

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

MARISSA GIOVANNA SCHAMNE

**EFEITO COMPORTAMENTAL DAS ESTATINAS EM UM MODELO ANIMAL DA
DOENÇA DE PARKINSON**

PONTA GROSSA

2014

MARISSA GIOVANNA SCHAMNE

**EFEITO COMPORTAMENTAL DAS ESTATINAS EM UM MODELO ANIMAL DA
DOENÇA DE PARKINSON**

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

Orientador: Prof. Dr. Edmar Miyoshi

PONTA GROSSA

2014

Ficha Catalográfica
Elaborada pelo Setor de Tratamento da Informação BICEN/UEPG

Schamne, Marissa Giovanna

S291 Efeito comportamental das estatinas em
um modelo animal da Doença de Parkinson/
Marissa Giovanna Schamne. Ponta Grossa,
2014.
80f.

Dissertação (Mestrado em Ciências
Farmacêuticas - Área de Concentração:
Fármacos, Medicamentos e Biociências
Aplicadas à Farmácia), Universidade
Estadual de Ponta Grossa.

Orientador: Prof. Dr. Edmar Miyoshi.

1.Doença de Parkinson. 2.Estatinas.
3.Neuroproteção. 4.Comportamento.
I.Miyoshi, Edmar. II. Universidade
Estadual de Ponta Grossa. Mestrado em
Ciências Farmacêuticas. III. T.

CDD: 616.8



Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas

Associação Ampla entre a
Universidade Estadual do Centro-Oeste e a
Universidade Estadual de Ponta Grossa

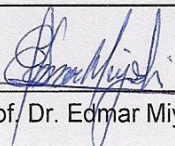


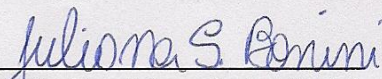
Ata nº. 04/2014

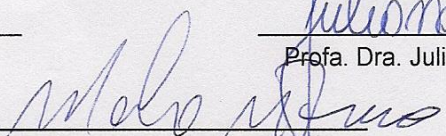
ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO – NÍVEL DE MESTRADO, DA PÓS-GRADUANDA MARISSA GIOVANNA SCHAMNE, DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO STRICTO SENSU EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS, REALIZADA NO DIA 25 DE FEVEREIRO DE 2014, NA UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA.

Ao vigésimo quinto dia do mês de fevereiro de dois mil e quatorze, às 14h00min, no Anfiteatro do Hospital Regional de Ponta Grossa no Bloco M da Universidade Estadual de Ponta Grossa, sob a presidência do Prof. Dr. Edmar Miyoshi, em sessão pública, reuniu-se a banca examinadora para a defesa de dissertação da pós-graduanda Marissa Giovanna Schamne. Área de concentração: Fármacos, medicamentos e biociências aplicadas à Farmácia. Linha de Pesquisa: Avaliação Clínico/Laboratorial de Processos Fisiopatológicos. A banca foi constituída pelos pesquisadores: Prof. Dr. Edmar Miyoshi (Presidente) /UEPG, Profa. Dra. Juliana Sartori Bonini /UNICENTRO e Prof. Dr. Marcelo Machado Ferro/ UEPG indicados pelo egrégio colegiado do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas – nível de Mestrado Acadêmico, desta Universidade, em associação ampla com a Universidade Estadual do Centro-Oeste. Iniciados os trabalhos, a presidência deu conhecimento aos membros da banca e à candidata das normas que regem a defesa de dissertação e definiu-se a ordem a ser seguida pelos examinadores para a arguição. O trabalho analisado foi **“Efeitos comportamentais das estatinas em um modelo animal da doença de Parkinson.”**. Encerrada a defesa de dissertação, procedeu-se o julgamento, tendo sido a candidata APROVADA. Foi dada ciência à mestranda que, de acordo com o Art. 34 do Regulamento do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas - UNICENTRO/UEPG, *para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas, área de concentração Fármacos, Medicamentos e Biociências aplicadas à Farmácia, o aluno tem o prazo de 30 (trinta) dias após esta defesa para entregar as cópias da versão definitiva, que devem ser aprovadas pelo orientador e homologadas pelo Colegiado de curso*. Nada mais havendo a tratar, lavrou-se à presente ata que vai assinada pelos membros da banca examinadora e por mim, Renata Carneiro, Renata Carneiro, secretária do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas pela UEPG. Ponta Grossa, 25 de fevereiro de 2014

Observação (se necessária):


Prof. Dr. Edmar Miyoshi


Profa. Dra. Juliana Sartori Bonini


Prof. Dr. Marcelo Machado Ferro

***Dedico este trabalho aos meus pais,
Marise e Marcio, por serem os pilares da
minha educação, e em especial a minha
mãe, por todo apoio, incentivo e amor,
com quem divido essa conquista.***

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, pela vida e capacidade de realizar e concluir esse trabalho.

Ao meu orientador, **Prof. Dr. Edmar Miyoshi**, pela oportunidade e confiança. Pela solicitude em dividir seus conhecimentos. Pelos conselhos sensatos, ensinamentos, e por guiar meus passos no caminho da pesquisa científica.

Ao **Prof. Dr. Marcelo Machado Ferro**, por estar sempre presente e disposto a ajudar. Por toda a colaboração para a realização desse trabalho, e por dividir seus conhecimentos.

Ao **Prof. Dr. Daniel Fernandes**, por garantir a oportunidade de ingressar no mestrado e, por toda atenção e colaboração.

Aos membros da banca, **Prof. Dr. Marcelo Machado Ferro** e **Prof. Dra. Juliana Sartori Bonini**, pelo aceite e disponibilidade.

A minha mãe **Marise**, por ser a base da minha educação, por todo o companheirismo, incentivo e amor incondicional. Exemplo de competência e independência.

Ao meu namorado **Italo**, por toda a ajuda e apoio que sempre me ofereceu. Por estar sempre disposto a colaborar e me compreender, e sempre incentivando a seguir em frente. Você foi fundamental nessa etapa!

A **Débora**, por toda a animação e incentivo com a pesquisa. Sua amizade foi fundamental durante todo esse processo e um presente.

Às alunas de iniciação científica, **Ana Flávia** e **Camila**, por serem meu braço direito (e esquerdo) no desenvolvimento desse trabalho e pela amizade dedicada.

À **Marina**, por ser uma companheira de laboratório, dividindo as frustrações e alegrias, e agora uma amiga.

Aos amigos de turma: **Luiz Renato, Rodrigo, Jaqueline e Murilo**, pelos sete anos de faculdade e pós-graduação compartilhados. Pela amizade, companheirismo, risadas compartilhadas. Foi muito mais divertido com vocês.

A minha amiga, **Marcela**, por ter iniciado junto comigo na pesquisa, e por sempre dar incentivo e uma palavra de confiança.

As minhas amigas, **Renata, Camila e Aryadne**, por entenderem minha ausência, pelo apoio e confiança.

Aos **Professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da UEPG**, pela competente maestria com que guiam esse programa, e assim incentivam muitos a ingressarem na carreira científica.

Ao **Prof. Dr. Rui Prediger** e a **Morgana Moretti**, pela disponibilidade e auxílio na realização do Western Blot.

Ao **Prof. Dr. José Carlos Velloso**, pela ajuda na realização das dosagens bioquímicas.

À **Universidade Estadual de Ponta Grossa**, pelo suporte e espaço que tem sido minha casa nos últimos sete anos.

Às funcionárias do biotério, **Maria e Marilene**, por todo carinho, disposição oferecidos a mim, e o cuidado e zelo que tem com os animais utilizados nesse estudo.

À **CAPES**, pelo apoio financeiro.

E por fim, **a todos as pessoas** que de alguma forma contribuíram para a realização desse trabalho, meus sinceros agradecimentos.

“A alegria que se tem em pensar e aprender faz-nos pensar e aprender ainda mais”.

Aristóteles

RESUMO

A doença de Parkinson (DP) é a segunda doença neurodegenerativa mais comum na atualidade, e ainda não há nenhuma terapia eficaz para controlar a progressão da doença, os tratamentos atuais apenas aliviam os sintomas. O objetivo deste estudo foi avaliar a capacidade neuroprotetora das estatinas sobre os neurônios dopaminérgicos de ratos com lesão pela neurotoxina 6-hidroxidopamina (6-OHDA) como modelo animal da DP. Para testar tal hipótese, os animais foram submetidos à cirurgia estereotáxica para a infusão de 6-OHDA no feixe prosencefálico medial (FPM) a fim de provocar a morte de neurônios dopaminérgicos. Duas metodologias diferentes foram empregadas neste estudo para a lesão dopaminérgica, 1) infusão bilateral para os testes de reconhecimento social, preferência à sacarose, natação forçada e campo aberto, 2) infusão unilateral para o teste do comportamento rotatório. Os animais foram tratados durante 10 dias (3 dias antes da cirurgia e por mais 7 dias após) com veículo, sinvastatina ou pravastatina na dose de 10 mg/kg. Foram testadas duas estatinas com solubilidades diferentes para avaliar se o efeito acontece apenas sobre o sistema nervoso central ou se há efeito periférico. No teste do reconhecimento social os animais dos grupos 6-OHDA tratados com as estatinas tiveram um desempenho significativamente melhor do que os animais do grupo 6-OHDA+veículo. No teste da natação forçada, os animais do grupo 6-OHDA tratados com estatinas ficaram menos tempo imóveis quando comparados com os animais do grupo 6-OHDA+veículo. No teste do comportamento rotatório, o número de rotações contralaterais dos animais lesionados e tratados com as estatinas foi significativamente menor quando comparado com os animais do grupo 6-OHDA+veículo. Esses resultados sugerem que as estatinas possam ter diminuído a morte de neurônios dopaminérgicos. Para confirmar essa hipótese, foi realizada a técnica de Western Blot para a expressão da enzima tirosina hidroxilase (TH) no FPM. Mais alguns testes precisam ainda ser realizados para confirmar o potencial neuroprotetor das estatinas.

Palavras-chave: Doença de Parkinson, estatinas, neuroproteção, comportamento

ABSTRACT

Currently Parkinson's disease (PD) is the second most common neurodegenerative disease, and yet there is no effective therapy to control the progression of the disease, current treatments only relieve symptoms. The aim of this study was to evaluate the neuroprotective ability of statins on dopaminergic neurons from rats injured by the neurotoxin 6-hydroxydopamine (6-OHDA), which was used as an animal model for PD. In order to test this hypothesis, the animals underwent stereotaxic surgery for infusion of 6-OHDA into the medial forebrain bundle in order to cause the death of dopaminergic neurons. Two different methodologies were used in this study regarding dopaminergic injury, 1) bilateral infusions for tests of social recognition, preference for sucrose, forced swimming test and open field, 2) unilateral infusion for test rotational behavior. The animals were treated for 10 days (3 days before surgery and for 7 days after) with vehicle, simvastatin or pravastatin 10 mg/kg. Statins with two different solubility were tested to evaluate if the effect occurs only on the central nervous system or if there is a peripheral effect too. In the social recognition test the animals 6-OHDA treated with statins had a significantly better performance than those of group 6-OHDA+vehicle. In the forced swimming test, animals 6-OHDA treated with statins spent less time immobile compared with animals of the 6-OHDA+vehicle. In the rotational behavior test the number of contralateral rotations in animals 6-OHDA treated with statins was significantly smaller when compared with animals of group 6-OHDA+vehicle. These results suggest that statins may have decreased the death of dopaminergic neurons. To confirm this hypothesis, the Western Blot test was performed for expression of the enzyme tyrosine hydroxylase (TH). It's still necessary to conduct further tests to confirm the neuroprotective potential of statins.

Key-words: Parkinson's disease, statins, neuroprotection, behavior

LISTA DE ILUSTRAÇÕES E TABELA

FIGURA 1- Via de síntese da dopamina	21
FIGURA 2- Estrutura química da dopamina e da 6-OHDA	22
FIGURA 3- Prováveis mecanismos de morte neuronal pela 6-OHDA	25
FIGURA 4- Via de síntese do colesterol e ponto de ação das estatinas	27
FIGURA 5- Cronograma experimental para lesões uni e bilaterais	34
FIGURA 6- Ponto de intersecção entre as suturas sagital e coronal – o bregma	36
FIGURA 7- Equação de Friedewald	42
FIGURA 8- Relação entre a primeira e a segunda investigação no teste do reconhecimento social	44
FIGURA 9- Consumo de água e sacarose	45
FIGURA 10- Consumo total de líquidos	46
FIGURA 11- Tempo de imobilidade na natação forçada	47
FIGURA 12- Tempo de natação na natação forçada	48
FIGURA 13- Tempo de escalada na natação forçada	48
FIGURA 14- Número de quadrantes cruzados no teste do campo aberto	49
FIGURA 15- Número de levantadas no teste do campo aberto	50
FIGURA 16- Número de rotações contralaterais 7 dias após a cirurgia	51
FIGURA 17- Número de rotações contralaterais 14 dias após a cirurgia	52
FIGURA 18- Imagem representativa do Western Blot demonstrando a expressão de TH em cada grupo.	53
FIGURA 19- Diagrama representando os possíveis mecanismos neuroprotetores das estatinas	66
TABELA 1- Medicamentos utilizados na terapia da doença de Parkinson	21
TABELA 2- Coeficiente de permeabilidade cerebrovascular ($\mu\text{L}/\text{min}/\text{cm}^2$) através da BHE de ratos e da cultura de uma monocamada de células do endotélio cerebral de bovinos determinados pelo C^{14}	28
TABELA 3- Número de rotações ipsilaterais- 7º e 14º dia	52
TABELA 4- Imunodeteção de proteínas (Western Blot) grupos SHAM e 6-OHDA	53

TABELA 5- Colesterol total	54
TABELA 6- Triglicerídeos	54
TABELA 7- HDL	54
TABELA 8- LDL	55
QUADRO 1- <i>Ranking</i> do potencial neuroprotetor das estatinas	65

LISTA DE ABREVIATURAS

6-OHDA	6-hidroxidopamina
AVE	Acidente vascular encefálico
BHE	Barreira hematoencefálica
COX-2	Ciclooxigenase 2
DA	Dopamina
DP	Doença de Parkinson
eNOS	Óxido nítrico sintase endotelial
FPM	Feixe prosencefálico medial
HMG-CoA redutase	3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A redutase
IL	Interleucina
i.m.	Intramuscular
iNOS	Óxido nítrico sintase induzível
IP ₃	Inositol trifosfato
i.p.	Intraperitoneal
NADPH	Fosfato de nicotinamida adenina oxidase
NF-κB	Fator nuclear kappa B
NGF	Fator neurotrófico
NMDA	<i>N</i> -metil-D-aspartato
nNOS	Óxido nítrico sintase neuronal
NO	Óxido nítrico
RID	Razão da duração da investigação
ROS	Espécies reativas de oxigênio
SN	Substância negra
SNpc	Substância negra pars compacta
SNC	Sistema nervoso central
s.c.	Subcutânea
TNF-α	Fator de necrose tumoral

SUMÁRIO

1 REVISÃO DE LITERATURA	14
1.1 DOENÇA DE PARKINSON.....	14
1.1.1 Epidemiologia.....	14
1.1.2 Fisiopatologia	15
1.1.3 Etiologia	16
1.1.4 Sintomas	18
1.1.4.1 Sintomas motores	18
1.1.4.2 Sintomas não motores	18
1.1.4.2.1 Sintoma depressivo.....	19
1.1.4.2.2 Prejuízo de memória	19
1.1.5 Tratamentos.....	20
1.2 MODELOS ANIMAIS DE DOENÇA DE PARKINSON	22
1.3 ESTATINAS	26
2 OBJETIVOS	32
2.1 OBJETIVO GERAL	32
2.2 OBJETIVO ESPECÍFICO	32
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	33
3.1 ANIMAIS	33
3.2 TRATAMENTO	34
3.3 CIRURGIA ESTEREOTÁXICA.....	35
3.4 TESTES COMPORTAMENTAIS.....	36
3.4.1 Teste de reconhecimento social.....	36
3.4.2 Teste de preferência à sacarose	37

3.4.3 Teste de natação forçada modificada	38
3.4.4 Campo aberto	38
3.4.5 Comportamento rotatório induzido pela apomorfina	39
3.5 IMUNODETECÇÃO DE PROTEÍNAS (WESTERN BLOT)	40
3.6 DOSAGEM DE COLESTEROL TOTAL, TRIGLICERÍDEOS, HDL, LDL	41
3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA	42
4 RESULTADOS	44
4.1 TESTE DE RECONHECIMENTO SOCIAL	44
4.2 TESTE DE PREFERÊNCIA À SACAROSE	45
4.3 TESTE DE NATAÇÃO FORÇADA MODIFICADO	46
4.4 CAMPO ABERTO	49
4.5 COMPORTAMENTO ROTATÓRIO INDUZIDO PELA APORMOFINA	50
4.6 IMUNODETECÇÃO DE PROTEÍNAS (WESTERN BLOT)	53
4.7 DOSAGEM DE COLESTEROL TOTAL, TRIGLICERÍDEOS, HDL, LDL	53
5 DISCUSSÃO	56
6 CONCLUSÃO	67
REFERÊNCIAS	68

1 REVISÃO DE LITERATURA

1.1 DOENÇA DE PARKINSON

A doença de Parkinson (DP) foi descrita pela primeira vez em 1817, pelo médico inglês James Parkinson. Neste estudo, ele relatou o caso de quatro pacientes com sintomas motores parecidos: lentidão de movimentos, tremor de repouso e rigidez muscular. Esse trabalho foi publicado sob o título de “Ensaio da Paralisia Agitante”, nome que originalmente deu à doença (MENEZES e TEIVE, 2003). Em 1875 Jean Martin Charcot denominou a patologia como Doença de Parkinson em homenagem ao pesquisador que a descreveu inicialmente.

Quando a descreveu inicialmente, James Parkinson abordou apenas os sinais motores da doença, relatando que a capacidade intelectual dos pacientes não era comprometida. Porém, mais tarde, outros pesquisadores relataram que sintomas cognitivos também acometiam os doentes, eliminando assim a ideia de que a DP causava apenas complicações motoras aos indivíduos (DUVOISIN, 1991; MENEZES e TEIVE, 2003).

1.1.1 Epidemiologia

A DP é a segunda doença neurodegenerativa relacionada com a idade mais comum da atualidade, ficando atrás apenas da doença de Alzheimer, sendo responsável por um significativo aumento da morbidade e mortalidade, afetando a vida social e econômica dos indivíduos e da sociedade (SCHAPIRA e OLANOW, 2004; MANSOURI et al., 2012).

Atualmente atinge cerca de 1 a 3% dos indivíduos com mais de 60 anos, sendo a incidência em torno de 20 casos/100.000 habitantes/ano (SINGH, PILLAY et al., 2007). Geralmente acomete pessoas com idade mais avançada (aproximadamente 60 anos), mas existem casos de manifestação da doença em adultos jovens perto dos 45 anos (LANG e LOZANO, 1998).

A organização mundial de saúde (OMS) afirma que devido ao envelhecimento da população mundial, o número de casos de DP tende a aumentar, bem como a importância da doença como um problema de saúde pública.

De acordo com a Organização das Nações Unidas, hoje existem 810 milhões de idosos no mundo, e em 2020 acredita-se que esse número chegue a 1 bilhão de

peessoas. No Brasil o número de idosos é de 20,6 milhões de pessoas, e o número de casos da doença pode variar em torno dos 250 mil. Estima-se que existam 100 casos da doença a cada 100 mil habitantes. É mais comum no gênero masculino, com uma razão de homens para mulheres de 3:2 (BARBOSA et al., 2006; MASSANO, 2011).

O período de latência para o desenvolvimento da doença não é conhecido, o mais provável é que leve de 5 a 7 anos para se instalar completamente, embora possa variar de acordo com a etiologia (LANG e LOZANO, 1998; SINGH, PILLAY, 2007).

1.1.2 Fisiopatologia

No sistema nervoso central (SNC), os neurônios dopaminérgicos estão localizados principalmente em três regiões: via nigroestriatal – que detém aproximadamente 75% do conteúdo de dopamina (DA) do cérebro, e é composta por corpos celulares de neurônios da substância negra (SN) cujos axônios terminam no corpo estriado; via mesolímbica/mesocortical – cujos corpos celulares dos neurônios aparecem em grupos no mesencéfalo; e finalmente a via tuberohipofiseal – pequeno grupos de neurônios do hipotálamo que regula as secreções da hipófise (PRZEDBORSKI, 2005).

A DP está associada com duas áreas cerebrais predominantemente: a SN e o núcleo estriado (núcleos caudado e putamen). Essas estruturas cerebrais fazem parte de um grupo de massa de substância cinzenta situada no interior do hemisfério cerebral denominado núcleos da base (OBESO et al., 2000; SULZER, 2007; DA CUNHA, et al., 2007; DA CUNHA, et al., 2009).

Os núcleos ou gânglios da base constituem um grupo de núcleos subcorticais que tem por função principal o controle dos movimentos voluntários e o aprendizado das habilidades motoras, ou seja, eles ajudam na execução e na preparação dos movimentos. Essas estruturas são: estriado (caudado e putamen), globo pálido interno e externo, núcleo subtalâmico e a SN (pars compacta e reticulada) (BURCH e SHEERIN, 2005).

A DP é uma doença neurodegenerativa, caracterizada pela perda progressiva dos neurônios dopaminérgicos na substância negra pars compacta (SNpc), que se projetam para o estriado, acarretando em diminuição dos níveis de DA, alterando

todo do processamento das informações pelos núcleos da base (OBESO et al., 2000; SULZER, 2007; DA CUNHA, et al., 2007; DA CUNHA, et al., 2009).

A SN recebe esse nome devido a sua coloração, pois os neurônios dessa região além de produzirem DA, produzem também neuromelanina (pigmento escuro), que confere uma coloração escurecida para essa região. Por isso, em estudos *post mortem* de indivíduos com a DP, observa-se uma descoloração dessa região, pois tanto a DA como a neuromelanina deixaram de ser produzidas pelos neurônios dopaminérgicos (SPILLANTINI et al., 1997).

Na DP além da neurodegeneração na SNpc, ocorre uma neurodegeneração progressiva dos neurônios dopaminérgicos de área tegmental ventral. E além da DA, a produção de outros neurotransmissores também pode ser comprometida na doença, devido à morte de outros neurônios que não dopaminérgicos (SHAPIRA et al., 2006).

Por exemplo, pode acontecer morte neuronal no *locus coeruleus* prejudicando a síntese de noradrenalina, no núcleo motor dorsal vagal e núcleo basal de Meynert (acetilcolina), e nos núcleos da rafe (serotonina) (LIMONGI, 2003; SHAPIRA et al., 2006).

