



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA**

**RETIRADA DO TRATAMENTO COM
ATORVASTATINA E O DANO POR ESPÉCIES
REATIVAS NO CÓRTEX CEREBRAL DE RATOS**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Clarissa Vasconcelos de Oliveira

Santa Maria, RS, Brasil

2013

Retirada do tratamento com atorvastatina e o dano por espécies reativas no córtex cerebral de ratos

por

Clarissa Vasconcelos de Oliveira

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS) como requisito para obtenção do grau de **Mestre em Farmacologia**

Orientador: Profº Dr. Mauro Schneider Oliveira

Santa Maria, RS, Brasil

2013

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Farmacologia**

**A comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Dissertação de Mestrado**

**RETIRADA DO TRATAMENTO COM ATORVASTATINA E O DANO
POR ESPÉCIES REATIVAS NO CÓRTEX CEREBRAL DE RATOS**

elaborada por
Clarissa Vasconcelos de Oliveira

como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Farmacologia

COMISSÃO EXAMINADORA:

Mauro Schneider Oliveira Dr. (UFSM)
(Presidente/Orientador)

Roselei Fachinetto Dra. (UFSM)
(1º membro da banca)

Cristiano Ricardo Jessé Dr. (Unipampa)
(2º membro da banca)

Santa Maria, 27 de fevereiro de 2013

Dedico essa dissertação à minha família

“A verdadeira ciência ensina, sobretudo a duvidar e a ser ignorante”

(Miguel Unamuno)

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço à minha família, meus pais, Claro e Genisa, e a minha irmã, Sibebe, pela compreensão, pelo apoio, pela confiança, pelos ensinamentos e pelo amor que sempre me deram. Sem vocês eu nada seria. Amo vocês.

Ao Professor Mauro, que me abriu as portas para ingressar no seu grupo, e compartilhou comigo seu tempo e conhecimento. Que além de cientista é uma pessoa admirável. Muito obrigada pela oportunidade e pela confiança.

Aos meus amigos, Aline, Bárbara, Brandolt, Jéssica, que mesmo na distância não se fizeram ausentes. Obrigada pela sinceridade, pelos conselhos, pela palavra amiga, pelo carinho: “Não preciso de modelos, não preciso de heróis. Eu tenho amigos” (Renato Russo).

Agradeço ao Vini, pela parceria e pela ajuda durante todo o trabalho.

Obrigada a minha iniciação científica, Jéssica, sobretudo pela sua amizade e por alegrar meus dias com seu bom humor diário.

As minhas colegas de laboratório e amigas, Alice, Camilla, Fran, Nai, Aline, muito obrigada pelo apoio e pelos conselhos nas horas boas e nas horas ruins, é muito bom ter vocês ao meu lado.

Ao pessoal do Laboratório de Bioquímica do Exercício, Bibi, Fe, Aninha, Mauren, Samurai, Iuri, Léo e demais, agradeço pela troca de experiências, vocês me ensinaram muito. Muito obrigada pelos ensinamentos, pela amizade e parceria.

Agradeço ao Labneuro, em especial ao Professor Carlos Mello, por ter me dado a oportunidade de realizar esse trabalho em seu laboratório.

Meu muito obrigada ao Laboratório da Professora Roselei Fachinetto, que inúmeras vezes me permitiu realizar parte dos experimentos em seu laboratório.

À Universidade Federal de Santa Maria pela oportunidade de fazer parte do seu corpo docente.

Ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal de Santa Maria, seus professores e funcionários, por auxiliarem no meu crescimento profissional.

A Capes pela bolsa de estudos concedida.

E finalmente, agradeço a Deus, por sempre estar presente em minha vida, Iluminando meu caminho e por ter colocado todas as pessoas acima citadas em minha vida.

Muito obrigada!

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Farmacologia
Universidade federal de Santa Maria

RETIRADA DO TRATAMENTO COM ATORVASTATINA E O DANO POR ESPÉCIES REATIVAS NO CÓRTEX CEREBRAL DE RATOS

AUTORA: CLARISSA VASCONCELOS DE OLIVEIRA

ORIENTADOR: MAURO SCHNEIDER OLIVEIRA

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 27 de fevereiro de 2013

As estatinas são fármacos utilizados no tratamento das dislipidemias. Esses agentes são inibidores reversíveis da enzima limitante da via de biossíntese do colesterol, a 3-hidróxi-3-metilglutaril-coenzima A redutase, e impedem a conversão do HMG-CoA a mevalonato. Além da capacidade de diminuir o colesterol plasmático, as estatinas também possuem efeitos que são independentes da inibição da via de biossíntese do colesterol, são os chamados efeitos pleiotrópicos. Dados da literatura tem demonstrado que os inibidores da HMG-CoA redutase possuem propriedades neuroprotetoras, relacionadas à melhora na função vascular devido ao aumento da produção de óxido nítrico, neste contexto, essa classe de fármacos tem se mostrado útil no tratamento e na prevenção de doenças neurodegenerativas tais como, Alzheimer e Parkinson. Por outro lado, estudos baseados em dados clínicos mostram que a após a interrupção abrupta do tratamento com estatinas ocorre um período em que as propriedades protetoras geradas são perdidas, e efeitos deletérios são ativados, levando ao aparecimento de uma deterioração rebote na vasculatura, o qual parece estar associado a alterações na atividade das enzimas óxido nítrico sintase endotelial e NADPH oxidase. Contudo, até o momento, pouco se sabe sobre esse feito da síndrome da retirada da estatina no sistema nervoso central. Sendo assim, esse estudo teve por objetivo verificar o efeito da retirada do tratamento com atorvastatina no córtex cerebral de ratos. Para isso, diferentes parâmetros do estresse oxidativo/nitrosativo foram medidos, tais como a imunoreatividade para os marcadores de dano 3-nitrotirosina, 4-hidroxinonal e carbonil, a atividade das enzimas pró-oxidantes NADPH oxidase e xantina oxidase e das enzimas antioxidantes superóxido dismutase mitocondrial e citoplasmática, catalase e glutathione-S-transferase, bem como, o nível de óxido nítrico medido através do nitrito e nitrato. Os resultados obtidos mostram que a retirada do tratamento provoca diminuição na atividade da superóxido dismutase mitocondrial aumento na atividade da NADPH oxidase, o que sugere estar ocorrendo aumento na quantidade de radical superóxido. Associado a isso, foi visto diminuição no nível de óxido nítrico e aumento na imunoreatividade para 3-nitrotirosina, o que sugere que o superóxido está reagindo com o óxido nítrico levando a formação de peroxinitrito. Este último provoca a nitração de proteínas. O aumento da razão 3-NT/MnSOD, e da expressão da enzima visto por western blot, comprova a suposição de que a superóxido dismutase mitocondrial está sendo nitrada, essa nitração leva a uma menor detoxificação do superóxido, de modo que assim, é formado um ciclo. Assim, conclui-se que a retirada do tratamento com atorvastatina provoca dano oxidativo/nitrosativo no córtex cerebral de ratos devido a alterações na atividade das enzimas pró e anti-oxidantes.

Palavras chaves: estatinas, retirada, dano oxidativo/nitrosativo, córtex cerebral

ABSTRACT

Master Dissertation
Graduating Program in Pharmacology
Federal University of Santa Maria, RS, Brazil

ATORVASTATIN TREATMENT WITHDRAWAL AND THE DAMAGE BY REACTIVE SPECIES IN RATS CEREBRAL CORTEX

AUTHOR: CLARISSA VASCONCELOS DE OLIVEIRA

ADVISOR: MAURO SCHNEIDER OLIVEIRA

Date and Place of Defense: Santa Maria, February 27st, 2013

Statins are drugs used in dislipidemias treatment. These agents are reversible inhibitors of the rate-limiting enzyme in cholesterol biosynthesis, the 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase, and preventing the conversion of HMG-CoA to mevalonate. Besides reducing the plasma cholesterol, statins also present effects which seem cholesterol-independent, the so-called pleiotropic effects of statins. Data in literature has been shown that HMG-CoA inhibitors display neuroprotective properties, mainly related to improvement in vascular function due to increase in nitric oxide production, in this context, this class of drugs has proven useful in treatment and prevention of neurodegenerative disorders such as Alzheimer's and Parkinson's. On the other hand, studies based on clinical data have shown that after abrupt discontinuation of statin therapy occurs a period in which the protective properties are lost, and deleterious effects are activated, leading to the appearance of rebound deterioration of vasculature which seems to be associated with alterations in enzymes activities endothelial nitric oxide synthase and NADPH oxidase. However, little is known about whether these effects of statin withdrawal syndrome in the central nervous system. Therefore, this study aimed to investigate the effect of atorvastatin treatment withdrawal in the rat cerebral cortex. For this purpose, different parameters of oxidative/nitrosative stress were measured, including nitric oxide levels, the immunoreactivity for damage markers 3-nitrotyrosine, 4-hydroxynonenal and carbonyl, the activity of pro-oxidant enzymes NADPH oxidase and xanthine oxidase and the activity of antioxidant enzymes mitochondrial and cytoplasmatic superoxide dismutase, catalase and glutathione-S-transferase. The results indicate that atorvastatin withdrawal decreases mitochondrial superoxide dismutase activity and increases NADPH oxidase activity, which may increase superoxide radical levels. Associated with this was seen a decreased in the level of nitric oxide and increased in 3-nitrotyrosine immunoreactivity, suggesting that superoxide is reacting with nitric oxide leading the formation of peroxynitrite, which leads to proteins nitration. Increasing in the 3-NT/MnSOD ratio, and enzyme expression seen by western blot confirms the assumption that MnSOD is being nitrated, that nitration leads to lower superoxide detoxification. In conclusion, withdrawal of atorvastatin treatment occasioned oxidative/nitrosative damage in the rat cerebral cortex due to alterations in pro-oxidant and antioxidant enzymes activities.

Key words: statins, withdrawal, oxidative/nitrosative damage, cerebral cortex

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1 – Via do mevalonato e dos efeitos pleiotrópicos das estatinas.....	16
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS

3-NT: 3-nitrotirosina

ADP: adenosina-5'-difostato

ATP: Adenosina-5'-Trifostato

CAT: catalase

CuZnSOD: SOD cobre/zinco (citoplasmática)

DNA: ácido desoxirribonucleico

ELA: esclerose lateral amiotrófica

eNOS: óxido nítrico sintase endotelial

ERNs: espécies reativas de nitrogênio

EROs: espécies reativas de oxigênio

FAD: flavina-adenina dinucleótideo

FPP: farnesilpirofosfato

GGPP: geranylgeranylpirofosfato

GPx: glutathione peroxidase

GSH: glutathione reduzida

GSH-Px: glutathione peroxidase

GSH-Rd: glutathione reductase

GSSG: glutathione oxidada

GST: glutathione-S-transferase

GTP: guanosina trifostato

GTPase: enzima hidrolase de GTP

HDL: lipoproteína de alta densidade

HMG-CoA reductase: 3-Hidróxi-3-Metilglutaril-Coenzima A reductase

HNE: 4-hidroxinonenal

IL-1 β : interleucina-1 beta

iNOS: óxido nítrico sintase induzível

LDL: lipoproteína de baixa densidade

MnSOD: SOD manganês (mitocondrial)

NADPH: nicotinamida adenina dinucleótideo fostato hidrogênio

NO: óxido nítrico

RNA_m: ácido ribonucleico mensageiro

SNC: Sistema Nervoso Central

SOD: superóxido dismutase

TNF α : fator de necrose tumoral alfa

XOD: xantina oxidase

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
1.1 Estatinas	13
1.1.1 Breve Histórico	13
1.1.2 Mecanismo de ação e efeitos pleiotrópicos	14
1.1.3 Retirada do tratamento com estatina	18
1.2 Espécies reativas e estresse oxidativo/nitrosativo	19
1.2.1 NADPH oxidase e Xantina oxidase	21
1.3 Enzimas antioxidantes	24
2. HIPÓTESE	27
3. OBJETIVOS	28
3.1 Objetivo geral	28
3.2 Objetivos específicos	28
4. ARTIGO CIENTÍFICO	29
5. CONCLUSÃO	37
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	38

1. INTRODUÇÃO

1.1 Estatinas

1.1.1 Breve Histórico

No início de 1950, os estudos epidemiológicos sobre a relação entre o elevado nível de colesterol plasmático e doenças coronárias foram iniciados por John Gofman na Universidade da Califórnia em Berkeley. Gofman além verificar que existia uma relação direta entre ataques cardíacos e colesterol, descobriu também que o colesterol está armazenado em lipoproteínas de baixa densidade (LDL) e que os ataques cardíacos são menos freqüentes quando o colesterol está armazenado em lipoproteínas de alta densidade (HDL) (GOFMAN *et al.*, 1949; GOFMAN & LINDGREN, 1950; GOFMAN, 1956). A conexão epidemiológica entre colesterol sanguíneo e aterosclerose coronária foi firmemente estabelecida por um fisiologista da Universidade de Minnesota, Ancel Keys, o qual mostrou em seu estudo com 15 mil homens de meia idade que a incidência de ataques cardíacos era linearmente proporcional ao nível de colesterol no sangue (KEYS *et al.*, 1955; KEYS *et al.*, 1966).

A partir disso, o interesse clínico no colesterol levou ao desenvolvimento de intensos estudos para determinar a via pela qual o colesterol era sintetizado no corpo, bem como o mecanismo de regulação do mesmo. Os achados sugeriram que a inibição da 3-Hidroxi-3-Metilglutaril Coenzima redutase (HMG-CoA redutase) poderia ser uma maneira efetiva de diminuir o colesterol plasmático em humanos. Entre 1950 e 1960, muitas companhias iniciaram pesquisas por moléculas capazes de bloquear um dos 30 passos reacionais da síntese do colesterol a partir da acetil-coenzima A. Diversas moléculas homólogas aos intermediários da via foram sintetizadas, algumas dessas foram efetivas em animais, mas nenhuma delas foi efetiva a nível clínico (STEINBERG, 2006). Triparanol (MER/29), o qual foi introduzido para uso clínico nos Estados Unidos em 1959, foi o primeiro agente redutor de colesterol capaz de inibir a síntese do mesmo. No entanto, foi retirado do mercado no início de 1960, devido aos sérios efeitos colaterais, incluindo catarata (BLOHM & MACKENZIE, 1959; AVIGAN *et al.*, 1960; STEINBERG *et al.*, 1960; AVIGAN & STEINBERG, 1962). Em seguida, vieram

os Fibratos e a Colestiramina, porém, nenhum destes agentes pode ser considerado ideal em termos de eficácia e segurança.

