

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:
BIOQUÍMICA TOXICOLÓGICA**

**EFEITOS DE DIFERENTES TRATAMENTOS COM ATORVASTATINA
SOBRE AS CONVULSÕES INDUZIDAS POR PENTILENOTETRAZOL**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Vinícius Rafael Funck

Santa Maria, RS, Brasil,

2011

EFEITOS DE DIFERENTES TRATAMENTOS COM ATORVASTATINA SOBRE AS CONVULSÕES INDUZIDAS POR PENTILENOTETRAZOL

por

Vinícius Rafael Funck

Dissertação apresentada no curso de mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para a obtenção do grau de **Mestre em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica.**

Orientador: Prof. Dr. Mauro Schneider Oliveira

Co-orientador: Prof. Dr. Juliano Ferreira

Santa Maria, RS, Brasil.

2011

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências Naturais e Exatas
Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas:
Bioquímica Toxicológica**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Dissertação de Mestrado

**EFEITOS DE DIFERENTES TRATAMENTOS COM ATORVASTATINA
SOBRE AS CONVULSÕES INDUZIDAS POR PENTILENOTETRAZOL**

elaborada por
Vinícius Rafael Funck

Como requisito parcial para a obtenção do grau de
Mestre em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica

COMISSÃO EXAMINADORA:

Mauro Schneider Oliveira, Dr. (Orientador)

Maribel Antonello Rubin, Dra. (UFSM)

Félix Antunes Soares, Dr. (UFSM)

Santa Maria, 22 de Agosto de 2011.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, quero agradecer a Deus.

Aos meus pais, Elaine e Ademir e ao meu irmão Vagner pelo apoio constante para que eu sempre concluísse meus estudos, abdicando de muitas coisas ao longo do tempo para que eu não desistisse dos meus objetivos. Podem ter certeza, que terei eterna gratidão por tudo o que me oportunizaram.

A minha namorada Dani, que sempre torceu por mim, me apoiou e principalmente por não desistir de mim, apesar das dificuldades que passamos e da distância. Espero que sejamos felizes por muito tempo, assim como, já sou agora. Amo-te.

Ao meu orientador e amigo Mauro, por tudo que aprendi com ele, por toda a paciência em passar seu conhecimento, além do esforço e preocupação em nos ajudar, mesmo estando longe estava sempre disponível para discutir sobre os experimentos e resultados. Obrigado também por ter me dado à oportunidade de me orientar mesmo me conhecendo há pouco tempo.

Ao meu co-orientador Juliano que me deu a primeira oportunidade para entrar no programa, me apresentou o Mauro para que começássemos o projeto e sempre disponibilizou seu laboratório quando precisássemos.

Ao professor Carlos Mello, por todo o suporte, e a disponibilidade de usar o seu laboratório discutir sobre os resultados, métodos e estatísticas, e também pela ajuda que me deu para continuar trabalhando no laboratório esse último semestre e terminar meus experimentos do mestrado.

A Clarissa e a Leticia que além de me ajudarem em todo o trabalho feito até agora, também me aturaram e suportaram todo esse tempo.

A toda gurizada do BIOEX pela parceria, em especial ao Leonardo, Samurai e o professor Luiz Fernando e participaram diretamente do trabalho, além de passarem os seus conhecimentos de laboratório sem restrição alguma, parceria também nas comemorações das nossas conquistas.

Ao professor Mallmann por manter a parceria de amizade e trabalho disponibilizando o LAMIC quando necessário e ao Maurício pela disponibilidade de ajudar ativamente no desenvolvimento do método, parceria para toda hora como sempre quando trabalhamos juntos.

A galera de UPT e meus colegas da graduação que manterão contato Cássia, Fernanda, André e Fran pela amizade sincera e pelos festerê. Agradecendo a Cassia que “me largou a barbada” de falar com o Juliano pra fazer o mestrado, mas que não foi tão barbada assim.

À Universidade Federal de Santa Maria e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica, pela oportunidade de subir mais um degrau na vida acadêmica.

E, à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao CNPq, pelo apoio financeiro.

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica
Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil.

EFEITOS DE DIFERENTES TRATAMENTOS COM ATORVASTATINA SOBRE AS CONVULSÕES INDUZIDAS POR PENTILENOTETRAZOL

Autor: Vinícius Rafael Funck
Orientador: Mauro Schneider Oliveira
Data e Local da defesa: Santa Maria, 22 de Agosto de 2011.