A fisiopatologia neuroquímica da DP não é restrita apenas a diminuições na concentração de neurotransmissores, Gerlach e Riederer (1996), relataram que ocorrem também diminuição da atividade da enzima glutamato descarboxilase. Essa enzima é responsável pela síntese do ácido γ -aminobutírico (GABA).

Uma das principais características da DP é a deposição de corpos de Lewy na SNpc. São depósitos intracelulares ricos em uma proteína chamada α -sinucleína (ROY e PAHAN, 2011, WANG et al., 2011, KUMAR et al., 2012). Acredita-se que a agregação de α -sinucleína pode ter um papel crítico na patogênese da demência e na DP.

1.1.3 Etiologia

São várias as hipóteses que visam explicar a causa da DP. Entre essas hipóteses, o fator ambiental é aquele que é capaz de gerar um gatilho desencadeante para o processo degenerativo. Essa teoria ambiental considera estudos que demonstram a elevada frequência da doença em países industrializados (poluição, radicais livres e estresse oxidativo) e áreas rurais

(exposição a pesticidas). Outras hipóteses seriam: fatores genéticos; processo natural de envelhecimento, aumento na formação de radicais livres ou o funcionamento inadequado de seus mecanismos neutralizadores; redução dos estoques de ATP que acabam levando a morte neuronal (PONZONI, 1995).

A causa da DP ainda não está elucidada. Trata-se de uma patologia multifatorial e há fortes indícios do papel da neuroinflamação na degeneração nigroestriatal, do estresse oxidativo, no qual há produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e da excitotoxicidade, levando a morte de células produtoras de DA na SNpc (KURKOWSKA-JASTRZEBSKA et al., 1999; HALD, LOTHARIUS, 2005; HIRSCH, HUNOT, HARTMANN et al., 2005; MOSLEY et al., 2006; WERSINGER, SIDHU, 2006; FUKAE, MIZUNO, HATTORI, 2007, ROY e PAHAN 2011).

A neurodegeneração na DP pode ser acompanhada por uma reação inflamatória, caracterizada pela ativação da micróglia (macrófagos residentes no cérebro) levando a produção de uma série de mediadores inflamatórios (ex: NF- κ B, IL-1, IL-6, COX-2) (HUNOT, DUGAS et al., 1999) e aumento na expressão de diferentes citocinas pró-inflamatórias pelas células da glia (BOKA, ANGLADE et al., 1994).

A micróglia, uma vez ativada, libera óxido nítrico (NO) e peróxido de hidrogênio, e essas substâncias conhecidamente causam severos danos aos neurônios, especialmente aos neurônios dopaminérgicos que são mais suscetíveis aos seus efeitos (YOU DIM e RIEDERER, 1997).

A ativação da micróglia é um mecanismo de defesa do SNC. Em contrapartida, as substâncias liberadas pela micróglia, no intuito de defender o SNC aumentam a neurotoxicidade e influenciam a neurodegeneração. A SNpc é uma das regiões cerebrais com maior concentração de micróglia (JENNER e OLANOW, 1996).

O estresse oxidativo pode ser o principal causador da neurodegeneração dopaminérgica. Os próprios neurônios dopaminérgicos parecem favorecer o ambiente para a produção de ROS através do metabolismo da DA, que produz $\text{-O}_2\cdot$, $\text{-OH}\cdot$ e $\text{-H}_2\text{O}_2$. Além disso a auto-oxidação da DA produz DA-quinona, uma molécula que danifica as proteínas reagindo com resíduos de cisteína (DAUER, PRZEDBORSKI, 2003).

Um marcador anatomopatológico da DP são os corpos ou corpúsculos de Lewy. Estes são inclusões eosinofílicas intracelulares de origem protéica que se acumulam em neurônios em processo de degeneração, especialmente nos neurônios

dopaminérgicos da SNpc (BLANDINI et al., 2000; SULZER, 2007). Eles estão presentes em 85% das autópsias de pessoas com DP diagnosticada. São formados principalmente pelas proteínas α -sinucleína e ubiquitina, nos neurônios remanescentes.

Sabe-se que a agregação de α -sinucleína é um fator desencadeante para um mecanismo celular que leva à morte progressiva de determinadas populações neuronais (SHIMOHAMA et al. 2003; EMBORG, 2004). A α -sinucleína acumula-se nos neurônios, e quando ultrapassa uma determinada quantidade, é capaz de promover uma neurotoxicidade resultando em morte neuronal e diminuição da aferência dopaminérgica para o estriado (KOO, LEE, IM; 2008).

Outros fatores de risco também podem favorecer o desenvolvimento da DP. Por exemplo, a exposição a pesticidas (paraquat, rotenona), a algumas toxinas (1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP), 6-hidroxidopamina (6-OHDA)), ao chumbo entre outros (ELBAZ, MOISAN, 2008).

1.1.4 Sintomas

1.1.4.1 Sintomas motores

Os sintomas motores da DP começam a se manifestar quando aproximadamente 70% dos neurônios dopaminérgicos da região nigroestriatal já foram perdidos. Além da redução dos níveis de DA, nota-se uma leve redução dos níveis de serotonina e noradrenalina, intensificando sintomas cognitivos, como o comportamento tipo depressivo (BEZARD et al., 2001; DEUMENS et al., 2002).

Os principais sintomas motores da DP são a bradicinesia, o tremor de repouso, rigidez muscular e anormalidades posturais (MELLO, BARBOSA e CARAMELLI, 2007; FRANCARDO et al., 2012). E o diagnóstico da doença é feito considerando esses sintomas cardinais motores (PADOVANI et al., 2006).

1.1.4.2 Sintomas não-motores

Além desses sintomas, há aqueles ainda chamados de sintomas não-motores como fadiga, depressão, distúrbios do sono, prejuízo cognitivo e de memórias procedurais, hipotensão ortostática, incontinência urinária, constipação intestinal,

sialorréia, entre outros que também podem aparecer com a evolução da doença (PAVESE, 2012; MELO, BARBOSA e CARAMELLI, 2007).

É comum os pacientes se tornarem passivos ou retraídos, manifestando falta de iniciativa, respondem demoradamente a questões, e os processos cognitivos são vagarosos (“bradifrenia”) (DAUER, PRZEDBORSKI, 2003; SHAPIRA et al., 2006).

Os mais relevantes e aqueles que mais prejudicam o prognóstico da doença são a depressão e o prejuízo de memória.

1.1.4.2.1 Sintoma depressivo

Cerca de 40% dos indivíduos com DP são acometidos desse sinal logo no início da doença. Ele acontece devido à diminuição de DA na região nigroestriatal, mas acredita-se que outras vias também possam estar envolvidas (noradrenérgica, gabaérgica, serotoninérgica) (SCHRAG, 2004; TADAIESKY, 2008).

Muitas vezes os sinais da depressão são confundidos com os próprios sintomas da DP, por isso muitas vezes é negligenciado o que prejudica ainda mais o tratamento do indivíduo e acelera o processo de declínio cognitivo (CAMARGO et al., 2004). E ela está associada diretamente ao grau de acometimento motor.

Já foi comprovado a associação desse sintomatologia com a DP através de vários estudos com modelos animais utilizando neurotoxinas como o MPTP e a 6-OHDA (LIMA et al, 2007; REKSIDLER, 2009).

1.1.4.2.2 Prejuízo de memória

Memória pode ser definida como o processo de aquisição, consolidação e evocação de informações. Existem diferentes tipos de memórias, que dependem da natureza, do tempo de retenção e do conteúdo (IZQUIERDO, 2002).

Existem várias classificações de memórias, variando de acordo com função, tempo de duração e conteúdo (IZQUIERDO, 2002).

Segundo a função, a memória pode ser classificada como memória de trabalho (*working memory*), que é uma memória muito breve (alguns segundos a poucos minutos), e esse tipo de memória não deixa traços (IZQUIERDO, 2011).

Quanto ao conteúdo, a memória pode ser classificada como memória declarativa e procedural. A memória declarativa é aquela que registra fatos e

conhecimentos em que é possível declarar como essas informações foram adquiridas. Enquanto que a memória procedural ou de procedimento é aquela que pode ser chamada de hábito, são as capacidades/habilidades motoras e sensoriais (IZQUIERDO, 2011).

Esses dois tipos de memória citadas no parágrafo acima, podem ainda serem divididas em explícitas e implícitas. As memórias de procedimento são adquiridas de maneira implícita, ou seja, sem que se perceba claramente o que está aprendendo. Enquanto que as memórias explícitas são adquiridas com plena intervenção da consciência (IZQUIERDO, 2011).

Déficits de vários tipos de memória e dificuldade de aprendizado são comuns na DP. Devido à região encefálica afetada pela neurodegeneração, é mais comum os indivíduos com DP sofrerem prejuízos nas memórias implícitas e operacionais (GERLACH e RIEDERER, 1996; MARIÉ et al., 1999; STEBBINS et al., 1999).

Conforme o avanço e o agravamento da DP os pacientes acometidos desenvolvem demência, cujas principais características são a lentificação do processo cognitivo, apatia, prejuízo da memória e de funções executivas.

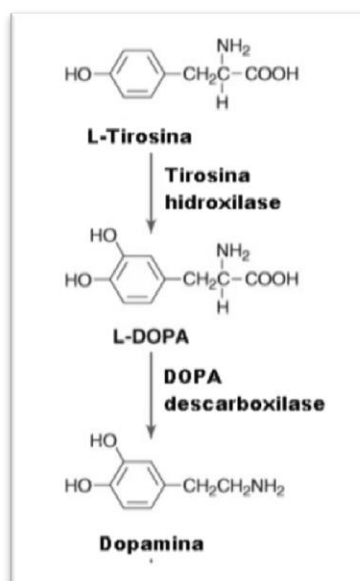
1.1.5 Tratamentos

Atualmente, não há nenhum fármaco que seja capaz de combater a progressão da DP (SONSALLA et al. 2012; SCHAPIRA e OLLANOW, 2004). Os medicamentos disponíveis visam apenas o controle dos sintomas, sem combater o avanço da doença, além de acarretar várias complicações motoras com o uso frequente (PRASHER e FINDLEY, 1991; ROY e PAHAN, 2011) e eventualmente estes tratamentos podem falhar (SONSALLA et al., 2012).

O tratamento mais efetivo para a DP envolve a terapia de reposição da DA, feita pela administração de seu precursor bioquímico, a 3,4-di-hidróxi-L-fenilalanina (L-dopa ou levodopa) (FIGURA 1).

Tal tratamento melhora de forma efetiva os sintomas associados à DP, porém, à longo prazo o tratamento com levodopa é pouco eficiente e causa diversas complicações (MAIA, 2009). O uso da levodopa deve ser retardado o máximo possível, pois esse medicamento pode causar uma série de efeitos colaterais indesejáveis ao paciente e terá que ser utilizado pelo resto da vida.

FIGURA 1: Via de síntese da dopamina



FONTE: Adaptado de SIEGEL et al., 2006.

Na tentativa de retardar a utilização da levodopa, podem ser utilizados fármacos agonistas dopaminérgicos (quando há necessidade de se iniciar a terapia dopaminérgica). O indivíduo só é submetido ao tratamento com levodopa quando não responde mais a esses tratamentos. Nesses casos, a levodopa é utilizada associada a um inibidor periférico da dopa-decarboxilase. O principal efeito colateral decorrente do tratamento com a levodopa é a discinesia, que prejudica ainda mais a qualidade de vida do paciente (RASCOL et al., 2000).

A TABELA 1 fornece dados sobre as principais classes de medicamentos antiparkinsonianos.

TABELA 1: Medicamentos utilizados na terapia da doença de Parkinson

Medicamentos	Mecanismo de ação
Levodopa	Reposição de dopamina
Levodopa + carbidopa ou benserazida	Reposição de dopamina + inibidor periférico da dopa descarboxilase
Bromocriptina, pergolida, pramipexol, cabergolina	Agonistas dopaminérgicos
Selegina	Inibidores da MAO B
Amantadina	Liberadores de dopamina
Triexilfenidil, biperideno	Antagonistas dos receptores muscarínicos da acetilcolina
Entacapone, tolcapone	Inibidores da COMT

FONTE: PORTARIA SAS/MS Nº 228 DE 10 DE MAIO DE 2010.

Outra complicação do tratamento farmacológico da DP é que frequentemente os fármacos usados agravam os sintomas cognitivos, podendo levar ao aparecimento de alucinações após longos períodos de utilização.

Muitos autores descrevem que quando o paciente parkinsoniano começa a apresentar os sinais motores da doença, já perdeu cerca de 70% dos neurônios nigroestriatais. Reverter o quadro nestas situações é muito difícil, por isso os tratamentos, tanto cirúrgicos quanto farmacológicos, reduzem a sintomatologia, mas não permitem um prognóstico de cura (MENEZES e TEIVE, 2003).

Devido a muitos efeitos adversos do tratamento para a DP, estudos recentes vêm pesquisando o potencial de certas substâncias para atuarem como neuroprotetores na DP (SCHAPIRA e OLANOW, 2004).

1.2 MODELOS ANIMAIS DE DOENÇA DE PARKINSON

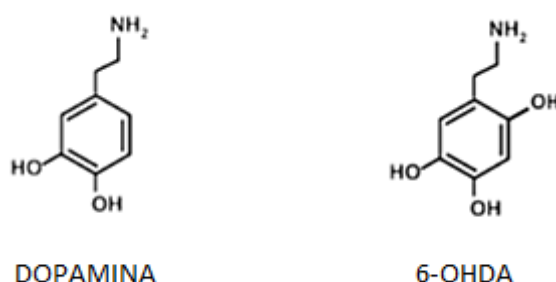
Os modelos experimentais são capazes de mimetizar, *in vitro* e *in vivo*, características histológicas e/ou bioquímicas da doença ajudando assim a definir importantes aspectos de morte celular críticos para a degeneração da SNpc (BLUM, 2001).

Para estudar a evolução e o tratamento de patologias neurodegenerativas, o uso de modelos animais torna-se uma ferramenta muito útil e de extrema importância. Apesar de não seguirem a mesma evolução da doença nos humanos, esses modelos precisam ser fiéis ao que acontece no organismo humano uma vez acometido destas patologias. Nas doenças neurodegenerativas, os modelos animais permitem a realização de estudos invasivos, que não são viáveis de serem realizados em humanos (GERLACH, RIEDERER, 1996; RODRIGUEZ et al., 2001).

A DP é uma doença humana, e não se manifesta espontaneamente em animais, é somente observada através da administração de neurotoxinas que interrompam ou destruam seletivamente o sistema catecolaminérgico, tais como a 6-hidroxidopamina (6-OHDA), a metanfetamina, o 1-metil-4fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP) e a rotenona (KAHLE et al., 2002).

A 6-OHDA é um análogo hidroxilado do neurotransmissor natural DA (FIGURA 2), e trata-se de uma das neurotoxinas mais comumente usada experimentalmente para desenvolver degenerações *in vitro* e *in vivo* em modelos de neurodegeneração associados à DP (YONG et al., 2011).

FIGURA 2: Estrutura química da dopamina e da 6-OHDA



FONTE: Adaptado de BLANDINI; ARMENTERO, 2012.

As lesões produzidas pela 6-OHDA ocorrem após a administração intracerebral direta (diretamente nos ventrículos ou tecidos cerebrais), devido a sua incapacidade de atravessar a barreira hematoencefálica (BHE) (THOENEN e TRANZER, 1973; BLUM, 2001; BERNSTEIN et al., 2011).

A 6-OHDA utiliza o mesmo mecanismo de transporte que as catecolaminas (DA, noradrenalina) (THOENEN e TRANZER, 1973); se acumulando no citoplasma dos neurônios e induzindo a neurotoxicidade seletiva para os neurônios catecolaminérgicos (PALLARES et al., 2007; YONG et al., 2011).

Como a 6-OHDA também apresenta semelhança estrutural com a noradrenalina, transportadores desta monoamina também podem captar a 6-OHDA, levando esses neurônios a morte. Como o objetivo em um modelo animal de DP é a morte de neurônios dopaminérgicos, geralmente se utiliza um fármaco que bloqueie os transportadores de noradrenalina, juntamente com a administração de 6-OHDA. Os fármacos mais utilizados para tal são os antidepressivos tricíclicos como: desipramina, nortriptilina e imipramina (SCHOBER, 2004; BOVE, SERRATS, 2005).

Para causar danos nos neurônios dopaminérgicos pela infusão intracerebral de 6-OHDA, microgramas desta neurotoxina podem ser injetadas uni ou bilateralmente na SNpc ou em outras áreas, então, conseqüentemente a isso, ocorre à morte dos neurônios dopaminérgicos. A determinação da intensidade da lesão nos neurônios dopaminérgicos pode ser feita através de análises histológicas ou através da determinação neuroquímica da quantidade residual de DA no tecido lesado, tais análises podem ser feitas em comparação com animais usados como controle, ou seja, não lesionados (SCHWARTING e HUSTON, 1996).

Segundo Cicchetti et al. (2002), a administração intraestriatal de 6-OHDA

promove um modelo de lesão nigroestriatal lenta, progressiva e retrógrada que muito se assemelha aos aspectos patogênicos da DP.

Na intenção de reproduzir modelos experimentais da DP, a 6-OHDA preferencialmente é injetada no corpo estriado, na SNpc ou no FPM, destruindo assim neurônios dopaminérgicos da SNpc e esgotando o corpo estriado de DA, reproduzindo assim as características fisiopatológicas responsáveis pelas deficiências motoras da DP. A degeneração induzida por injeções unilaterais de 6-OHDA produz um comportamento motor assimétrico e quantificável após indução pela administração sistêmica de agonistas dos receptores dopaminérgicos. Devido a isso se permite um controle fácil e confiável da extensão da lesão realizada e os potenciais benefícios de novos tratamentos (PRZEDBORSKI, LEVIVIER et al., 1995; SCHWARTING, HUSTON, 1996; BLUM, 2001).

Esta toxina pode ser utilizada tanto para realizar lesões unilaterais como bilaterais. Em lesões unilaterais, geralmente se administra uma maior quantidade de 6-OHDA na estrutura cerebral de interesse. O modelo unilateral é mais utilizado para realizar o teste de comportamento rotatório, sendo que por apresentar um hemisfério cerebral intacto, quando desafiados com agonistas dopaminérgicos (apomorfina) o animal tende a rodar contralateralmente a lesão e quando se administram fármacos liberadores de dopamina (anfetaminas) o animal roda ipsilateralmente (mesmo lado) a lesão. O modelo bilateral (injeção de 6-OHDA nos dois hemisférios) caracteriza um modelo mais fidedigno da doença. A DP acomete, geralmente, os dois hemisférios cerebrais, por esse motivo, através do modelo bilateral, podem ser avaliados os sintomas motores e cognitivos da doença através dos testes que avaliam o comportamento dos animais (TADAIESKY et al., 2008; GREGORIO et al., 2009; SANTIAGO et al., 2010)

A 6-OHDA é captada pelo neurônio através de transportadores, sofre oxidação semelhante à da DA e gera radicais livres (SCHOBER, 2004; BOVE, SERRATS et al., 2005).

Sachs e Jonsson (1975), Kumar et al. (1995), Soto-Otero et al. (2000) apud Pallares et al., (2007), sugerem que a 6-OHDA é capaz de promover auto-oxidação, rapidamente formando uma série de radicais livres, como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o ânion superóxido e radicais hidroxila. Portanto, o principal mecanismo da toxina é pelo envolvimento de um estresse oxidativo, levando a efeitos tóxicos seletivos sobre os neurônios dopaminérgicos, os quais são extremamente sensíveis

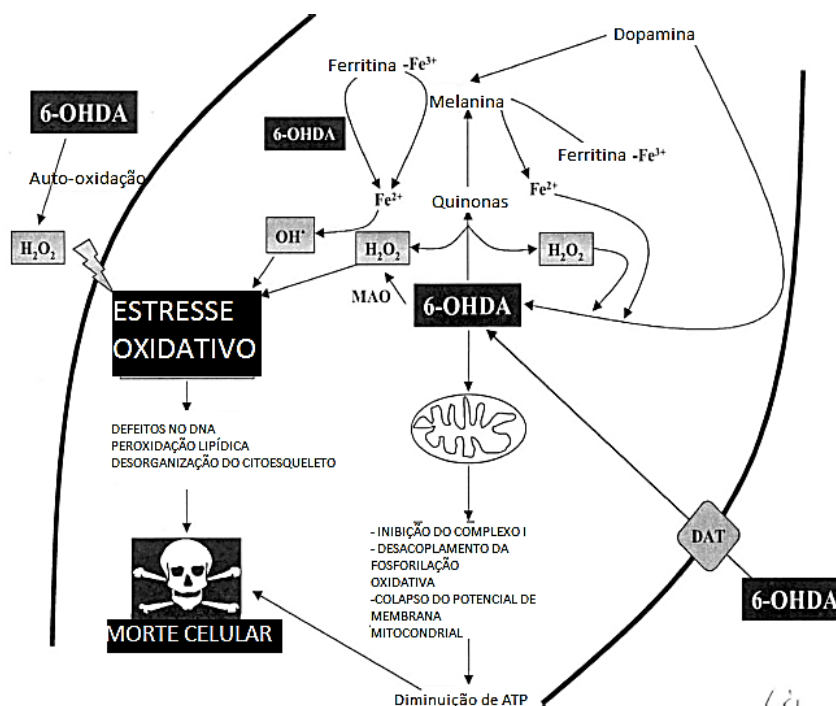
(BERNSTEIN et al., 2011).

De acordo com Gören (2009), a 6-OHDA aumenta a geração intracelular de radicais livres e inibe alguns mecanismos mitocondriais. Os efeitos tóxicos da 6-OHDA contribuem para a degeneração de neurônios produtores de DA e estimulam a liberação de superóxido e citocinas. As citocinas estimulam espécies reativas de oxigênio e a cicloxigenase 2 (COX-2) que por sua vez estimulam a produção de prostaglandinas, que podem exercer também um efeito tóxico direto em neurônios dopaminérgicos.

Além de lesionar os neurônios da SNpc pela indução da produção de H_2O_2 e radicais livres, participa da reação de Fenton, e é tóxica para o complexo I mitocondrial (UNGERSTEDT, ARBUTHNOTT, 1971; GERLACH, RIEDERER, 1996; BLUM et al., 2001; BETARBET et al., 2002). A 6-OHDA também pode induzir a ativação da micróglia (BOVE, SERRATS, 2005; MILLER, JAMES-KRACKE et al., 2009). A micróglia ativada promove a liberação de diversos mediadores inflamatórios (p.ex. NF- κ B, IL-1, IL-6, COX-2) responsáveis pela produção de radicais livres (MCGEER, MCGEER, 2004; HUNTER, DRAGICEVIC et al., 2007) e posterior morte neuronal.