Em 1968, Akira Endo no laboratório de pesquisas da Sankyo, especulava que fungos como cogumelos e moldes poderiam produzir antibióticos capazes de inibir a HMG-CoA redutase. Em abril de 1971, após cultivar mais de 3800 cepas de fungos, Endo encontrou no caldo de cultura de um molde uma potente atividade inibitória, ocasionada pela presença de uma substância chamada de citrinina (ENDO & KURODA, 1976). Citrinina fortemente inibia a HMG-CoA redutase e, além disso, diminuía os níveis de colesterol séricos em ratos (ENDO & KURODA, 1976; TANZAWA *et al.*, 1977). No entanto, devido a sua hepatotoxicidade não foi aprovada para uso clínico. Em julho de 1973, um novo metabólito, ML-236B ou compactina, isolado de uma cultura de *Penicillium citrinium* mostrou potente atividade inibitória da síntese do colesterol tanto *in vitro* como *in vivo* (ENDO *et al.*, 1977), no entanto em ratos a compactina não demonstrou efeito (ENDO, 1992). Em fevereiro de 1979, os pesquisadores da Merck isolaram um composto semelhante a compactina, chamado de mevinolina ou lovastatina a partir do fungo *Aspergillus terreus* (ALBERTS *et al.*, 1980; VAGELOS, 1991). Em setembro de 1987, foi dada a aprovação pelo FDA (Food and Drug Administration) para a lovastatina se tornar a primeira estatina comercial (VAGELOS, 1991; ENDO, 2010).

Desde que a lovastatina começou a ser comercializada, 6 estatinas, incluindo 2 semi-sintéticas (sinvastatina e pravastatina) e 4 sintéticas (fluvastatina, atorvastatina, rosuvastatina e pitavastatina) foram introduzidas no mercado (ENDO, 1992; 2008). Atualmente as estatinas são a classe de drogas com maior venda, utilizada por pacientes em todo o mundo, estima-se que cerca de 30 milhões de pessoas fazem uso de alguma estatina. Sendo a atorvastatina da indústria farmacêutica Pfizer (Lipitor[®]) a estatina mais utilizada.

1.1.2 Mecanismo de ação e efeitos pleiotrópicos

As estatinas são fármacos utilizados para reduzir os níveis séricos de colesterol. Esses agentes são capazes de se ligar, de modo reversível, a HMG-CoA redutase, enzima marca-passo da via de biossíntese do colesterol no fígado, responsável por catalisar a redução do HMG-CoA a mevalonato (NELSON & COX, 2000) (figura 1). Os compostos hidrofóbicos

volumosos das estatinas ocupam o sítio de ligação da enzima, bloqueando o acesso do substrato HMG-CoA. A forte ligação das estatinas ao sítio ativo da enzima ocorre devido ao grande número de interações de Van der Waals entre as estatinas e a HMG-CoA redutase (LIAO & LAUFS, 2005).

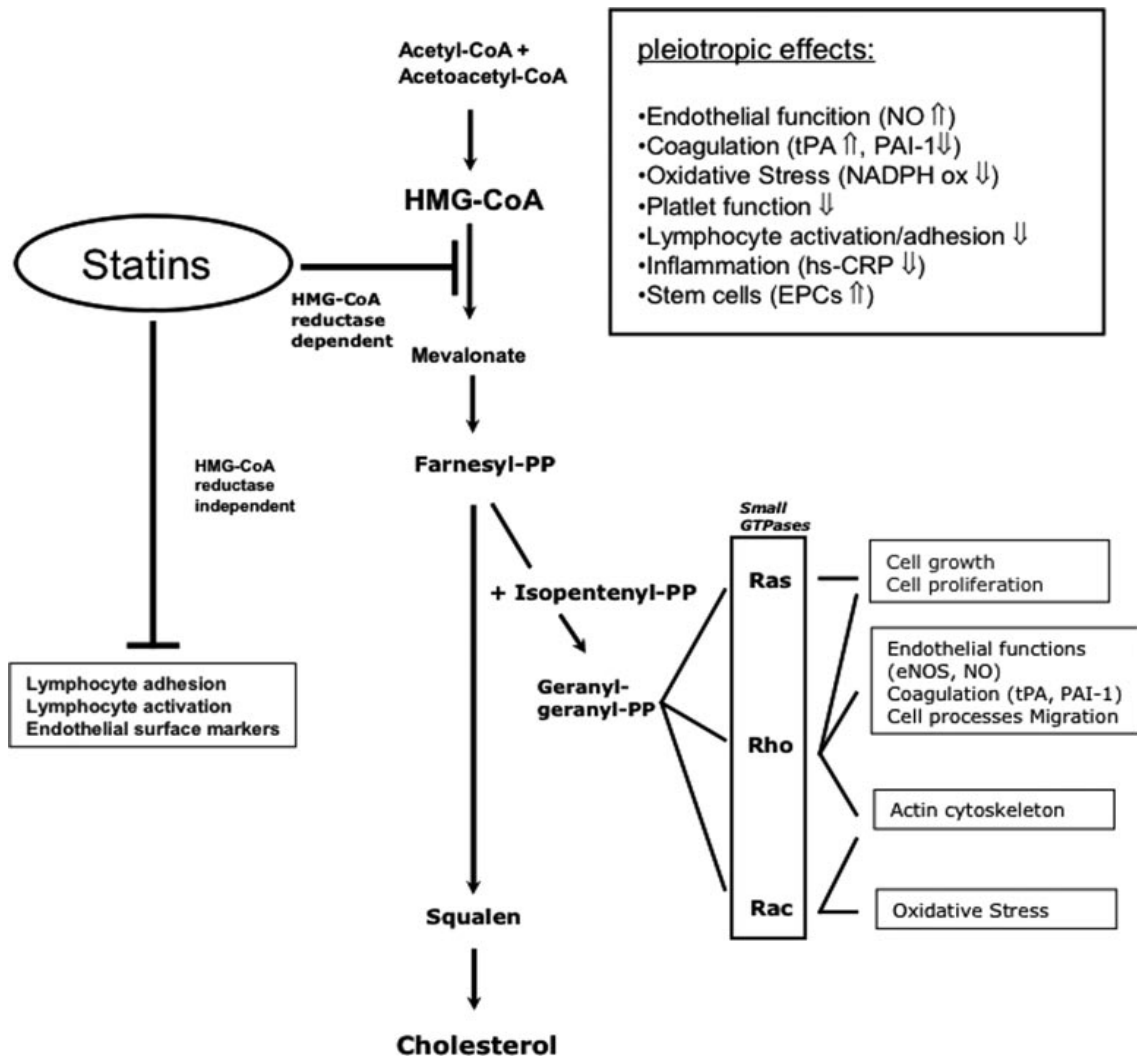


Figura 1: Via do mevalonato e dos efeitos pleiotrópicos das estatinas. As estatinas inibem a conversão do HMG-CoA à mevalonato por inibir competitivamente a HMG-CoA redutase. A biossíntese do colesterol e a síntese dos intermediários isoprenóides são inibidas. A atividade das pequenas GTPases é dependente da isoprenilação pelo intermediários isoprenóides, os quais são inibidos pelas estatinas. Os subsequentes efeitos pleiotrópicos das estatinas estão listados na caixa. PP- pirofosfato; HMG-CoA- 3-hidróxi-3-metilglutaril-Coenzima A. Modificado a partir de Bosel J, Endres M. *Nervenarzt* 2006;77:289–90.

Além dos efeitos sobre o colesterol plasmático, as estatinas possuem diversas propriedades que independem da inibição da biossíntese do colesterol, são os chamados efeitos pleiotrópicos. Existem estudos demonstrando que as estatinas têm efeito benéfico na

redução dos riscos de desenvolvimento de patologias cerebrais e cardiovasculares, incluindo doença de Alzheimer e epilepsia (LUKIW *et al.*, 2005). A análise transversal da base de dados de três hospitais por Wolozin e colaboradores, sugere que a prevalência do mal de Alzheimer em pacientes que tomam estatina é 60% menor em comparação aos pacientes que tomam outras medicações usados no tratamento de doenças cardiovasculares, e este efeito é independente da diminuição dos níveis séricos de colesterol (WOLOZIN *et al.*, 2000). Um outro estudo de caso-controle baseado no Banco de Dados de Pesquisa Clínica Geral UK mostrou que entre indivíduos com 50 anos de idade ou mais em terapia com estatina, o risco de desenvolvimento de demência foi significativamente reduzido, independente do seu estado lipídico (JICK *et al.*, 2000). Evidências recentes têm estimulado a discussão das estatinas como novos potenciais antiinflamatórios e agentes protetores vasculares para o tratamento de outras doenças cerebrais, como a esclerose múltipla e a depressão (LIAO & LAUFS, 2005).

Os efeitos pleiotrópicos das estatinas decorrem principalmente do bloqueio da formação dos intermediários isoprenóides da via de biossíntese do colesterol, entre eles o geranylgeranilpirofosfato (GGPP) e o farnesilpirofosfato (FPP), os quais possuem um papel essencial como anexos lipídicos para a modificação pós-translacional de várias proteínas, entre elas a proteína G heterométrica e as pequenas proteínas de ligação ao GTP, que pertencem a família das GTPases Rho, Ras e Rac. A isoprenilação converte as pequenas proteínas de ligação ao GTP de um estado inativo (citossólico) para um estado ativo (ligado a membrana). Assim, o bloqueio da conversão do HMG-CoA em ácido mevalônico previne a síntese dos intermediários isoprenóides, o qual resulta na inibição de moléculas de sinalização importantes, encontradas na via do mevalonato (PRINZ & ENDRES, 2009) (figura1).

Inibindo a geranylgeranilação da Rho e da Rac GTPases, ocorre uma superregulação na expressão e na atividade da eNOS, óxido nítrico sintase endotelial, (por inibir a Rho-GTPase) e a inibição da NADPH oxidase (por inibir a Rac-GTPase). Como consequência, a produção de superóxido diminui e a biodisponibilidade do óxido nítrico aumenta, o que pode atenuar a atividade das plaquetas (LAUFS *et al.*, 2000b) e os processos inflamatórios (ENDRES, 2006) e estimular o progenitor de células endoteliais (BOURCIER & LIBBY, 2000; WERNER *et al.*, 2002; CHEN *et al.*, 2003). Somado a isso, as estatinas superregulam a atividade do tPA (ativador do plasmogênio tecidual) e diminuem o inibidor do ativador do plasminogênio 1 (PAI1), ambos os quais são mediados pela inibição da Rho-GTPase (BOURCIER & LIBBY, 2000).

Estudos sugerem que a terapia com estatina modula a atividade da óxido nítrico sintase induzível (iNOS). A lovastatina, uma estatina natural, tem mostrado ser capaz de inibir

a superregulação da iNOS, e a produção de NO, em astrócitos e macrófagos de ratos (PAHAN *et al.*, 1997). Dados os supostos efeitos deletérios desta isoforma de NOS no sistema nervoso central, sua inibição pelas estatinas pode suprimir a resposta inflamatória que acompanha as desordens neurológicas, como por exemplo, a isquemia aguda. Além disso, em conjunto, estas observações sugerem um papel duplo das estatinas na isquemia cerebral, através do qual elas podem simultaneamente superregular a eNOS e inibir a iNOS de um modo sinergicamente neuroprotetor.

Muitos dos efeitos sobre a remodelação bioquímica do endotélio e sobre as moléculas de adesão ocorrem porque as estatinas são capazes de modular a produção de citocinas no sistema nervoso central. Citocinas são mediadores das respostas inflamatória e imunológica no cérebro e são produzidas por neurônios, células gliais e endotélio. Desse modo, as estatinas podem representar um novo meio de suprimir as respostas as citocinas por reduzir diretamente a indução *in vivo* de mediadores inflamatórios como iNOS, IL-1 β e o TNF- α nos astrócitos e macrófagos. A demonstração que esses efeitos das estatinas são reversíveis com a coadministração de mevalonato ou farnesil pirofosfato sugere que as estatinas são antiinflamatórias pois elas diminuem a isoprenilação (e conseqüentemente a atividade) das proteínas envolvidas na sinalização intracelular na inflamação (PAHAN *et al.*, 1997). Em resumo, estas observações preliminares permitem inferir que as ações antiinflamatórias, bem como de mobilização das células progenitoras endoteliais, ocasionadas pelas estatinas contribuem para a neuroproteção.

Os inibidores da HMG-CoA redutase também podem ser neuroprotetores através de seus potenciais efeitos antioxidantes. O dano oxidativo parece ser um mecanismo fundamental de muitas desordens neurológicas, incluindo as doenças cerebrovasculares (CHAN, 1996; DELANTY & DICHTER, 1998). A geração de radicais livres causa dano neuronal e endotelial através da indução da peroxidação lipídica, da oxidação de proteínas, e do dano direto aos ácidos nucléicos. Diversos estudos indicam que a terapia com estatinas pode reduzir a oxidação lipoproteica e melhorar os danos induzidos por radicais livres (VAUGHAN & DELANTY, 1999). Sabe-se que as estatinas são capazes de reduzir diversos marcadores de estresse oxidativo, como a 3-nitrotirosina, 8-hidroxideoxiguanosina (8-OHdG) e os isoprostanos, em pacientes hipercolesterolêmicos e em pacientes com risco de doença cardiovascular (RUECKSCHLOSS *et al.*, 2001; DE CATERINA *et al.*, 2002; WASSMANN *et al.*, 2002; SHISHEHBOR *et al.*, 2003; HONG *et al.*, 2006; HARAMAKI *et al.*, 2007; CANGEMI *et al.*, 2008). Além disso, a inibição de fontes enzimáticas de radicais livres de

oxigênio, como a NADPH oxidase, tem sido sugerido como um dos mecanismos redutores do estresse oxidativo mediante uso das estatinas (CARNEVALE *et al.*, 2010).

1.1.3 Retirada do tratamento com estatina

Estudos sugerem que após a descontinuação aguda do tratamento com estatina, ocorre um período no qual os mecanismos protetores vasculares são inibidos e mecanismos deletérios vasculares são ativados. Este período é caracterizado por disfunção endotelial e aumento da atividade pró-aterosclerótica e pró-inflamatória nos vasos sanguíneos, e é definida por muitos pesquisadores como “síndrome da retirada da estatina” (PINEDA & CUBEDDU, 2011).

Laufs *et al* (2000) e Westphal *et al* (2008), revelaram em suas pesquisas que a interrupção do tratamento com estatina além de levar a uma perda rápida de suas propriedades protetoras, também é seguida por uma deterioração rebote na vasculatura. Uma diminuição significativa na atividade da óxido nítrico sintase endotelial e nos níveis de óxido nítrico foram observados nas células endoteliais após a descontinuação da terapia com estatina (LAUFS *et al.*, 2000a; WESTPHAL *et al.*, 2008). Assim, o grupo propôs que a retirada da terapia com estatina leva a um profundo efeito rebote, porque a rápida isoprenilação da Rho citosólica induz massiva translocação para a membrana e ativação da Rho, levando a supressão da atividade e da expressão da eNOS.

Segundo Brandes e colegas, após a retirada da estatina, nas células musculares lisas vasculares ocorre aumento dos níveis de substâncias pró-aterogênicas como o fator tecidual (tromboplastina) e os radicais livres (BRANDES *et al.*, 2003). Nesse sentido, sabe-se que o tratamento com estatina previne a ancoragem da Rac e da Ras na membrana plasmática, e que a Rac-1 está criticamente envolvida na ativação da NADPH oxidase, assim, Vecchione e Brandes (2012) mostraram que, a retirada da terapia com estatina ativa a NADPH oxidase através da translocação e conseqüente ativação da Rac-1, levando a produção do radical superóxido (VECCHIONE & BRANDES, 2002). Além disso, a descontinuação do tratamento aumenta as vias de sinalização celular envolvidas no crescimento, diferenciação, apoptose, e vasoconstrição estimuladas por angiotensina-II (TOUYZ & SCHIFFRIN, 2000; CASTEJON

et al., 2007), bem como os níveis plasmáticos do fator plaquetário 4 e da β -tromboglobulina (GERTZ *et al.*, 2003).

