et al., The cognitive and histopathological effects of chronic 4-vessel occlusion in rats depend on the set of vessels occluded and the age of the animals. **Behavioural Brain Research**, v. 197, n. 2, p. 378–387, 2009.

BARYAN, H. K.; ALLAN, S. M.; VAIL, A.; SMITH, C. J. Systematic review and meta-analysis of the efficacy of statins in experimental stroke. **International Journal of Stroke: Official Journal of the International Stroke Society**, v. 7, n. 2, p. 150–156, 2012.

BRETELER, M. M. Vascular involvement in cognitive decline and dementia. Epidemiologic evidence from the Rotterdam Study and the Rotterdam Scan Study. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 903, p. 457–465, 2000.

BUSTOS, C.; HERNÁNDEZ-PRESA, M. A.; ORTEGO, M.; et al., HMG-CoA reductase inhibition by atorvastatin reduces neointimal inflammation in a rabbit model of atherosclerosis. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 32, n. 7, p. 2057–2064, 1998.

CIMINO, M.; GELOSA, P.; GIANELLA, A.; et al. Statins: multiple mechanisms of action in the ischemic brain. **The Neuroscientist: A Review Journal Bringing Neurobiology, Neurology and Psychiatry**, v. 13, n. 3, p. 208–213, 2007.

CORBETT, D.; NURSE, S. The problem of assessing effective neuroprotection in experimental cerebral ischemia. **Progress in Neurobiology**, v. 54, n. 5, p. 531–548, 1998.

CORREIA BACARIN, C.; MORI, M. A.; DIAS FIUZA FERREIRA, E.; et al. Fish oil provides robust and sustained memory recovery after cerebral ischemia: influence of treatment regimen. **Physiology & Behavior**, v. 119, p. 61–71, 2013.

DE LA TORRE, J. C. Alzheimer's disease is a vasocognopathy: a new term to describe its nature. **Neurological Research**, v. 26, n. 5, p. 517–524, 2004.

DE LA TORRE, J. C. Carotid artery ultrasound and echocardiography testing to lower the prevalence of Alzheimer's disease. **Journal of Stroke and**

Cerebrovascular Diseases: The Official Journal of National Stroke Association, v. 18, n. 4, p. 319–328, 2009.

DE LA TORRE, J. C. Impaired brain microcirculation may trigger Alzheimer's disease. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 18, n. 3, p. 397–401, 1994.

DE LA TORRE, J. C. Is Alzheimer's disease a neurodegenerative or a vascular disorder? Data, dogma, and dialectics. **The Lancet. Neurology**, v. 3, n. 3, p. 184–190, 2004.

DE LA TORRE, J. C.; FORTIN, T.; PARK, G. A.; et al. Chronic cerebrovascular insufficiency induces dementia-like deficits in aged rats. **Brain Research**, v. 582, n. 2, p. 186–195, 1992.

DE LA TORRE, J. C.; STEFANO, G. B. Evidence that Alzheimer's disease is a microvascular disorder: the role of constitutive nitric oxide. **Brain Research. Brain Research Reviews**, v. 34, n. 3, p. 119–136, 2000.

DUDCHENKO, P. A. An overview of the tasks used to test working memory in rodents. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 28, n. 7, p. 699–709, 2004.

EGGERMONT, L.; SWAAB, D.; LUITEN, P.; SCHERDER, E. Exercise, cognition and Alzheimer's disease: more is not necessarily better. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 30, n. 4, p. 562–575, 2006.

ENDRES, M.; LAUFS, U.; LIAO, J. K.; MOSKOWITZ, M. A. Targeting eNOS for stroke protection. **Trends in Neurosciences**, v. 27, n. 5, p. 283–289, 2004.

FARKAS, E.; LUITEN, P. G. Cerebral microvascular pathology in aging and Alzheimer's disease. **Progress in Neurobiology**, v. 64, n. 6, p. 575–611, 2001.

FERNANDES, J. S.; MORI, M. A.; EKUNI, R.; OLIVEIRA, R. M. W.; MILANI, H. Long-term treatment with fish oil prevents memory impairments but not hippocampal damage in rats subjected to transient, global cerebral ischemia. **Nutrition Research (New York, N.Y.)**, v. 28, n. 11, p. 798–808, 2008.