A FIGURA 3 representa os prováveis mecanismos de lesão da 6-OHDA.

FIGURA 3: Prováveis mecanismos de morte neuronal pela 6-OHDA



FONTE: Adaptado de BLUM, 2001.

Apesar da 6-OHDA induzir o estresse oxidativo, outros aspectos da doença não são reproduzidos, tais como: precisão anatômica da lesão, tempo da doença. Mas mesmo assim esses modelos ajudam a trazer novas hipóteses para eventos moleculares que acontecem na DP (BLUM, 2001).

Com o uso deste modelo animal, pode-se estudar alterações neuroquímicas (FERRO et al., 2005; DA CUNHA et al., 2008; TADAIESKY et al., 2008; GREGORIO et al., 2009), motoras (DA CUNHA et al., 2008; GREGORIO et al., 2009), prejuízos de memória (DA CUNHA et al., 2007; TADAIESKY et al., 2008; DA CUNHA et al., 2009) e depressão (TADAIESKY et al., 2008) associadas à DP.

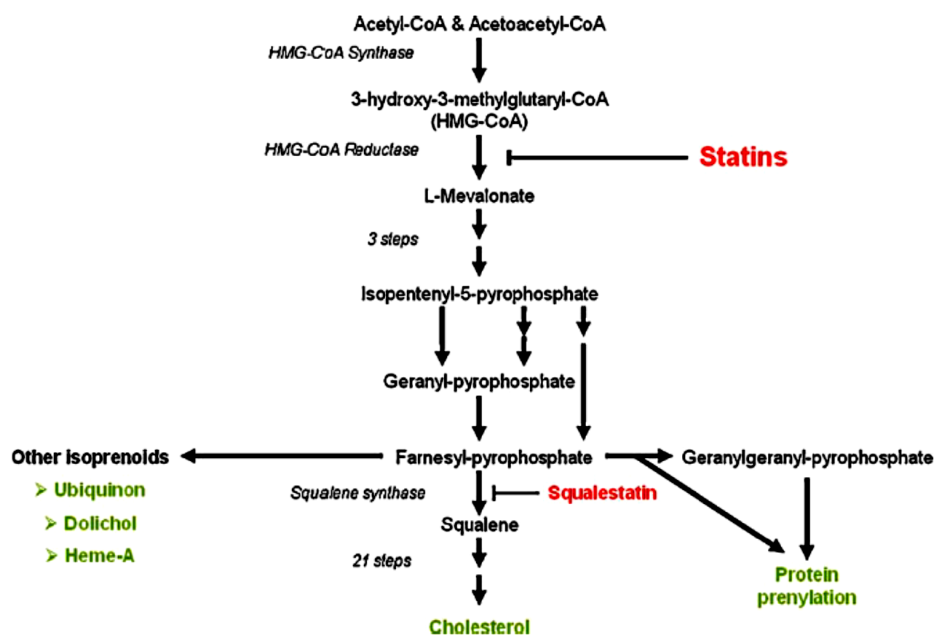
1.3 ESTATINAS

Atualmente nenhuma terapia eficaz está disponível para deter a progressão da DP, porém, trabalhos recentes sugerem que algumas estatinas tem a capacidade de modular a neurodegeneração devido a sua capacidade de atravessar potentemente a barreira hematoencefálica (BHE) (ROY e PAHAN, 2011), melhorar a função endotelial, diminuir o estresse oxidativo e a inflamação, inibir a resposta trombogênica e apresentar propriedades imunomodulatórias (SANTIAGO, HERNANDEZ-ROMERO et al., 2009, VAN DER MOST et al., 2009).

As estatinas são inibidoras da 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A redutase (HMG-CoA redutase), enzima necessária para a produção de L-mevalonato, produto intermediário para a síntese de colesterol. Portanto uma de suas principais aplicações é reduzir o colesterol e prevenir doenças cardíacas. Além dessas ações, pode ainda melhorar o fluxo sanguíneo, reduzir a coagulação, modular o sistema imune e reduzir danos oxidativos (VAN DER MOST et al., 2009; SANTIAGO, HERNANDEZ-ROMERO, 2009).

Além do uso clássico das estatinas, recentemente elas têm sido utilizadas com diversas outras implicações clínicas, como melhora do quadro cardiovascular (NAKAMURA et al., 2006), e melhora das condições clínicas do paciente pós acidente vascular encefálico (AVE) (OVBIAGELE et al., 2007), além de tratar quadros de esclerose múltipla (IFERGAN et al., 2006), traumatismo crânio-encefálico (WANG et al., 2007), doença de Alzheimer (LI et al., 2007).

FIGURA 4: Via de síntese do colesterol e ponto de ação das estatinas



FONTE: VAN DER MOST et al., 2009.

As estatinas pertencem a uma classe medicamentosa bem tolerada, possuindo poucos efeitos colaterais (VAN DER MOST et al., 2009, WANG et al., 2011). Diversos estudos têm investigado se o tratamento com estatinas pode ser benéfico para indivíduos com demência e doenças neurodegenerativas ou ainda com risco de desenvolver tais doenças, porém as conclusões ainda são incertas devido a resultados conflitantes (ZACCO et al., 2003, WOLOZIN et al., 2007, GOSH et al., 2009, ROY e PAHAN, 2011).

Para este estudo, duas estatinas são utilizadas: a sinvastatina, que conhecidamente possui um caráter lipofílico, portanto é capaz de atravessar a BHE, consequentemente, pode realizar seu efeito diretamente no SNC; e a pravastatina, uma estatina, assim como a sinvastatina, derivada de fungos, porém com menor lipossolubilidade quando comparada com a anterior.

Devido a essa característica e baseado em dados de um estudo de Van der Most et al. (2009), esta não é capaz de atravessar a BHE. Na TABELA 2 são apresentados os diferentes coeficientes de permeabilidade cerebrovascular de algumas estatinas.

TABELA 2: Coeficientes de permeabilidade cerebrovascular ($\mu\text{L}/\text{min}/\text{cm}^2$) através da BHE de ratos e da cultura de uma monocamada de células do endotélio cerebral de bovinos determinados pelo C^{14} – comparando as estatinas com a sacarose.

Composto	Permeabilidade a BHE do rato	Permeabilidade a monocamada do endotélio cerebral
Sacarose	$0,175 \pm 0,011$	n.a
Pravastatina	$0,178 \pm 0,021$	$0,0755 \pm 0,15$
Sinvastatina	$27,7 \pm 3,9$	$4,76 \pm 0,32$
Lovastatina	$57,9 \pm 9,6$	$8,32 \pm 0,47$
Sinvastatina (ácido)	$0,653 \pm 0,058$	$0,193 \pm 0,064$
Lovastatina (ácido)	$0,442 \pm 0,024$	$0,420 \pm 0,16$

FONTE: Dados adaptados de SAHEKI et al., 1994 *apud* VAN DER MOST et al., 2009.

n.a: não aplicado

Tal característica é interessante, pois um dos objetivos deste trabalho foi avaliar se o efeito neuroprotetor na DP é apenas um efeito central ou pode também ser um efeito periférico da ação desses fármacos.

Nenhuma diferença clínica nas propriedades neuroprotetoras foi relatada entre as estatinas lipofílicas e lipofóbicas (VAN DER MOST et al., 2009).

Acredita-se que a redução dos níveis de colesterol não seja o único efeito das estatinas no organismo. Segundo Wierzbicki et al. (2003), Liao e Laufs (2005), Van der Most et al. (2009), Gosh et al. (2009), Roy e Pahan (2011), há um outro mecanismo de ação das estatinas que tem um papel importante na sinalização celular.

O provável efeito de neuroproteção sobre o processo patológico na DP deve-se a diversos efeitos. O primeiro seria pela redução de danos oxidativos que ocorre pela diminuição da peroxidação de lipídios após privação de oxigênio e glicose, e da produção de espécies reativas de oxigênio (GOSH et al., 2009, VAN DER MOST et al., 2009, ROY e PAHAN, 2011).

Ou ainda, esse provável mecanismo neuroprotetor das estatinas também se daria pela supressão de moléculas pró-inflamatórias, como o fator de necrose tumoral ($\text{TNF-}\alpha$), óxido nítrico (NO) e superóxido, interleucina (IL)-1 β e IL-6 (SANTIAGO, HERNÁNDEZ-ROMERO et al., 2008, GOSH et al., 2009, ROY e PAHAN, 2011, WANG et al., 2011).

Outro possível efeito neuroprotetor das estatinas relaciona-se à capacidade de melhorar a função vascular, seja ou pela regulação da produção de óxido nítrico como pela inibição da coagulação (VAN DER MOST et al., 2009, ROY e PAHAN, 2011, WANG et al., 2011).

O NO age como uma molécula sinalizadora no sistema vascular. Localmente ele melhora o fluxo sanguíneo através de um aumento na resposta vasodilatadora. Esta molécula pode ser produzida por três enzimas: óxido nítrico sintase endotelial (eNOS), óxido nítrico sintase neuronal (nNOS) e pela forma induzível ou inflamatória expressa pelos macrófagos (iNOS).

Há um equilíbrio entre as atividades dessas diferentes enzimas. Numa situação isquêmica, por exemplo, a eNOS é ativada e exerce seu efeito protetor, que é em grande parte devido à vasodilatação. Porém, nos casos de superprodução de NO, ou seja, quando há um desequilíbrio entre a ação dessas enzimas, pode ocorrer o dano oxidativo.

As estatinas provavelmente agem explorando o que de melhor se pode aproveitar dessas enzimas. Inicialmente ela é capaz de aumentar a síntese de NO pela eNOS, que é um mecanismo benéfico para as células, enquanto também impede a superprodução de NO, reduzindo a atividade das iNOS (VAN DER MOST et al., 2009, ROY e PAHAN, 2011, WANG et al., 2011, KUMAR et al., 2012).

Além disso, as estatinas podem ser utilizadas também no tratamento de doenças inflamatórias. Inúmeros estudos sugerem que as estatinas possuem efeitos imunomodulatórios relevantes, e consequentemente podem ser usadas no tratamento de condições neuroinflamatórias (SANTIAGO, HERNANDEZ-ROMERO, 2009).

Não há ainda um mecanismo que explique como se dá a ação imunomodulatória das estatinas. Um dos primeiros mecanismos estudados e que se acredita que haja uma relação, é através da interferência no processo de apresentação do antígeno que resulta na redução da proliferação de linfócitos T (VAN DER MOST et al., 2009, KUMAR et al., 2012).

Agindo sobre os linfócitos T, as estatinas alteram sua característica fenotípica de forma que essas células reduzem a produção de citocinas pró-inflamatórias, e aumentam a secreção de citocinas anti-inflamatórias (VAN DER MOST et al., 2009, ROY e PAHAN, 2011).

Quanto à ação das estatinas nas células imunes do SNC, pouco foi discutido, mas sabe-se que o tratamento com as estatinas também consegue reduzir a ativação microglial, com isso, há uma menor geração de ROS.

Vários estímulos inflamatórios e degenerativos induzem a produção de ROS pela ativação de fosfato de nicotinamida adenina oxidase (NADPH). As estatinas têm a

capacidade de atenuar a geração de superóxido mediada pelo NADPH oxidase, diminuindo a formação de ROS (ROY e PAHAN, 2011).

As estatinas são capazes de inibir a função HMG-CoA redutase e assim inibir a agregação de metabólitos intermediários. Esses metabólitos, quando formados, são acoplados a transcrição de várias moléculas pró-inflamatórias através da via da proteína quinase ativada por mitógeno (MAP). Uma vez inibida a síntese de colesterol a partir do mevalonato pelas estatinas, a expressão de moléculas pró-inflamatórias é reduzida e também a produção de ROS é atenuada (ROY e PAHAN, 2011).

Além disso, por bloquearem a cadeia de síntese do colesterol, as estatinas também reduzem a produção de ROS pela NADPH. A proteína que estimula a eNOS é ativada pelo fosfatidilinositol (IP3). Coincidentemente, o mevalonato é capaz de inibir o IP3, portanto reduzindo a concentração do mevalonato. As estatinas provocam um *up-regulation* na produção de NO derivado de eNOS, causando vasodilatação (ROY e PAHAN, 2011).

Estudos mostram que as estatinas têm se mostrado úteis para suprimir a agregação de α -sinucleínas e assim impedir a morte neuronal (BAR-ON, 2008, SANTIAGO, HERNÁNDEZ-ROMERO et al., 2008, KUMAR et al., 2012, PREDIGER et al., 2013).

Experimentos *in vivo* mostram que o tratamento com estatinas, após danos cerebrais, aumenta a neurogênese e sinaptogênese, sem alterar os níveis séricos de colesterol. Esses dados só reforçam a ideia de que as estatinas podem induzir a neuroproteção em doenças neurodegenerativas promovendo a liberação de fatores neurotróficos (VAN DER MOST et al., 2009, PREDIGER et al. 2013).

Estudos mostram que é alta a concentração de metabólitos de colesterol oxidado em cérebros de pacientes com DP, sugerindo que o colesterol é provavelmente fator de risco para esta doença, portanto, o uso de inibidores deste lipídio mostra-se uma terapêutica em potencial (BAR-ON, 2008, GOSH et al., 2009, ROY e PAHAN, 2011, KUMAR et al., 2012).

Como descrito acima, nem todas as estatinas são capazes de atravessar a BHE, e aquelas que atravessam são em concentrações relativamente baixas. Tratamentos a curto prazo com as estatinas não alteram os índices de colesterol no cérebro. Comprovando isso, experimentos em ratos e cobaias demonstraram que uma alta dose de estatinas afeta a produção de colesterol no cérebro, mas não o conteúdo

cerebral de colesterol (BOTTI et al, 1991; LUTJOHANN et al., 2004; THELEN et al., 2006; FRANKE et al. ,2007; VAN DER MOST et al., 2009). Apenas o tratamento a longo prazo com as estatinas é capaz de reduzir os níveis do colesterol no cérebro (VAN DER MOST et al., 2009).

Sabe-se que doenças cardiovasculares, hipercolesterolemia, hipertensão e diabetes são importantes fatores de risco para o desenvolvimento de demência e doenças neurodegenerativas, e que medicamentos utilizados para tratar tais doenças estão associados, de acordo com estudos epidemiológicos, com a diminuição da demência nestes pacientes (WOLOZIN et al., 2007).

Em modelos animais de DP utilizando a 6-OHDA, as estatinas são capazes de reduzir a incidência de movimentos involuntários anormais (SCHUSTER et al., 2008, WANG et al., 2011).

O tratamento crônico com altas doses de estatinas induz um *up regulation* dos receptores D1 e D2 da DA e aumenta a expressão de eNOS no córtex pré-frontal de ratos (WANG et al, 2005).

Sabe-se que a excitotoxicidade mediada pelos receptores ionotrópicos do glutamato é uma forma bem documentada da causa da morte neuronal (SATTLER e TYMIANSKI, 2001, ZACCO et al., 2003). A superativação de receptores NMDA está associada com excitotoxicidade neuronal, culminando com a morte neuronal (WANG et al., 2004). Alterações nos receptores NMDA no cérebro estão envolvidas nas desordens do movimento e alterações neuropsiquiátricas (YAN et al, 2011).

Através da utilização de estatinas ocorre uma diminuição da quantidade de colesterol na membrana das células, e esta diminuição afeta principalmente os receptores NMDA. Por isso, acredita-se que o tratamento com estatinas consegue diminuir a concentração de colesterol no cérebro e consequentemente a inibição da enzima HMG-CoA redutase protege os neurônios da excitotoxicidade mediada pelos receptores NMDA (ZACCO et al., 2003).

Resumindo todos os possíveis efeitos das estatinas relacionados à neurodegeneração da DP, pode-se afirmar que elas reduzem a agregação de α -sinucleína e o estresse oxidativo, diminuem a expressão da COX-2, reduzem a liberação de TNF- α e do NF- κ B e causam um *upregulation* dos receptores D1 e D2 no cérebro (BECKER et al., 2009, WOOD et al., 2010, WANG et al., 2011, PREDIGER et al., 2013). E tais mecanismos podem estar envolvidos no efeito neuroprotetor associado à DP.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Estudar os efeitos neuroprotetores das estatinas no modelo animal de doença de Parkinson induzido pela administração intracerebral de 6-OHDA em ratos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar se o efeito das estatinas na doença de Parkinson acontece a nível central ou se esse efeito ocorre a nível periférico, pela diferença de solubilidade dos inibidores da HMG CoA-redutase utilizados neste estudo.
- Avaliar se as estatinas diminuem a lesão em neurônios dopaminérgicos da substância negra pars compacta pela administração intracerebral de 6-OHDA.
- Avaliar se as estatinas são capazes de restabelecer os níveis de dopamina no estriado em animais com lesão nos neurônios dopaminérgicos da substância negra pars compacta induzida pela administração intracerebral de 6-OHDA.
- Avaliar se as estatinas conseguem reverter/impedir as alterações motoras induzidas pela administração intracerebral unilateral de 6-OHDA.
- Avaliar se as estatinas são capazes de reverter/prevenir o prejuízo de aprendizado e memória em animais com lesão de neurônios dopaminérgicos da substância negra pars compacta induzida pela administração intracerebral bilateral de 6-OHDA.
- Avaliar se as estatinas conseguem reverter/prevenir a anedonia em animais com lesão de neurônios dopaminérgicos da substância negra pars compacta induzida pela administração intracerebral bilateral de 6-OHDA.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética no uso de animais para experimentação da UEPG (Processo CEUA- 010/2013, Protocolo UEPG-3593/2013). Os estudos foram realizados utilizando-se ratos Wistar machos, com três meses de idade e peso em torno de 300g, procedentes do biotério da UEPG mantidos em biotério climatizado ($22 \pm 2^\circ \text{C}$), com ciclo claro/escuro de 12 horas (ciclo claro inicia às 07h), com comida e água *ad libitum*.

Também foram utilizados ratos Wistar jovens (com um mês de idade) para realização do teste de reconhecimento social. Os animais foram divididos de acordo com os testes realizados.

Foram estudados grupos de animais controle sham-operados tratados com veículo, sham-operados tratados com sinvastatina e pravastatina na dose de 10 mg/kg, e animais com lesão na via nigroestriatal tratados com veículo, animais com lesão na via nigroestriatal tratados com sinvastatina e pravastatina na dose de 10 mg/kg. Os animais do grupo controle sham-operados foram submetidos a todos os procedimentos cirúrgicos dos animais lesados, exceto a injeção intracerebral de 6-OHDA.

Essa dose de 10 mg/kg das estatinas foi definida com base nos trabalhos de WANG et al. (2006), PIERMARTIRI et al. (2009), YAN et al. (2011), KUMAR et al. (2012) e PREDIGER et al. (2013).

Para os testes de preferência a sacarose, reconhecimento social, natação forçada e campo aberto, o N final de animais de acordo com os grupos foi:

SHAM+veículo N=10	6-OHDA+veículo N=9
SHAM+sinvastatina N=8	6-OHDA+sinvastatina N=10
SHAM+pravastatina N=9	6-OHDA+pravastatina N=10

Para o teste do comportamento rotatório induzido por apomorfina o N final de animais de acordo com os grupos foi:

SHAM+veículo N=9	6-OHDA+veículo N=9
SHAM+sinvastatina N=10	6-OHDA+sinvastatina N=10
SHAM+pravastatina N=10	6-OHDA+pravastatina N=9

3.2 TRATAMENTO

O tratamento consistiu na administração por via oral (gavagem) de sinvastatina 10mg/kg (genérico Sandoz) e pravastatina 10 mg/kg (genérico Ranbaxy) solubilizadas em soro fisiológico ou somente soro fisiológico (veículo) por 10 (dez) dias, sendo iniciado o tratamento 3 dias antes do procedimento cirúrgico até 7 dias após a cirurgia estereotáxica.

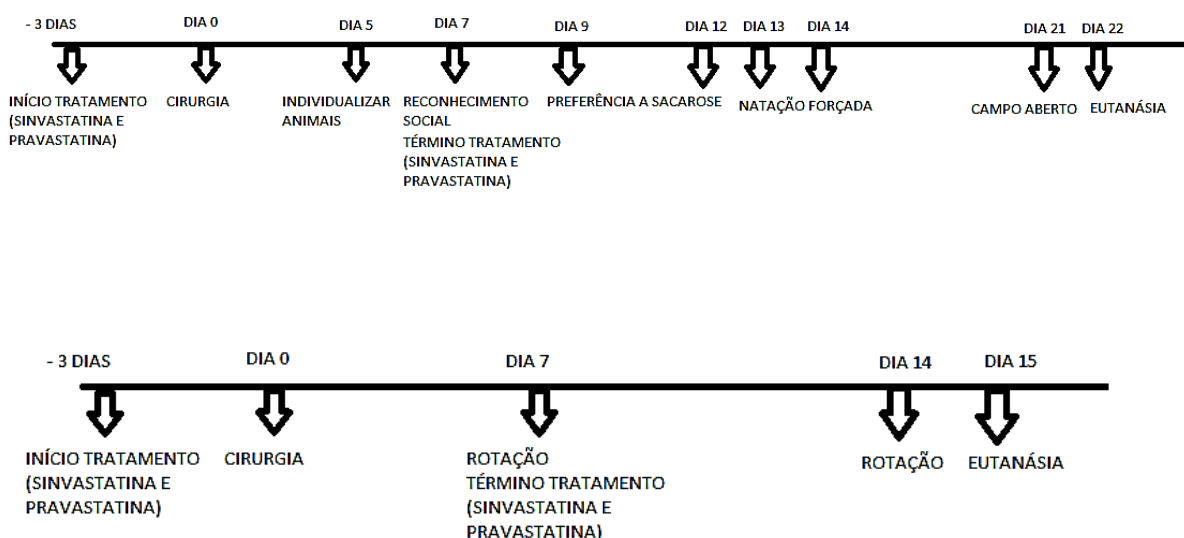
Para a solubilização dos comprimidos, estes foram triturados até a consistência de pó e em seguida armazenados sob as condições adequadas para utilização. O preparo das estatinas utilizadas era realizado diariamente conforme a necessidade, de acordo com o peso dos animais.