Uma variedade de estudos clínicos avaliando a existência da “síndrome da retirada da estatina” foram conduzidos em pacientes hospitalizados. Os dados apresentados no estudo de Pineda e Cubbedu (2011) sugerem que a interrupção da terapia com estatina mesmo que por um dia, em pacientes com algum tipo de dano vascular agudo, como a síndrome coronária aguda, a isquemia aguda, ou até mesmo antes e/ou imediatamente após uma cirurgia vascular, está associada com prognósticos hospitalares piores. A ocorrência de uma lesão vascular aguda juntamente com a descontinuação do tratamento com estatina parece atuar sinergicamente na piora das respostas dos pacientes. Conseqüentemente, o estudo defende que, todas as medidas que assegurem a continuação do tratamento, incluindo a administração via nasogástrica no período pós-operatório, devem ser estabelecidas. Os pesquisadores também alertam sobre a importância do conhecimento dos médicos a respeito dos riscos da descontinuação da terapia com estatina. Além disso, sob condições de dano vascular severo, segundo os resultados obtidos no estudo clínico, o tratamento com os inibidores da HMG-CoA deve ser continuado, e a dose pode ser maximizada durante a hospitalização, a menos que isso seja contra-indicado (PINEDA & CUBEDDU, 2011).

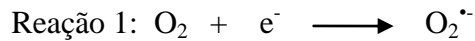
1.2 Espécies reativas e estresse oxidativo/nitrosativo

Radicais livres são definidos como moléculas, átomos ou grupamentos de átomos que possuem número ímpar de elétrons em sua última camada eletrônica. É este não-emparelhamento de elétrons que confere sua alta reatividade. Entretanto, existem moléculas que não possuem elétrons desemparelhados e são da mesma forma, reativos e conhecidos como espécies reativas de oxigênio (ERO) e também espécies reativas de nitrogênio (ERN) (PIETTA, 2000; VISIOLI *et al.*, 2000).

O metabolismo aeróbio apresenta uma série de reações que podem formar espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (BARREIROS *et al.*, 2006). As principais EROs distribuem-se em dois grupos, os radicalares: hidroxila (OH^\bullet), superóxido (O_2^\bullet), peroxila (ROO^\bullet) e alcoxila (RO^\bullet); e os não-radicalares: oxigênio (O_2), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e ácido hipocloroso. Dentre as ERNs incluem-se o óxido nítrico (NO), óxido nitroso (N_2O_3), ácido

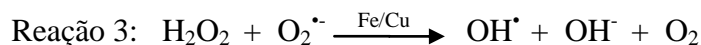
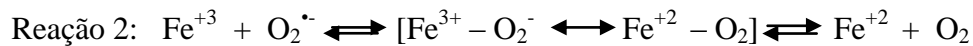
nitroso (HNO_2), nitritos (NO_2^-), nitratos (NO_3^-) e peroxinitritos (ONOO^-) (HALLIWELL *et al.*, 1999).

O superóxido (reação 1) é um oxidante fraco e sua ação tóxica ocorre, na verdade, mais em função dos produtos de sua redução, como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o radical peroxila (HO_2^\bullet) e o radical hidroxila (OH^\bullet), este último um potente agente oxidante.



Segundo Kontos (2001), a produção de radical-ânion superóxido, teria diversas origens, entre elas, a cadeia transportadora de elétrons mitocondrial e as enzimas, xantina oxidase e NADPH oxidase (KONTOS, 2001).

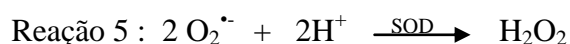
O superóxido participa de processos químicos importantes no contexto biológico. O principal deles é auxiliar na produção do radical peroxila, através da redução de quelatos de Fe^{+3} , formando Fe^{+2} (reação 2). O OH^\bullet pode ser obtido através da reação de Haber-Weiss (reação 3), na qual os íons de metais de transição catalisam a reação entre peróxido de hidrogênio e o superóxido (HALLIWELL *et al.*, 1995; KEHRER, 2000).



Além disso, o radical superóxido pode reagir diretamente com o óxido nítrico, gerando peroxinitrito. Este ao se decompor pode levar à formação de um oxidante com características do radical hidroxil (SCHNEIDER, C.D.; DE OLIVEIRA, A.R.; 2004) (reação 4).

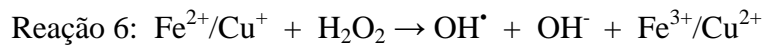


Ao receber mais um elétron e dois íons hidrogênio, o superóxido forma peróxido de hidrogênio, através do processo chamado dismutação (reação 5) (YU, 1994). As mitocôndrias são importantes fontes de superóxido e, como a presença deste ânion pode causar sérios danos, elas são ricas em superóxido dismutase mitocondrial (MnSOD) que o converte em peróxido de hidrogênio.



O peróxido de hidrogênio é pouco reativo frente às moléculas orgânicas na ausência de metais de transição. No entanto, exerce papel importante no estresse oxidativo por ser capaz de transpor as membranas celulares facilmente e gerar o radical hidroxila.

Quando o H_2O_2 recebe mais um elétron e um íon hidrogênio, é formado o radical hidroxila, que é o mais reativo dos intermediários, pois pode reagir e alterar qualquer estrutura celular que esteja próxima e assim danificar enzimas, membranas ou ácidos nucleicos. O radical hidroxila pode ser formado quando o peróxido de hidrogênio reage com íons ferro ou cobre (reação 6). A reação é conhecida como Reação de Fenton.



O estresse oxidativo/nitrosativo é definido como a situação na qual a formação de espécies reativas excede significativamente a capacidade de defesa antioxidante e de reparo do organismo, tendo como consequência o aumento de danos a biomoléculas. Estes danos, quando não reparados, acabam comprometendo o funcionamento da célula e levando-a a morte por apoptose ou necrose. Assim, os danos oxidativos induzidos nas células e tecidos têm sido relacionados com a etiologia de várias doenças, sobretudo as doenças neurodegenerativas. Devido a sua alta taxa metabólica e sua reduzida capacidade de regeneração celular, quando comparado a outros órgãos, o cérebro é particularmente susceptível ao dano por espécies reativas (ANDERSEN, 2004). Marcadores de estresse oxidativo, como carbonilas protéicas, nitrotirosina, produtos de peroxidação lipídica e bases de DNA oxidadas, são detectados em concentrações aumentadas em tecidos de pacientes e modelos animais de Alzheimer, Parkinson e ELA (FINKEL & HOLBROOK, 2000; HALLIWELL, 2000; VISIOLI *et al.*, 2000).

1.2.1 NADPH oxidase e Xantina oxidase

As espécies reativas são geradas a partir de diversas fontes in vivo. Um número de diferentes enzimas tem-se mostrado capazes de gerar EROs, incluindo o citocromo P450,

várias oxidases, peroxidases, lipoxigenases e desidrogenases (BRUNK & TERMAN, 2002; CARO & CEDERBAUM, 2002; GOTTLIEB, 2003). A nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) oxidase e a xantina oxidase (XOD) são duas enzimas bem conhecidas que geram espécies reativas de oxigênio (SATO *et al.*, 2011).

A família das enzimas NADPH oxidase geram superóxido, por catalisar a transferência de elétrons do NADPH para o oxigênio molecular (reação 7), e são especialmente importantes na sinalização redox (LAMBETH, 2004; CAVE *et al.*, 2006; BEDARD & KRAUSE, 2007). NADPH oxidases são encontradas virtualmente em todos os tecidos e são a maior fonte de ânion superóxido observada na vasculatura (GUZIK *et al.*, 2000).



A NADPH oxidase é um complexo enzimático de múltiplas subunidades que foi identificado pela primeira vez em neutrófilos, no qual, ela está envolvida na defesa não-específica contra micróbios durante a fagocitose. Na última década, cinco isoformas da oxidase foram identificadas, sendo que cada uma delas é codificada por um gene específico, e elas estão distribuídas em tecidos distintos (LAMBETH, 2004; BEDARD & KRAUSE, 2007). As isoformas distinguem-se pela presença de subunidades catalíticas distintas, que variam de Nox1-Nox5, as quais medeiam o processo de transferência de elétrons. As subunidades catalíticas Nox, contêm de 5-6 domínios transmembrana, sítios de ligação para o NADPH e o FAD, e dois domínios heme que podem sofrer redução e oxidação cíclica. Os componentes citosólicos da NADPH clássica compreendem o p47phox, p67phox, p40phox e a Rac1 ou 2 (AKKI *et al.*, 2009).

A ativação da enzima é um processo complexo que envolve múltiplas modificações pós-translacionais das subunidades regulatórias da oxidase, sobretudo da p47phox e da Rac, o que facilita sua translocação e ligação ao heterodímero Nox-p22phox, seguido pela ativação da transferência de elétrons. De maneira resumida, a NADPH oxidase consiste de cinco componentes essenciais, dois na membrana e três no citosol (BABIOR, 1999). Os dois componentes associados à membrana são a gp91phox (Nox), uma proteína que contém os componentes do transporte de elétrons da enzima, e a p22phox, uma pequena proteína de função desconhecida. Estas duas proteínas associadas formam um flavocitocromo conhecido como citocromo b558. No citosol, estão a p47phox, a qual se torna altamente fosforilada durante a ativação da oxidase; a p67phox, a qual contém um sítio de ligação do NADPH, mas

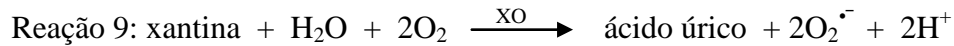
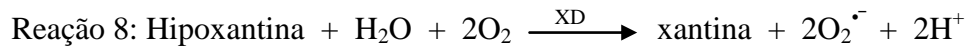
cuja função é desconhecida; e a Rac 1 ou Rac2, uma pequena GTPase. Os componentes citosólicos p47phox e p67phox estão na forma de um complexo o qual também contém p40phox, cujo papel na função da oxidase não está clara (BABIOR, 2000). Todas as NADPH oxidases requerem NADPH como doador de elétrons, recente foi sugerido que a disponibilidade do NADPH pode influenciar a atividade da oxidase em alguns locais (GUPTE, 2008).

As EROs originadas da NADPH oxidase podem mediar seus efeitos através de vias de sinalização, incluindo a ativação de kinases redox-sensíveis (como as proteínas B e C, membros da família das proteínas kinases ativadas pro mitógeno, MAPK, e as janus kinase, JAK), também indiretamente através da inibição das proteínas tirosina fosfastases, ou diretamente, alterando a atividade dos fatores de transcrição redox-sensíveis como o ativador de proteína-1 (AP-1), o NF- κ B, o fator induzido por hipóxia-1 (HIF-1) e o transdutor de sinal e ativador da transcrição (STAT), bem como através de efeito direto sobre as enzimas (como as metaloproteinases), os canais iônicos e os receptores (BRANDES, 2003; CAVE *et al.*, 2006; DWORAKOWSKI *et al.*, 2006; BEDARD & KRAUSE, 2007; ANILKUMAR *et al.*, 2009). O aumento na produção de superóxido pela NADPH oxidase induz dano oxidativo mitocondrial através de alterações estruturais na membrana mitocondrial interna e distúrbio no fluxo na cadeia transportadora de elétrons, o que aumenta a produção de EROs (RAY & SHAH, 2005; DOUGHAN *et al.*, 2008).

Outra fonte de superóxido sugerida é a enzima xantina oxidase, a qual no músculo esquelético, bem como em muitos outros tecidos, está localizada na parede vascular (JARASCH *et al.*, 1981; HELLSTEN-WESTING, 1993).

Esta enzima participa na via de degradação das purinas, oxidando hipoxantina a xantina e xantina a ácido úrico, utilizando-se a coenzima NAD⁺ como acceptor de elétrons. Em certas condições, tal como de estresse metabólico do tecido músculo-esquelético (razão ATP/ADP baixa), lesão de reperfusão (GRISHAM *et al.*, 1986; TERADA *et al.*, 1992), injúria térmica (FRIEDL *et al.*, 1989), reumática (MIESEL & ZUBER, 1993), renal (PFEFFER *et al.*, 1994) e doença pulmonar (TILL *et al.*, 1991), a xantina desidrogenase converte-se à sua forma oxidase - XO -, a qual utiliza oxigênio molecular como acceptor de elétrons, podendo vir a gerar EROs e causar lesões na célula muscular (HELLSTEN *et al.*, 1996).

A contribuição da enzima XO para a formação de espécies reativas é mostrada pela reação de oxidação de hipoxantina e xantina e seus respectivos produtos, xantina (reação 8) e ácido úrico (reação 9):



Em tecidos saudáveis a xantina oxidase existe principalmente na forma desidrogenase, não capaz de produzir o radical superóxido, porém a enzima pode ser modulada para a forma oxidase, a qual é capaz de produzir superóxido através da oxidação de grupos sulfidila essenciais (CORTE & STIRPE, 1972) ou através da proteólise limitada (DELLA CORTE & STIRPE, 1968). O início desse mecanismo modulador não foi, até o momento, completamente elucidado.

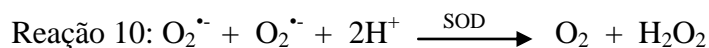
1.3 Enzimas antioxidantes

“Antioxidante é qualquer substância que, quando presente em baixa concentração comparada à do substrato oxidável, regenera o substrato ou previne significativamente a oxidação do mesmo” (HALLIWELL, 2000). Como as EROs são continuamente formadas em pequenas quantidades pelos processos normais do metabolismo, todas as células possuem mecanismos para mitigar seus efeitos agressores. O sistema de defesa antioxidante está dividido em enzimático e não enzimático. O primeiro inclui as enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutaciona peroxidase (GPx). Já o sistema não enzimático inclui compostos sintetizados pelo organismo humano como bilirrubina, ceruloplasmina, hormônios sexuais, melatonina, coenzima Q, ácido úrico, e outros, ingeridos através da dieta regular ou via suplementação como ácido ascórbico (vitamina C), α -tocoferol (vitamina E), β -caroteno (precursor de vitamina A) e grupos fenóis de plantas (flavonóides) (EVANS & HALLIWELL, 1999).

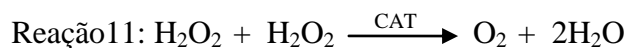
Ainda conforme a ação sobre os radicais livres, o antioxidante pode ser denominado de “scavenger”, quando ele age transformando um radical livre em outro menos reativo, ou “quencher”, quando consegue neutralizar completamente o radical livre através da absorção de toda a energia de excitação.

O perfeito equilíbrio entre as enzimas antioxidantes (CuZnSOD, MnSOD, CAT, GPx) é importante para a manutenção da integridade celular.