As estatinas são fármacos inibidores da enzima 3-hidroxi-3-metil-glutaril coenzima A (HMG-CoA) redutase, enzima marca passo na rota de biossíntese do colesterol. Vários trabalhos têm mostrado que as estatinas, particularmente a atorvastatina, são neuroprotetoras em diversas condições, incluindo isquemia, acidente vascular cerebral, traumatismo crânio-encefálico e exposição a aminoácidos excitatórios. No entanto, poucos estudos têm investigado se as estatinas possuem alguma efeito sobre crises convulsivas. Neste trabalho foi investigado se a atorvastatina ou a sinvastatina alteram as convulsões induzidas por pentilenotetrazol (PTZ), um agente convulsivante clássico, antagonista GABA_A. O tratamento de ratos Wistar machos adultos com atorvastatina por via oral durante sete dias (10 mg/kg/dia) aumentou a latência para crises generalizadas induzidas por PTZ (60 mg/kg). Em contraste, o tratamento com atorvastatina durante sete dias (10 mg/kg/dia) diminuiu a latência para convulsões clônicas e generalizadas induzidas por PTZ 24 horas após o término do tratamento (retirada do tratamento com atorvastatina). Tais efeitos não foram vistos com tratamentos similares utilizando sinvastatina. Além disso, o tratamento agudo com sinvastatina ou atorvastatina (10 mg/kg) 30 minutos antes da administração de PTZ não alterou as convulsões induzidas por este agente convulsivante. Curiosamente, a modulação das convulsões por atorvastatina não foi acompanhada de alterações nos níveis de colesterol plasmático ou do córtex cerebral nem na permeabilidade da barreira hemato-encefálica. Os níveis de atorvastatina no plasma e no córtex após sete dias de tratamento estavam acima do IC₅₀ para a inibição da HMG-CoA redutase, enquanto que a atorvastatina não foi detectada tanto no plasma quanto no córtex após 24 horas do término do tratamento. Concluí-se que o tratamento com atorvastatina e a cessação abrupta desse tratamento modulam de maneira diferente as convulsões induzidas por PTZ. Além disso, concluí-se que tais efeitos não estão relacionados com mudanças no colesterol plasmático e do córtex cerebral ou na permeabilidade da barreira hemato-encefálica (BHE). Estudos adicionais são necessários para avaliar os mecanismos moleculares subjacentes a estas descobertas, bem como suas implicações clínicas.

Palavras chave: estatinas, colesterol, EEG, epilepsia.

ABSTRACT

Dissertation of Master's Degree
Graduate Course in Toxicological Biochemistry
Federal University of Santa Maria, RS, Brazil.

Differential effects of atorvastatin treatment and withdrawal on pentylentetrazol-induced seizures

Author: Vinícius Rafael Funck
Advisor: Mauro Schneider Oliveira
Place and date: Santa Maria, March, 22th, 2011.

Statins are inhibitors of the 3-hydroxy-3-metil-glutaryl coenzyme A reductase, the rate-limiting enzyme in the pathway for cholesterol synthesis. Several studies have shown that statins, particularly atorvastatin, are neuroprotective in several conditions, including stroke, cerebral ischemia, traumatic brain injury and exposure to excitatory amino acids. However, only a few studies have investigated whether statins modulate seizure activity. In the current study we investigated whether atorvastatin or simvastatin alters seizures induced by pentylentetrazol (PTZ), a classic convulsant agent, GABA_A antagonist. Treatment of adult male Wistar rats orally with atorvastatin 10 mg/kg/day for seven days increased the latency to PTZ-induced generalized-seizures. In contrast, when the treatment with atorvastatin was withheld for 24 h (statin withdrawal), seizures were facilitated, evidenced by a decrease in latency for clonic and generalized-seizures. Such effect was not seen with a similar treatment using simvastatin or an acute treatment using a single dose of simvastatin or atorvastatin (10 mg/kg; 30 min before on PTZ). Interestingly, the effects of atorvastatin treatment or withdrawal were not accompanied by changes in plasma or the cerebral cortex cholesterol levels or in the of blood-brain barrier permeability. The atorvastatin levels in plasma and cortex after seven days of treatment were above the IC₅₀ for inhibition of HMG-CoA reductase, whereas atorvastatin was not detectable in the plasma or cortex following 24 hours of the end of treatment. We conclude that treatment with atorvastatin and its withdrawal exert differential effects on PTZ-induced seizures, which are not related to changes in plasma or cerebral cortex levels or in the blood-brain barrier permeability. Additional studies are necessary to evaluate the molecular mechanisms underlying these findings as well as its clinical implications.

Key words: statin, cholesterol, EEG, epilepsy

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Figura 1 – Estruturas químicas dos inibidores da HMG-CoA redutase.....	10
Figura 2 – Biossíntese do colesterol	11
Figura 3 – Regulação do complexo enzimático NADPH oxidase.....	13
Figura 4 – Uma visão geral dos modelos de crises epilépticas ou de epilepsia.	20
Figura 5 – Representação do receptor GABA _A mostrando os respectivos sítios de ligação de alguns ativadores e inibidores.....	21

ARTIGO

Figura 1 – Effect of acute (30 min before PTZ) oral administration of atorvastatin (10 mg/kg) (A-B) or simvastatin (10 mg/kg) (C-D) on the onset latency for clonic and generalized seizures induced by PTZ.	27
Figura 2 – Effect of oral administration of atorvastatin (10 mg/kg/day for 7 days) on the onset latency for clonic (A) and generalized tonic-clonic (B) seizures induced by PTZ.	28
Figura 3 – Effect of atorvastatin withdrawal (cessation of treatment after oral administration of 10 mg/kg/day atorvastatin for 7 days) on the onset latency for clonic (A) and generalized tonic-clonic (B) seizures induced by PTZ.....	29
Figura 4 – Effect of simvastatin treatment (10 mg/kg/day for 7 days) or withdrawal (cessation of treatment after oral administration of 10 mg/kg/day simvastatin for 7 days) on the onset latency for clonic (A) and generalized tonic-clonic (B) seizures induced by PTZ.....	30
Figura 5 – Effect of oral administration of atorvastatin (10 mg/kg/day for 7 days) on the plasma (A) and cerebral cortex (B) cholesterol levels.....	31
Figura 6 – Fluorescein content in the cerebral cortex of rats submitted to oral atorvastatin treatment (10 mg/kg/day for 7 days) or withdrawal (cessation of treatment after oral administration of 10 mg/kg/day atorvastatin for 7 days).....	31