FERREIRA, E. D. F.; ROMANINI, C. V.; MORI, M. A.; DE OLIVEIRA, R. M. W.; MILANI, H. Middle-aged, but not young, rats develop cognitive impairment and cortical neurodegeneration following the four-vessel occlusion/internal carotid artery model of chronic cerebral hypoperfusion. **The European Journal of Neuroscience**, v. 34, n. 7, p. 1131–1140, 2011.

FERREIRA, E. F. D.; VALÉRIO ROMANINI, C.; CYPRIANO, P. E.; WEFFORT DE OLIVEIRA, R. M.; MILANI, H. Sildenafil provides sustained neuroprotection in the absence of learning recovery following the 4-vessel occlusion/internal carotid artery model of chronic cerebral hypoperfusion in middle-aged rats. **Brain Research Bulletin**, v. 90, p. 58–65, 2013.

FRIJNS, C. J. M.; KAPPELLE, L. J. Inflammatory cell adhesion molecules in ischemic cerebrovascular disease. **Stroke; a Journal of Cerebral Circulation**, v. 33, n. 8, p. 2115–2122, 2002.

GODINHO, J.; DE OLIVEIRA, J. N.; FERREIRA, E. D. F.; et al. Cilostazol but not sildenafil prevents memory impairment after chronic cerebral hypoperfusion in middle-aged rats. **Behavioural Brain Research**, v. 283, p. 61–68, 2015.

GORELICK, P. B.; SCUTERI, A.; BLACK, S. E.; et al. Vascular contributions to cognitive impairment and dementia: a statement for healthcare professionals from the American Heart Association/American Stroke Association. **Stroke; a Journal of Cerebral Circulation**, v. 42, n. 9, p. 2672–2713, 2011.

HUANG, C.; EIDELBERG, D.; HABECK, C.; et al. Imaging markers of mild cognitive impairment: multivariate analysis of CBF SPECT. **Neurobiology of Aging**, v. 28, n. 7, p. 1062–1069, 2007.

KAAS, J. H. Plasticity of sensory and motor maps in adult mammals. **Annual Review of Neuroscience**, v. 14, p. 137–167, 1991.

KUREISHI, Y.; LUO, Z.; SHIOJIMA, I.; et al. The HMG-CoA reductase inhibitor simvastatin activates the protein kinase Akt and promotes angiogenesis in normocholesterolemic animals. **Nature Medicine**, v. 6, n. 9, p. 1004–1010, 2000.

KWAK, P. A.; LIM, S. C.; HAN, S.-R.; SHON, Y.-M.; KIM, Y.-I. Supra-additive neuroprotection by renexin, a mixed compound of ginkgo biloba extract and cilostazol, against apoptotic white matter changes in rat after chronic cerebral hypoperfusion. **Journal of Clinical Neurology (Seoul, Korea)**, v. 8, n. 4, p. 284–292, 2012.

LAUFS, U.; GERTZ, K.; DIRNAGL, U.; et al. Rosuvastatin, a new HMG-CoA reductase inhibitor, upregulates endothelial nitric oxide synthase and protects from ischemic stroke in mice. **Brain Research**, v. 942, n. 1-2, p. 23–30, 2002.

LEE, J.-K.; WON, J.-S.; SINGH, A. K.; SINGH, I. Statin inhibits kainic acid-induced seizure and associated inflammation and hippocampal cell death. **Neuroscience Letters**, v. 440, n. 3, p. 260–264, 2008.

LIAO, J. K.; LAUFS, U. Pleiotropic effects of statins. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 45, p. 89–118, 2005.

LU, D.; QU, C.; GOUSSEV, A.; et al. Statins increase neurogenesis in the dentate gyrus, reduce delayed neuronal death in the hippocampal CA3 region, and improve spatial learning in rat after traumatic brain injury. **Journal of Neurotrauma**, v. 24, n. 7, p. 1132–1146, 2007.

LUCKHAUS, C.; FLÜB, M. O.; WITTSACK, H.-J.; et al. Detection of changed regional cerebral blood flow in mild cognitive impairment and early Alzheimer's

dementia by perfusion-weighted magnetic resonance imaging. **NeuroImage**, v. 40, n. 2, p. 495–503, 2008.