As enzimas superóxido dismutases (SODs) (EC 1.15.1.1) são responsáveis pela dismutação do radical ânion superóxido convertendo-o em oxigênio e peróxido de hidrogênio (reação 10). Nos mamíferos, existem três isoformas de superóxido dismutase (SOD): SOD extracelular que contem cobre e zinco (SOD3; ECSOD), SOD mitocondrial que contém manganês (SOD2:MnSOD), e a SOD citosólica/nuclear que contém cobre e zinco (SOD1: CuZnSOD), no entanto esta última também se localiza no espaço intermembrana mitocondrial (OKADO-MATSUMOTO & FRIDOVICH, 2001). Apesar de todas as isoenzimas catalisarem a mesma reação, a função de cada isoforma de SOD na fisiologia celular parece ser muito diferente, e frequentemente uma SOD não pode compensar a outra. Estudos mostram que o fenótipo letal exibido por camundongos knockout para SOD2 não é corrigido ou retardado pela superexpressão da SOD1, isto sugere que a localização subcelular da SOD é importante nas funções fisiológicas destas enzimas (COPIN *et al.*, 2000).

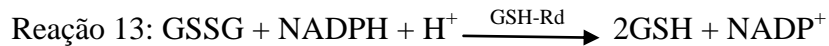
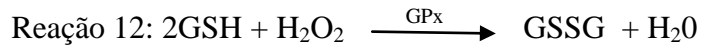


A catalase (EC 1.11.1.6), outro antioxidante enzimático, possui a capacidade de transformar o peróxido de hidrogênio em água e oxigênio (reação 11). A catalase localiza-se nos peroxissomas, por isso sua ação é diminuída em órgãos como o coração, pulmão e o cérebro (pois nessas estruturas são encontrados poucos peroxissomas). Nestes órgãos, a ação antioxidante por esta enzima ocorre quando os radicais livres atingem a circulação sanguínea, através da catalase eritrocitária. Na presença de baixos níveis de peróxido de hidrogênio, os peróxidos orgânicos são eliminados preferencialmente pela glutathiona peroxidase, enquanto que em altas concentrações predomina a ação da catalase (NORDBERG & ARNÉR, 2001).



A glutathiona peroxidase (GSH-Px) catalisa a redução do peróxido de hidrogênio e peróxidos orgânicos para seus correspondentes alcoóis à custa da conversão da GSH a GSSG (reação 12) (SHAN *ET AL.*, 1990). A glutathiona reduzida (GSH) está presente na maioria das células e é o tiol (-SH) mais abundante no meio intracelular (MEISTER & ANDERSON, 1983), sua capacidade redutora é determinada pelo grupamento -SH, presente na cisteína. A GSH pode ser considerada um dos agentes mais importantes do sistema de defesa antioxidante da célula. Após exposição da GSH ao agente oxidante, ocorre sua oxidação a GSSG (glutathiona oxidada) (HEBBEL, 1986), e sua recuperação é feita pela enzima

glutationa redutase (GSH-Rd) (reação 13), esta etapa é essencial para manter íntegro o sistema de proteção celular.



Há ainda, a enzima glutationa-S-transferase (GST), a qual tem importante atuação na desintoxicação de vários compostos orgânicos. As GSTs estão presentes em diferentes compartimentos subcelulares incluindo citosol, mitocôndria, retículo endoplasmático, núcleo e membrana plasmática. A regulação e a função das GSTs têm implicações no crescimento celular, no estresse oxidativo bem como na progressão e na prevenção de doenças.

A expressão alterada da GST (EC 2.5.1.18) parece ser uma resposta evolucionária das células para proteção contra a toxicidade química e o estresse oxidativo, e tem sido implicada em doenças hepáticas, cardíacas e neurológicas. A expressão tecido e espécie específicas, e a distribuição da GST são consideradas uma resposta adaptativa contra a toxicidade do metabolismo endógeno e exógeno (HAYES *et al.*, 2005) ao estresse oxidativo relacionado a doenças degenerativas, e a resistência a drogas visto na terapia contra o câncer. Nesse sentido, a GST possui um importante papel na ativação de proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPKs) e de vários fatores de transcrição que regulam a apoptose e a sobrevivência celular (ZIMNIAK, 2006). A manutenção da defesa antioxidante pela glutationa (GSH) em diferentes compartimentos celulares também é criticamente regulada pela GST, a qual catalisa reações de conjugação da glutationa reduzida (GSH) com os metabólitos produzidos, aumentando sua hidrossolubilidade, facilitando assim, a excreção dos mesmos. Desse modo, resume-se a GST como uma enzima multifuncional, envolvida na detoxificação celular de metabólitos endógenos tóxicos, radical superóxido e produtos químicos exógenos tóxicos (ALLOCATI *et al.*, 2009; ZIMNIAK, 2006).

2. HIPÓTESE

Além do efeito sobre o colesterol plasmático, as estatinas vêm mostrando serem capazes de proteger o sistema nervoso central através da melhora da função endotelial dos vasos sanguíneos cerebrais, sendo o aumento da produção do óxido nítrico o principal mediador desse efeito neuroprotetor. Desse modo, os inibidores da HMG-CoA redutase tem-se tornado úteis no tratamento de diversas doenças neurológicas. No entanto, estudos vêm mostrando que a retirada do tratamento com estatina leva a uma perda rápida dos mecanismos protetores proporcionados pelo tratamento com as mesmas, e ao aparecimento de uma deterioração rebote na vasculatura, relacionado a alteração na atividade das enzimas óxido nítrico sintase endotelial e NADPH oxidase. Porém, o efeito dessa “síndrome de retirada da estatina” sobre o sistema nervoso central ainda é pouco conhecido.

Desse modo, a hipótese desse trabalho é de que a retirada de um dia do tratamento com atorvastatina ocasiona efeito deletério no córtex cerebral de ratos, sobretudo, devido a mudanças no equilíbrio redox das células.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Este trabalho tem por objetivo verificar o efeito da retirada de um dia do tratamento com atorvastatina sobre parâmetros de dano oxidativo/nitrosativo no córtex cerebral de ratos e os mecanismos envolvidos.

3.2 Objetivos específicos

Avaliar o efeito da retirada do tratamento com atorvastatina sobre:

1. Os níveis de óxido nítrico no córtex cerebral de ratos, através da determinação dos níveis de nitrito e nitrato no mesmo;
2. A atividade das enzimas pró-oxidantes xantina oxidase e NADPH oxidase;
3. A atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase mitocondrial e citosólica, catalase, glutathione-S-transferase;
4. Os níveis de imunoreatividade para os marcadores de dano oxidativo/nitrosativo 3-nitrotirosina (3-NT), 4-hidroxinonenal (HNE) e carbonilas protéicas (carbonil), por slot blot;
5. Elucidar o mecanismo pelo qual a retirada do tratamento com atorvastatina provoca diminuição na atividade da enzima MnSOD e o conseqüente dano oxidativo/nitrosativo no córtex cerebral de ratos, verificando a imunoreatividade para MnSOD através do western blot, e imunoprecipitando a mesma para verificação da razão 3-NT/MnSOD por slot blot.

4. ARTIGO CIENTÍFICO

Pharmacological Research 71 (2013) 1–8



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Pharmacological Research

journal homepage: www.elsevier.com/locate/yphrs



Atorvastatin withdrawal elicits oxidative/nitrosative damage in the rat cerebral cortex

Clarissa Vasconcelos de Oliveira^a, Vinícius Rafael Funck^a, Letícia Meier Pereira^a,
Jéssica Grigoletto^a, Leonardo Magno Rambo^b, Leandro Rodrigo Ribeiro^b,
Luiz Fernando Freire Royes^{a,b}, Ana Flávia Furian^a, Mauro Schneider Oliveira^{a,b,*}

^a Graduate Program in Pharmacology, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, Brazil

^b Graduate Program in Biological Sciences: Biochemistry, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 26 October 2012
Received in revised form 1 February 2013
Accepted 11 February 2013

Keywords:

Atorvastatin
Withdrawal
Cerebral cortex
Nitrosative damage
SOD

ABSTRACT

Statins are inhibitors of the enzyme 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase, the rate-limiting step in cholesterol biosynthesis. Statins effectively prevent and reduce the risk of coronary artery disease through lowering serum cholesterol, and also exert anti-thrombotic, anti-inflammatory and antioxidant effects independently of changes in cholesterol levels. On the other hand, clinical and experimental evidence suggests that abrupt cessation of statin treatment (*i.e.* statin withdrawal) is associated with a deleterious rebound phenomenon. In fact, statin withdrawal increases the risk of thrombotic vascular events, causes impairment of endothelium-dependent relaxation and facilitates experimental seizures. However, evidence for statin withdrawal-induced detrimental effects to the brain parenchyma is still lacking. In the present study adult male Wistar rats were treated with atorvastatin for seven days (10 mg/kg/day) and neurochemical assays were performed in the cerebral cortex 30 min (atorvastatin treatment) or 24 h (atorvastatin withdrawal) after the last atorvastatin administration. We found that atorvastatin withdrawal decreased levels of nitric oxide and mitochondrial superoxide dismutase activity, whereas increased NADPH oxidase activity and immunoreactivity for the protein nitration marker 3-nitrotyrosine in the cerebral cortex. Catalase, glutathione-S-transferase and xanthine oxidase activities were not altered by atorvastatin treatment or withdrawal, as well as protein carbonyl and 4-hydroxy-2-nonenal immunoreactivity. Immunoprecipitation of mitochondrial SOD followed by analysis of 3-nitrotyrosine revealed increased levels of nitrated mitochondrial SOD, suggesting the mechanism underlying the atorvastatin withdrawal-induced decrease in enzyme activity. Altogether, our results indicate the atorvastatin withdrawal elicits oxidative/nitrosative damage in the rat cerebral cortex, and that changes in NADPH oxidase activity and mitochondrial superoxide dismutase activities may underlie such harmful effects.

© 2013 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Statins are inhibitors of the enzyme 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A (HMG-CoA) reductase, which catalyzes the rate-limiting step in cholesterol biosynthesis [1]. As a consequence, they effectively prevent and reduce the risk of coronary artery disease by lowering serum cholesterol levels [1]. Besides their action on HMG-CoA reductase, it has been shown that statins display anti-thrombotic [2], anti-inflammatory [2] and antioxidant

activity [2–5]. Therefore, it has been proposed that statin treatment would be useful in other conditions than cardiovascular diseases. In fact, the neuroprotective effects of statins have been reported in several clinical and experimental conditions, such as traumatic brain injury [6], stroke [7], ischemia [8], Alzheimer's disease [5], excitotoxic aminoacid exposure [9] and seizures [10,11]. However, compelling clinical and experimental evidence suggests that abrupt cessation of statin treatment (*i.e.* statin withdrawal) is associated with a deleterious rebound phenomenon [10,12–18]. For instance, patients with stable coronary heart disease presented a threefold increase in thrombotic vascular events after simvastatin treatment was stopped and continued with relatively lower doses of fluvastatin [12], and statin discontinuation was associated with poor outcome and higher mortality after intracerebral hemorrhage [19]. Another large epidemiologic study showed that patients who stopped statins on admission for acute myocardial

* Corresponding author at: Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Av. Roraima, n° 1000, Prédio 21, sala 5207, CEP 97105-900, Santa Maria, RS, Brazil. Tel.: +55 55 3220 9378; fax: +55 55 3220 8241.

E-mail address: ms.oliveira@ufsm.br (M.S. Oliveira).

infarction developed more heart failure, ventricular tachycardia, or death during hospitalization than patients who were not in statin treatment [13]. Moreover, cerivastatin or atorvastatin withdrawal elicited oxidative stress and impaired endothelium-dependent relaxation in mice [14] and rapid loss of statin-mediated protection in mouse models of cerebral ischemia and thrombus formation [15]. Furthermore, atorvastatin withdrawal facilitated the occurrence of pentylenetetrazol-induced seizures, as evidenced by a decrease in the latency to clonic and generalized tonic-clonic seizures [10]. However, evidence for statin withdrawal-induced harmful effects to the brain parenchyma is still lacking.

Considering the widespread use of statins and compelling evidence that statin withdrawal causes important deleterious effects for which there has been no clear prophylactic strategy [16], it becomes important to study the molecular mechanisms underlying such effects. Given the antioxidant activity displayed by statin treatment and in light of the concept that drug discontinuation effects are caused by the biologic adaptation to the drug persisting after the drug is cleared from the body [20], we hypothesized that atorvastatin withdrawal elicits oxidative and nitrosative stress in the rat cerebral cortex. Therefore, the present study aimed to investigate the effects of statin withdrawal on markers of oxidative and nitrosative stress and on the activity of antioxidant and pro-oxidant enzymes in the rat cerebral cortex, in order to shed some light on the molecular mechanisms underlying the deleterious effects elicited by statin withdrawal.

2. Material and methods

2.1. Animals and reagents

Adult male Wistar rats (250–300 g) were used. Animals were maintained under controlled light and environment (12:12 h light-dark cycle, $24 \pm 1^\circ\text{C}$, 55% relative humidity) with free access to water and food (Supra™, Santa Maria, RS, Brazil). All experimental protocols were designed aiming to keep the number of animals used to a minimum, as well as their suffering. These were conducted in accordance with national and international legislation (guidelines of Brazilian Council of Animal Experimentation – CONCEA – and of U.S. Public Health Service's Policy on Humane Care and Use of Laboratory Animals – PHS Policy), and with the approval of the Ethics Committee for Animal Research of the Federal University of Santa Maria (process #53/2010).

Atorvastatin were extracted from commercially available capsules (Lipitor®). Its identity and purity were checked by nuclear resonance methods and were >98%. Atorvastatin was chosen because several studies have shown that its withdrawal worsens outcomes in a number of experimental conditions [10,14,15], and because it is the most widely prescribed statin, being used as the reference group in statin safety studies [21,22]. Primary antibodies for mitochondrial SOD and 3-nitrotyrosine (3-NT) were purchased from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA, catalog numbers sc-30080 and sc-55256, respectively). All the other reagents were purchased from Thermo Scientific Pierce Protein Research Products (Rockford, IL, USA) or Sigma–Aldrich (St. Louis, MO, USA).

Animals were treated with atorvastatin (10 mg/kg) or a corresponding volume of vehicle solution (sterile saline solution – 0.9% NaCl) by daily intragastric gavage for 7 days, and in one group treatment was withheld for 24 h before sample collection. Atorvastatin doses and schedules for administration were chosen based in previous studies [10,15], and treatment schedules were carried out in such a manner that samples from every experimental group were collected in a given session.

2.2. Tissue processing for neurochemical analyses

At the appropriate time according to the schedule described above, animals were killed by decapitation and had their brain exposed by the removal of the parietal bone. Cerebral cortices were rapidly dissected on an inverted ice-cold Petri dish and homogenized in the proper solution for each subsequent neurochemical analyses, as described below.

2.3. Determination of nitrite plus nitrate content (NOx)

The cerebral cortex was homogenized 1:5 (m/v) with ZnSO_4 (200 mM) and acetonitrile (96%), centrifuged at $16,000 \times g$ for 30 min at 4°C , and the supernatant was collected for NOx assay according to the spectrophotometric method based on the Griess reaction described by Miranda et al. [23]. The resulting pellet was suspended in NaOH (6 M) for protein determination.