LISTA DE ABREVIATURAS

ATP	Adenosina trifosfato
AVC	Acidente vascular cerebral
BHE	Barreira hemato-encefálica
CoQ₁₀	Coenzima Q ₁₀
CYP 7A1	Citocromo P450 7A1
CYP3A4	Citocromo P450 3A4
DA	Doença de Alzheimer
DP	Doença de Parkinson
EEG	Eletroencefalograma
eNOS	Óxido nítrico sintase endotelial
ERO	Espécies reativas de oxigênio
GABA_A	Ácido Gama-Aminobutírico
HMG-CoA	3-hidroxi-3metil-glutaril coenzima A
IC50	Concentração Inibitória Máxima de 50%
ILAE	International League Against Epilepsy
iNOS	Óxido nítrico sintase induzida
LDL	Lipoproteínas de baixa densidade
MPTP	1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetraidropiridina
NADPH	Nicotinamida-adenina-dinucleotídeo-fosfato reduzida
nNOS	Óxido nítrico sintase neuronal
ON	Óxido nítrico
PTZ	Pentilenotetrazol
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa

SUMÁRIO

RESUMO.....	VI
ABSTRACT.....	VII
LISTA DE FIGURAS.....	VIII
LISTA DE ABREVIATURAS.....	IX
1. APRESENTAÇÃO.....	1
2. INTRODUÇÃO.....	3
3. OBJETIVOS.....	6
3.1. Objetivo Geral.....	7
3.2. Objetivos Específicos.....	7
4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	8
4.1 Estatinas.....	9
4.2. Farmacologia bioquímica das estatinas.....	10
4.3. Estatinas nas doenças neurodegenerativas.....	16
4.4. Epilepsia: aspectos gerais e modelos experimentais.....	17
4. ARTIGO CIENTÍFICO.....	22
5. DISCUSSÃO.....	34
6. CONCLUSÃO.....	40
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	42

1. APRESENTAÇÃO

No item **INTRODUÇÃO** está descrita uma revisão sobre os temas trabalhados nesta dissertação.

Os resultados que fazem parte desta dissertação estão apresentados sob a forma de artigo, o qual encontra-se no item **ARTIGO CIENTÍFICO**. As seções Materiais e Métodos, Resultados, Discussão e Referências Bibliográficas encontram-se no próprio artigo e representam a íntegra deste estudo.

Os itens **DISCUSSÃO** e **CONCLUSÕES** encontrados no final desta dissertação apresentam interpretações e comentários gerais sobre o artigo científico contido neste trabalho.

As **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS** referem-se somente às citações que aparecem nos itens **INTRODUÇÃO**, **REVISÃO BIBLIOGRÁFICA** e **DISCUSSÃO** desta dissertação.

2. INTRODUÇÃO

Epilepsia é uma condição neurológica crônica com incidência de 1 % na população em geral (Dichter et al., 2007). Enquanto a monoterapia com anticonvulsivantes promove o controle das convulsões em aproximadamente 70-80 % dos pacientes, as convulsões permanecem não controláveis em um número significativo de pacientes, mesmo com o uso de várias drogas (Ben-Menachem et al., 2007). Por esta razão é importante à busca por novas drogas anticonvulsivantes, e o entendimento dos mecanismos de indução e manutenção de convulsões é de fundamental importância para este fim.

As estatinas são fármacos utilizados para reduzir os níveis séricos de colesterol e constituem um dos grupos de fármacos mais prescritos atualmente, atingindo vendas da ordem de 15 bilhões de dólares por ano. O mecanismo de ação do efeito redutor de colesterol das estatinas é a inibição da enzima marca-passo da biossíntese do colesterol, a 3-hidróxi-3-metilglutaril-coenzima A (HMG-CoA) redutase, que catalisa a redução do HMG-CoA a mevalonato (Nelson & Cox, 2000). As estatinas são as drogas mais eficientes para o tratamento de pacientes com elevados níveis de colesterol no sangue e doenças ateroscleróticas (Daimon et al., 2004; Lukiw et al., 2005; Stuve et al., 2003), e a atorvastatina é a estatina mais prescrita nessas situações (53 % das prescrições). Existem também estudos demonstrando que as estatinas têm efeito benéfico na redução dos riscos de desenvolvimento de patologias cerebrais e cardiovasculares (Lukiw et al., 2005), incluindo doença de Alzheimer e epilepsia. Nesse contexto, foi mostrado que a prevalência da doença de Alzheimer é menor entre pacientes em uso de estatinas (Jick et al., 2000; Wolozin et al., 2000), e que o tratamento com estatinas reduz praticamente a metade o risco de aparecimento de epilepsia em pacientes idosos (razão de chance=0.65) (Pugh et al., 2009). Além disso, foi demonstrado que a administração de atorvastatina por sua vez, é capaz de atenuar as convulsões e a morte celular induzidas por ácido caínico em ratos (Lee et al., 2008b), sugerindo que as estatinas podem ser úteis em desordens convulsivas. Por outro lado, a administração de lovastatina aumenta a frequência de convulsões do tipo crise de ausência em ratos (Serbanescu et al., 2004), sugerindo que o efeito anticonvulsivante das estatinas depende de vários fatores, como o modelo estudado e estatina usada.