As escolha das doses das estatinas baseou-se nos resultados de trabalhos anteriores, em que na dose de 10 mg/kg já foi possível observar bons resultados comportamentais, e de acordo com os resultados de trabalhos mais relevantes da literatura utilizando essa mesma dose.

Foi escolhida essa forma de tratamento com o objetivo de compreender tanto a fase pré-cirúrgica como a fase pós-cirúrgica, na tentativa de prevenir a morte neuronal decorrente da administração de 6-OHDA.

A FIGURA 5 representa o protocolo experimental para as lesões uni e bilaterais.

FIGURA 5: Cronograma experimental para lesões uni e bilaterais



3.3 CIRURGIA ESTEREOTÁXICA

Todos os procedimentos de lesão da via nigroestriatal foram realizados através de cirurgia estereotáxica, para garantir a reprodutibilidade de localização das administrações de 6-OHDA no FPM.

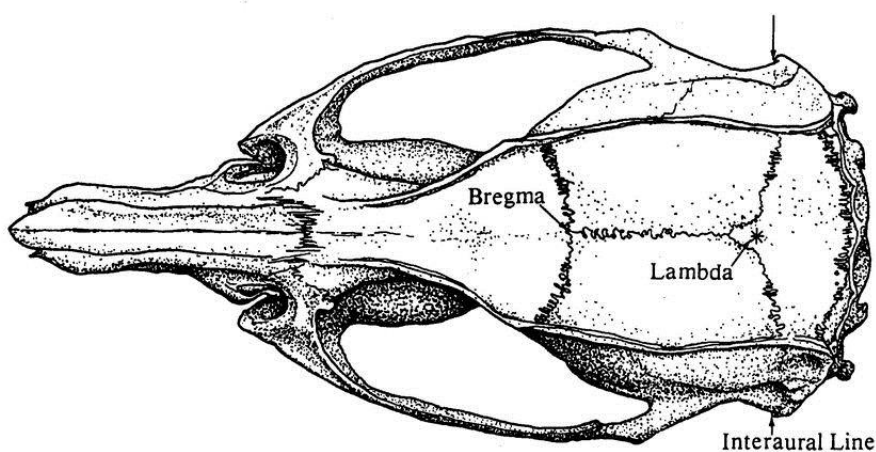
Foi administrada nortriptilina (10 mg/Kg), vinte minutos antes da cirurgia estereotáxica, para evitar a lesão de neurônios noradrenérgicos. Devido à similaridade estrutural entre as catecolaminas e a neurotoxina 6-OHDA, esta última pode ser internalizada pelos transportadores de noradrenalina para dentro dos neurônios noradrenérgicos causando sua morte, e o objetivo do estudo é lesionar apenas os neurônios dopaminérgicos.

Para a lesão na via nigroestriatal, os animais foram anestesiados com tiopental (50 mg/Kg) e tricotomizados. Em seguida foram corretamente fixados no aparelho estereotáxico.

Para fazer a antissepsia local, foi utilizado álcool iodado e em seguida foi administrado um anestésico local- lidocaína 0,2 mL com 2% de vasoconstritor via subcutânea (s.c.) logo abaixo da pele que recobre o crânio dos ratos.

Com auxílio de bisturi, a pele e a fáscia muscular que recobrem o crânio dos animais foram afastadas, o bregma (intersecção anterior das suturas cranianas) foi localizado e utilizado como ponto de referência para encontrar as coordenadas do FPM, sendo essas: anteroposterior (AP), - 0,19 cm do bregma; médio-lateral (ML) $\pm$ 0,19 cm da linha média; dorsoventral (DV), - 0,79 cm do crânio, adaptado de Paxinos e Watson (2005).

FIGURA 6: Ponto de intersecção entre as suturas sagital e coronal – o bregma



FONTE: PAXINOS e WATSON, 2005.

Com uma broca de baixa rotação, foram feitas perfurações nos crânios, e por elas foram inseridas agulhas e 4 µg por hemisfério cerebral (para administrações bilaterais) ou 8 µg (para administrações unilaterais) da toxina 6-OHDA, dissolvida em salina com 0,2% de ácido ascórbico, foram microinjetados no FPM, conforme procedimento descrito em trabalhos anteriores por DA CUNHA et al., 2008.

Durante a cirurgia, foi administrado bicarbonato de sódio via intraperitoneal (i.p.) (fármaco básico), para acelerar a excreção do tiopental (fármaco ácido) e evitar possíveis problemas cardiorrespiratórios no animal durante e após a cirurgia. Em seguida foi administrado Pentabiótico de uso veterinário, na dose de 1mg/kg por via intramuscular (i.m). O Pentabiótico é composto por: benzilpenicilina benzatina 3.000.000UI, benzilpenicilina procaína 1.500.000UI, benzilpenicilina potássica 1.500.000UI, diidroestreptomicina base (sulfato) 1.250 mg e estreptomicina base (sulfato) 1.250 mg. Essa combinação de antibióticos tem por finalidade ampliar o espectro anti-bacteriano e evitar o aparecimento de infecções decorrentes do procedimento cirúrgico.

3.4 TESTES COMPORTAMENTAIS

Os testes do reconhecimento social, preferência à sacarose, natação forçada e campo aberto foram realizados após lesão bilateral com 4 µg de 6-OHDA, enquanto que o teste do comportamento rotatório induzido pela apomorfina foi realizado após lesão unilateral com 8 µg de 6-OHDA, os dois tipos de lesão no FPM.

3.4.1 Teste de reconhecimento social

Passados cinco dias da cirurgia, os animais foram separados individualmente em cada caixa moradia, com livre acesso a água e ração. Os testes foram realizados após 2 dias da individualização para a habituação com o novo ambiente.

O experimento foi realizado utilizando o procedimento descrito por Dantzer e colaboradores (1987), e recentemente padronizado por Prediger e colaboradores (2003, 2005, 2006). Este modelo padronizado é válido para avaliar a memória de curta-duração.

Para este teste também foram utilizados ratos jovens (aproximadamente 1 mês de idade), que 30 minutos antes do início dos testes foram separados

individualmente em cada caixa.

Este teste consiste em duas apresentações sucessivas, de 5 minutos cada, separadas por um intervalo de tempo variável (30 minutos, neste caso). Na primeira apresentação, um animal jovem foi colocado na caixa do rato adulto, e o tempo de investigação/exploração (cheirar, lambe, aproximação, etc.) foi contado. Finalizados os primeiros 5 minutos, o rato jovem foi retirado da caixa do animal adulto, e voltou para a caixa onde estava anteriormente sozinho. Após 30 minutos de intervalo, aconteceu a segunda apresentação, executada da mesma maneira que a primeira.

Segundo Prediger et al. (2006), neste tipo de experimento, quando se utiliza um intervalo de tempo menor que 40 minutos entre as duas apresentações, o rato adulto é capaz de reconhecer o animal jovem com o qual foi previamente apresentado, verificando-se uma diminuição no tempo de exploração na segunda apresentação. Contudo, se esse intervalo entre as duas apresentações for superior a 40 minutos, o rato adulto perde a capacidade de reconhecimento, não sendo observada uma redução no tempo de exploração na segunda apresentação.

Para a interpretação dos resultados deste teste, o tempo gasto pelos animais nas duas investigações foi expresso como uma razão entre a segunda e primeira exposições (*Ratio of Investigation Duration – RID*). Um menor valor de RID significa uma diminuição do comportamento investigativo durante a segunda exposição, o que reflete a capacidade do animal adulto em reconhecer o animal jovem. A transformação desse dado foi escolhida como maneira para equilibrar as variações entre os diferentes ratos (PREDIGER et al., 2003).

3.4.2 Teste de preferência à sacarose

O consumo de sacarose é frequentemente usado como medida de anedonia em roedores (CRAFT, DEVRIES, 2006). Este teste foi realizado passados 9 (nove) dias da cirurgia, com os mesmos animais que foram individualizados no quinto dia pós-cirúrgico e mantidos assim até o 13º dia, e submetidos ao teste do reconhecimento social.

Numa fase de adaptação, dois bebedouros com água foram ofertados aos animais por 24 horas, para que os mesmos se habituassem a beber água de ambos. Após essas 24 horas de adaptação, um dos bebedouros com água foi substituído por uma solução de sacarose a 0,8%, como descrito em estudos anteriores por

Slattery, Markou et al. (2007). Vinte e quatro horas depois, os bebedouros foram trocados de lado na caixa do animal, para evitar um efeito de perseverança, ou seja, evitar que o animal beba de apenas um dos bebedouros.

Esse teste acontece em 48 horas visando minimizar os efeitos de neofobia e perseverança a algum local ou lado da caixa. O consumo de água e de sacarose foi avaliado simultaneamente nos grupos SHAM e 6-OHDA, através da pesagem dos bebedouros antes e depois dos testes.

3.4.3 Teste de natação forçada modificada

O modelo de teste de natação forçada que foi utilizado é o teste modificado por Porsolt e colaboradores (1978).

Após 14 dias da cirurgia e uma vez reagrupados nas caixas-moradias, os animais foram colocados em um cilindro plástico opaco (20 cm de diâmetro e 50 cm de altura, com água a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ até 30 cm), durante 15 minutos para um pré-teste ou sessão treino. Vinte e quatro horas após o treinamento os animais foram submetidos ao teste por 5 minutos. A sessão teste foi filmada e gravada por uma câmera posicionada acima do cilindro para análise posterior.

Os comportamentos de imobilidade (tempo que o animal permanece parado apenas flutuando na água ou fazendo apenas os mínimos movimentos necessários para manter a cabeça fora da água), de natação (tempo que o animal permanece realizando movimentos de natação circular no cilindro) e de escalada (tempo que o animal permanece realizando movimentos verticais das patas dianteiras na parede do cilindro) foram quantificados durante esses 5 minutos de teste.

Após a sessão treino e teste, os animais foram secos e colocados em um ambiente aquecido por 2 horas, antes de retornar a caixa moradia. A água do cilindro foi trocada entre cada animal.

3.4.4 Campo aberto

O principal objetivo do teste de campo aberto é verificar o comportamento exploratório do animal, sendo que o mesmo também pode ser utilizado para avaliar ansiedade.

Esse teste é importante para observar se existe alteração motora nos

animais, decorrentes da injeção bilateral de 6-OHDA. Após realização do teste de natação forçada, no 21º dia após a cirurgia, os animais foram submetidos ao teste de campo aberto.

Para tal, utiliza-se uma caixa feita de madeira e fórmica, com um chão de cor branca (100 x 100 cm), dividido em 25 quadrantes de 20 x 20 cm, com paredes de 40 cm de altura. Durante os experimentos, cada rato foi colocado no centro do campo aberto e mantido sob observação por 5 minutos. O número de quadrantes cruzados, atos de levantar e auto-limpezas foram registrados. O aparelho foi construído de acordo com o sugerido por BROADHURST (1960).

3.4.5 Comportamento rotatório induzido pela apomorfina

Uma das propostas de reproduzir as características da DP *in vivo* foi feita por Ungerstedt, em 1968, no qual ele propõe que ratos com lesão unilateral na SNpc induzida pela infusão intracerebral de uma neurotoxina, neste caso a 6-OHDA, apresentariam um comportamento rotatório quando expostos a drogas dopaminérgicas, tal proposta pode ser usada como modelo animal da DP (Da CUNHA et al., 2008).

Desde então este modelo tem sido um dos mais populares na pesquisa de drogas para o tratamento da DP (Da CUNHA et al., 2008).

A 6-OHDA injetada unilateralmente, constitui um modelo de hemiparkinsonismo, que é caracterizado por um comportamento motor assimétrico após a administração de drogas dopaminérgicas, devido a um desequilíbrio fisiológico entre o lado lesado e não-lesado, sendo que o lado não-lesado atua como controle interno (BETARBET et al., 2002).

Sete e quatorze dias após a cirurgia, os animais foram submetidos aos testes de rotação. O comportamento rotatório dos animais com lesão unilateral na SNpc foi observado em um recipiente cilíndrico, cujas rotações ipsilaterais e contralaterais foram contadas por 60 minutos, após a administração subcutânea (s.c.) de um agonista dopaminérgico, a apomorfina (1,0 mg/kg), conforme descritos em trabalhos anteriores por Da Cunha et al. (2008).

As rotações no mesmo sentido da lesão da substância negra foram chamadas de ipsilaterais e para o lado contrário foram chamadas de contralaterais.

O experimento foi filmado através de uma câmera situada sobre o cilindro, e

somente depois, analisadas e quantificadas as rotações. Buscou-se sempre confrontar um animal experimental com um animal controle. A ordem de entrada nas sessões de comportamento rotatório foi obtida mediante sorteio.

3.5 IMUNODETECÇÃO DE PROTEÍNAS (WESTERN BLOT)

Os resultados desta análise apresentados neste trabalho referem-se aos animais lesionados bilateralmente pela 6-OHDA (4 µg).

Após a decapitação dos animais, seus cérebros foram removidos e dissecados sobre uma placa de Petri cercada de gelo (tentativa de reduzir possíveis perdas proteicas nas estruturas coletadas). Foram coletados os estriados que em seguida foram armazenados em freezer a -80°C até a sua análise.

As amostras foram preparadas segundo Oliveira et al. (2008). Os tecidos estriatais foram homogeneizados mecanicamente em 400 µL de tampão de homogeneização (Tris 50 mM pH 7,0, EDTA 1 mM, fluoreto de sódio 100 mM, PMSF 0,1 mM, Na₃VO₄ 2 mM, Triton X-100 1%, glicerol 10% e Cocktail inibidor de proteases 1%). Os lisados foram centrifugados (10.000 x g por 10 min, a 4°C) para a eliminação de restos celulares, e o sobrenadante (300 µl) diluído 1/1 (v/v) em solução (Tris 100 mM pH 6,8, EDTA 4mM, SDS 8%) e aquecidos a 100°C por 5 min. Após homogeneização, uma alíquota foi retirada para a dosagem de proteínas. Em seguida adicionou-se numa proporção de 25:100 (v/v) a solução de diluição de amostra (glicerol 40%, Tris 25mM e azul de bromofenol, pH 6,8).

O teor protéico foi estimado através do método descrito por Peterson (1977) e a concentração protéica estimada a partir de uma curva padrão de soro albumina bovina. As proteínas (40 µg de proteína total/poço) foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida (concentração 12% de acrilamida) contendo SDS (SDS-PAGE) e gel de entrada com 4% de acrilamida. A seguir, as proteínas foram transferidas para as membranas de nitro-celulose. Para verificar a eficiência do processo de transferência, as membranas foram coradas com Ponceau 0,5% em ácido acético 1%.

Após este processo, as membranas foram bloqueadas durante 1 hora com leite em pó desnatado 5% TBS (Tris 10 mM, NaCl 150 mM, pH 7,5). O imunconteúdo de Tirosina Hidroxilase e β-actina foi detectada com o uso de anticorpos específicos diluídos em TBS-T contendo soroalbumina bovina (Tris 10

mM, NaCl 150 mM, Tween- 20 0,05%, BSA 2%, pH 7,5) na diluição 1:5000 e 1:10000, respectivamente. As membranas ficaram incubadas com o anticorpo de interesse para tirosina-hidroxilase *overnight* a 4°C em agitação constante. No dia seguinte, para a detecção dos complexos imunes, as membranas foram incubadas por 1 hora com anticorpo secundário conjugado com peroxidase (1:5000) e a imunorreatividade das bandas foi revelada por quimioluminescência com o reagente LumiGLO® (Cell Signaling, Beverly, MA, EUA) segundo especificações do fabricante.

Todas as etapas de bloqueio e incubação foram seguidas por três lavagens (5 minutos cada) das membranas com TBS-T. A densidade óptica (DO) das bandas foi quantificada usando ScionImage software® (Frederick, MD, EUA). O imunocconteúdo tirosina hidroxilase foi determinado pela relação entre a DO dessa proteínas/DO da β -actina respectiva. Os dados foram expressos como porcentagem em relação ao controle.

3.6 DOSAGEM DE COLESTEROL TOTAL, TRIGLICERÍDEOS, HDL, LDL

Após decapitação dos animais, o sangue foi coletado em tubos heparinizados (4 μ L), centrifugados (2500 rpm por 10 min, 10°C). O sobrenadante/soro foi separado e armazenado em freezer (-20°C) até a análise.

As amostras foram processadas no aparelho Chemistry Analyzer Selectra JR (Siemens).

A metodologia de análise para colesterol total foi seguida de acordo com o determinado pelo fabricante dos reagentes (Kovalent). O método é um teste fotométrico enzimático, em que a determinação do colesterol acontece após hidrólise e oxidação enzimática. O indicador colorimétrico é uma quinonimina que é gerada a partir da 4-aminoantipirina e fenol pelo peróxido de hidrogênio sob ação catalítica da peroxidase (reação de Trinder) (ARTISS et al., 1983; RIFAI et al., 1999).

Para a análise dos triglicérides a metodologia também foi de acordo com a determinação do fabricante. O método é um teste colorimétrico enzimático, utilizando glicerol-3-fosfato-oxidase que determina o nível de triglicerídeos no plasma após o rompimento enzimático com lipoproteína lipase. O restante da reação colorimétrica é o mesmo para a dosagem de colesterol total.

Há quatro classes de lipoproteínas: lipoproteínas de alta densidade (HDL), lipoproteínas de baixa densidade (LDL), lipoproteínas de densidade muito baixa (VLDL) e quilomicrons. Enquanto o LDL está envolvido no transporte de colesterol para as células periféricas o HDL é responsável pelo transporte reverso das células para o fígado (WIEBE et al., 1997; RIFAI et al., 1999).

A metodologia para a análise do HDL se dá através de uma reação antígeno-anticorpo. Anticorpos β -lipoproteína humana formam complexos com LDL, VLDL e quilomicrons de forma que apenas o HDL reaja enzimaticamente com o colesterol oxidase e colesterol esterase gerando peróxido de hidrogênio e este ao reagir com F-DAOS e 4-aminoantipirina sob ação catalítica da peroxidase, forma um complexo azul e a intensidade da coloração é usada para quantificar o HDL (WIEBE et al., 1997; RIFAI et al., 1999).

O LDL é calculado a partir da equação de Friedewald, representada pela FIGURA 7 (FRIEDEWALD et al., 1972).

FIGURA 7: EQUAÇÃO DE FRIEDEWALD

$$\text{LDL colesterol mg/dL} = \text{Colesterol total} - \text{HDL colesterol} \left(\frac{\text{Triglicerídeos}}{5} \right)$$

FONTE: FRIEDEWALD et al., 1972

3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram expressos como a média $\pm$ erro padrão da média (e.p.m.). Os resultados foram analisados por análise de variância (ANOVA) de duas vias, sendo avaliadas as variáveis pré-tratamento (tratamento com veículo, sinvastatina e pravastatina), tratamento (após administração de soro fisiológico ou 6-OHDA no FPM) e a interação entre ambas.

Os dados foram analisados com objetivo de avaliar o comportamento após a lesão dopaminérgica, bem como analisar alguma influência que o tratamento possa ter causado nos animais sem lesão. Posteriormente, os grupos foram comparados entre si empregando-se o teste *post-hoc* de Newman-Keuls.

A probabilidade aceita como indicativo da existência de diferença

estatisticamente significativa foi $p < 0,05$. Todas as comparações estatísticas foram efetuadas utilizando-se o software *Statistic 5.0*.

4 RESULTADOS

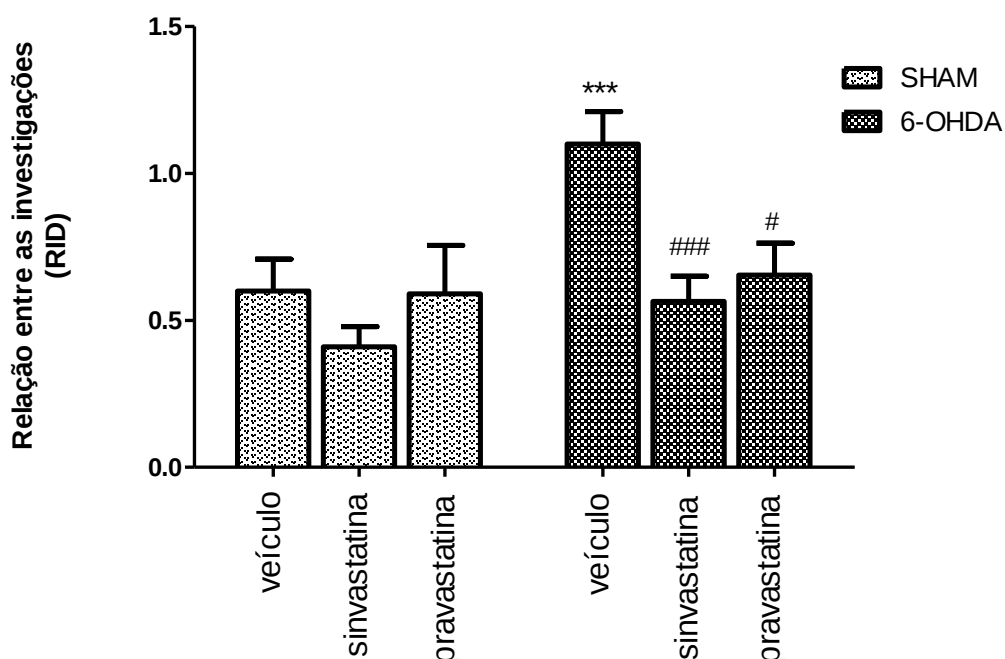
Todos os testes comportamentais foram realizados com 60 animais, divididos em dois subgrupos de 30 animais realizados em tempos diferentes.

4.1 TESTE DE RECONHECIMENTO SOCIAL

A FIGURA 8 apresenta os efeitos do pré-tratamento com veículo, sinvastatina (10 mg/kg) e pravastatina (10 mg/kg) e do tratamento intracerebral com 6-OHDA bilateralmente (4 µg em cada hemisfério) sobre o desempenho dos animais no teste do reconhecimento social, quando se apresentou um rato jovem em ambas as investigações.

Pela ANOVA de duas vias é possível observar um efeito significativo no pré-tratamento [$F(2,51)=5,51$; $p\leq 0,001$], e na interação entre o pré-tratamento e o tratamento [$F(1,51)=8,41$; $p\leq 0,001$].

FIGURA 8: Relação entre a primeira e segunda investigação dos grupos SHAM e 6-OHDA tratados com veículo, sinvastatina (10 mg/kg) e pravastatina (10 mg/kg), sete dias após cirurgia bilateral. *** $p\leq 0,001$ grupo 6-OHDA+veículo comparado com o grupo SHAM+veículo, ### $p\leq 0,001$ comparado com o grupo 6-OHDA+veículo, # $p\leq 0,05$ comparado com o grupo 6-OHDA+veículo (ANOVA de duas, seguido de teste post hoc de Newman-Keuls).