MENDOZA-OLIVA, A.; ZEPEDA, A.; ARIAS, C. The complex actions of statins in brain and their relevance for Alzheimer's disease treatment: an analytical review. **Current Alzheimer Research**, v. 11, n. 9, p. 817–833, 2014.

MITTMANN, T.; EYSEL, U. T. Increased synaptic plasticity in the surround of visual cortex lesions in rats. **Neuroreport**, v. 12, n. 15, p. 3341–3347, 2001.
RIDKER, P. M.;

MORO, M. A.; CÁRDENAS, A.; HURTADO, O.; LEZA, J. C.; LIZASOAIN, I. Role of nitric oxide after brain ischaemia. **Cell Calcium**, v. 36, n. 3-4, p. 265–275, 2004.

NETO, C. J. B. F.; PAGANELLI, R. A.; BENETOLI, A.; LIMA, K. C. M.; MILANI, H. Permanent, 3-stage, 4-vessel occlusion as a model of chronic and progressive brain hypoperfusion in rats: a neurohistological and behavioral analysis. **Behavioural Brain Research**, v. 160, n. 2, p. 312–322, 2005.

NUDO, R. J.; WISE, B. M.; SIFUENTES, F.; MILLIKEN, G. W. Neural substrates for the effects of rehabilitative training on motor recovery after ischemic infarct. **Science (New York, N.Y.)**, v. 272, n. 5269, p. 1791–1794, 1996.

OSAWA, A.; MAESHIMA, S.; SHIMAMOTO, Y.; et al. Relationship between cognitive function and regional cerebral blood flow in different types of dementia. **Disability and Rehabilitation**, v. 26, n. 12, p. 739–745, 2004.

PAGANELLI, R. A.; BENETOLLI, A.; LIMA, K. C. M.; et al. A novel version of the 8-arm radial maze: effects of cerebral ischemia on learning and memory. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 132, n. 1, p. 9–18, 2004.

PARLE, M.; SINGH, N. Reversal of memory deficits by Atorvastatin and Simvastatin in rats. **Yakugaku Zasshi: Journal of the Pharmaceutical Society of Japan**, v. 127, n. 7, p. 1125–1137, 2007.

PAXINOS G.; WATSON C. The Rat Brain in Stereotaxic coordinates. 2nd ed. San Diego: American Press; 1997

PECHLIVANIS, M.; KUHLMANN, J. Hydrophobic modifications of Ras proteins by isoprenoid groups and fatty acids--More than just membrane anchoring. **Biochimica Et Biophysica Acta**, v. 1764, n. 12, p. 1914–1931, 2006.

PEREIRA, F. M.; FERREIRA, E. D. F.; DE OLIVEIRA, R. M. W.; MILANI, H. Time-course of neurodegeneration and memory impairment following the 4-vessel occlusion/internal carotid artery model of chronic cerebral hypoperfusion in middle-aged rats. **Behavioural Brain Research**, v. 229, n. 2, p. 340–348, 2012.

PIERMARTIRI, T. C. B.; VANDRESEN-FILHO, S.; DE ARAÚJO HERCULANO, B.; et al. Atorvastatin prevents hippocampal cell death due to quinolinic acid-induced seizures in mice by increasing Akt phosphorylation and glutamate uptake. **Neurotoxicity Research**, v. 16, n. 2, p. 106–115, 2009.

POSADA-DUQUE, R. A.; VELASQUEZ-CARVAJAL, D.; ECKERT, G. P.; CARDONA-GOMEZ, G. P. Atorvastatin requires geranylgeranyl transferase-I and Rac1 activation to exert neuronal protection and induce plasticity. **Neurochemistry International**, v. 62, n. 4, p. 433–445, 2013.

PUCCETTI, L.; PASQUI, A. L.; AUTERI, A.; BRUNI, F. Mechanisms for antiplatelet action of statins. **Current Drug Targets. Cardiovascular & Haematological Disorders**, v. 5, n. 2, p. 121–126, 2005.

RIDKER, P. M.; RIFAI, N.; PFEFFER, M. A.; et al. Inflammation, pravastatin, and the risk of coronary events after myocardial infarction in patients with average cholesterol levels. Cholesterol and Recurrent Events (CARE) Investigators. **Circulation**, v. 98, n. 9, p. 839–844, 1998.