No intuito de investigar melhor o possível efeito anticonvulsivante das estatinas, é importante testar o efeito da administração desses fármacos em outros

modelos de convulsão. Nesse contexto, as convulsões induzidas por PTZ, um modulador alostérico negativo do receptor GABA_A (Huang et al., 2001), constituem um importante modelo para o teste de novas drogas anticonvulsivantes. De fato, a supressão das alterações eletroencefalográficas induzidas por PTZ possui alto valor preditivo para o descobrimento de drogas efetivas contra crises generalizadas do tipo ausência e tonico-clônicas. Entretanto, ainda não se sabe como as estatinas são capazes de modular as convulsões induzidas por este agente convulsivante.

Apesar dos efeitos benéficos em decorrência do uso das estatinas, alguns trabalhos vêm mostrando que a interrupção do tratamento causa efeitos deletérios, foi visto que pacientes com doença coronariana após a retirada do tratamento tiveram um aumento no risco cardíaco em relação aos pacientes que seguiram o tratamento (Heeschen et al., 2002). Estudos em animais mostraram que o tratamento com atorvastatina aumenta a expressão de óxido nítrico sintase endotelial e diminui a expressão de RhoA. No entanto 2 dias após a retirada do tratamento, observou-se uma diminuição na expressão de eNOS e aumento na expressão de RhoA (Gertz et al., 2003). Além disso, em camundongos sem a subunidade gp91phox de nicotinamida-adenina-dinucleotídeo-fosfato reduzida (NADPH) oxidase, não ocorreu aumento na geração de superóxido após a retirada do tratamento com atorvastatina quando comparado com os animais que eram selvagens e também sofreram a retirada do medicamento (Vecchione and Brandes, 2002). Isso mostra que o efeito de retirada do tratamento com estatinas também deve ser investigado em modelos de epilepsia, já que elas podem estar sendo utilizadas por pacientes com epilepsia e que sofrem de dislipidemias.

Dado o elevado número de pacientes com epilepsia que apresentam convulsões refratárias às drogas disponíveis atualmente, torna-se importante a busca por novas drogas anticonvulsivantes. Nesse sentido, desde que as estatinas diminuem a chance de desenvolvimento de epilepsia (Pugh et al., 2009) e atenuam as convulsões induzidas por ácido caínico (Lee et al., 2008b), o presente estudo é importante para determinar se as estatinas modulam as convulsões induzidas por PTZ.

3. OBJETIVOS

3.1 – Objetivo Geral

Avaliar o efeito de diferentes tratamentos com estatinas sobre as convulsões induzidas por PTZ em ratos.

3.2 - Objetivos Específicos

1- Avaliar o efeito da administração aguda da Atorvastatina ou Sinvastatina sobre as convulsões induzidas por PTZ.

2- Avaliar o efeito da administração crônica da Atorvastatina sobre as convulsões induzidas por PTZ.

3- Avaliar o efeito da retirada do tratamento com Atorvastatina sobre as convulsões induzidas por PTZ.

4- Avaliar o efeito da Sinvastatina com e sem retirada do tratamento sobre as convulsões induzidas por PTZ.

5- Quantificar o colesterol no soro e córtex cerebral dos animais tratados com Atorvastatina.

6- Avaliar o efeito da administração de forma crônica ou retirada do tratamento com Atorvastatina sobre a permeabilidade da barreira hematoencefálica.

7- Quantificar a Atorvastatina no córtex e soro de ratos após a administração de forma crônica ou retirada do tratamento com Atorvastatina.

4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

4.1- Estatinas

As estatinas são inibidores da 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A (HMG-CoA), enzima limitante da biossíntese do colesterol. Ao reduzir a formação de colesterol endógenamente, as estatinas reduzem os níveis plasmáticos de colesterol total e lipoproteínas de baixa densidade (LDL). Altas concentrações plasmáticas de LDL constituem um fator de risco para doenças cardiovasculares e, assim, o uso de fármacos capazes de diminuir os níveis de colesterol é útil para a prevenção dessas doenças. Nesse sentido, muitos estudos confirmam que as estatinas são altamente eficazes em diminuir os níveis de colesterol e reduzir o risco de doenças cardiovasculares (Bertolini et al., 1997; Sacks et al., 1996).

A mevastatina foi a primeira estatina produzida, extraída inicialmente do fungo *Penicillium citrinum* (Endo et al., 1976). A lovastatina, pravastatina e sinvastatina, também são derivadas de produtos fúngicos. Dentre esses, a lovastatina e a sinvastatina possuem o anel lactona em sua estrutura que na digestão sofre uma hidrólise resultando na forma hidroxilada e ativa, enquanto que a pravastatina é administrada com o anel aberto na forma ácida e biologicamente ativa (figura 1). Por outro lado, a fluvastatina é de origem totalmente sintética, com uma estrutura muito diferente das estatinas derivadas dos fungos. A fluvastatina é um derivado mevalonolactona com um substituinte fluorofenil no anel indol (figura 1). As estatinas que chegaram ao mercado depois da fluvastatina, tendo a estrutura semelhante ao grupo fluorofenil.