2.4. Slot blot assays

Levels of protein carbonyls, 3-NT and 4-hydroxy-2-nonenal protein-adducts (HNE) were determined by slot blot as described in detail by Joshi et al. [24], except that the cerebral cortex was homogenized 1:10 (m/v) in 50 mM phosphate-buffered saline (PBS; pH 7.4) supplemented with a cocktail of protease inhibitors (1 mM phenylmethanesulfonyl fluoride, 3 μM Aprotinin, 20 μM Leupeptin, 10 μM Bestatin, 1 μM E-64, 4 μM Pepstatin A, 5 mM EDTA) and was centrifuged at $13,200 \times g$ at 4°C for 20 min and supernatants were collected. The specificity for primary antibodies against protein carbonyls, 3-NT or HNE was checked by repeating each experiment with no primary antibody included in the incubation steps. Under these conditions, no staining was seen on the blots, suggesting that there was no non-specific binding of the primary antibodies.

2.5. NADPH oxidase activity

NADPH oxidase activity was measured according to Thannickal and Fanburg [25], with slight modifications. Cerebral cortex was removed and homogenized 1:10 (m/v) in 50 mM PBS (pH 7.4), then centrifuged at $1000 \times g$ at 4°C for 10 min and the resulting supernatant was used. NADPH oxidase activity was determined by monitoring NADPH consumption for 90 min at 37°C in the presence or absence of the inhibitor diphenyleioidonium (10 μM).

2.6. Xanthine oxidase activity

The cerebral cortex was homogenized 1:10 (m/v) in 50 mM PBS (pH 7.4) and xanthine oxidase activity was measured in whole homogenates according to the spectrophotometric method described by Zanotto-Filho et al. [26].

2.7. Superoxide dismutase (SOD) activity

For determination of mitochondrial SOD activity, assays were performed in mitochondrion-enriched fractions, which were obtained as previously described by Bhattacharya et al. [27], with some modifications. Briefly, the cerebral cortex was rapidly dissected and homogenized in ice-cold isolation buffer A (100 mM sucrose, 10 mM EDTA, 100 mM Tris–HCl, 46 mM KCl, pH 7.4). The resulting suspension was then centrifuged for 3 min at $2000 \times g$ at 4°C . After centrifugation, the supernatant (S1) was once more centrifuged for 10 min at $12,000 \times g$ at 4°C . The resulting supernatant (S2) was used for determination of cytosolic SOD activity. The pellet (P2) was then resuspended in isolation buffer B (100 mM sucrose, 10 mM EDTA, 100 mM Tris–HCl, 46 mM KCl, and 0.5% bovine serum

albumin free of fatty acids, pH 7.4) and recentrifuged for 10 min at $12,000 \times g$ at 4°C . The final pellet (P3) was then gently washed and resuspended in isolation buffer C (270 mM mannitol, 70 mM sucrose, 0.02 mM EDTA, 20 mM Tris-HCl, 1 mM K_2HPO_4 , pH 7.4) and stored at -20°C . SOD activity was determined in cytosolic (S2) and mitochondrial (P3) fractions as described by Misra and Fridovich [28]. One unit of SOD was defined as the amount of enzyme required to inhibit the rate of epinephrine autoxidation by 50% at 37°C .

2.8. Catalase (CAT) activity

CAT activity was determined spectrophotometrically as described by Furian et al. [29]. CAT specific activity was expressed as first-order rate constant, k . Appropriated controls for non-enzymatic decomposition of hydrogen peroxide were included in the assays.

2.9. Glutathione-S-transferase (GST) activity

Cerebral cortex was homogenized in 50 mM phosphate-buffered saline and GST activity was assayed spectrophotometrically according to Habig et al. [30].

2.10. Western blot assays

The cerebral cortex was rapidly dissected and gently homogenized in ice-cold T-PER tissue protein extraction reagent (Thermo Scientific), supplemented with Halt Protease Inhibitor Cocktail (Thermo Scientific). Homogenates were centrifuged at $13,200 \times g$ at 4°C for 20 min and supernatants were collected. An aliquot (20 μg protein) of the supernatant was mixed with SDS loading buffer and boiled for 5 min. Proteins were then subjected to a 15% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and transferred to a PVDF membrane. Membranes were blocked with 5% (w/v) bovine serum albumin (BSA) in Tris-buffered saline, containing 0.04% (v/v) Tween 20 (TBS-T) for 1 h and incubated overnight at 4°C with a 1:5000 dilution of anti-mitochondrial SOD antibodies in TBS-T containing 2.5% BSA. Membranes were washed three times in TBS-T and incubated for 1 h with biotinylated anti-rabbit secondary antibody (1:2500, Sigma Aldrich) in TBS-T containing 2.5% BSA. Membranes were washed three more times and incubated for 1 h with a streptavidin peroxidase polymer (1:2500, Sigma Aldrich) in TBS-T containing 2.5% BSA. Blots were developed using 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine, dried, scanned, and quantified with ImageJ software.

2.11. Immunoprecipitation and mitochondrial SOD nitration analysis

The cerebral cortex was rapidly dissected and gently homogenized as described above for western blot assays, and 500 μg of protein were subjected to immunoprecipitation and subsequent determination of nitrated mitochondrial SOD content by slot blot according to Mamo et al. [31], with some modifications. Briefly, homogenates were precleared with protein A/G-agarose beads (Santa Cruz Biotechnology) for 1 h and incubated overnight with a 1:250 dilution of anti-mitochondrial SOD antibodies or control IgG. Next, samples were incubated for 2 h with protein A/G-agarose beads and subjected to centrifugation at $1000 \times g$ for 1 min. Pellets were collected, washed three times with protein extraction reagent, and resuspended in SDS loading buffer. After boiling for 5 min, samples were centrifuged at $1000 \times g$ for 1 min and the supernatant was used for detection of 3-NT and mitochondrial SOD by slot blot, as described above.

2.12. Protein determination

Protein content was measured colorimetrically by the method of Bradford [32] or by the bicinchoninic acid method using a commercially available kit (Thermo Scientific Pierce BCA Protein Assay Kit). Bovine serum albumin (1 mg/mL) was used as standard.

2.13. Statistical analyses

Data were analyzed by parametric one-way ANOVA and expressed as mean + standard error of the mean. *Post hoc* comparisons were performed using the Bonferroni test. A probability of $P < 0.05$ was considered significant.

3. Results

Since atorvastatin withdrawal has been shown to decrease nitric oxide levels in endothelial cells [18], our first experiment was aimed to investigate the effect of atorvastatin treatment or withdrawal NOx levels in the rat cerebral cortex. Nitrite and nitrate are stable metabolites of nitric oxide, and the sum of nitrite plus nitrate content (NOx) may provide information about the nitric oxide levels. Interestingly, statistical analysis (One-way ANOVA followed by Bonferroni test) revealed a significant decrease in NOx levels following atorvastatin treatment ($32.18 \pm 8.07\%$) or withdrawal ($34.65 \pm 6.17\%$) [$F(2,31) = 5.248$; $P < 0.05$] (Fig. 1).

Given the above described change in NOx levels and since direct and indirect antioxidant activity has been reported for atorvastatin [3–5], we decided to investigate the effect of atorvastatin treatment or withdrawal on the levels of selected markers for oxidative or nitrosative damage. Whereas a significant increase ($33.4 \pm 11.25\%$) in 3-NT immunoreactivity was detected following atorvastatin withdrawal [$F(2,21) = 5.421$; $P < 0.05$] (Fig. 2A), no significant differences in the levels of protein carbonyls [$F(2,29) = 0.1357$; $P > 0.05$] (Fig. 2B) or HNE [$F(2,28) = 0.8280$; $P > 0.05$] (Fig. 2C) were found.

Considering that protein nitration (as shown by 3-NT levels) is typically caused by peroxynitrite, and the main source of this radical is the reaction between superoxide anion and nitric oxide, we decided to investigate the effect of atorvastatin treatment or withdrawal on the NADPH oxidase and xanthine oxidase activities, two important cellular sources of superoxide anion. Interestingly, we found a significant increase ($39.99 \pm 9.77\%$) in NADPH oxidase activity [$F(2,28) = 3.554$; $P < 0.05$] in the rat cerebral cortex following atorvastatin withdrawal (Fig. 3A). On the other hand, no significant differences regarding xanthine oxidase activity were found [$F(2,18) = 0.2629$; $P > 0.05$] (Fig. 3B).

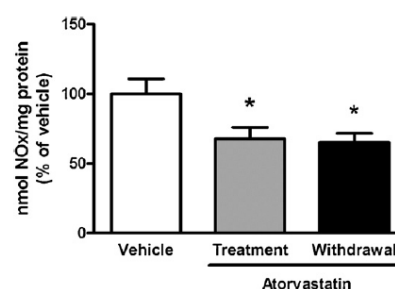


Fig. 1. Effect of oral atorvastatin treatment or withdrawal on NOx content in the rat cerebral cortex. Data are mean + standard error of the mean for $n = 10$ –12 per group. The asterisk indicates a significant difference from the vehicle group ($P < 0.05$ – one-way ANOVA followed by the Bonferroni test).

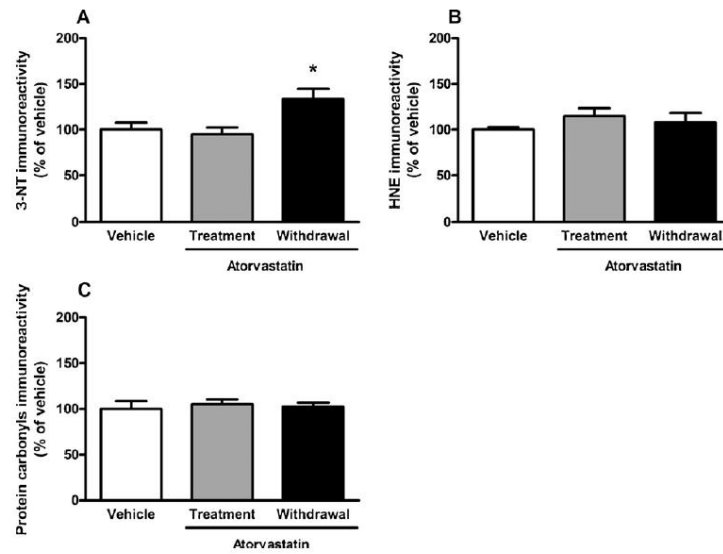


Fig. 2. Effect of oral atorvastatin treatment or withdrawal on immunoreactivity for (A) 3-nitrotyrosine (3-NT), (B) 4-hydroxy-2-nonenal (HNE) and (C) protein carbonyls in the rat cerebral cortex. Data are mean + standard error of the mean for $n=8-12$ per group. The asterisk indicates a significant difference from the vehicle group ($P < 0.05$ – one-way ANOVA followed by the Bonferroni test).

Superoxide anion can be enzymatically dismutated to a more stable hydrogen peroxide by cytosolic and mitochondrial SOD activities, which are the major ROS detoxifiers of the cell. Therefore, in light of the currently reported increase in NADPH oxidase

activities in the rat cerebral cortex following atorvastatin treatment or withdrawal. Interestingly, atorvastatin withdrawal decreased mitochondrial SOD activity (by $71.42 \pm 18.12\%$) [$F(2,13)=10.37$; $P < 0.05$] (Fig. 4A), without altering cytosolic SOD activity [$F(2,12)=0.4280$; $P > 0.05$] (Fig. 4B). Hydrogen peroxide

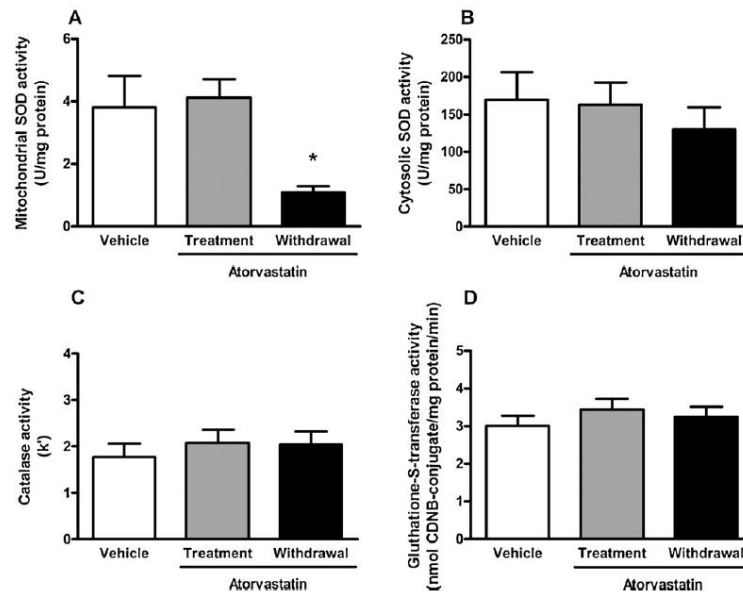


Fig. 3. Effect of oral atorvastatin treatment or withdrawal on activity of (A) NADPH oxidase and (B) xanthine oxidase in the rat cerebral cortex. Data are mean + standard error of the mean for $n=7-11$ per group. The asterisk indicates a significant difference from the vehicle group ($P < 0.05$ – one-way ANOVA followed by the Bonferroni test).

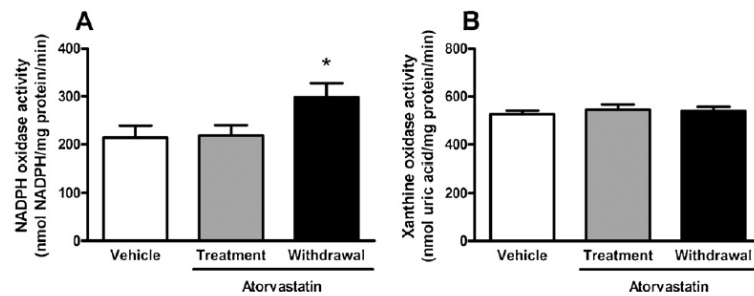


Fig. 4. Effect of oral atorvastatin treatment or withdrawal on activity of (A) mitochondrial SOD and (B) cytosolic SOD, (C) catalase and (D) glutathione-S-transferase in the rat cerebral cortex. Data are mean + standard error of the mean for $n=4-7$ per group. The asterisk indicates a significant difference from the vehicle group ($P<0.05$ – one-way ANOVA followed by the Bonferroni test).

may then be converted into water and oxygen by enzymes CAT and/or through the glutathione system. In this context, we measured CAT and GST activities in the rat cerebral cortex after atorvastatin treatment or withdrawal. However, no significant differences were found regarding CAT [$F(2,17)=0.3044$; $P>0.05$] (Fig. 4C) or GST [$F(2,17)=0.6098$; $P>0.05$] (Fig. 4D) activities.