O grupo 6-OHDA+veículo apresentou um valor maior de RID do que o grupo

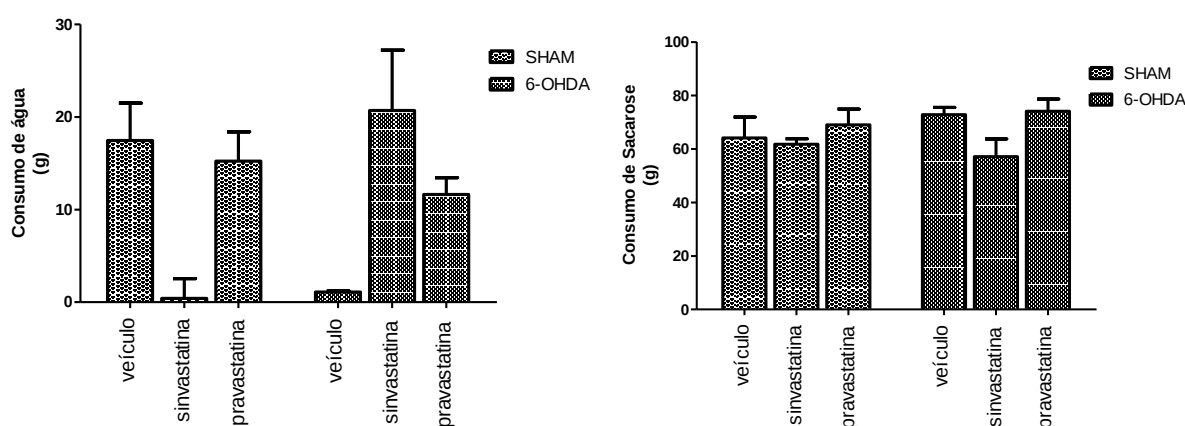
SHAM+veículo ($p \leq 0,001$, ANOVA de duas vias seguido de teste post hoc de Newman-Keuls). Já os grupos 6-OHDA+sinvastatina e 6-OHDA+pravastatina apresentaram diferenças significativas entre os tempos de investigações quando comparados com o grupo 6-OHDA+veículo (### $p \leq 0,001$ comparado com o grupo 6-OHDA+veículo, # $p \leq 0,05$ comparado com o grupo 6-OHDA+veículo (ANOVA de duas, seguido de teste post hoc de Newman-Keuls, respectivamente)).

4.2 TESTE DE PREFERÊNCIA À SACAROSE

Conforme observado na FIGURA 9 não houve diferença significativa no consumo de água e sacarose após pré-tratamento com veículo, sinvastatina (10 mg/kg) e pravastatina (10 mg/kg) e do tratamento intracerebral com 6-OHDA bilateralmente (4 μ g em cada hemisfério) sobre o desempenho dos animais no teste da preferência à sacarose.

Pela ANOVA de duas vias não foram encontradas diferenças significativas no fator pré-tratamento [$F(2,51)=1,83$; $p=0,49$]; nem no fator tratamento [$F(1,51)=0,75$; $p=0,38$], e nem na interação entre esses dois fatores [$F(2,51)=0,98$; $p=0,89$].

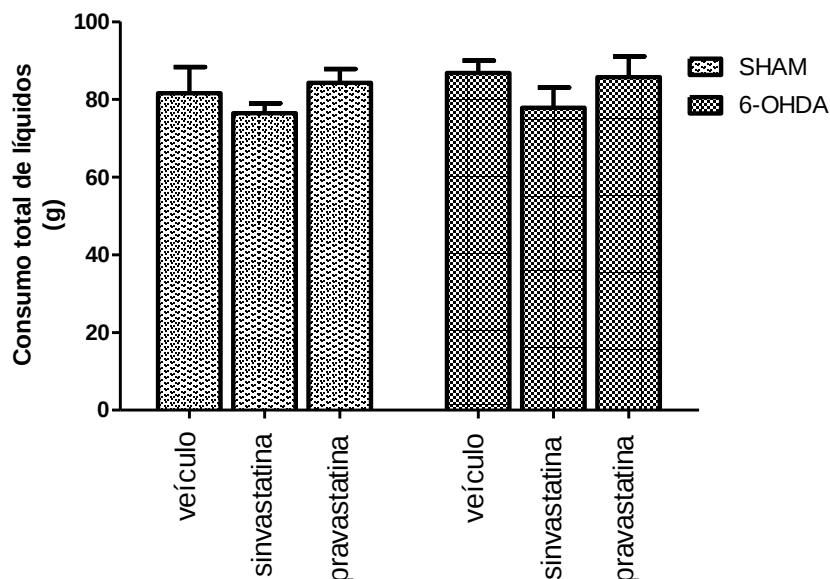
FIGURA 9: Consumo de água e sacarose dos grupos SHAM e 6-OHDA tratados com veículo, sinvastatina (10 mg/kg) e pravastatina 10 mg/kg, dez dias após cirurgia bilateral. Não houve diferença estatística entre os grupos $p > 0,05$ (ANOVA de duas vias).



Pela FIGURA 10 é possível observar que também não houve diferença significativa no consumo total de líquidos após pré-tratamento com veículo, sinvastatina (10 mg/kg) e pravastatina (10 mg/kg) e do tratamento intracerebral com 6-OHDA bilateralmente (4 μ g em cada hemisfério) sobre o desempenho dos animais

no teste da preferência à sacarose.

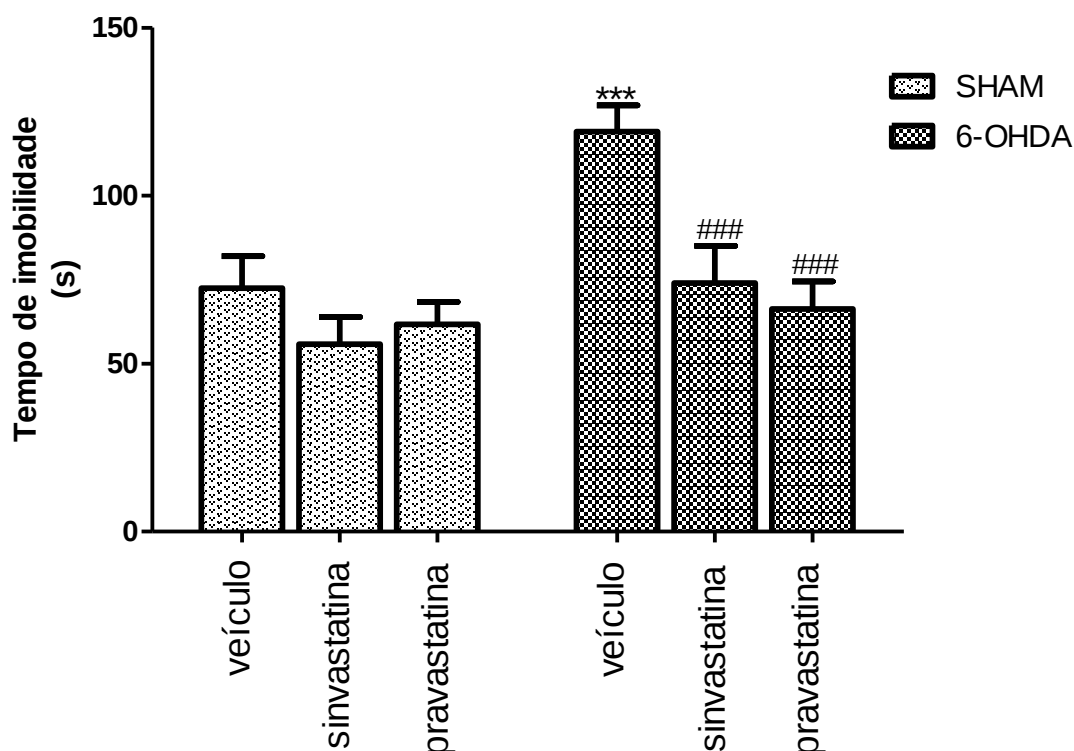
FIGURA 10: Consumo total de líquidos dos grupos SHAM e 6-OHDA tratados com veículo, sinvastatina (10 mg/kg) e pravastatina 10 mg/kg, dez dias após cirurgia bilateral. Não houve diferença estatística entre os grupos $p>0,05$ (ANOVA de duas vias).



4.3 TESTE DE NATAÇÃO FORÇADA MODIFICADO

Como parâmetro indicativo para o comportamento tipo depressivo nesse teste foi utilizado o tempo de imobilidade dos animais durante os 5 minutos da sessão de teste. A análise através de ANOVA de duas vias deste parâmetro revelou diferenças significativas entre os grupos experimentais tanto no pré-tratamento [$F(6,98)=4,37$; $p\leq 0,001$] como no tratamento [$F(3,49)=4,75$; $p\leq 0,001$], conforme pode ser visto na FIGURA 11.

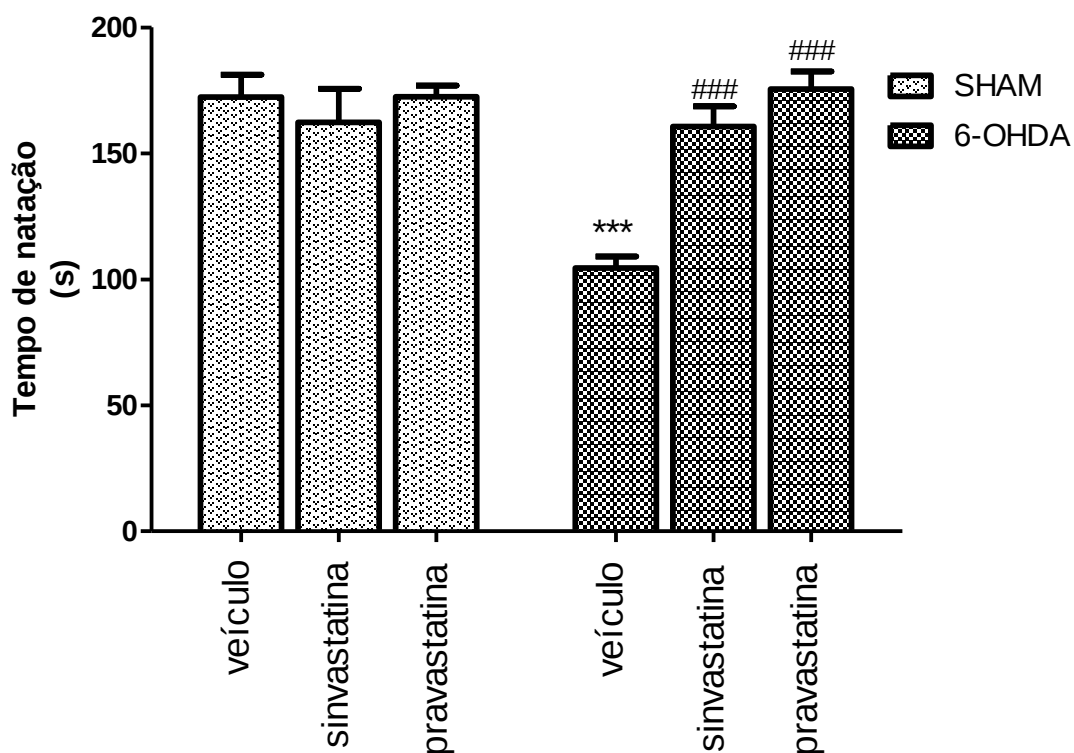
FIGURA 11: Avaliação do tempo de imobilidade dos grupos SHAM e 6-OHDA tratados com veículo, sinvastatina e pravastatina na dose de 10 mg/kg, 14 dias após cirurgia bilateral, ** $p \leq 0,001$ comparado com o grupo SHAM+veículo, ## $p \leq 0,001$ comparado com o grupo 6-OHDA+veículo, (ANOVA de duas vias, seguido de teste post hoc de Newman-Keuls).



Esses resultados indicam que os animais do grupo 6-OHDA+veículo apresentaram um tempo de imobilidade maior quando comparado com o grupo SHAM+veículo ($p \leq 0,001$, ANOVA de duas vias seguido de teste post hoc de Newmann Keuls). E quando os animais do grupo 6-OHDA foram tratados com sinvastatina e pravastatina na dose de 10 mg/kg houve uma redução no tempo de imobilidade, quando comparados aos animais do grupo 6-OHDA+veículo, conforme pode ser observado na figura acima.

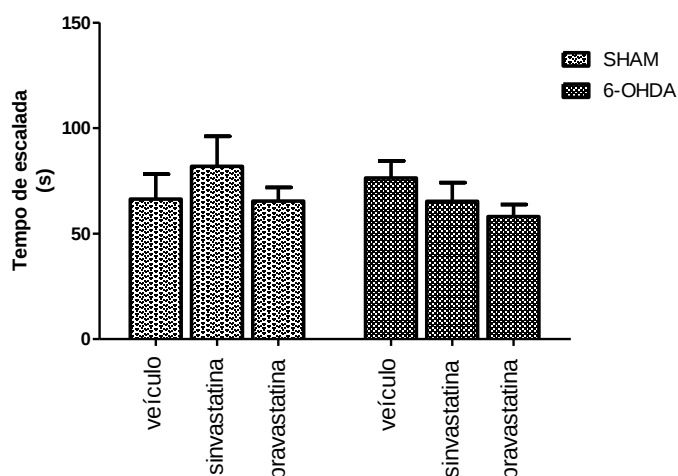
Quanto ao tempo de natação, também foram encontradas diferenças significativas no pré-tratamento e tratamento. Os animais do grupo 6-OHDA+veículo apresentaram uma redução no tempo de natação quando comparados com o grupo SHAM+veículo ($p \leq 0,001$, ANOVA de duas vias seguido de teste post hoc de Newmann Keuls). Esta redução foi revertida com o tratamento com sinvastatina e pravastatina na dose de 10 mg/kg, conforme demonstrado na FIGURA 12.

FIGURA 12: Avaliação do tempo de natação dos grupos SHAM e 6-OHDA tratados com veículo, sinvastatina e pravastatina na dose de 10 mg/kg, 14 dias após cirurgia bilateral, *** $p \leq 0,001$ comparado com o grupo SHAM+veículo, ### $p \leq 0,001$ comparado com o grupo 6-OHDA+veículo, (ANOVA de duas vias, seguido de teste post hoc de Newman-Keuls).



Em relação ao tempo de escalada não foram observadas diferenças significativas entre nenhum dos fatores analisados (pré-tratamento, tratamento e na interação entre eles), conforme pode ser visto na FIGURA 13.

FIGURA 13: Avaliação do tempo de escalada dos grupos SHAM e 6-OHDA tratados com veículo, sinvastatina e pravastatina na dose de 10 mg/kg, 14 dias após cirurgia bilateral. Não houve diferença estatística entre os grupos $p > 0,05$ (ANOVA de duas vias).

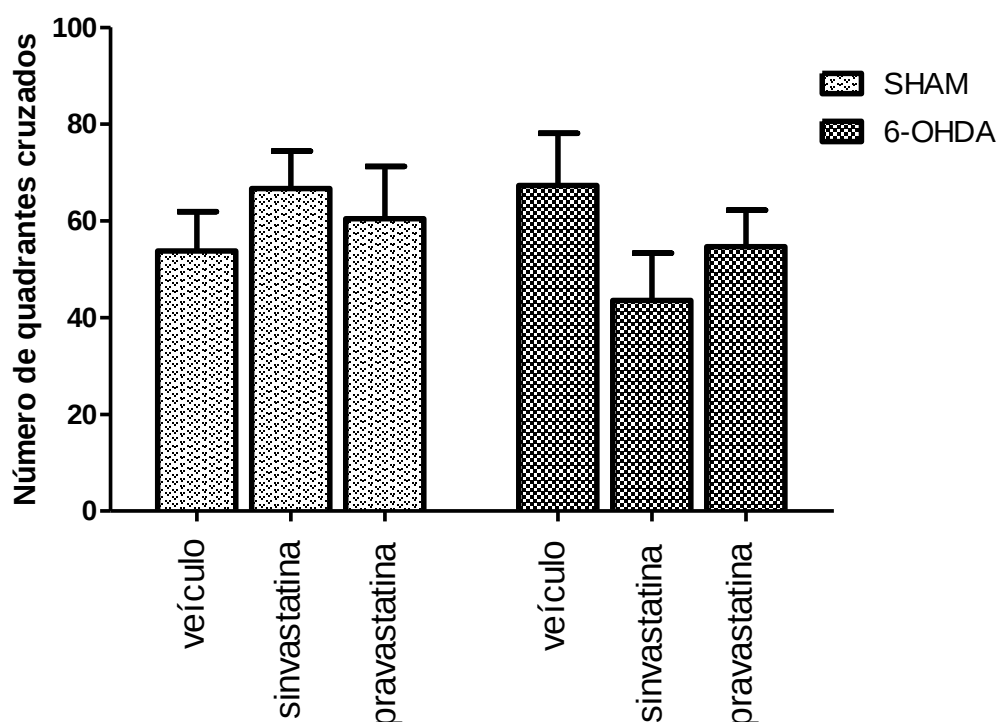


4.4 CAMPO ABERTO

No teste do campo aberto, foram avaliados os números de quadrantes cruzados pelo animal, número de levantadas, número de auto-limpezas e número de bolos fecais, sendo os resultados destas duas últimas observações não foram apresentados.

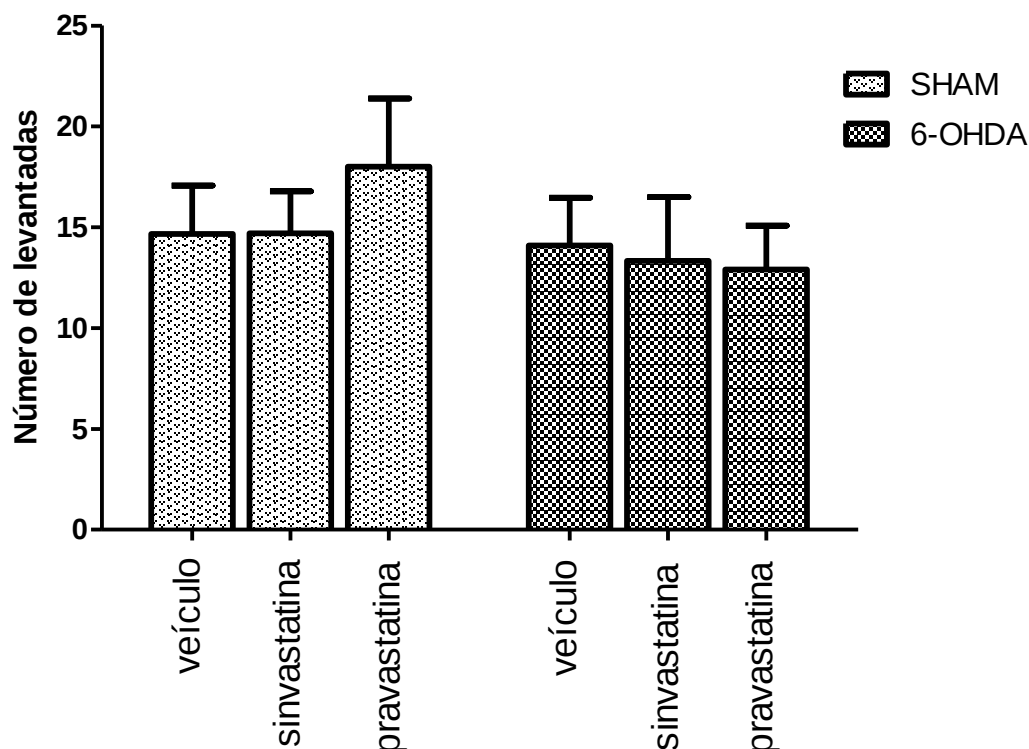
De acordo com a FIGURA 14, em relação ao número de quadrantes cruzados, não foram observadas diferenças estatísticas significativas no pré-tratamento [$F(2,51)=0,18$; $p<0,83$], no tratamento [$F(1,51)=0,86$; $p<0,35$], e nem na interação entre os fatores pré-tratamento e tratamento [$F(2,51)=2,08$; $p<0,13$].

FIGURA 14: Número de quadrantes cruzados dos grupos SHAM e 6-OHDA tratados com veículo, sinvastatina e pravastatina na dose de 10 mg/kg, 21 dias após cirurgia bilateral. Não houve diferença estatística entre os grupos $p>0,05$ (ANOVA de duas vias).



Resultados semelhantes ao número de quadrantes cruzados foram obtidos através da análise do número de levantadas, no fator pré-tratamento [$F(2,51)=0,11$; $p<0,89$], no tratamento [$F(1,51)=1,05$; $p<0,31$], e na interação entre os fatores [$F(2,51)=0,34$; $p<0,71$], não sendo observada diferença significativa entre os grupos, conforme representado na FIGURA 15.

FIGURA 15: Número de levantadas dos grupos SHAM e 6-OHDA tratados com veículo, sinvastatina e pravastatina na dose de 10 mg/kg, 21 dias após cirurgia bilateral. Não houve diferença estatística entre os grupos $p>0,05$ (ANOVA de uma via).



Os parâmetros auto-limpeza e número de bolos fecais também foram avaliados, porém não foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos.