Todas as estatinas de origem totalmente sintéticas estão na forma ácida e aberta, como por exemplo, a atorvastatina que é metabolizada principalmente pelo citocromo P450 3A4 (CYP 3A4), este metabolismo de primeira passagem acontece no fígado e pode formar dois metabólitos ativos a orto-hidroxiatorvastatina e a para-hidroxiatorvastatina e três metabólitos inativos na forma lactona, mais de 90% ligado a proteínas plasmáticas. Porém, a sinvastatina é produzida de forma semissintética e pode ser chamada de pró-droga, pois é administrada na forma lactona, que é absorvida pelo sistema gastrointestinal e hidrolisada pelo fígado para a forma β -hidroxilada, forma ativa (Erturk et al., 2003). Dependendo da sua estrutura química elas têm diferentes afinidades pela HMGCoA-redutase, que determina seu efeito

farmacológico e diferentes propriedades farmacocinéticas (distribuição pelos tecidos, a estabilidade metabólica, enzimas e transportadores envolvidos em seu metabolismo). Assim, informações sobre as propriedades físico-químicas das estatinas são úteis para compreender as suas propriedades farmacocinéticas, bem como, a interação com outras drogas vai depender da farmacocinética de cada estatina (Kajinami et al., 2004; Niemi et al., 2004; Wang et al., 2005).

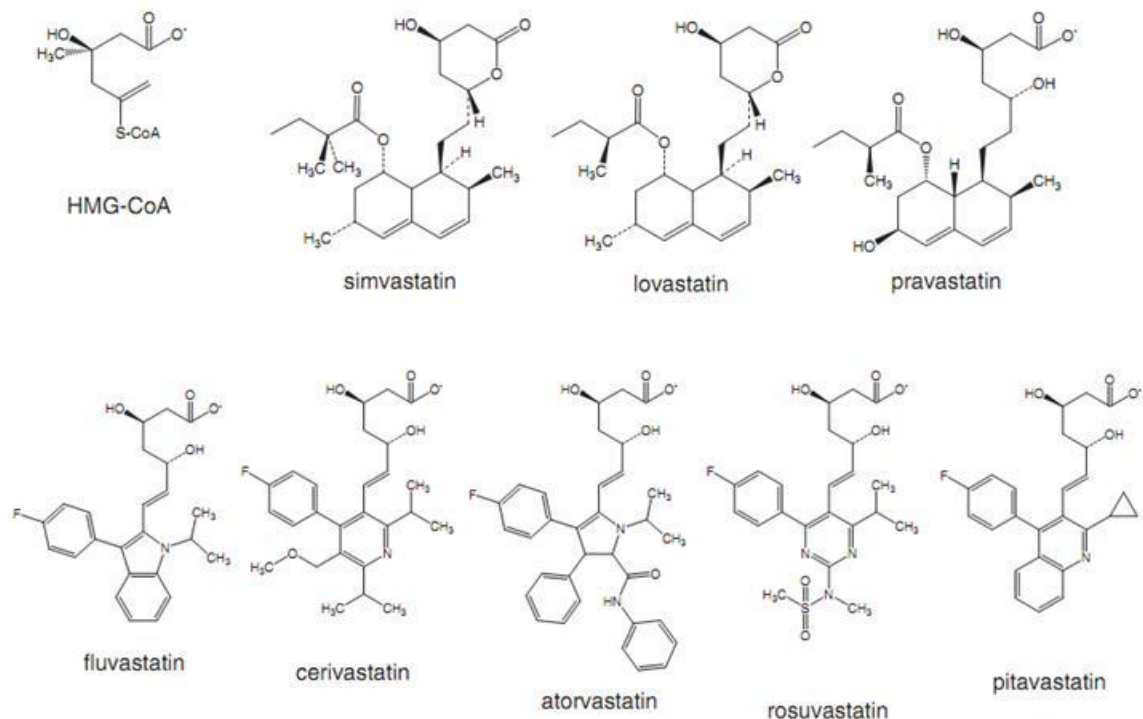


Figura 1. Estruturas químicas dos inibidores da HMG-CoA redutase (estatinas). Algumas estatinas como a lovastatina, simvastatina e a pravastatina são produzidas a partir de fungos, no entanto as mais novas foram desenvolvidas de forma sintética. A simvastatina, lovastatina e a pravastatina tem o anel naftaleno como estrutura semelhante, no entanto a lovastatina e a simvastatina são administradas como pró-drogas na forma lactona, já a pravastatina está na forma ativa com o anel aberto na forma ácida. As estatinas sintéticas têm estruturas diferentes, embora tenham uma molécula como HMG na forma ácida e aberta, possuem o grupo 4-fluorfenil e isopropil (Shitara and Sugiyama, 2006).

4.2 - Farmacologia bioquímica das estatinas.

A HMG-CoA redutase é a enzima que catalisa a formação do mevalonato a partir do HMG-CoA, o passo limitante da via de biossíntese do colesterol (Figura 2).

A redução dos níveis séricos de colesterol leva a um aumento da expressão de receptores LDL por regulação da transcrição para manter a homeostase intracelular do colesterol. No entanto, o citocromo P450 7A1 (CYP 7A1, colesterol 7 α -hidroxilase) que é específico para o fígado, transforma o colesterol intracelular em ácidos biliares, levando a redução do colesterol nos hepatócitos, embora a expressão aumentada de receptores LDL seja uma via de diminuição do colesterol sérico. A biodegradação do colesterol no fígado resulta na redução do colesterol total sérico. Considerando que 50% ou mais do colesterol total produzido é endógeno, e na sua maioria produzido pelo fígado, pode-se dizer que o principal alvo das estatinas é o fígado (Transon et al., 1996).