In order to shed some light on the mechanisms underlying the currently reported decrease in mitochondrial SOD after atorvastatin withdrawal, we measured the expression and level of nitration of mitochondrial SOD protein, since peroxynitrite-mediated nitration of selected tyrosine residues in its polypeptide chain greatly decreases its catalytic activity [33,34]. Interestingly, atorvastatin withdrawal increased mitochondrial SOD immunoreactivity (by $72.2 \pm 26.59\%$) [$F(2,15)=4.145$; $P<0.05$] (Fig. 5A). In addition, atorvastatin withdrawal increased the 3-NT/mitochondrial SOD ratio (by $109.8 \pm 17.2\%$) [$F(2,11)=4.039$; $P<0.05$] (Fig. 5B), indicating increased levels of nitrated mitochondrial SOD.

4. Discussion

Statins are cholesterol-lowering agents acting primarily through competitive inhibition of HMG-CoA reductase, but several experimental and clinical studies have shown that statins display a myriad of beneficial effects which appear to be independent from its cholesterol-lowering action, the so-called pleiotropic effects of statins. As such effects appear common to several vascular and non-vascular diseases, statin treatment has been emerged as a potential add-on therapy for several conditions [35]. For instance,

statins alter general immunological responses by altering post-translational protein prenylation [2,36], modulate inflammation by inhibiting monocyte-endothelium interactions [2,36], and increase production and bioavailability of endothelium-derived nitric oxide by decreasing Rho GTPase responses [2,36]. In addition, antioxidant actions play a pivotal role in the pleiotropic effects of statin treatment. In fact, atorvastatin treatment reduced lipoperoxidation, protein oxidation and nitration, and increased GSH levels in parietal cortex of aged beagles, a well-established preclinical model of Alzheimer's disease [5]. Moreover, atorvastatin treatment significantly increased the antioxidant enzyme biliverdin reductase-A protein levels, phosphorylation and activity, with a concomitant decrease in oxidative stress in the parietal cortex of aged beagles [37]. In the same experimental model of Alzheimer's disease, atorvastatin treatment increased heme oxygenase-1 expression in the parietal cortex of aged beagles, and a significant negative correlation between heme oxygenase-1 protein levels and oxidative stress parameters has been found [38].

On the other hand, studies in vascular endothelial and smooth muscle cells and in laboratory animals as well as clinical studies revealed that discontinuation of statin treatment not only led to a rapid loss of its vascular protective actions, but was also followed by a rebound deterioration of vascular health. Importantly, there is no consensus on how to treat patients undergoing statin withdrawal or a clear preventive strategy [39]. Therefore, understanding of the molecular mechanisms underlying the deleterious effects arising after abrupt cessation of statin therapy are of fundamental importance. The molecular basis for the adverse cardiovascular effects

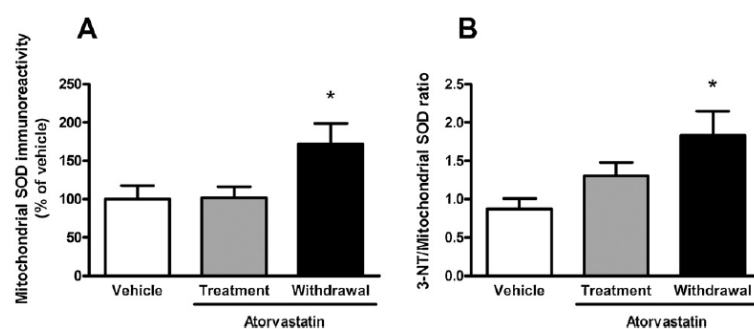


Fig. 5. Effect of oral atorvastatin treatment or withdrawal on (A) immunoreactivity of mitochondrial SOD protein and (B) 3-NT/mitochondrial SOD ratio in the rat cerebral cortex. Data are mean + standard error of the mean for $n=4-6$ per group. The asterisk indicates a significant difference from the vehicle group ($P<0.05$ – one-way ANOVA followed by the Bonferroni test).

of statin withdrawal has been established [39], but it is not clear whether such mechanisms for statin withdrawal-induced harmful effects can be generalized to other tissues than the cardiovascular system. In this context, we aimed to investigate the effects of atorvastatin withdrawal on oxidative and nitrosative stress parameters in the rat cerebral cortex. Accordingly, in the present study we showed that abrupt cessation of oral atorvastatin treatment elicited protein nitration (as measured by increase 3-NT immunoreactivity) in the rat cerebral cortex.

Nitric oxide is a little reactive radical produced by nitric oxide synthase isozymes (NOS) which display a myriad of physiological and pathological effects [40]. When nitric oxide interacts with oxygen and superoxide anion, nitrosylation and nitration occur, respectively. With respect to nitrosylation, nitric oxide interacts with oxygen, electron acceptors or metals to produce nitrosium ion, which can subsequently interact with protein thiols such as cysteine residues in a reversible manner [41]. Given its reversibility, protein nitrosylation has been considered a physiological post-translational modification which regulates protein function in a similar way to phosphorylation [41]. On the other hand, nitric oxide interacts with superoxide to generate the highly reactive peroxynitrite, leading to tyrosine nitration of proteins [42]. Regarding this point, increasing evidence suggest a strong relationship between protein nitration and the pathophysiology of several diseases, including inflammatory, neurodegenerative, and cardiovascular disorders [42]. Protein nitration tyrosine residues can block protein phosphorylation by interfering with tyrosine residues, thus modifying cell signaling pathways [42].

Regarding the source of superoxide for peroxynitrite formation, we found that statin withdrawal increased NADPH oxidase, an important cellular source of superoxide. Interestingly, while NADPH oxidase inhibition has been suggested as a major pleiotropic mechanism of statin treatment [2,4,36], statin withdrawal has been associated with a rebound increase in NADPH oxidase [14]. The mechanisms underlying NADPH oxidase activation triggered by statin withdrawal are multiple, and include increased plasma membrane targeting of NADPH oxidase catalytic subunits through rac1-GTPase and geranylgeranylation [4]. In this context and in agreement with the current literature we found an increase in NADPH oxidase activity in the cerebral cortex of rats from statin withdrawal group, indicating that NADPH oxidase could be an important source of superoxide in this condition.

Interestingly, we found a decrease in NOx content in the rat cerebral cortex following atorvastatin treatment or withdrawal. Considering atorvastatin treatment, there is evidence that statins increase endothelial NOS activity, through augmented enzyme expression by lengthening the half-life of its mRNA [36], activation of protein kinase B/Akt pathway, which in turn activates endothelial NOS by enzyme phosphorylation [36] and restoration of eNOS activity through reduction of caveolin-1 abundance [36]. Since we found a decrease in NOx content, it is possible that the statin effect on endothelial NOS does not occur in the cerebral cortex. However, since nitric oxide production is subjected to direct feedback inhibition of NOS by nitric oxide [43], decreased nitric oxide levels may be, at least in part, explained by this mechanism. One alternative explanation comes from the fact that statins downregulate activity both neuronal NOS and inducible NOS isoforms [44], which are the predominant NOS isoforms in the brain parenchyma [43]. Moreover, decreased NOx content following atorvastatin withdrawal could be also explained by scavenging of nitric oxide by superoxide originating from NADPH oxidase, resulting in increased peroxynitrite formation and protein nitration. Additionally, it should be noted that peroxynitrite can decompose to yield nitrate and/or nitrite (*i.e.* NOx) by several enzymatic and non-enzymatic mechanisms [45]. For instance, it has been shown that peroxynitrite decomposes at neutral pH *via* protonation to peroxynitrous acid to yield nitrate

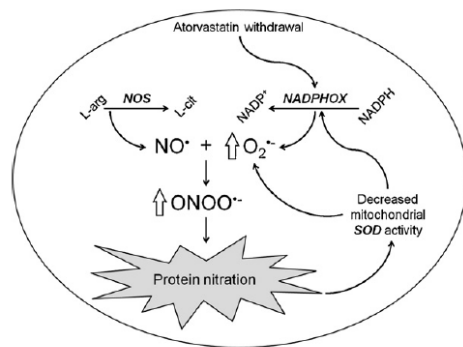


Fig. 6. A proposed scheme for the effects of atorvastatin withdrawal in the rat cerebral cortex. Atorvastatin withdrawal increases NADPH oxidase activity (Fig. 3) and therefore superoxide production. Superoxide anion reacts with nitric oxide, decreasing nitric oxide levels (Fig. 1) and generating the highly reactive peroxynitrite, which ultimately causes protein nitration (Fig. 2). A possible target of peroxynitrite is mitochondrial SOD (Fig. 5), which decreased activity (Fig. 4) contributes to maintenance of increased superoxide levels. In addition, decreased mitochondrial SOD activity may contribute to NADPH oxidase activation [47], resulting in a feedforward cycle. L-Arg, L-arginine; L-cit, L-citrulline; NOS, nitric oxide synthase; NO•, nitric oxide; NADP•, oxidized nicotinamide adenine dinucleotide phosphate; NADPH, reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate; NADPHOX, NADPH oxidase; O₂^{•-}, superoxide anion; ONOO⁻, peroxynitrite; SOD, superoxide dismutase.

[45]. In addition, heme proteins, such as hemoglobin and myoglobin, catalyze the isomerization of peroxynitrite to nitrate, and enzymes like peroxiredoxins, cyclooxygenase-1 and glutathione peroxidase may decompose peroxynitrite to yield nitrite [45]. In this context, it is also possible that NOx decrease reflect at least in part impairment in one or more pathways of nitrate and/or nitrite generation from peroxynitrite decomposition.

Importantly, in the present study we showed that atorvastatin withdrawal decreases mitochondrial superoxide dismutase. To the best of our knowledge, this is the first report of decreased mitochondrial SOD follow statin withdrawal. This enzyme is responsible for superoxide anion dismutation in water and hydrogen peroxide, and it is a key scavenger of superoxide in the mitochondrial matrix. Mitochondrial SOD is vital to life in an oxygen-rich atmosphere, as demonstrated by several studies in various *in vivo* models with reduced mitochondrial SOD expression or enzyme activity [46]. In addition, altered expression or enzyme activity of mitochondrial SOD has been linked to many disorders [46], suggesting an important role for mitochondrial SOD in disease development. Indeed, the presently reported decrease in mitochondrial SOD activity adds a new mechanism underlying the deleterious effects of statin withdrawal. In this context, our present results are in agreement with the emerging concept of the existence of a cross talk between mitochondria and cytosolic NADPH oxidases [47] (Fig. 6). In fact, it has been demonstrated that increased levels of mitochondrial superoxide activate cytosolic NADPH oxidases, increasing superoxide production in the cytoplasm [48]. Since NADPH oxidase-derived superoxide stimulate protein kinase C ϵ within the mitochondrial matrix [49] and leads to depolarization of mitochondrial membrane potential followed by mitochondrial ROS formation and respiratory chain dysfunction [49], such interplay constitutes a feedforward cycle in which the NADPH oxidases increase mitochondrial reactive species, which further activate the cytoplasmic NADPH oxidases and increase cellular superoxide production, triggering mitochondrial impairment and diminishing nitric oxide bioavailability [47].

Regarding the mechanism for decreased mitochondrial SOD activity, it has been demonstrated that this enzyme is a target for peroxynitrite-mediated nitration, which ultimately decreases its

activity [33,34]. In fact, mitochondrial SOD appears to be hypersensitive toward nitration, accounting for as much as 20% of total protein nitration under conditions of oxidative stress [50]. In light of our present results, it is plausible to propose that decreased mitochondrial SOD activity elicited by atorvastatin withdrawal may be a result of nitration of selected tyrosine residues in its polypeptide chain, since abrupt discontinuation of atorvastatin treatment increased 3-NT/mitochondrial SOD ratio, indicating that levels of nitrated mitochondrial SOD are increased in the rat cerebral cortex following atorvastatin withdrawal. Interestingly, we found that mitochondrial SOD immunoreactivity was increased after atorvastatin withdrawal, suggesting increased expression of this enzyme in the rat cerebral cortex. Considering the decrease in mitochondrial SOD activity following atorvastatin withdrawal, an increase in protein levels could represent a cellular attempt to compensate decreased enzyme activity, which ultimately revealed ineffective possibly because nitration of key tyrosine residues in mitochondrial SOD following atorvastatin withdrawal.

5. Conclusion

In summary, in the present study we showed that atorvastatin withdrawal elicits oxidative/nitrosative damage in the rat cerebral cortex and that this effect may be mediated by increased NADPH oxidase activity and decreased mitochondrial SOD activity. A proposed scheme of our present results is shown in Fig. 6. Although additional studies are necessary to evaluate the clinical implications of our findings, it is possible that antioxidant strategies targeting NADPH oxidase or mitochondrial SOD activities may constitute potential targets for prophylaxis and/or treatment of the deleterious effects of statin withdrawal to the brain.

Acknowledgments

Work supported by grants from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) (ARD 10/0685-8, ARD 11/1630-1 and PRONEM 11/2082-4) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (141164/2010-7) and by fellowships from Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES) (to C.V.O., V.R.F. and L.R.R.), CNPq (to L.M.P., L.M.R. and L.F.F.R.) and FAPERGS (to J.G.). The authors thank Dr. Carlos Fernando Mello for kindly providing laboratory facilities.