RIKITAKE, Y.; LIAO, J. K. Rho GTPases, statins, and nitric oxide. **Circulation Research**, v. 97, n. 12, p. 1232–1235, 2005.

ROHER, A. E.; GARAMI, Z.; ALEXANDROV, A. V.; et al. Interaction of cardiovascular disease and neurodegeneration: transcranial Doppler ultrasonography and Alzheimer's disease. **Neurological Research**, v. 28, n. 6, p. 672–678, 2006.

ROHER, A. E.; KOKJOHN, T. A.; BEACH, T. G. An association with great implications: vascular pathology and Alzheimer disease. **Alzheimer Disease and Associated Disorders**, v. 20, n. 1, p. 73–75, 2006.

ROMANINI, C. V.; SCHIAVON, A. P.; FERREIRA, E. D. F.; DE OLIVEIRA, R. M. W.; MILANI, H. Sildenafil prevents mortality and reduces hippocampal damage after permanent, stepwise, 4-vessel occlusion in rats. **Brain Research Bulletin**, v. 81, n. 6, p. 631–640, 2010.

RUITENBERG, A.; DEN HEIJER, T.; BAKKER, S. L. M.; et al. Cerebral hypoperfusion and clinical onset of dementia: the Rotterdam Study. **Annals of Neurology**, v. 57, n. 6, p. 789–794, 2005.

SANOSSIAN, N.; OVBIAGELE, B. Drug insight: translating evidence on statin therapy into clinical benefits. **Nature Clinical Practice. Neurology**, v. 4, n. 1, p. 43–49, 2008.

SAYAN-OZACMAK, H.; OZACMAK, V. H.; BARUT, F.; JAKUBOWSKA-DOGRU, E. Rosiglitazone treatment reduces hippocampal neuronal damage possibly through alleviating oxidative stress in chronic cerebral hypoperfusion. **Neurochemistry International**, v. 61, n. 3, p. 287–290, 2012.

SIRONI, L.; CIMINO, M.; GUERRINI, U.; et al. Treatment with statins after induction of focal ischemia in rats reduces the extent of brain damage. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 23, n. 2, p. 322–327, 2003.

WAKITA, H.; TOMIMOTO, H.; AKIGUCHI, I.; et al. Axonal damage and demyelination in the white matter after chronic cerebral hypoperfusion in the rat. **Brain Research**, v. 924, n. 1, p. 63–70, 2002.

WATANABE, J.; OGATA, T.; HAMADA, O.; et al. Improvement of cognitive function after carotid endarterectomy--a new strategy for the evaluation of cognitive function. **Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases: The Official Journal of National Stroke Association**, v. 23, n. 6, p. 1332–1336, 2014.

WIERZBICKI, A. S.; POSTON, R.; FERRO, A. The lipid and non-lipid effects of statins. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 99, n. 1, p. 95–112, 2003.

YAMADA, M.; HUANG, Z.; DALKARA, T.; et al. Endothelial nitric oxide synthase-dependent cerebral blood flow augmentation by L-arginine after chronic statin treatment. **Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism: Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism**, v. 20, n. 4, p. 709–717, 2000.

ZEPEDA, A.; SENGPIEL, F.; GUAGNELLI, M. A.; VACA, L.; ARIAS, C. Functional reorganization of visual cortex maps after ischemic lesions is accompanied by changes in expression of cytoskeletal proteins and NMDA and GABA(A) receptor subunits. **The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience**, v. 24, n. 8, p. 1812–1821, 2004.

ZHANG, L.; ZHANG, J.; SUN, H.; et al. An enriched environment elevates corticosteroid receptor levels in the hippocampus and restores cognitive function in a rat model of chronic cerebral hypoperfusion. **Pharmacology, Biochemistry, and Behavior**, v. 103, n. 4, p. 693–700, 2013.

ZHOU, Q.; LIAO, J. K. Pleiotropic effects of statins. - Basic research and clinical perspectives -. **Circulation Journal: Official Journal of the Japanese Circulation Society**, v. 74, n. 5, p. 818–826, 2010.

ZHU, H.; ZHANG, J.; SUN, H.; et al. An enriched environment reverses the synaptic plasticity deficit induced by chronic cerebral hypoperfusion. **Neuroscience Letters**, v. 502, n. 2, p. 71–75, 2011.