A inibição da HMG-CoA redutase também resulta na redução da biossíntese de farnesil pirofosfato, um metabolito intermediário da ubiquinona/coenzima Q₁₀ (CoQ₁₀; figura 2). A CoQ₁₀ é um isoprenóide esteróide que desempenha um papel importante na transdução de energia celular dentro do sistema de transporte de elétrons na mitocôndria, além de estabilizar as membranas celulares, preservando a integridade e função celular.

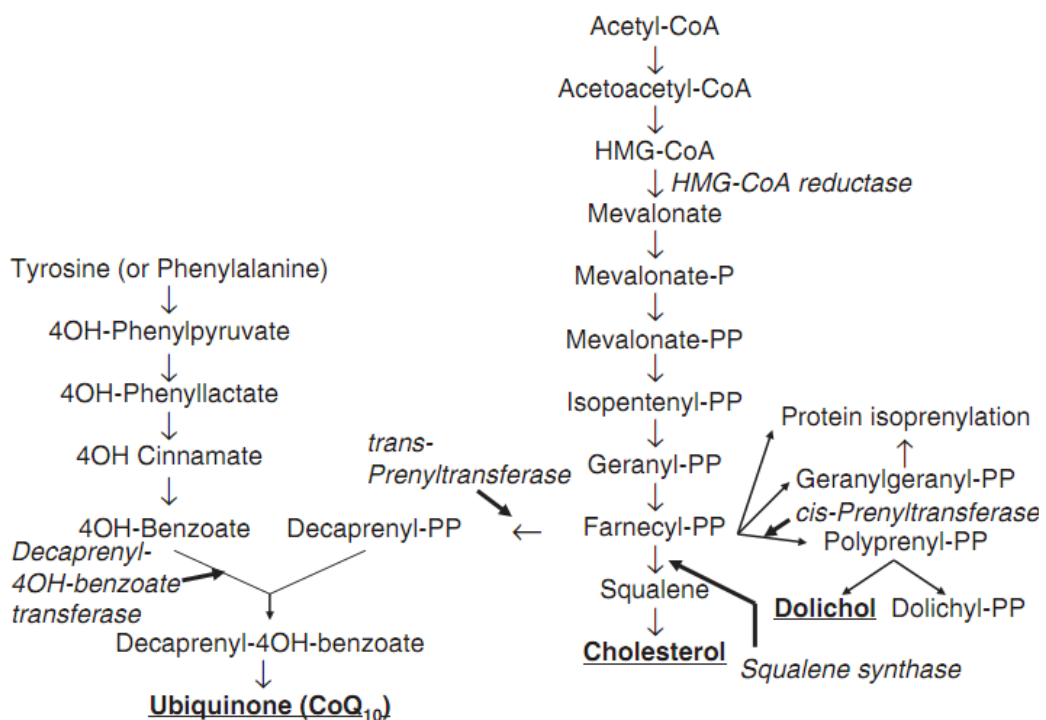


Figura 2. Biossíntese do colesterol. O colesterol é sintetizado a partir do acetil-CoA. A síntese do mevalonato mediada pela HMG-CoA redutase é o passo limitante da via que regula a síntese do

colesterol. O farnesil pirofosfato é um ponto de ramificação para a biossíntese dos isoprenoides, dolicol e ubiquinona (Shitara and Sugiyama, 2006).

4.3 – Estatinas nas doenças neurodegenerativas.

Altos níveis séricos de colesterol e lipídeos são fatores de risco para a doença coronariana e o acidente vascular cerebral (AVC). Portanto, a diminuição do colesterol e lipídeos mediada pelas estatinas confere efeitos benéficos para os pacientes com doença coronariana e isquemia cerebral (Amarenco et al., 2009). Outros estudos têm mostrado que o tratamento com estatinas exercem neuroproteção no AVC, pois modulam mediadores inflamatórios como a molécula de adesão intercelular-1, quimiocinas e interleucina-6 (Berger et al., 2008; Cui et al., 2009; Mayanagi et al., 2008).

Além do papel de diminuir o colesterol, outro efeito favorável importante das estatinas no AVC está associado com a regulação da produção de óxido nítrico (ON) e modulação da óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) (Endres et al., 2004).

Estudos “*in vitro*” mostraram que as estatinas aumentam a produção de ON modificando favoravelmente a estabilidade de eNOS ou prevenindo a hipóxia pela baixa expressão da eNOS (Laufs and Liao, 1998).

Kureishi e colaboradores demonstraram que, em células endoteliais da veia umbilical humana e cultura de células endoteliais aórticas bovinas a simvastatina e a pravastatina induziram uma rápida fosforilação da Akt e a atividade da proteína quinase, que por consequência fosforila eNOS e aumenta a produção de ON. Além disso, a ativação da Akt induzida pelas estatinas foi mediada pela fosfatidilinositol – 3 quinase/proteína quinase Akt via transdução de sinal, esse processo foi impedido por seus inibidores específicos wortmannin ou LY294002.(Kureishi et al., 2000).