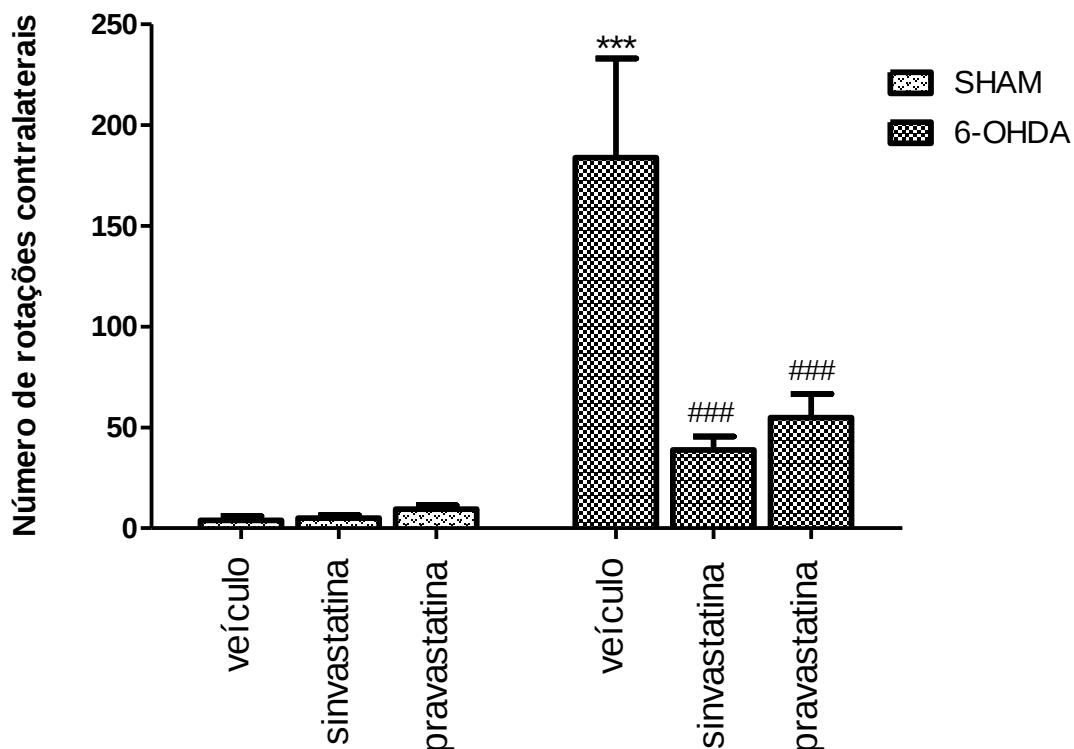
4.5 COMPORTAMENTO ROTATÓRIO INDUZIDO PELA APORMOFINA

Pela análise do comportamento rotatório, os animais dos grupos 6-OHDA+sinvastatina e 6-OHDA+pravastatina apresentaram um número de rotações contralaterais menor do que os animais do grupo 6-OHDA+veículo.

De acordo com o fator pré-tratamento houve diferença significativa entre o tratamento com as estatinas e veículo [$F(2,50)=7,38$; $p\leq 0,001$]. Com relação ao fator tratamento (6-OHDA ou salina) também foram encontradas diferenças significativas [$F(1,50)=27,08$; $p\leq 0,001$]. E na associação entre esses fatores também houve diferença estatisticamente significativa [$F(2,50)=8,05$; $p\leq 0,001$], no sétimo dia após a cirurgia.

Na FIGURA 16 estão representados os dados do comportamento rotatório contralateral dos animais no sétimo dia após a cirurgia.

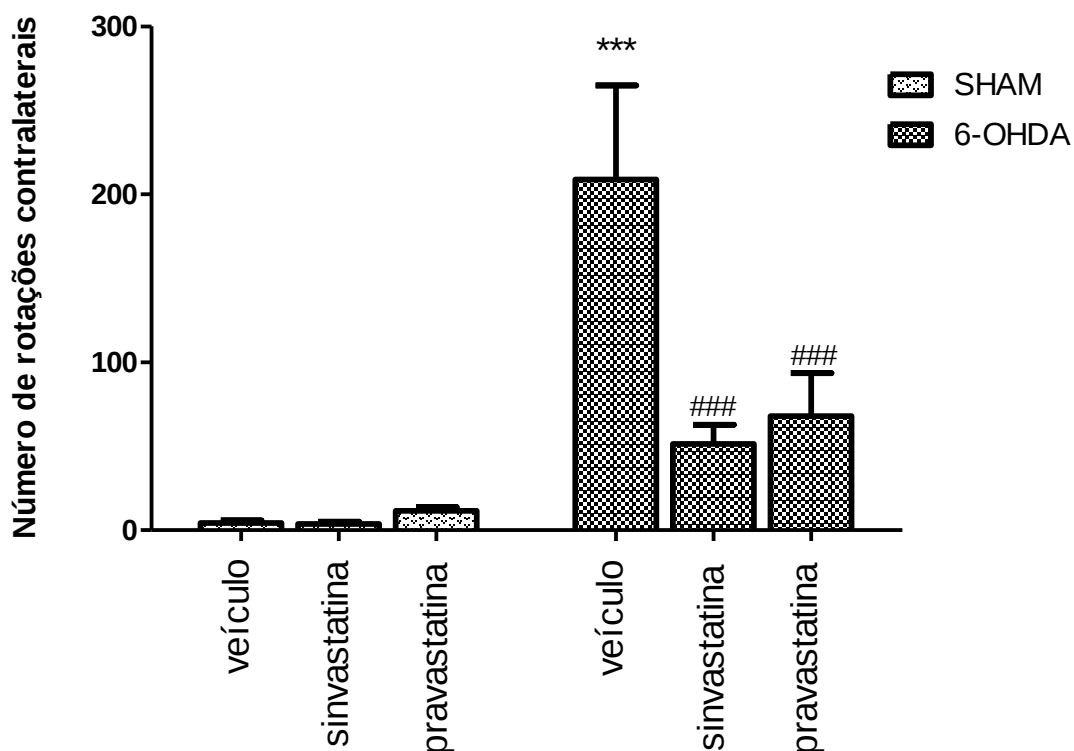
FIGURA 16: Número de rotações contralaterais no 7º dia após cirurgia unilateral induzidas pela apomorfina (1 mg/kg, s.c.) nos grupos SHAM e 6-OHDA tratados com veículo, sinvastatina e pravastatina na dose de 10 mg/kg. *** $p \leq 0,001$ comparado com o grupo SHAM+veículo, ### $p \leq 0,001$ comparado com o grupo 6-OHDA+veículo (ANOVA de duas vias, seguido de teste post-hoc de Newman Keuls).



Os resultados para o comportamento rotatório do 14º dia após a cirurgia foram bem semelhantes aos do 7º dia. A FIGURA 17 representa os resultados do comportamento rotatório dos grupos do 14º depois da cirurgia.

Foram observadas diferenças significativas nos fatores pré-tratamento [$F(2,50)=5,74$; $p \leq 0,001$], tratamento [$F(1,50)=25,04$; $p \leq 0,001$], e na interação entre esses fatores [$F(2,50)=6,18$; $p \leq 0,001$], no décimo quarto dia após a cirurgia.

FIGURA 17: Número de rotações contralaterais no 14º dia após cirurgia unilateral induzidas pela apomorfina (1 mg/kg, s.c.) nos grupos SHAM e 6-OHDA tratados com veículo, sinvastatina e pravastatina na dose de 10 mg/kg. *** $p \leq 0,001$ comparado com o grupo SHAM+veículo, ### $p \leq 0,001$ comparado com o grupo 6-OHDA+veículo (ANOVA de duas vias, seguido de teste post-hoc de Newman Keuls).



As rotações ipsilaterais também foram avaliadas, tanto no 7º como no 14º dia após a cirurgia, porém não foram observadas diferenças significativas entre os grupos e entre os fatores avaliados (TABELA 3).

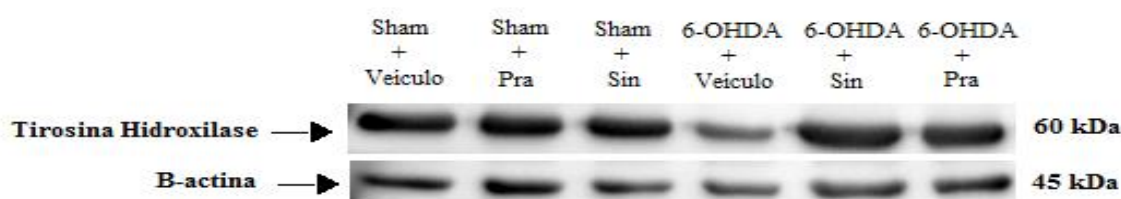
TABELA 3: Número de rotações ipsilaterais

GRUPO	MÉDIA ± EPM	MÉDIA ± EPM
	7º DIA	14º DIA
SHAM+VEÍCULO	6,1 ± 1,5	3,1 ± 1,3
SHAM+SINVASTATINA	3,6 ± 1,2	5,6 ± 1,9
SHAM+PRAVASTATINA	6,1 ± 2,4	4,7 ± 2,1
6-OHDA+VEÍCULO	7,3 ± 3,1	0,4 ± 0,2
6-OHDA+SINVASTATINA	6,1 ± 2,1	3,5 ± 1,4
6-OHDA+PRAVASTATINA	6,7 ± 2,0	3,1 ± 1,7

4.6 IMUNODETECÇÃO DE PROTEÍNAS (WESTERN BLOT)

No teste do Western Blot foi quantificado a Tirosina Hidroxilase (TH) no estriado dos animais com lesão bilateral. A FIGURA 18 expressa uma imagem representativa do Western Blot para TH em cada um dos grupos.

FIGURA 18: Imagem representativa do Western Blot demonstrando a expressão de TH em cada grupo.



Como o N utilizado para as análises iniciais do Western Blot foi pequeno (N=4) ainda não foram observadas diferenças significativas entre os grupos quanto a concentração de TH.

Ainda se faz necessário o aumento do número amostral para que se tenha um resultado mais confiável e para que seja possível observar as diferenças entre os grupos.

TABELA 4: Imunodeteção de proteínas (Western Blot) grupos SHAM e 6-OHDA

GRUPO	MÉDIA ± EPM
SHAM+VEÍCULO	99,9 ± 19,7
SHAM+SINASTATINA	98,7 ± 9,8
SHAM+PRAVASTATINA	123,8 ± 8,1
6-OHDA+VEÍCULO	146,6 ± 39,4
6-OHDA+SINASTATINA	148,0 ± 26,3
6-OHDA+PRAVASTATINA	123,4 ± 12,2

4.7 DOSAGEM DE COLESTEROL TOTAL, TRIGLICERÍDEOS, LDL, HDL

Não foram encontradas diferenças significativas entre nenhum dos grupos

para nenhum dos parâmetros avaliados, conforme pode ser observado nas tabelas abaixo.

TABELA 5: Colesterol total

GRUPO	MÉDIA ± EPM
SHAM+VEÍCULO	132,6 ± 7,8
SHAM+SINVASTATINA	139,11 ± 5,5
SHAM+PRAVASTATINA	132,9 ± 5,7
6-OHDA+VEÍCULO	131,0 ± 7,7
6-OHDA+SINVASTATINA	124,2 ± 6,6
6-OHDA+PRAVASTATINA	136,1 ± 5,9

TABELA 6: Triglicerídeos

GRUPO	MÉDIA ± EPM
SHAM+VEÍCULO	113,5 ± 6,3
SHAM+SINVASTATINA	109,3 ± 6,9
SHAM+PRAVASTATINA	101,4 ± 7,3
6-OHDA+VEÍCULO	145,7 ± 15,2
6-OHDA+SINVASTATINA	112,1 ± 12,3
6-OHDA+PRAVASTATINA	116,4 ± 11,0

TABELA 7: HDL

GRUPO	MÉDIA ± EPM
SHAM+VEÍCULO	51,6 ± 3,5
SHAM+SINVASTATINA	45,7 ± 3,3
SHAM+PRAVASTATINA	47,4 ± 3,3
6-OHDA+VEÍCULO	55,4 ± 2,8
6-OHDA+SINVASTATINA	48,2 ± 5,7
6-OHDA+PRAVASTATINA	50,5 ± 3,2

TABELA 8: LDL

GRUPO	MÉDIA ± EPM
SHAM+VEÍCULO	58,3 ± 7,6
SHAM+SINVASTATINA	71,3 ± 5,6
SHAM+PRAVASTATINA	64,9 ± 5,4
6-OHDA+VEÍCULO	46,9 ± 5,5
6-OHDA+SINVASTATINA	53,4 ± 7,5
6-OHDA+PRAVASTATINA	61,9 ± 7,6

5 DISCUSSÃO

Estudos têm demonstrado que as estatinas podem melhorar tanto os sintomas motores como os sintomas não-motores da DP, bem como atenuar a incidência e controlar a progressão da doença (WANG et al., 2011).

Os dados desse trabalho corroboram com o que já foi evidenciado nessas pesquisas. Existem inúmeros trabalhos investigando o potencial neuroprotetor das estatinas em diferentes regiões do SNC, e seu potencial anti-inflamatório já foi observado em diversos modelos de doenças neurológicas (YAN et al., 2011), e estudos de Kumar et al. (2012) demonstraram que a neuroinflamação e a infiltração de células inflamatórias no SNC são inibidas pela ação dos inibidores da HMG-CoA redutase.

Devido aos diversos mecanismos neuroprotetores das estatinas, elas têm sido usadas no manejo de diversas doenças neurodegenerativas, como o AVE, a doença de Alzheimer.

Os mecanismos mais aceitos envolvidos no potencial neuroprotetor desses fármacos envolvem além da redução dos níveis de colesterol, a supressão da molécula-1 (ICAM-1) de adesão intracelular, redução da produção de β -amilóide e dos níveis séricos de apolipoproteína E, efeitos anti-trombóticos, resposta anti-inflamatória, modificação dos receptores relacionados à cognição e o aumento dos níveis de eNOS com melhora da perfusão cerebral (PAHAN et al., 1997, SELLEY et al., 2005, HERNÁNDES-ROMERO et al., 2008, KUMAR et al., 2012, PREDIGER et al., 2013).

É cada vez maior o número de evidências clínicas e de pesquisa com animais dos benefícios dos inibidores da HMG-CoA redutase no tratamento da depressão (LUDKA et al., 2012) e da demência (JICK et al., 2000, WOLOZIN et al., 2007), porém o mecanismo exato como isso acontece ainda não foi esclarecido (PREDIGER et al., 2013).

Os resultados obtidos neste trabalho estão em concordância com outros estudos que avaliaram o efeito das estatinas no comportamento cognitivo, no comportamento tipo depressivo (GOSH et al., 2009, YAN et al., 2011, PREDIGER et al., 2013) e também no comportamento motor (GOSH et al., 2009, YAN et al., 2011, KUMAR et al., 2012).

Pela administração bilateral de 6-OHDA no FPM dos animais foi possível

observar o surgimento de alguns sintomas cognitivos (quadro tipo depressivo e prejuízo da memória procedural de curta duração). Esses tipos de sintomas podem aparecer antes do aparecimento dos sintomas motores da DP.

As vias dopaminérgicas são responsáveis por inervar diferentes regiões do cérebro que são responsáveis pela memória e o aprendizado, como o hipocampo, estriado e o córtex pré-frontal (SEAMANS et al., 1998). Neste estudo para avaliar a memória de curta-duração dos ratos foi utilizado o teste do reconhecimento social, em que é possível observar prejuízos na memória desses animais.

A redução de noradrenalina, serotonina e dopamina estão associadas aos prejuízos na memória, e o bulbo olfatório de ratos e humanos apresenta grande quantidade de neurônios dopaminérgicos, o que auxilia na distinção e reconhecimento de odores (STEBBINS et al., 1999, DAVILA et al., 2003). Portanto, pela redução da atividade de dopamina no estriado e em outras regiões cerebrais que auxiliam no processo de memória e aprendizado, pode acontecer prejuízo na memória de curta duração.

O teste do reconhecimento social foi utilizado para avaliar a memória social dos ratos. Trata-se de um teste que pode ser utilizado para evidenciar possíveis prejuízos na memória olfativa de curta duração. Inúmeros estudos relatam a influência da redução de neurotransmissores (noradrenalina, serotonina e dopamina) no prejuízo de memórias.

Neste trabalho como medida de avaliação do teste do reconhecimento social optou-se por utilizar o valor de RID, que é uma relação entre a segunda e a primeira exposição. Observou-se que os animais do grupo 6-OHDA+veículo apresentarem um maior valor para RID do que os animais do grupo SHAM+veículo. Por esse resultado é possível afirmar que houve um prejuízo na memória de curta duração desses animais, causado pela lesão dos neurônios dopaminérgicos da via nigroestriatal.

Outra diferença significativa encontrada foi entre os tempos da segunda exploração dos animais 6-OHDA+veículo, 6-OHDA+sinvastatina e 6-OHDA+pravastatina. O RID para os animais 6-OHDA tratados com estatinas foi consideravelmente inferior ao RID dos animais 6-OHDA+veículo. Isto indica que os animais tratados com as estatinas se lembravam do rato jovem na segunda exposição e, por isso, passavam menos tempo investigando-o.

Pelos resultados desse teste, estima-se que o pré-tratamento com as

estatinas é capaz de promover um menor prejuízo de memória olfativa de curta duração no modelo animal de DP. E este efeito pode ter relação com o possível potencial neuroprotetor das estatinas.

Já é descrito na literatura por Tadaiesky et al. (2008) e Santiago et al. (2010) que a administração bilateral de 6-OHDA é capaz de promover um comportamento tipo depressivo nos animais. E para avaliar os sintomas tipo depressivo foram aplicados os testes de preferência à sacarose e da natação forçada.

O teste de preferência à sacarose tem sido amplamente utilizado como modelo de anedonia nos animais. Por ele é possível comparar o consumo de água, solução de sacarose e o consumo total de líquidos desses animais.

Neste trabalho não foi observado o comportamento de anedonia nos animais, pois analisando os resultados do teste de preferência à sacarose não foram encontradas diferenças significativas entre o consumo de água e sacarose. Este comportamento de anedonia é esperado quando se trabalha com um comportamento tipo depressivo.

Não se pode afirmar que o comportamento tipo depressivo não foi observado nos animais desse estudo, pois o teste da natação forçada é um teste de desespero comportamental, caracterizado por um aumento no tempo de imobilidade do animal quando colocado na água, indicando assim, um estado emocional negativo.

Nesse teste, os animais são forçados a nadar em um espaço em que não há possibilidade de fuga. Depois de um período de natação intensa (cujos comportamentos mais comuns são a tentativa de fuga, agitação e inquietação), os animais tendem a ficar imóveis, flutuando na água.

Para Steru e colaboradores (1985), e Papp e Willner (1991), essa imobilidade é decorrente de um estado “depressivo”, caracterizado pelo desespero e incapacidade de se adaptar ao estresse, quadro esse muito semelhante ao transtorno depressivo em humanos.

Os resultados deste trabalho demonstram que o tempo de imobilidade foi significativamente maior nos animais do grupo 6-OHDA+veículo. Por esse dado é possível caracterizar um comportamento tipo depressivo no animal.

Já os animais dos grupos 6-OHDA+sinvastatina e 6-OHDA+pravastatina apresentaram uma redução no tempo do comportamento imóvel, ou seja, mantiveram-se mais tempo em movimento (nadando, escalando). Analisando resultado é possível afirmar que houve uma provável redução do estado tipo

depressivo, quando comparado aos animais pré-tratados com veículo.

Outro resultado importante a considerar é o resultado do tempo de natação. Os animais cujo comportamento tipo depressivo foi provavelmente revertido pela ação dos inibidores da HMG-CoA redutase passaram um tempo significativamente maior nadando do que os animais lesionados que receberam apenas veículo.

É importante salientar também que o pré-tratamento com as estatinas não afetou o desempenho dos animais do grupo SHAM no teste da natação forçada, demonstrando assim, que o fármaco por si só não afeta o comportamento dos animais.

O teste do campo aberto foi utilizado para avaliar o comportamento motor dos animais. Nesse teste o número de quadrantes cruzados, número de levantadas, número de auto-limpezas e o número de bolos fecais liberados pelos animais durante os 5 minutos de permanência dentro da caixa são contados.

Esse teste também pode ser utilizado como forma de avaliar a ansiedade nos animais. Os animais ansiosos tendem a permanecer parados, preferindo os cantos da caixa, com menor número de levantadas, maior número de auto-limpezas e bolos fecais (indicativos de ansiedade). No presente estudo, somente o comportamento motor dos animais foi observado através desse teste.

A razão da realização do teste do campo aberto nessa pesquisa foi para demonstrar que o desempenho dos animais no teste da natação forçada não foi devido ao comprometimento motor causado pela administração da 6-OHDA. O comprometimento motor causado pela administração de 6-OHDA é dose-dependente (DÍAZ et al., 2001).

Segundo os resultados encontrados, a concentração de 6-OHDA administrada bilateralmente não foi o suficiente para causar déficits motores nos animais, pois não foram observadas diferenças significativas entre a ambulação e o número de levantadas dos animais no teste (isso pode ser observado através do número de quadrantes cruzados e número de levantas do rato). Porém a concentração foi suficiente para provocar os prejuízos cognitivos que acometem o indivíduo com DP nas fases iniciais.

Um aspecto importante a ser considerado como a possível causa dessa redução do tempo de imobilidade e do valor de RID nos animais lesados e tratados com as estatinas seria a ação neuroprotetora desses fármacos, que agiram reduzindo a morte de neurônios dopaminérgicos provocada pela 6-OHDA através

dos diversos mecanismos pleiotrópicos dos inibidores da HMG-CoA redutase. Para justificar se houve um efeito neuroprotetor nesse caso, é necessário a realização de análises pertinentes que comprovem o mecanismo neuroprotetor das estatinas.

Apesar do mecanismo incerto por trás das estatinas quando essas são associadas a melhoras no desempenho cognitivo, há algumas hipóteses que podem auxiliar na explicação desse fato. Embora o mecanismo não seja conhecido, de acordo com estudos clínicos as estatinas estão associadas com a redução na incidência de depressão e ansiedade (YOUNG-XU et al., 2003).

Acredita-se que o comportamento tipo depressivo esteja correlacionado com alterações do nível da DA no estriado (TADAIESKY et al., 2008, CASTRO et al., 2012).

Os receptores *N*-metil-D-aspartato (NMDA), pertencem à família dos receptores ionotrópicos para glutamato, e estão amplamente expressos no córtex cerebral, hipocampo, núcleo *accumbens* e estriado (JANSSEN et al., 2005; BECKER et al., 2009; WANG et al., 2010). E alterações na população dos receptores NMDA no cérebro estão associados com importantes funções cerebrais, incluindo apoptose neuronal (YU et al, 1999), atenção e movimento (BI, 2002) e ansiedade e depressão (JOHNSON et al., 2006; YAN et al., 2011).

Existe uma interação entre os receptores NMDA e o sistema dopaminérgico (de BARTOLOMEIS et al., 2005). Alterações no sistema dopaminérgico do cérebro podem levar a alterações nos receptores glutamatérgicos NMDA e vice-versa (HALLET et al., 2006). Em trabalhos de Fiorentini et al. (2006), foi observado uma intensa diminuição na expressão de receptores D1/NMDA no estriado após lesão com 6-OHDA.

É bem documentado já na literatura que os receptores NMDA no cérebro estão relacionados com os distúrbios de ansiedade. O efeito ansiolítico e no comportamento tipo depressivo atribuído às estatinas pode ser correlacionado a elevação do número de receptores NMDA mediado pelas estatinas em diversas regiões do cérebro, como a amígdala, o estriado, o córtex cingulado, o hipocampo e o núcleo *accumbens* (WANG et al., 2009, YAN et al., 2011). No trabalho de Yan e colaboradores, eles demonstraram que a administração de 6-OHDA no FPM reduz a expressão de receptores NMDA.