References

- Endo A. A historical perspective on the discovery of statins. *Proceedings of the Japan Academy – Series B: Physical and Biological Sciences* 2010;86:484–93.
- Liao JK, Laufs U. Pleiotropic effects of statins. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 2005;45:89–118.
- Franzoni F, Quiñones-Galvan A, Regoli F, Ferrannini E, Galetta F. A comparative study of the in vitro antioxidant activity of statins. *International Journal of Cardiology* 2003;90:317–21.
- Wassmann S, Laufs U, Müller K, Konkol C, Ahlbory K, Bäumer AT, Linz W, Böhm M, Nickenig G. Cellular antioxidant effects of atorvastatin in vitro and in vivo. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 2002;22:300–5.
- Barone E, Ceni G, Di Domenico F, Martin S, Sultana R, Mancuso C, Murphy MP, Head E, Butterfield DA. Long-term high-dose atorvastatin decreases brain oxidative and nitrosative stress in a preclinical model of Alzheimer disease: a novel mechanism of action. *Pharmacological Research* 2011;63:172–80.
- Lu D, Goussev A, Chen J, Pannu P, Li Y, Mahmood A, Chopp M. Atorvastatin reduces neurological deficit and increases synaptogenesis, angiogenesis, and neuronal survival in rats subjected to traumatic brain injury. *Journal of Neurotrauma* 2004;21:21–32.
- Kahles T, Luedike P, Endres M, Galla HJ, Steinmetz H, Busse R, Neumann-Haefelin T, Brandes RP. NADPH oxidase plays a central role in blood-brain barrier damage in experimental stroke. *Stroke* 2007;38:3000–6.
- Laufs U, Gertz K, Huang P, Nickenig C, Böhm M, Dirnagl U, Endres M. Atorvastatin upregulates type III nitric oxide synthase in thrombocytes, decreases platelet activation, and protects from cerebral ischemia in normocholesterolemic mice. *Stroke* 2000;31:2442–9.
- Zacco A, Togo J, Spence K, Ellis A, Lloyd D, Furlong S, Piser T. 3-Hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors protect cortical neurons from excitotoxicity. *Journal of Neuroscience* 2003;23:11104–11.
- Funck VR, de Oliveira CV, Pereira LM, Rambo LM, Ribeiro LR, Royes LF, Ferreira J, Guerra GP, Furian AF, Oliveira MS, Mallmann CA, de Mello CF. Differential effects of atorvastatin treatment and withdrawal on pentylenetetrazol-induced seizures. *Epilepsia* 2011;52:2094–104.
- Russo E, Donato di Paola E, Gareri P, Siniscalchi A, Labate A, Gallelli L, Citraro R, De Sarro G. Pharmacodynamic potentiation of antiepileptic drugs' effects by some hmg-coa reductase inhibitors against audiogenic seizures in dba/2 mice. *Pharmacological Research* 2012;70:1–12.
- Thomas M, Mann J. Increased thrombotic vascular events after change of statin. *Lancet* 1998;352:1830–1.
- Fonarow GC, Wright RS, Spencer FA, Fredrick PD, Dong W, Every N, French WJ, Investigators NROMI. Effect of statin use within the first 24 hours of admission for acute myocardial infarction on early morbidity and mortality. *American Journal of Cardiology* 2005;96:611–6.
- Vecchione C, Brandes RP. Withdrawal of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors elicits oxidative stress and induces endothelial dysfunction in mice. *Circulation Research* 2002;91:173–9.
- Gertz K, Laufs U, Lindauer U, Nickenig G, Böhm M, Dirnagl U, Endres M. Withdrawal of statin treatment abrogates stroke protection in mice. *Stroke* 2003;34:551–7.
- Pineda A, Cubeddu LX. Statin rebound or withdrawal syndrome: does it exist? *Current Atherosclerosis Reports* 2011;13:23–30.
- Laufs U, Wassmann S, Hilgers S, Ribaudo N, Böhm M, Nickenig G. Rapid effects on vascular function after initiation and withdrawal of atorvastatin in healthy, normocholesterolemic men. *American Journal of Cardiology* 2001;88:1306–7.
- Laufs U, Endres M, Custodis F, Gertz K, Nickenig G, Liao JK, Böhm M. Suppression of endothelial nitric oxide production after withdrawal of statin treatment is mediated by negative feedback regulation of the gpase gene transcription. *Circulation* 2000;102:3104–10.
- Dowlathahi D, Demchuk AM, Fang J, Kapral MK, Sharma M, Smith EE. Network RotCS: association of statins and statin discontinuation with poor outcome and survival after intracerebral hemorrhage. *Stroke* 2012;43:1518–23.
- Reidenberg MM. Drug discontinuation effects are part of the pharmacology of a drug. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 2011;339:324–8.
- Staffa JA, Chang J, Green L. Cerivastatin and reports of fatal rhabdomyolysis. *New England Journal of Medicine* 2002;346:539–40.
- Cziraky MJ, Willey VJ, McKenney JM, Kamat SA, Fisher MD, Guyton JR, Jacobson TA, Davidson MH. Statin safety: an assessment using an administrative claims database. *American Journal of Cardiology* 2006;97:61C–8C.
- Miranda KM, Espey MG, Wink DA. A rapid, simple spectrophotometric method for simultaneous detection of nitrate and nitrite. *Nitric Oxide* 2001;5:62–71.
- Joshi G, Perluigi M, Sultana R, Agrippino R, Calabrese V, Butterfield DA. In vivo protection of synaptosomes by ferulic acid ethyl ester (faee) from oxidative stress mediated by 2,2-azobis(2-amidino-propane)dihydrochloride (aaph) or Fe(2+)/H(2)O(2): insight into mechanisms of neuroprotection and relevance to oxidative stress-related neurodegenerative disorders. *Neurochemistry International* 2006;48:318–27.
- Thannickal VJ, Fanburg BL. Activation of an h2o2-generating NADH oxidase in human lung fibroblasts by transforming growth factor beta 1. *Journal of Biological Chemistry* 1995;270:30334–8.
- Zanotto-Filho A, Schröder R, Moreira JC. Xanthine oxidase-dependent ROS production mediates vitamin A pro-oxidant effects in cultured sertoli cells. *Free Radical Research* 2008;42:593–601.
- Bhattacharya SK, Thakar JH, Johnson PL, Shanklin DR. Isolation of skeletal muscle mitochondria from hamsters using an ionic medium containing ethylenediaminetetraacetic acid and nagase. *Analytical Biochemistry* 1991;192:344–9.
- Misra HP, Fridovich I. The generation of superoxide radical during the autooxidation of hemoglobin. *Journal of Biological Chemistry* 1972;247:6960–2.
- Furian AF, Oliveira MS, Royes LF, Fiorenza NG, Figuera MR, Myskiw JC, Weiblen R, Rubin MA, Frussa-Filho R, Mello CF. Gm1 ganglioside induces vasodilation and increases catalase content in the brain. *Free Radical Biology and Medicine* 2007;43:924–32.
- Habig WH, Pabst MJ, Jakoby WB. Glutathione S-transferases: the first enzymatic step in mercapturic acid formation. *Journal of Biological Chemistry* 1974;249:7130–9.
- Mamo LC, Suliman HB, Giles BL, Auten RL, Piantadosi CA, Nozik-Grayck E. Discordant extracellular superoxide dismutase expression and activity in neonatal hyperoxic lung. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 2004;170:313–8.
- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 1976;72:248–54.
- MacMillan-Crow LA, Crow JP, Thompson JA. Peroxynitrite-mediated inactivation of manganese superoxide dismutase involves nitration and oxidation of critical tyrosine residues. *Biochemistry* 1998;37:1613–22.
- Yamakura F, Taka H, Fujimura T, Murayama K. Inactivation of human manganese-superoxide dismutase by peroxynitrite is caused by exclusive nitration of tyrosine 34 to 3-nitrotyrosine. *Journal of Biological Chemistry* 1998;273:14085–9.
- Wang CY, Liu PY, Liao JK. Pleiotropic effects of statin therapy: molecular mechanisms and clinical results. *Trends in Molecular Medicine* 2008;14:37–44.

- [36] Zhou Q, Liao JK. Pleiotropic effects of statins – basic research and clinical perspectives. *Circulation Journal* 2010;74:818–26.
- [37] Barone E, Mancuso C, Di Domenico F, Sultana R, Murphy MP, Head E, Butterfield DA. Biliverdin reductase-a: a novel drug target for atorvastatin in a dog pre-clinical model of alzheimer disease. *Journal of Neurochemistry* 2012;120:135–46.
- [38] Butterfield DA, Barone E, Di Domenico F, Cenini G, Sultana R, Murphy MP, Mancuso C, Head E. Atorvastatin treatment in a dog preclinical model of alzheimer's disease leads to up-regulation of haem oxygenase-1 and is associated with reduced oxidative stress in brain. *International Journal of Neuropsychopharmacology* 2012;15:981–7.
- [39] Cubeddu LX, Seamon MJ. Statin withdrawal: clinical implications and molecular mechanisms. *Pharmacotherapy* 2006;26:1288–96.
- [40] Steinert JR, Chernova T, Forsythe ID. Nitric oxide signaling in brain function, dysfunction, and dementia. *Neuroscientist* 2010;16:435–52.
- [41] Hess DT, Matsumoto A, Kim SO, Marshall HE, Stamler JS. Protein s-nitrosylation: purview and parameters. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2005;6:150–66.
- [42] Souza JM, Peluffo G, Radi R. Protein tyrosine nitration – functional alteration or just a biomarker? *Free Radical Biology and Medicine* 2008;45:357–66.
- [43] Alderton WK, Cooper CE, Knowles RG. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochemical Journal* 2001;357:593–615.
- [44] van der Most PJ, Dolga AM, Nijholt IM, Luiten PG, Eisel UL. Statins: mechanisms of neuroprotection. *Progress in Neurobiology* 2009;88:64–75.
- [45] Ferrer-Sueta G, Radi R. Chemical biology of peroxynitrite: kinetics, diffusion, and radicals. *ACS Chemical Biology* 2009;4:161–77.
- [46] Holley AK, Dhar SK, St Clair DK. Manganese superoxide dismutase vs. P53: regulation of mitochondrial ros. *Mitochondrion* 2010;10:649–61.
- [47] Dikalov S. Cross talk between mitochondria and nadph oxidases. *Free Radical Biology and Medicine* 2011;51:1289–301.
- [48] Dikalova AE, Bikineyeva AT, Budzyn K, Nazarewicz RR, McCann L, Lewis W, Harrison DG, Dikalov SI. Therapeutic targeting of mitochondrial superoxide in hypertension. *Circulation Research* 2010;107:106–16.
- [49] Doughan AK, Harrison DG, Dikalov SI. Molecular mechanisms of angiotensin ii-mediated mitochondrial dysfunction: linking mitochondrial oxidative damage and vascular endothelial dysfunction. *Circulation Research* 2008;102:488–96.
- [50] Guo W, Adachi T, Matsui R, Xu S, Jiang B, Zou MH, Kirber M, Lieberthal W, Cohen RA. Quantitative assessment of tyrosine nitration of manganese superoxide dismutase in angiotensin ii-infused rat kidney. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 2003;285:H1396–403.

5. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos permitem inferir que a retirada do tratamento com atorvastatina é capaz de provocar dano oxidativo/nitrosativo no córtex cerebral de ratos. Esse dano é mediado pela nitração dos resíduos de tirosina da enzima superóxido dismutase mitocondrial, a qual é de importância vital para o organismo. A nitração, e a conseqüente diminuição da atividade da MnSOD, acontece porque o radical superóxido, proveniente da elevada atividade enzimática da NADPH oxidase durante a retirada do tratamento, reage com o radical óxido nítrico formando peroxinitrito, o qual é o responsável pela nitração de proteínas. Conseqüentemente, a nitração da MnSOD leva a uma menor neutralização do radical superóxido, elevando os níveis do mesmo e, gerando assim um ciclo vicioso.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKKI, A., ZHANG, M., MURDOCH, C., BREWER, A. & SHAH, A.M. (2009) NADPH oxidase signaling and cardiac myocyte function. **J Mol Cell Cardiol**, 47, 15-22.
- ALBERTS, A.W., CHEN, J., KURON, G., HUNT, V., HUFF, J., HOFFMAN, C., ROTHROCK, J., LOPEZ, M., JOSHUA, H., HARRIS, E., PATCHETT, A., MONAGHAN, R., CURRIE, S., STAPLEY, E., ALBERS-SCHONBERG, G., HENSENS, O., HIRSHFIELD, J., HOOGSTEEEN, K., LIESCH, J. & SPRINGER, J. (1980) Mevinolin: a highly potent competitive inhibitor of hydroxymethylglutaryl-coenzyme A reductase and a cholesterol-lowering agent. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 77, 3957-3961.
- ANDERSEN, J.K. (2004) Oxidative stress in neurodegeneration: cause or consequence? **Nat Med**, 10 Suppl, S18-25.
- ANILKUMAR, N., SIRKER, A. & SHAH, A.M. (2009) Redox sensitive signaling pathways in cardiac remodeling, hypertrophy and failure. **Front Biosci**, 14, 3168-3187.
- AVIGAN, J. & STEINBERG, D. (1962) Deposition of desmosterol in the lesions of experimental atherosclerosis. **Lancet**, 1, 572.
- AVIGAN, J., STEINBERG, D., THOMPSON, M.J. & MOSETTIG, E. (1960) Mechanism of action of MER-29, an inhibitor of cholesterol biosynthesis. **Biochem Biophys Res Commun**, 2, 63-65.
- BABIOR, B.M. (1999) NADPH oxidase: an update. **Blood**, 93, 1464-1476.
- BABIOR, B.M. (2000) The NADPH oxidase of endothelial cells. **IUBMB Life**, 50, 267-269.
- BEDARD, K. & KRAUSE, K.H. (2007) The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. **Physiol Rev**, 87, 245-313.

- BLOHM, T.R. & MACKENZIE, R.D. (1959) Specific inhibition of cholesterol biosynthesis by a synthetic compound (MER-29). **Arch Biochem Biophys**, 85, 245-249.
- BOURCIER, T. & LIBBY, P. (2000) HMG CoA reductase inhibitors reduce plasminogen activator inhibitor-1 expression by human vascular smooth muscle and endothelial cells. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, 20, 556-562.
- BRANDES, R.P. (2003) Role of NADPH oxidases in the control of vascular gene expression. **Antioxid Redox Signal**, 5, 803-811.
- BRANDES, R.P., BEER, S., HA, T. & BUSSE, R. (2003) Withdrawal of cerivastatin induces monocyte chemoattractant protein 1 and tissue factor expression in cultured vascular smooth muscle cells. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, 23, 1794-1800.
- BRUNK, U.T. & TERMAN, A. (2002) The mitochondrial-lysosomal axis theory of aging: accumulation of damaged mitochondria as a result of imperfect autophagocytosis. **Eur J Biochem**, 269, 1996-2002.
- CANGEMI, R., LOFFREDO, L., CARNEVALE, R., PERRI, L., PATRIZI, M.P., SANGUIGNI, V., PIGNATELLI, P. & VIOLI, F. (2008) Early decrease of oxidative stress by atorvastatin in hypercholesterolaemic patients: effect on circulating vitamin E. **Eur Heart J**, 29, 54-62.
- CARNEVALE, R., PIGNATELLI, P., DI SANTO, S., BARTIMOCCIA, S., SANGUIGNI, V., NAPOLEONE, L., TANZILLI, G., BASILI, S. & VIOLI, F. (2010) Atorvastatin inhibits oxidative stress via adiponectin-mediated NADPH oxidase down-regulation in hypercholesterolemic patients. **Atherosclerosis**, 213, 225-234.
- CARO, A.A. & CEDERBAUM, A.I. (2002) Role of calcium and calcium-activated proteases in CYP2E1-dependent toxicity in HEPG2 cells. **J Biol Chem**, 277, 104-113.
- CASTEJON, A.M., ZOLLNER, E., TRISTANO, A.G. & CUBEDDU, L.X. (2007) Upregulation of angiotensin II-AT1 receptors during statin withdrawal in vascular smooth muscle cells. **J Cardiovasc Pharmacol**, 50, 708-711.

- CAVE, A.C., BREWER, A.C., NARAYANAPANICKER, A., RAY, R., GRIEVE, D.J., WALKER, S. & SHAH, A.M. (2006) NADPH oxidases in cardiovascular health and disease. **Antioxid Redox Signal**, 8, 691-728.
- CHAN, P.H. (1996) Role of oxidants in ischemic brain damage. **Stroke**, 27, 1124-1129.
- CHEN, J., ZHANG, Z.G., LI, Y., WANG, Y., WANG, L., JIANG, H., ZHANG, C., LU, M., KATAKOWSKI, M., FELDKAMP, C.S. & CHOPP, M. (2003) Statins induce angiogenesis, neurogenesis, and synaptogenesis after stroke. **Ann Neurol**, 53, 743-751.
- COPIN, J.C., GASCHE, Y. & CHAN, P.H. (2000) Overexpression of copper/zinc superoxide dismutase does not prevent neonatal lethality in mutant mice that lack manganese superoxide dismutase. **Free Radic Biol Med**, 28, 1571-1576.
- CORTE, E.D. & STIRPE, F. (1972) The regulation of rat liver xanthine oxidase. Involvement of thiol groups in the conversion of the enzyme activity from dehydrogenase (type D) into oxidase (type O) and purification of the enzyme. **Biochem J**, 126, 739-745.
- DE CATERINA, R., CIPOLLONE, F., FILARDO, F.P., ZIMARINO, M., BERNINI, W., LAZZERINI, G., BUCCIARELLI, T., FALCO, A., MARCHESANI, P., MURARO, R., MEZZETTI, A. & CIABATTONI, G. (2002) Low-density lipoprotein level reduction by the 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme-A inhibitor simvastatin is accompanied by a related reduction of F2-isoprostane formation in hypercholesterolemic subjects: no further effect of vitamin E. **Circulation**, 106, 2543-2549.
- DELANTY, N. & DICHTER, M.A. (1998) Oxidative injury in the nervous system. **Acta Neurol Scand**, 98, 145-153.
- DELLA CORTE, E. & STIRPE, F. (1968) The regulation of rat-liver xanthine oxidase: Activation by proteolytic enzymes. **FEBS Lett**, 2, 83-84.