Vários estudos têm mostrado que além de afetar a via de sinalização da eNOS, as estatinas têm efeito neuroprotetor por outros mecanismos, como por exemplo, o efeito antioxidante. No AVC uma grande quantidade de espécies reativas de oxigênio (ERO) são geradas pelas células inflamatórias, através de vários sistemas enzimáticos, onde se destacam a ciclooxigenase, xantina desidrogenase, xantina oxidase e NADPH oxidase. Como um multicomponente enzimático a NADPH

oxidase é uma importante fonte de anion superóxido nas células inflamatórias (Wang et al., 2007).

Estudos em ratos Zucker obesos e resistentes a insulina mostraram que a produção de superóxido pela NADPH oxidase teve um aumento significativo nas artérias cerebrais comparado com ratos Zucker não obesos. Esse aumento nos níveis de superóxido foi impedido pelo tratamento com rosuvastatina, indicando que a inibição da NADPH oxidase é um efeito induzido pelas estatinas. A NADPH oxidase é formada por duas subunidades ligadas a membrana, gp91 e a p22, e três subunidades citosólicas, p67, p47 e p40 mais Rac (Figura 3) uma pequena GTPase (Groemping and Rittinger, 2005).

No modelo de oclusão da artéria cerebral média em ratos, o pré-tratamento com atorvastatina fez com que diminuísse a produção de ERO e o volume de infarto cerebral através da diminuição da atividade da NADPH oxidase, pois evita que ocorra a translocação da subunidade citoplasmática p47 para a membrana que é fundamental para que a ela exerça sua atividade enzimática (Hong et al., 2006).

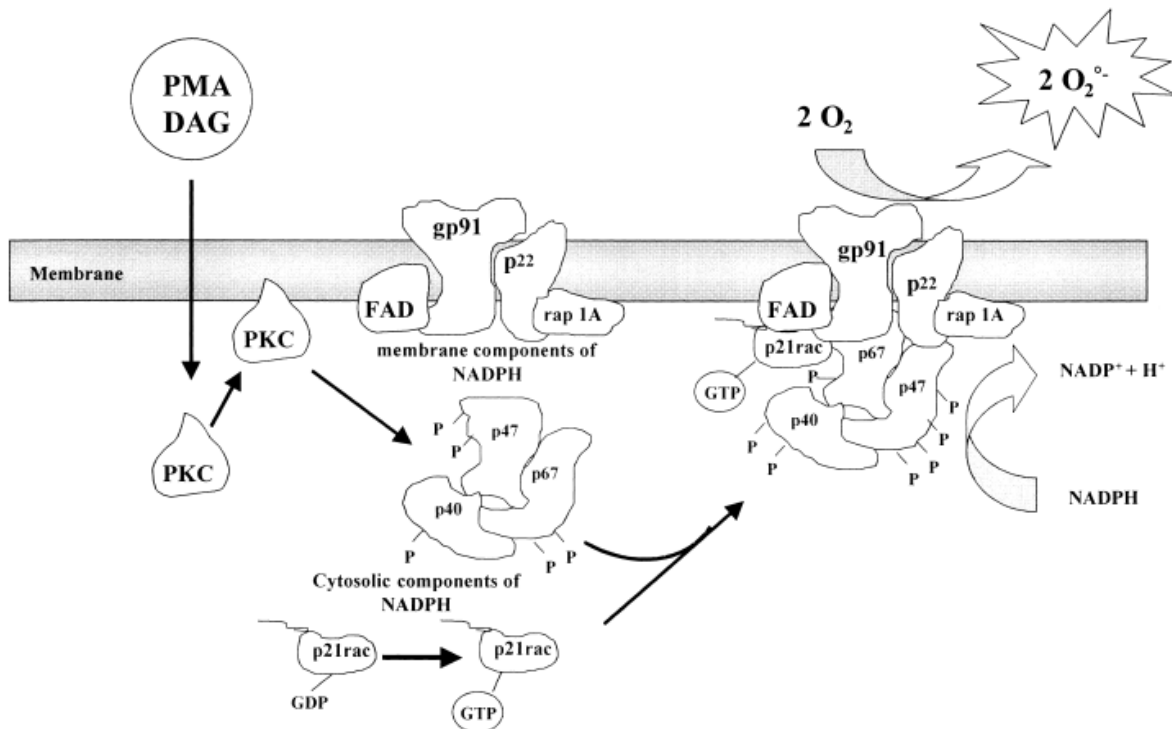


Figura 3: Regulação do complexo enzimático NADPH oxidase. A translocação e montagem dos componentes citosólicos (p47phox, p67phox e p21rac) associando-se com flavocitocromo de membrana, citocromo e mais p47 phox fosforilada leva a ativação da NADPH oxidase que por sua vez catalisa a redução do oxigênio em anion superóxido (Morena et al., 2002).

Para evidenciar os efeitos das estatinas sobre as doenças neurodegenerativas, há uma série de estudos envolvendo doença de Alzheimer (DA) e o efeito das estatinas. Um estudo com modelo de DA em camundongos, o tratamento com pravastatina diminuiu significativamente a da proteína β -amiloide no hipocampo, acompanhado de uma melhora cognitiva (Handattu et al., 2009). Experimentos “*in vitro*” mostraram que as estatinas reduzem a produção da proteína β -amiloide através da diminuição da secreção de proteína precursora amiloide, pela inibição da isoprenilação da Rab/Rho na membrana que levou a uma redução dos níveis da proteína precursora amiloide (Ostrowski et al., 2007).