Sabe-se que as estatinas são capazes de reverter o declínio da expressão de receptores NMDA no hipocampo e na amígdala, e isto pode estar associado a sua

capacidade de reduzir os sintomas tipo depressivo e o comportamento ansioso dos animais.

Os inibidores da HMG-CoA redutase podem melhorar os déficits cognitivos na DP através da modulação de vários receptores no cérebro (WANG et al., 2009).

Num estudo de Prediger e colaboradores (2013), eles utilizaram uma estatina durante 7 dias para tentar reverter os prejuízos cognitivos dos animais lesados pelo MPTP. Quando o estriado e o hipocampo desses animais foram analisados, percebeu-se um aumento nos níveis de NGF (fator neurotrófico).

A administração exógena de NGF aumenta os níveis de enzimas antioxidantes e previne as células da apoptose pela indução de vias de sinalização de genes antiapoptóticos após a exposição a 6-OHDA ou ao MPTP (PREDIGER et al., 2013).

Portanto, acredita-se que o efeito neuroprotetor das estatinas sobre o comportamento dos animais, se deve em parte, pelo aumento dos níveis de NGF (PREDIGER et al., 2013).

Os testes de reconhecimento social e de natação forçada foram realizados em dias diferentes após a cirurgia, e durante o teste de reconhecimento social os animais estavam em fase de tratamento com as estatinas e enquanto que no teste de natação forçada o tratamento já havia terminado, essa observação reforça a proposta da atividade neuroprotetora das estatinas.

Para fundamentar os resultados encontrados nos testes comportamentais, foi realizada a imunodeteção de proteínas, através da técnica do Western Blot, para avaliar a expressão da enzima Tirosina Hidroxilase (TH) nos estriados dos animais com lesão bilateral pela 6-OHDA no feixe prosencefálico medial. A TH é uma enzima fundamental na síntese de catecolaminas (como a dopamina), e por isso é utilizada como um marcador de neurônios dopaminérgicos.

O modelo de injeção bilateral da 6-OHDA no cérebro do animal é extremamente utilizado para mimetizar o que ocorre no cérebro humano com doença de Parkinson, pois a doença acomete ambos os lados do cérebro, causando a morte neuronal. Vários estudos já demonstraram que a administração de 6-OHDA no cérebro de animais leva a morte neuronal e consequente redução da expressão da TH em estriado e substância negra, gerando sintomas semelhantes aos sintomas que acometem humanos, como os clássicos sintomas motores (VAN OOSTEN & COOLS, 1999; ILIJIC, et al., 2011).

Analisando os resultados da imunodeteção de proteínas observa-se que não foram observadas diferenças significativas entre os grupos analisados, e essa observação pode ser devido à intensidade da lesão causada pela 6-OHDA. Neste caso, ela pode não ter sido suficiente ou muito pequena para causar uma degeneração neuronal observável no Western Blot, e por isso os resultados encontrados.

Na imagem representativa se observa uma leve tendência à diminuição da expressão de TH nos animais lesionados com a 6-OHDA e que não receberam tratamento, o que poderia justificar o surgimento dos déficits comportamentais observados nesses animais. Tal tendência não é observada nos animais lesionados com a neurotoxina e tratados com as estatinas, sugerindo que estes fármacos podem estar envolvidos com a diminuição da morte neuronal, e consequentemente a inibição dos déficits comportamentais.

Esses resultados precisam ainda ser mais estudados, aumentando o N para quantificação da TH, bem como quantificar os mediadores inflamatórios e as espécies reativas de oxigênio, que estão envolvidos no processo de neurodegeneração. A dosagem de dopamina e seus metabólitos no estriado é outra opção para demonstrar a possível neuroproteção, bem como a avaliação dos transportadores de glutamato na tentativa de explicar a associação entre as vias dopaminérgicas e glutamatérgicas na melhoria dos sintomas cognitivos. Outra opção ainda, é comparar com os resultados da imunodeteção de proteínas para as lesões unilaterais para observação da intensidade da lesão nesse experimento.

Quanto aos resultados da lesão unilateral, a 6-OHDA injetada unilateralmente constitui um modelo de hemiparkinsonismo, caracterizado por um comportamento motor assimétrico após a administração de drogas dopaminérgicas, devido a um desequilíbrio entre o lado lesado e o não-lesado, sendo que o lado não-lesado atua como controle interno (BETARBET et al., 2002).

O modelo do comportamento rotatório de roedores, produzido pela lesão unilateral da via nigroestriatal, é uma ferramenta muito utilizada para testar drogas agonistas e antagonistas dopaminérgicas e ainda para estudos de problemas motores que mimetizam os sintomas da DP (GERLACH e RIEDERER, 1996).

No modelo animal de DP utilizando a 6-OHDA administrada unilateralmente no FPM, quando os animais são desafiados com um agonista dopaminérgico D1/D2 (como a apomorfina) tendem a apresentar um comportamento rotatório contralateral

ao lado da lesão. Esse tipo de comportamento pode ser associado ao nível da lesão na via nigroestriatal (SCHWARTING e HOUSTON, 1996).

A apomorfina atua sobre os receptores dopaminérgicos D1 e D2 e em doses menores atua sobre o auto-receptor pré-sináptico inibindo a liberação de DA (DELEU et al., 2002). A apomorfina induz rotações contralaterais ao lado lesado, devido à estimulação dos receptores D2, supersensibilizados após a desnervação no estriado (FERRO, 2007).

Os resultados deste trabalho demonstram que a administração unilateral de 6-OHDA no FPM de ratos produz um comportamento rotatório contralateral ao lado lesado do animal, após o desafio com apomorfina, evidenciando a morte dos neurônios dopaminérgicos. Resultado esse, condizente com o já discutido anteriormente por diversos autores.

Esse comportamento rotatório pode ser explicado pela hiperexpressão dos receptores dopaminérgicos na porção lesada do estriado, ou seja, as drogas agonistas como a apomorfina tem seu efeito potencializado pela hiperexpressão dos receptores (GERLACH e RIEDERER, 1996, SCHWARTING e HOUSTON, 1996). Essa supersensibilidade pós-sináptica apenas ocorre quando quase todos os neurônios dopaminérgicos na substância negra são eliminados (FERRO et al., 2007).

O tratamento prévio com as estatinas foi capaz de prevenir esse comportamento rotatório, provavelmente pela redução da morte desses neurônios provocada pela 6-OHDA.

A causa do comportamento rotatório parece estar relacionada ao desequilíbrio entre as sinapses dopaminérgicas nigroestriatais entre os lados direito e esquerdo do cérebro. Esse desbalanço prejudica os impulsos para iniciar os movimentos promovidos pela conexão estriado-tálamo-córtex motor, os quais são modulados pela via nigroestriatal (SCHWARTING e HUSTON, 1996, NICOLA et al., 2000).

Os resultados apresentados nesse trabalho apontam para um grande número de rotações contralaterais dos animais do grupo 6-OHDA+veículo quando comparado com as rotações contralaterais dos animais do grupo SHAM+veículo.

Baseado nesse resultado é possível afirmar que a lesão provocada pela infusão da 6-OHDA foi significativa, pois quanto maior a lesão, maior é o número de rotações esperado.

Comparando então os grupos de animais lesados e tratados com as estatinas

com os animais lesados e que não receberam tratamento, o número de rotações contralaterais desses primeiros grupos foi significativamente menor do que dos animais do grupo que recebeu apenas veículo.

Além disso, analisando os resultados dos animais do grupo SHAM tratados com as estatinas não foi observado um número de rotações contralaterais significativo, o que sugere que os inibidores da HMG-CoA redutase sozinho não interfere no comportamento rotatório desses animais.

Os resultados desse trabalho estão em concordância com os resultados apresentados por Wang e colaboradores (2005), onde foi observado que o tratamento crônico com sinvastatina é capaz de restaurar o *downregulation* da expressão de receptores D1/D2 no cérebro de ratos após a administração de 6-OHDA no FPM.

Umas das hipóteses apontadas como sendo o motivo das estatinas conseguirem reverter ou diminuir o comportamento rotatório é através da modulação de receptores D1/D2 e da expressão de eNOS nos cérebros dos ratos.

Além dessa, Kumar et al. (2012), coloca como provável mecanismo neuroprotetor das estatinas sobre o comportamento motor dos animais a redução do dano oxidativo (pela diminuição da peroxidação lipídica, diminuição da concentração de nitrito e da diminuição da atividade da glutathione peroxidase), e a preservação da atividade das enzimas do complexo mitocondrial (evitando redução das atividades do complexo I e III). Ainda, as estatinas através da sua atividade anti-inflamatória impede a elevação dos níveis de IL-6 e de TNF- α .

A administração oral de sinvastatina reduz de maneira dose-dependente a depleção de DA e de seus metabólitos (ácido 3,4-dihidróxifenil acético e do ácido homovalínico (HVA)), e ainda previne a formação de 3-nitrotirosina no estriado de ratos (SELLEY et al., 2005).

As estatinas possuem efeitos protetores sobre a cadeia respiratória da mitocôndria (KALONIA et al., 2011, KUMAR et al, 2012). Em estudos do grupo de Kumar (2012), o tratamento crônico com as estatinas reduziu significativamente as disfunções mitocondriais induzidas pela 6-OHDA.

Porém a ação das estatinas sobre a cadeia respiratória da mitocôndria pode ser ainda devido ao seu potencial antioxidante, agindo de maneira citoprotetora e atenuando a disfunção mitocondrial (WANG et al., 2011, KUMAR et al., 2012).

Zacco e colaboradores (2003) estabeleceram um *ranking* da capacidade

neuroprotetora de diferentes estatinas. Esse mesmo *ranking* vale para o potencial de inibição da enzima HMG-CoA redutase (QUADRO 1).

QUADRO 1: *Ranking* do potencial neuroprotetor das estatinas

ROSUVASTATINA = SINVASTATINA > ATORVASTATINA = MEVASTATINA > PRAVASTATINA
--

FONTE: ZACCO et al., 2003.

As duas estatinas utilizadas neste estudo possuem capacidade neuroprotetora, apesar de no *ranking* a pravastatina apresentar a menor atividade. Ambas foram descritas como sendo capazes de prevenir a ativação de células de glia, de iNOS, da transcrição do fator NF- κ B e de p21^{ras} (GOSH et al., 2009, KUMAR et al., 2012).

Inicialmente esperava-se encontrar resultados diferentes entre a sinvastatina e a pravastatina, devido a suas características de lipossolubilidade. Mas analisando trabalhos na literatura e os resultados desse estudo, nenhuma diferença significativamente relevante foi encontrada.

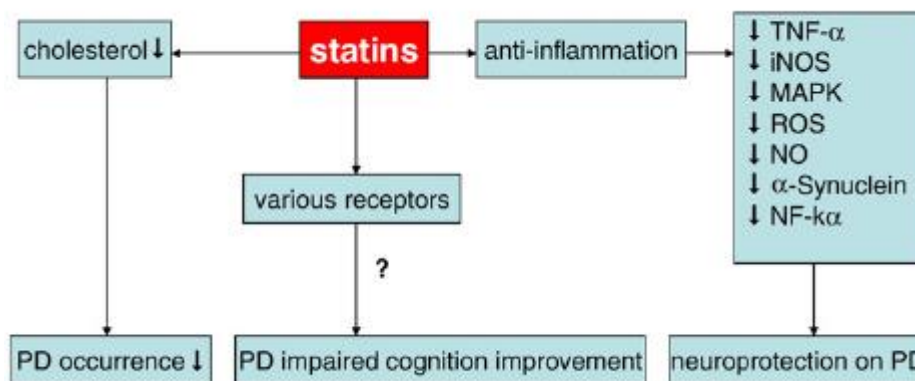
Acredita-se que o efeito das estatinas seja então tanto a nível de SNC quanto sobre mecanismos anti-oxidantes, anti-inflamatórios e imunomoduladores no sistema periférico, e estes mecanismos periféricos, de acordo com os resultados encontrados nas dosagens de colesterol total, triglicerídeos, HDL e LDL não estão relacionados ao seus níveis plasmáticos, uma vez que não foram encontradas diferenças na concentração desses índices entre os grupos.

Ou seja, o efeito das estatinas sob a neurodegeneração na doença de Parkinson é outro, não sendo restrito a sua capacidade de reduzir as taxas de lipídeos no sangue.

O que também pode justificar a ação neuroprotetora da pravastatina é a capacidade de algumas neurotoxinas, como a 6-OHDA e o MPTP alterarem a permeabilidade da BHE (GOSH et al., 2009), e assim esse fármaco penetra e age sobre o SNC.

A FIGURA 19 representa um diagrama com os prováveis mecanismos neuroprotetores das estatinas na DP.

FIGURA 19: Diagrama representando os possíveis mecanismos neuroprotetores das estatinas.



FONTE: WANG et al., 2011.

A capacidade de neuroproteção está associada com a resposta anti-inflamatória produzida pelas estatinas, incluindo ainda também a diminuição da produção de TNF- α , NO e superóxido, seus efeitos anti-oxidantes e a capacidade de melhorar a disfunção mitocondrial causada pelas neurotoxinas.

Ainda há muito a ser estudado e esclarecido sobre o mecanismo neuroprotetor dos inibidores da HMG-CoA redutase. Mas os dados encontrados nesse trabalho sugerem que as estatinas possuem uma capacidade de reverter/impedir o surgimento de déficits cognitivos pela morte neuronal bem como de reduzir as complicações motoras associadas à doença de Parkinson, o que confere a elas um potencial neuroprotetor.

6 CONCLUSÃO

Baseando-se nos resultados disponíveis, é possível sugerir que o tratamento com a 6-OHDA foi capaz de reproduzir os prejuízos cognitivos e o déficit motor da DP descritos em trabalhos anteriores. E que o tratamento com as estatinas foi responsável por reverter/impedir boa parte do prejuízo de memória/aprendizado, do comportamento tipo depressivo e do déficit motor (rotações contralaterais) dos animais. Esses resultados podem estar relacionados com a capacidade neuroprotetora desses fármacos, observada pela melhoria nos quadros comportamentais e ao que tudo indica pela manutenção dos níveis da enzima TH nos animais tratados com sinvastatina e pravastatina. Ainda com esses resultados fica claro que o efeito das estatinas sobre a DP não acontece apenas sobre o SNC, pois devido a resultados comportamentais relevantes pelo tratamento com as duas estatinas (e pelo fato de possuírem características de permeabilidade a BHE diferentes), há indícios de que esse efeito acontece também a nível periférico no organismo.

REFERÊNCIAS

ARTISS, J.D., ZAK, B. Measurement of cholesterol concentration. In: RIFAI, N.; WARNICK, G.R.; DOMINICZAK, M. H., eds. Handbook of lipoprotein testing. Washington: AACC Press, p. 99-114, 1997.

BAR-ON, P., et al. Statins reduce neuronal α -synuclein aggregation in in vitro models of α -synuclein disease. **Journal of Neurochemistry**, v. 105, p. 1656-1667, 2008.

BARBOSA, M. T., et al. Parkinsonism and Parkinson's Disease in the Elderly: A Community-Based Survey in Brazil (the Bambui Study). **Movement Disorders**, v. 21, p. 800–808, 2006.

de BARTOLOMEIS, et al. Dopamine-glutamate interaction and antipsychotics mechanism of action: implication for new pharmacological strategies in psychosis. **Curr. Pharm. Des.**, v. 11, p. 3561–3594, 2005.

BECKER, C., et al. Statins and the risk of Parkinson disease: an update on the controversy. **Drug Safety**, v. 8, p. 261–271, 2009.

BERNSTEIN, A. I., et al. 6-OHDA generated ROS induces DNA damage and p53- and PUMA- dependent cell death. **BMC Medicine**, 2011.

BETARBET, R.; SHERER, T.B.; GREENAMYRE, J.T. Animal models of Parkinson's disease. **Bioessays**, v. 24, p. 308-318, 2002.

BEZARD, E, et al.. Relationship between the appearance of symptoms and the level of nigrostriatal degeneration in a progressive 1- methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-lesioned macaque model of Parkinson's disease. **Journal of Neuroscience** v. 21, p. 6853. 6861, 2001.

BI, H., et al. N-methyl-D-aspartate receptor subunit NR2A and NR2B messenger RNA levels are altered in the hippocampus and entorhinal cortex in Alzheimer's disease. **Journal of Neurology Science**, v. 200, p. 11–18, 2002.

BLANDINI, F., et al. Functional changes of the basal ganglia circuitry in Parkinson's disease. **Progress in Neurobiology** v.62, n.1, p.63-88. 2000.

BLANDINI, F.; ARMENTERO, M. -T. Animal models of Parkinson's disease. **FEBS Journal**, v. 279, n. 7, p. 1156–1166, apr. 2012.

BLUM, D.; TORCH, S.; LAMBENG, N., et al. Molecular pathways involved in the neurotoxicity of 6-OHDA, dopamine and MPTP: contribution to the apoptotic theory in Parkinson's disease. **Progress in Neurobiology**, v. 65, p. 135-172, 2001.

BOKA, G., P. ANGLADE, et al. Immunocytochemical analysis of tumor necrosis factor and its receptors in Parkinson's disease. **Neuroscience Lett.**, v. 172, no 1-2, p.151-154, 1994.

BOTTI, R. E., TRISCARI, J., et al. Concentrations of pravastatin and lovastatin in cerebrospinal fluid in healthy subjects. **Neuropharmacology**, n. 14, p. 256-261, 1991.

BOVE, J.; SERRATS J., et al. Neuroprotection induced by the adenosine A2A antagonist CSC in the 6-OHDA rat model of parkinsonism: effect on the activity of striatal output pathways. **Experimental Brain Research**, v. 165, n. 3, p. 362-74, 2005.

BURCH D., SHEERIN F. Parkinson's disease. **Lancet** v. 365, p. 622-627, 2005.

CAMARGO A. C. R., et al. O impacto da Doença de Parkinson na qualidade de vida: uma revisão de literatura. **Revista Brasileira de Fisioterapia**, v. 8, p. 267-272, 2004.

CASTRO, A.A., et al. Lithium and valproate prevent olfactory discrimination and short-term memory impairments in the intranasal 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) rat model of Parkinson's disease. **Behavioural Brain Research**, vol. 229, p.208–215, 2012.

CICCHETTI, F. et al. Neuroinflammation of the nigrostriatal pathway during progressive 6-OHDA dopamine degeneration in rats monitored by immunohistochemistry and PET imaging. **European Journal of Neuroscience**, vol. 15, p. 991-998, 2002.

CRAFT, T. K., DEVRIES, A. C. Role of IL-1 poststroke depressive-like behavior in mice. **Biological Psychiatry**, v. 60, n. 8, p. 812-818, 2006.

DA CUNHA, C.; WIETZIKOSKI E. C., et al. Learning processing in the basal ganglia: a mosaic of broken mirrors. **Behavioural Brain Research**, v. 199, n. 1, p. 157-70, 2009.

DA CUNHA, C., WIETZIKOSKI, E. C., et al. Hemiparkinsonian rats rotate toward the side with the weaker dopaminergic neurotransmission. **Behavioural Brain Research**, v. 189, p. 364-372, 2008.

DA CUNHA, C.; WIETZIKOSKI S., et al. Pre-training to find a hidden platform in the Morris water maze can compensate for a deficit to find a cued platform in a rat model of Parkinson's disease. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 87, n. 4, p. 451-63, 2007.

DANTZER, R., BLUTHE R. M., et al. Modulation of social memory in male rats by

neurohypophyseal peptides. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 91, n. 3, p. 363-368, 1987.

DAVILA, N.G.; BLAKEMORE, L.J.; TROMBLEY, P.Q. Dopamine modulates synaptic transmission between rat olfactory bulb neurons in culture. **Journal of Neurophysiology**, v. 90, p. 395–404, 2003.

DAUER, W.; PRZEDBORSKI, S. Parkinson's Disease: Mechanisms and Models. **Neuron** v. 39, p. 889-909, 2003.

DELEU, D.; NORTHWAY, M.G.; HANSSENS, Y. Clinical pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of drugs used in the treatment of Parkinson's disease. **Clinical Pharmacokinetic**, vol.41, p. 261-309, 2002.

DEUMENS, R; BLOKLAND, A; PRICKAERTS, J. Modeling Parkinson's Disease in Rats: An Evaluation of 6-OHDA Lesions of the Nigrostriatal Pathway Experimental **Neurology**, v.175, p. 303–317, 2002.

DÍAZ, M.R.; ABDALA, P.; BARROSO-CHINEA, P.; OBESO, J.; GONZÁLEZ HERNÁNDEZ, T. Motor behavioural changes after intracerebro ventricular injection of 6- hydroxydopamine in the rat: an animal model of Parkinson's disease. **Behavioural Brain Research**, v. 122, p. 79-92, 2001.

DUVOISIN, R.C. (ed). **Parkinson's disease**. Third Edition. Raven Press, New York, 1991.

ELBAZ, A.; MOISAN, F. Update in the epidemiology of Parkinson's disease. **Current Opinion in Neurology**, v. 21, n. 4, p. 454-460, aug. 2008.

EMBORG, M.E. Evaluation of animal models of Parkinson's disease for neuroprotective strategies. **Journal of Neuroscience Methods** v. 139, p. 121-143, 2004.

FERRO, M. M. Caracterização neuroquímica e comportamental da lesão da via nigroestriatal com 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetraidropiridina (MPTP) e 6-hidroxidopamina (6-OHDA) em ratos. 2007, 66p. Tese de Doutorado, Programa de Pós-graduação em Ciências, Bioquímica, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.

FERRO, M. M.; BELLISSIMO M. Y., et al. Comparison of bilaterally 6-OHDA- and MPTP-lesioned rats as models of the early phase of Parkinson's disease: histological, neurochemical, motor and memory alterations. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 148, n. 1, p. 78-87, 2005.

FIORENTINI, C., et al. Loss of synaptic D1 dopamine/N-methyl-D-aspartate glutamate receptor complexes in L-DOPA-induced dyskinesia in the rat. **Molecular Pharmacology**, v. 69, p. 805–812, 2006.

FRANCARDO, V., RECCCHIA, A., et al. Impact of the lesion procedure on the profiles of motor impairment and molecular responsiveness to L-DOPA in the 6-hydroxydopamine mouse model of Parkinson's disease. **Neurobiology of Disease**, v. 42, p. 327-340, 2011.