- DOUGHAN, A.K., HARRISON, D.G. & DIKALOV, S.I. (2008) Molecular mechanisms of angiotensin II-mediated mitochondrial dysfunction: linking mitochondrial oxidative damage and vascular endothelial dysfunction. **Circ Res**, 102, 488-496.
- DWORAKOWSKI, R., ANILKUMAR, N., ZHANG, M. & SHAH, A.M. (2006) Redox signalling involving NADPH oxidase-derived reactive oxygen species. **Biochem Soc Trans**, 34, 960-964.
- ENDO, A. (1992) The discovery and development of HMG-CoA reductase inhibitors. **J Lipid Res**, 33, 1569-1582.
- ENDO, A. (2008) A gift from nature: the birth of the statins. **Nat Med**, 14, 1050-1052.
- ENDO, A. (2010) A historical perspective on the discovery of statins. **Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci**, 86, 484-493.
- ENDO, A. & KURODA, M. (1976) Citrinin, an inhibitor of cholesterol synthesis. **J Antibiot (Tokyo)**, 29, 841-843.
- ENDO, A., TSUJITA, Y., KURODA, M. & TANZAWA, K. (1977) Inhibition of cholesterol synthesis in vitro and in vivo by ML-236A and ML-236B, competitive inhibitors of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase. **Eur J Biochem**, 77, 31-36.
- ENDRES, M. (2006) Statins: potential new indications in inflammatory conditions. **Atheroscler Suppl**, 7, 31-35.
- EVANS, P. & HALLIWELL, B. (1999) Free radicals and hearing. Cause, consequence, and criteria. **Ann N Y Acad Sci**, 884, 19-40.
- FINKEL, T. & HOLBROOK, N.J. (2000) Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. **Nature**, 408, 239-247.

- FRIEDL, H.P., TILL, G.O., TRENTZ, O. & WARD, P.A. (1989) Roles of histamine, complement and xanthine oxidase in thermal injury of skin. **Am J Pathol**, 135, 203-217.
- GERTZ, K., LAUFS, U., LINDAUER, U., NICKENIG, G., BÖHM, M., DIRNAGL, U. & ENDRES, M. (2003) Withdrawal of statin treatment abrogates stroke protection in mice. **Stroke**, 34, 551-557.
- GOFMAN, J.W. (1956) Serum lipoproteins and the evaluation of atherosclerosis. **Ann N Y Acad Sci**, 64, 590-595.
- GOFMAN, J.W. & LINDGREN, F. (1950) The role of lipids and lipoproteins in atherosclerosis. **Science**, 111, 166-171.
- GOFMAN, J.W., LINDGREN, F.T. & ELLIOTT, H. (1949) Ultracentrifugal studies of lipoproteins of human serum. **J Biol Chem**, 179, 973-979.
- GOTTLIEB, R.A. (2003) Cytochrome P450: major player in reperfusion injury. **Arch Biochem Biophys**, 420, 262-267.
- GRISHAM, M.B., HERNANDEZ, L.A. & GRANGER, D.N. (1986) Xanthine oxidase and neutrophil infiltration in intestinal ischemia. **Am J Physiol**, 251, G567-574.
- GUPTE, S.A. (2008) Glucose-6-phosphate dehydrogenase: a novel therapeutic target in cardiovascular diseases. **Curr Opin Investig Drugs**, 9, 993-1000.
- GUZIK, T.J., WEST, N.E., BLACK, E., MCDONALD, D., RATNATUNGA, C., PILLAI, R. & CHANNON, K.M. (2000) Vascular superoxide production by NAD(P)H oxidase: association with endothelial dysfunction and clinical risk factors. **Circ Res**, 86, E85-90.
- HALLIWELL, B. (2000) The antioxidant paradox. **Lancet**, 355, 1179-1180.

- HALLIWELL, B., AESCHBACH, R., LÖLIGER, J. & ARUOMA, O.I. (1995) The characterization of antioxidants. **Food Chem Toxicol**, 33, 601-617.
- HARAMAKI, N., IKEDA, H., TAKENAKA, K., KATOH, A., SUGANO, R., YAMAGISHI, S., MATSUOKA, H. & IMAIZUMI, T. (2007) Fluvastatin alters platelet aggregability in patients with hypercholesterolemia: possible improvement of intraplatelet redox imbalance via HMG-CoA reductase. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, 27, 1471-1477.
- HEBBEL, R.P. (1986) Erythrocyte antioxidants and membrane vulnerability. **J Lab Clin Med**, 107, 401-404.
- HELLSTEN-WESTING, Y. (1993) Immunohistochemical localization of xanthine oxidase in human cardiac and skeletal muscle. **Histochemistry**, 100, 215-222.
- HELLSTEN, Y., HANSSON, H.A., JOHNSON, L., FRANDBSEN, U. & SJÖDIN, B. (1996) Increased expression of xanthine oxidase and insulin-like growth factor I (IGF-I) immunoreactivity in skeletal muscle after strenuous exercise in humans. **Acta Physiol Scand**, 157, 191-197.
- HONG, H., ZENG, J.S., KREULEN, D.L., KAUFMAN, D.I. & CHEN, A.F. (2006) Atorvastatin protects against cerebral infarction via inhibition of NADPH oxidase-derived superoxide in ischemic stroke. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, 291, H2210-2215.
- JARASCH, E.D., GRUND, C., BRUDER, G., HEID, H.W., KEENAN, T.W. & FRANKE, W.W. (1981) Localization of xanthine oxidase in mammary-gland epithelium and capillary endothelium. **Cell**, 25, 67-82.
- JICK, H., ZORNBERG, G.L., JICK, S.S., SESHADRI, S. & DRACHMAN, D.A. (2000) Statins and the risk of dementia. **Lancet**, 356, 1627-1631.
- KEHRER, J.P. (2000) The Haber-Weiss reaction and mechanisms of toxicity. **Toxicology**, 149, 43-50.

- KEYS, A., ANDERSON, J.T., FIDANZA, F., KEYS, M.H. & SWAHN, B. (1955) Effects of diet on blood lipids in man, particularly cholesterol and lipoproteins. **Clin Chem**, 1, 34-52.
- KEYS, A., ARAVANIS, C., BLACKBURN, H.W., VAN BUCHEM, F.S., BUZINA, R., DJORDJEVIĆ, B.D., DONTAS, A.S., FIDANZA, F., KARVONEN, M.J., KIMURA, N., LEKOS, D., MONTI, M., PUDDU, V. & TAYLOR, H.L. (1966) Epidemiological studies related to coronary heart disease: characteristics of men aged 40-59 in seven countries. **Acta Med Scand Suppl**, 460, 1-392.
- KONTOS, H.A. (2001) Oxygen radicals in cerebral ischemia: the 2001 Willis lecture. **Stroke**, 32, 2712-2716.
- LAMBETH, J.D. (2004) NOX enzymes and the biology of reactive oxygen. **Nat Rev Immunol**, 4, 181-189.
- LAUFS, U., ENDRES, M., CUSTODIS, F., GERTZ, K., NICKENIG, G., LIAO, J.K. & BÖHM, M. (2000a) Suppression of endothelial nitric oxide production after withdrawal of statin treatment is mediated by negative feedback regulation of rho GTPase gene transcription. **Circulation**, 102, 3104-3110.
- LAUFS, U., GERTZ, K., HUANG, P., NICKENIG, G., BÖHM, M., DIRNAGL, U. & ENDRES, M. (2000b) Atorvastatin upregulates type III nitric oxide synthase in thrombocytes, decreases platelet activation, and protects from cerebral ischemia in normocholesterolemic mice. **Stroke**, 31, 2442-2449.
- LIAO, J.K. & LAUFS, U. (2005) Pleiotropic effects of statins. **Annu Rev Pharmacol Toxicol**, 45, 89-118.
- LUKIW, W.J., PAPPOLLA, M., PELAEZ, R.P. & BAZAN, N.G. (2005) Alzheimer's disease--a dysfunction in cholesterol and lipid metabolism. **Cell Mol Neurobiol**, 25, 475-483.
- MEISTER, A. & ANDERSON, M.E. (1983) Glutathione. **Annu Rev Biochem**, 52, 711-760.

- MIESEL, R. & ZUBER, M. (1993) Elevated levels of xanthine oxidase in serum of patients with inflammatory and autoimmune rheumatic diseases. **Inflammation**, 17, 551-561.
- NORDBERG, J. & ARNÉR, E.S. (2001) Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. **Free Radic Biol Med**, 31, 1287-1312.
- OKADO-MATSUMOTO, A. & FRIDOVICH, I. (2001) Subcellular distribution of superoxide dismutases (SOD) in rat liver: Cu,Zn-SOD in mitochondria. **J Biol Chem**, 276, 38388-38393.
- PAHAN, K., SHEIKH, F.G., NAMBOODIRI, A.M. & SINGH, I. (1997) Lovastatin and phenylacetate inhibit the induction of nitric oxide synthase and cytokines in rat primary astrocytes, microglia, and macrophages. **J Clin Invest**, 100, 2671-2679.
- PFEFFER, K.D., HUECKSTEADT, T.P. & HOIDAL, J.R. (1994) Xanthine dehydrogenase and xanthine oxidase activity and gene expression in renal epithelial cells. Cytokine and steroid regulation. **J Immunol**, 153, 1789-1797.
- PIETTA, P.G. (2000) Flavonoids as antioxidants. **J Nat Prod**, 63, 1035-1042.
- PINEDA, A. & CUBEDDU, L.X. (2011) Statin rebound or withdrawal syndrome: does it exist? **Curr Atheroscler Rep**, 13, 23-30.
- PRINZ, V. & ENDRES, M. (2009) The acute (cerebro)vascular effects of statins. **Anesth Analg**, 109, 572-584.
- RAY, R. & SHAH, A.M. (2005) NADPH oxidase and endothelial cell function. **Clin Sci (Lond)**, 109, 217-226.
- RUECKSCHLOSS, U., GALLE, J., HOLTZ, J., ZERKOWSKI, H.R. & MORAWIETZ, H. (2001) Induction of NAD(P)H oxidase by oxidized low-density lipoprotein in human endothelial cells: antioxidative potential of hydroxymethylglutaryl coenzyme A reductase inhibitor therapy. **Circulation**, 104, 1767-1772.

- SATO, E., MOKUDAI, T., NIWANO, Y. & KOHNO, M. (2011) Kinetic analysis of reactive oxygen species generated by the in vitro reconstituted NADPH oxidase and xanthine oxidase systems. **J Biochem**, 150, 173-181.
- SHAN, X.Q., AW, T.Y. & JONES, D.P. (1990) Glutathione-dependent protection against oxidative injury. **Pharmacol Ther**, 47, 61-71.
- SHISHEHBOR, M.H., BRENNAN, M.L., AVILES, R.J., FU, X., PENN, M.S., SPRECHER, D.L. & HAZEN, S.L. (2003) Statins promote potent systemic antioxidant effects through specific inflammatory pathways. **Circulation**, 108, 426-431.
- STEINBERG, D. (2006) Thematic review series: the pathogenesis of atherosclerosis. An interpretive history of the cholesterol controversy, part V: the discovery of the statins and the end of the controversy. **J Lipid Res**, 47, 1339-1351.
- STEINBERG, D., AVIGAN, J. & FEIGELSON, E.B. (1960) Identification of 24-dehydrocholesterol in the serum of patients treated with MER-29. **Prog Cardiovasc Dis**, 2, 586-592.
- TANZAWA, K., KURODA, M. & ENDO, A. (1977) Time-dependent, irreversible inhibition of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase by the antibiotic citrinin. **Biochim Biophys Acta**, 488, 97-101.
- TERADA, L.S., DORMISH, J.J., SHANLEY, P.F., LEFF, J.A., ANDERSON, B.O. & REPINE, J.E. (1992) Circulating xanthine oxidase mediates lung neutrophil sequestration after intestinal ischemia-reperfusion. **Am J Physiol**, 263, L394-401.
- TILL, G.O., FRIEDL, H.P. & WARD, P.A. (1991) Lung injury and complement activation: role of neutrophils and xanthine oxidase. **Free Radic Biol Med**, 10, 379-386.
- TOUYZ, R.M. & SCHIFFRIN, E.L. (2000) Signal transduction mechanisms mediating the physiological and pathophysiological actions of angiotensin II in vascular smooth muscle cells. **Pharmacol Rev**, 52, 639-672.

- VAGELOS, P.R. (1991) Are prescription drug prices high? **Science**, 252, 1080-1084.
- VAUGHAN, C.J. & DELANTY, N. (1999) Neuroprotective properties of statins in cerebral ischemia and stroke. **Stroke**, 30, 1969-1973.
- VECCHIONE, C. & BRANDES, R.P. (2002) Withdrawal of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors elicits oxidative stress and induces endothelial dysfunction in mice. **Circ Res**, 91, 173-179.
- VISIOLI, F., KEANEY, J.F. & HALLIWELL, B. (2000) Antioxidants and cardiovascular disease; panaceas or tonics for tired sheep? **Cardiovasc Res**, 47, 409.
- WASSMANN, S., LAUFS, U., MÜLLER, K., KONKOL, C., AHLBORY, K., BÄUMER, A.T., LINZ, W., BÖHM, M. & NICKENIG, G. (2002) Cellular antioxidant effects of atorvastatin in vitro and in vivo. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, 22, 300-305.
- WERNER, N., PRILLER, J., LAUFS, U., ENDRES, M., BÖHM, M., DIRNAGL, U. & NICKENIG, G. (2002) Bone marrow-derived progenitor cells modulate vascular reendothelialization and neointimal formation: effect of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a reductase inhibition. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, 22, 1567-1572.
- WESTPHAL, S., ABLETSCHAUSER, C. & LULEY, C. (2008) Fluvastatin treatment and withdrawal: effects on endothelial function. **Angiology**, 59, 613-618.
- WOLOZIN, B., KELLMAN, W., RUOSSEAU, P., CELESIA, G.G. & SIEGEL, G. (2000) Decreased prevalence of Alzheimer disease associated with 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors. **Arch Neurol**, 57, 1439-1443.
- YU, B.P. (1994) Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. **Physiol Rev**, 74, 139-162.