FRANKE, C., et al. Bcl-2 upregulation and neuroprotection in guinea pig brain following chronic simvastatin treatment. **Neurobiol. Dis.** v. 25, p. 438–445, 2007.

FRIEDEWALD, W. T., et al. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. **Clinical Chemistry**, v. 18, 1972.

FUKAE, J.; MIZUNO Y.; HATTORI N. Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. **Mitochondrion** v.7, n.1-2, p.58-62. 2007.

GERLACH, M.; RIEDERER, P. Animal models of Parkinson's disease: an empirical comparison with the phenomenology of the disease in man. **Journal of Neural Transmission**, v. 103, p. 987-1041, 1996.

GREGORIO, M. L., E. C. WIETZIKOSKI, et al. Nicotine induces sensitization of turning behavior in 6-hydroxydopamine lesioned rats. **Neurotoxicity Research** v. 15, n. 4, p. 359-66, 2009.

GÖREN, B., MIMBAY, Z., et al. Investigation of neuroprotective effects of cyclooxygenase inhibitors in the 6-hydroxydopamine induces rat Parkinson mode. **Turkish Neurosurgery**, v. 18, n. 3, p. 230- 236, 2009.

GOSH, A., et al. Simvastatin inhibits the activation of p21^{ras} and prevents the loss of dopaminergic neurons in a mouse model of Parkinson's disease. **Journal of Neuroscience**, v. 29, p. 13543- 13556, 2009.

HALD, A.; LOTHARIUS J. Oxidative stress and inflammation in Parkinson's disease: is there a causal link? **Experimental Neurology** v.193, n.2, p.279-90, 2005.

HALLETT, P.J., et al. Dopamine D1 activation potentiates striatal NMDA receptors by tyrosine phosphorylation-dependent subunit trafficking. **Journal of Neuroscience**, v. 26, p. 4690–4700, 2006.

HERNÁNDEZ-ROMERO, M.C., et al. Simvastatin prevents the inflammatory process and the dopaminergic degeneration induced by the intranigral injection of lipopolysaccharide. **Journal of Neurochemical**, v. 105, p. 445- 459, 2008.

HIRSCH, E. C.; HUNOT S.; HARTMANN. A. Neuroinflammatory processes in Parkinson's disease. **Parkinsonism & Related Disorders** v. 11, p.S9-S15. 2005.

HUNOT, S., N. DUGAS, et al. FcepsilonRII/CD23 is expressed in Parkinson's disease and induces, in vitro, production of nitric oxide and tumor necrosis factor-alpha in glial cells. **Journal of Neuroscience**, v. 19, n 9, p. 3440-3447, 1999.

HUNTER, R. L.; DRAGICEVIC N., et al. Inflammation induces mitochondrial dysfunction and dopaminergic neurodegeneration in the nigrostriatal system. **Journal of Neurochemistry**, v. 100, n. 5, p. 1375-86, 2007.

IFERGAN, I., et al. Statins reduce human blood-brain barrier permeability and restrict leukocyte migration: relevance to multiple sclerosis. **Annals of Neurology**, v. 60, p. 45- 55, 2006.

IZQUIERDO, I. **Memória**. 2 ed., Editora Artmed, Porto Alegre, 2011.

IZQUIERDO, I. **Memória**. Editora Artmed, Porto Alegre, 2002.

KAHLE, P.J., HAASS, C., et al. Structure/function of alpha-synuclein in health and disease: rational development of animal models for Parkinson's and related disease. **Journal of Neurochemistry**, v. 82, p. 449-457, 2002.

JENNER, P; OLANOW, CW. Oxidative stress and the pathogenesis of Parkinson's disease. **Neurology**, v. 47, n. 3, p. S161-S170, 1996.

JICK, H., et al. Statins and the risk of dementia. **Lancet**, v. 356, p.1627–1631,2000.

JOHNSON, P. L., SHEKHAR, A. Panic-prone state induced in rats with GABA dysfunction in the dorsomedial hypothalamus is mediated by NMDA receptors. **Journal of Neuroscience**, v. 26, p. 7093–7104, 2006.

KALONIA, H., et al. Comparative neuroprotective profile of statins in quinolinic acid induced neurotoxicity in rats. **Behavioral Brain Research**, v. 216, p. 220- 228, 2011.

KOO H-J., LEE H-J., IM H. Sequence determinants regulating fibrillation of human α -synuclein. **Biochemical and Biophysical Research Communications** v. 368, p. 772-778, 2008.

KUMAR, A., et al. Neuroprotective potential of atorvastatin and simvastatin (HMG-CoA reductase inhibitors) against 6-hydroxydopamine (6-OHDA) induced Parkinson-like symptoms. **Brain Research**, v. 1471, p. 13- 22, 2012.

KURKOWSKA-JASTRZEBSKA, I., et al.. The inflammatory reaction following 1-

methyl-4-phenyl-1,2,3, 6-tetrahydropyridine intoxication in mouse. **Experimental Neurology** v.156, n.1, p.50-61, 1999.

LANG, A.; LOZANO M. A. Parkinson's disease. First of two parts. **New England Journal of Medicine** v.339, n.15, p.1044-53. 1998.

LI, G., et al. Statin therapy is associated with reduced neuropathologic chances of Alzheimer disease. **Neurology**, v. 69, p. 878- 885, 2007.

LIAO, J.K., LAUFS, U. Pleiotropic effects of statins. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, v. 45, p. 89–118, 2005.

LIMA M. M. S.; ANDERSEN M. L.; REKSIDLER A.B.; VITAL M. A. B. F.; TUFIK S. The role of the substantia nigra pars compacta in regulating sleep patterns in rats, **Plos One**, Issue 6 e.513, 2007.

LIMONGI, J.C.P. Neuroproteção. In: MENESES, M.S.; TEIVE, H.A.G. **Doença de Parkinson**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 176-181, 2003.

LUDKA, F.K., et al. Acute atorvastatin treatment exerts antidepressant-like effect in mice via the l-arginine-nitric oxide-cyclic guanosine monophosphate pathway and increases BDNF levels. **European Neuropsychopharmacology**, 2012.

LUTJOHANN, D., STROICK, M., et al. High doses of simvastatin, pravastatin and cholesterol reduce brain cholesterol synthesis in guinea pigs. **Steroids**, n. 69, p. 431-438, 2004.

MAIA, R. C. Nova esperança de tratamento para o mal de Parkinson. Portal **Sociedade Brasileira de Química**, publicado em 26 de abril de 2009.

MANSOURI, Z., SABETKASAEI, M., et al. Curcumin has neuroprotection effect on homocysteine rat model of Parkinson. **Journal of Molecular Neuroscience**, 2012.

MARIÉ, R.M.; BARRÉ, L.; DUPUY, B.; VIADER, F.; DEFER, G.; BARON, J.C. Relationships between striatal dopamine denervation and frontal executive tests in Parkinson's disease. **Neuroscience Letters** v. 260, p. 77-80, 1999.

MASSANO, J. Doença de Parkinson Atualização Clínica. **Acta Médica Portuguesa**, v. 24, s. 4, p. 827-834, dec. 2011.

MCGEER, P. L.; MCGEER E. G. Inflammation and neurodegeneration in Parkinson's disease. **Parkinsonism & Related Disorders**, v. 10, p. S3-7, 2004.

MELO, L. M., BARBOSA, E. R., CARAMELLI, P. Declínio cognitivo e demência

associados à doença de Parkinson: características clínicas e tratamento. **Revista Psiq. Clín.**, vol. 34, nº 4, p. 176-183, 2007.

MENEZES, M. S.; TEIVE, H. A. G. Doença de Parkinson. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003.

MILLER, R. L., et al. Oxidative and inflammatory pathways in Parkinson's disease. **Neurochemical Research**, v. 34, n. 1, p. 55-65, 2009.

MOSLEY, R. L., et al. Neuroinflammation, Oxidative Stress and the Pathogenesis of Parkinson's Disease. **Clinical Neuroscience Research** v.6, n.5, p.261-281. 2006.

NAKAMURA, H., et al. Primary prevention of cardiovascular disease with pravastatin in Japan (MEGA Study): a prospective randomized controlled trial. **Lancet**, vol. 368, p. 1155- 1163, 2006.

NICOLA, S. M.; SURMEIER, D. T.; MALENKA, R. C. Dopaminergic modulation of neuronal excitability in the striatum and nucleus accumbens. **Annuary Review. Neuroscience**, vol. 23, p. 185–215, 2000.

OBESO, J. A., et al. Pathophysiology of the basal ganglia in Parkinson's disease. **Trends in Neurosciences** v. 23, p. s8-s19, 2000.

OLIVEIRA, R. M., GUIMARAES, F. S., DEAKIN, J. F. Expression of neuronal nitric oxide synthase in the hippocampal formation in affective disorders. **Braz J Med Biol Res.**, vol. 41, p.333-341, 2008.

ONU - Organização das Nações Unidas, 2012.

OVBIAGELE, B., et al. Statin enhancement of collateralization in acute stroke. **Neurology**, v. 68, p. 2129- 2131, 2007.

PADOVANI, A. C., et al. Parkinson's disease and dementia. **Neurol Sci.**, v. 27, p. 40-43, 2006.

PALLARES, J. R., et al. Mechanism of 6-hydroxydopamine neurotoxicity: the role of NADPH oxidase and microglial activation in 6- hydroxydopamine-induced degeneration of dopaminergic neurons. **Journal of Neurochemistry**, v. 103, p. 145-156, 2007.

PAPP, M; WILLNER, P. Rapid onset of antidepressant action in an animal model of depression. **Eur Neuropsychopharmacol**, v. 6, p. S4. 1996.

PAVESE, N. PET studies in Parkinson's disease motor and cognitive dysfunction.

Parkinsonism relat. Disord., v. 18S1, p. S96-99, 2012.

PAXINOS, G; WATSON, C. The rat brain in stereotaxic coordinates. 5th ed. San Diego: Academic Press; 2005.

PETERSON, G.L. A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. **Anal Biochem.**, vol. 83, p. 346-356, 1977.

PIERMARTIRI, T. C., et al. Atorvastatin prevents hippocampal cell death due to quinolinic acid-induced seizures in mice by increasing Akt phosphorylation and glutamate uptake. **Neurotox. Research**, v. 16, p.106-115, 2009.

PONZONI, S. et al. Neurobiologia do Parkinsonismo II. Modelos experimentais. **Arq Neuropsiquiatr**, v. 53, p. 711-717, 1995.

PORSOLT, R. D.; ANTON G. Behavioural despair in rats: a new model sensitive to antidepressant treatments. **European Journal of Pharmacology**, v. 47, n. 4, p. 379-391, 1978.

PORTARIA SAS/MS Nº 228, 10 DE MAIO DE 2010.

PRASHER, D., FINDLEY, L. Dopaminergic induced changes in cognitive and motor processing in Parkinson's disease: an electrophysiological investigation. **Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry**, vol. 54, nº 7, p. 603-609, 1991.

PREDIGER, R. D., et al. Atorvastatin improves cognitive, emotional and motor impairments induced by 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) administration in rats, an experimental model of Parkinson's disease. **Brain Research**, v. 1513, p. 103- 116, 2013.

PREDIGER, R. D., et al. The risk is in the air: Intranasal administration of MPTP to rats reproducing clinical features of Parkinson's disease. **Experimental Neurology**, v. 202, n. 2, p. 391-403, 2006.

PREDIGER, R. D., et al. Antagonistic interaction between adenosine A2A and dopamine D2 receptors modulates the social recognition memory in reserpine-treated rats. **Behavioural Pharmacology**, v. 16, n. 4, p. 209-218, 2005.

PREDIGER, R. D., et al. Ethanol improves short-term social memory in rats. Involvement of opioid and muscarinic receptors. **European Journal of Pharmacology**, v. 462, n. 1-3, p. 115-123, 2003.

PRZEDBORSKI, S.; LEVIVIER M., et al. Dose-dependent lesions of the dopaminergic nigrostriatal pathway induced by intrastriatal injection of 6-

hydroxydopamine. **Neuroscience**, v. 67, n. 3, p. 631-47, 1995.

PRZEDBORSKI, S.. Pathogenesis of nigral cell death in Parkinson's disease. **Parkinsonism & Related Disorders**, v. 11, p.S3-S7, 2005.

RASCOL, O., et al. A five-year study of the incidence of dyskinesia in patients with early Parkinson's disease who were treated with ropinirole or levodopa. **The New England Journal of Medicine**. v. 342, p. 1484-1491, 2000.

REKSIDLER A. B., et al. Distinct effects of intranigral L-DOPA Infusion in the MPTP rat model of Parkinson's disease. **Journal of Neural Transmission-Supplement** v. 73, p. 259–68, 2009.

RIFAI, N., et al. Lipids, lipoproteins and apolipoproteins. In: BURTIS, C. A.; ASHWOOD, E. R, editors. **Tietz Textbook of Clinical Chemistry**. 3rd ed. Philadelphia: W.B Saunders Company, p. 809-61, 1999.

ROY, A., PAHAN, K. Prospects of statins in Parkinson disease. **The Neuroscientist**, v. 17, no 3, p. 244-255, 2011.

RODRÍGUEZ, M., et al. Dopamine cell degeneration induced by intraventricular administration of 6-hydroxydopamine in rat: similarities with cell loss in Parkinson's Disease. **Experimental Neurology**, v. 169, p. 163-181, 2001.

SANTIAGO R. M., et al. Depressive-like behaviors alterations induced by intranigral MPTP, 6-OHDA, LPS and rotenone models of Parkinson's disease are predominantly associated with serotonin and dopamine. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry** v.34, p. 1104–1114, 2010.

SANTIAGO, M., et al. Zocor Forte® (simvastatin) has a neuroprotective effect against LPS striatal dopaminergic terminals injury, whereas against MPP+ does not. **European Journal of Pharmacology**, v. 609, p. 58-64, 2009.

SATTLER, R., et al. Molecular mechanism of glutamate receptor-mediated excitotoxic neuronal cell death. **Molecular Neurobiology**, v. 24, p. 107- 129, 2001.

SCHAPIRA, A.H.V., et al. Novel pharmacological targets for the treatment of Parkinson's disease. **Nature Reviews** v. 5, p. 845-854, 2006.

SCHAPIRA, A. H. V., OLANOW, C. W. Neuroprotection in Parkinson disease: mysteries, myths and misconceptions. **American Medical Association**, v. 291, no 3, 2004.

SCHÖBER, A. Classic toxin-induced animal models of Parkinson's disease: 6-OHDA

and MPTP. **Cell and Tissue Research**. v. 318, n. 1, p. 215-24, 2004.

SCHRAG A. Psychiatric aspects of Parkinson's disease: an update. **Journal of Neurology** v.251, p.795–804, 2004.

SCHUSTER, S., et al. The 3- hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase inhibitor lovastatin reduces severity of LDOPA- induced abnormal involuntary movements in experimental Parkinson's disease. **Journal of Neuroscience**. v. 28, p. 4311– 4316, 2008.

SCHWARTING, R. K., HUSTON, J. P. Unilateral 6-hydroxydopamine lesions of the meso-striatal dopaminergic neurons and their physiological sequelae. **Progress in Neurobiology**, v. 49, p. 215-66, 1996.

SELLEY, M.L. Simvastatin prevents 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced striatal dopamine depletion and protein tyrosine nitration in mice. **Brain Research**, v. 1037, p. 1–6, 2005.

SHIMOHAMA, S.; SAWADA, H.; KITAMURA, Y.; TANIGUCHI, T. Disease model: Parkinson's disease. **Trends in Molecular Medicine**, v. 9, p. 360-365, 2003.

SIEGEL, G. J. **Basic Neurochemistry**. Molecular, Cellular and Medical Aspects. 7th edition. London: Elsevier, 2006.

SINGH, N., PILLAY, V. & CHOONARA, Y. Advances in the treatment of Parkinson's disease. **Progress in Neurobiology**, vol. 81, p. 29-44, 2007.

SLATTERY, D. A., MARKOU A., CRYAN J. F. Evaluation of reward processes in an animal model of depression. **Psychopharmacology**, v. 190, n. 4, p. 555-568, 2007.

SONSALLA, P., WONG, L., et al. Delayed caffeine treatment prevents nigral dopamine neuron loss in a progressive rat model of Parkinson's disease. **Experimental neurology**, vol. 234, p. 482-487, 2012.

SPILLANTINI, M.G., et al. Alpha-synuclein in Lewy bodies. **Nature**, v. 388, p. 839-1997.

STEBBINS, G.T.; GABRIELI, J.D.E.; MASCHIARI, F.; MONTI, L.; GOETZ, C.G. Delayed recognition memory in Parkinson's disease: a role for working memory? **Neuropsychology** v. 37, p. 503-510, 1999.

STERU, L., et al. **Psychopharmacology**, v. 85, p. 367- 370, 1985.

SULZER, D. Multiple hit hypotheses for dopamine neuron loss in Parkinson's

disease. **Trends in Neurosciences** v.30, n.5, p.244-50. 2007.

TADAIESKY, M. T., et al. Emotional, Cognitive and Neurochemical Alterations in a Premotor Stage Model of Parkinson's Disease. **Neuroscience**, v. 156, n. 4, p. 830-840, 2008.

THELEN, K.M., et al. Brain cholesterol synthesis in mice is affected by high dose of simvastatin but not of pravastatin. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 316, p. 1146–1152, 2006 .

THOENEN, H., TRANZER, J. P. The pharmacology of 6-hydroxydopamine. **Revist Pharmacology**, v. 13, p. 169-180, 1973.

UNGERSTEDT, U. Postsynaptic supersensitivity after 6-hydroxydopamine induced degeneration of nigro-striatal dopamine system. **Acta Physiol. Scand.**, v. 367, p. 69–93, 1971.

UNGERSTEDT, U. Quantitative recording of rotational behavior in rats after 6-hydroxydopamine lesions of the nigrostriatal dopamine system. **Brain Research** v. 24, p. 485-493, 1970.

VAN DER MOST, P. J.; et al. Statins: Mechanisms of neuroprotection. **Progress in Neurobiology**, v. 88, p. 64-75, 2009.

VAN OOSTEN, R.V, et al. Functional updating of the bilateral 6-OHDA rat model for Parkinson's disease. **Society for Neuroscience** v. 25, p. 1599, 1999.

ZACCO, A., et al. 3-Hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors protect cortical neurons from excitotoxicity. **Journal of Neuroscience**, v. 23, p. 11104- 11111, 2003.

YAN, J., et al. Simvastatin prevents dopaminergic neurodegeneration in experimental parkinsonian models: the association with anti-inflammatory responses. **PLoS ONE**, 2011.

YONG, Y., et al. Lithium fails to protect dopaminergic neurons in the 6-OHDA model of Parkinson's disease. **Neurochemistry**, v. 36, p. 367-374, 2011.

YOU DIM, M. B., et al. Understanding Parkinson.s disease. **Scientific American** v. 276, p. 52.59, 1997.

YOUNG-XU, Y.K., et al. Long-term statin use and psychological well-being. **J.Am.Coll. Cardiol.**, v. 42, p. 690–697, 2003.

YU, S. P., et al. NMDA receptor-mediated K⁺ efflux and neuronal apoptosis. **Science**, v. 284, p. 336–339, 1999.

WANG, Q., et al. Statins: Multiple neuroprotective mechanisms in neurodegenerative diseases. **Experimental Neurology**, v. 230, p. 27- 34, 2011.

WANG, Q., et al. High dose of simvastatin induces hyperlocomotive and anxiolytic-like activities: the association with the up-regulation of NMDA receptor binding in the rat brain. **Experimental Neurology**, v. 216, p. 132- 138, 2009.

WANG, H., et al. Simvastatin and atorvastatin improve behavioral outcome, reduce hippocampal degeneration, and improve cerebral blood flow after experimental traumatic brain injury. **Experimental Neurology**, v. 206, p. 59- 69, 2007.

WANG, Q., et al. Simvastatin reverses the downregulation of dopamine D1 and D2 receptor expression in the prefrontal cortex of 6-hydroxydopamine-induced Parkinsonian rats. **Brain Research**, vol. 1045, p. 229- 233, 2005.

WANG, C., et al. Blockade of Nmethyl- D-aspartate receptors by phencyclidine causes the loss of corticostriatal neurons. **Neuroscience**, v. 125, p. 473–483, 2004.

WERSINGER, C.; SIDHU E. A. An inflammatory pathomechanism for Parkinson's disease? **Currant Medicinal Chemistry** v.13, n.5, p.591-602. 2006.

WIEBE, D. A.; WARNICK, G. R. Measurement of high-density lipoprotein cholesterol. In: RIFAI, N.; WARNICK, G.R.; DOMINICZAK, M. H., eds. **Handbook of lipoprotein testing**. Washington: AACC Press, p.127-44, 1997.

WIERZBICKI, A.S., Poston, R., Ferro, A. The lipid and non-lipid effects of statins. **Pharmacol. Ther.**, v. 99, p. 95–112, 2003.

WOLOZIN, B., WANG, S. W., et al. Simvastatin is associated with a reduced incidence of dementia and Parkinson's disease. **BMC Medicine**, v. 5, 2007.

WOOD, W.G.,et al. Statins and neuroprotection: a prescription to move the field forward. **Annals of New York Acad. Science**, v. 1199, p. 69–76, 2010.

**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
COMISSÃO DE ÉTICA DO USO DE ANIMAL**

CARTA DE APROVAÇÃO

Processo CEUA – 010/2013

Protocolo UEPG – 3593/2013

Título – “Protocolo de pesquisa “Avaliação do efeito neuroprotetor e comportamental dos inibidores de HMG-CoA redutase em um modelo animal de doença de Parkinson”. Decisão: aprovado por unanimidade, a utilização de 288 (duzentos e oitenta e oito) ratos.”.

Interessado – *Edmar Miyoshi*

Data de Entrada – 5/3/2013

Resultado: Aprovado

Data/Prazo – Validade de dois anos para projetos de pesquisa.
4/3/2015

Considerações

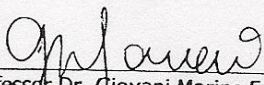
Prezado Professor,

Em relação ao protocolo de pesquisa sob sua responsabilidade a CEUA deliberou o seguinte:

- APROVADO, por dois anos, para a utilização de 288 ratos.

Atenciosamente,

Relatório Final previsto para 90 dias após término da vigência do protocolo ou no momento da apresentação de um novo protocolo.



Professor Dr. Giovanni Marino Favero
Coordenador Comissão de Ética no Uso de Animais CEUA-UEPG