Um estudo clínico mostrou que a administração crônica de lovastatina diminuiu significativamente os níveis séricos de Abeta em pacientes com DA, demonstrando que o tratamento com lovastatina é eficaz em retardar o início e a progressão da DA (Buxbaum et al., 2002). Já indivíduos com 50 anos ou mais que faziam uso de estatinas, tinham um risco significativamente reduzido de demência quando comparado com indivíduos que não usavam estatinas (Jick et al., 2000).

Com relação à doença de Parkinson (DP) outra neuropatia amplamente estudada, onde estudos clínicos envolvendo o uso das estatinas tem tido bons resultados com melhoria dos pacientes tratados, mas pouco se relata quais mecanismos de ação estariam envolvidos nessa melhoria clínica. Um estudo populacional caso-controle feito por Wahner e colegas que apresentou uma associação positiva na proteção ao risco de DP em relação à dose-resposta do uso de estatinas (Wahner et al., 2008). Outro estudo caso-controle mostrou que altas concentrações séricas de LDL estavam associadas a uma maior ocorrência da DP, e o uso de estatinas reduziu a prevalência da DP, sugerindo um possível mecanismo dependente do colesterol envolvido no efeito protetor das estatinas na DP (Huang et al., 2007). Na mesma linha de estudos, Mutez e colaboradores demonstraram que, pacientes com DP que faziam uso de estatinas tiveram um menor aumento na dose de levodopa em dois anos, comparado ao grupo controle, sugerindo que o uso de estatinas está associado com o início tardio e mais lento do desenvolvimento da DP (Mutez et al., 2009).

Estudos em animais estão sendo usados para explorar os mecanismos de neuroproteção das estatinas na DP, como por exemplo, temos a resposta anti-

inflamatória. Um modelo animal de DP muito utilizado é o de 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetraidropiridina (MPTP), no qual o tratamento com sinvastatina reduziu a depleção de dopamina, ácido 3, 4-dihidroxifenilacético e ácido homovalínico impedindo a formação de 3-nitrotirosina no estriado de forma dose dependente. Essa neuroproteção foi associada com o efeito anti-inflamatório causado pelas estatinas incluindo a atenuação da produção do fator de necrose tumoral (TNF) – alfa, óxido nítrico e superóxido (Selley, 2005).

Ghosh e colaboradores viram que as estatinas atenuam a ativação de p21 (Ras) e NF-kappaB mediada pelas células da micróglia em animais intoxicados com MMP(+) e MPTP que diminuiu a perda neuronal dopaminérgica e melhorou a função motora (Ghosh et al., 2009). Bem como, ratos tratados cronicamente com sinvastatina percorreram uma distância maior no campo aberto e aumentou a permanência nos braços abertos do labirinto elevado, mostrando que a sinvastatina induz a atividade locomotora e reduz a ansiedade. Esse efeito ansiolítico foi correlacionado positivamente com o aumento de receptores NMDA em muitas regiões do encéfalo como, por exemplo, a amígdala, putamen caudado, córtex cingulado, hipocampo e núcleo accumbens (Wang et al., 2009).

Apesar dos estudos relacionando doenças neurodegenerativas e estatinas serem recentes, poucos deles mostraram a relação entre o tratamento de estatinas em modelos de epilepsia, além disso, os resultados por eles mostrados ainda são contraditórios dependendo do modelo e da estatina utilizada.

Observou-se que o pré-tratamento com Lipitor® (atorvastatina) reduziu de forma eficiente a convulsão induzida por ácido caínico, a morte de neurônios do hipocampo, infiltração de monócitos e a expressão de genes pró-inflamatórios. Além disso, foi observado que o tratamento com lovastatina atenuou a excitotoxicidade em cultura de neurônios hipocampais induzida por ácido caínico e glutamato. Esses resultados sugerem um potencial uso das estatinas nas crises convulsivas e outras doenças neurológicas associadas à excitotoxicidade (Lee et al., 2008a). No entanto, outro estudo mostrou que a lovastatina agravou as crises de ausência atípica, com apenas efeitos mínimos sobre os esteróis do cérebro (Serbanescu et al., 2004). Além disso, Vliet e colegas mostraram que o tratamento com atorvastatina por 14 dias, começando o tratamento sete dias antes da indução da epilepsia (estimulação elétrica) não afetou a duração do status epilépticos ou desenvolvimento de epilepsia

em ratos. Sendo que seis semanas após o status epilepticus tanto os animais tratados com atorvastatina com o grupo controle tiveram rompimento da barreira hematoencefálica, e também não reduziu inflamação, morte neuronal ou reorganização sináptica (van Vliet et al., 2011). Isso mostra a necessidade da realização de mais estudos relacionados com modelos em epilepsia.

4.4 – Efeito de retirada das estatinas.

Várias evidências sugerem que as estatinas têm efeitos pleiotrópico que não apenas o de inibir a síntese do colesterol e isso tem sido visto em uma série de eventos como no AVC, doença coronariana aguda, doença de Parkinson e Alzheimer. No entanto, pacientes que tem esses tipos de doenças também podem sofrer de dislipidemias a qual requer um tratamento com estatinas. Esse tratamento muitas vezes pode ser negligenciado levando a uma interrupção do tratamento, conhecido com efeito de retirada.

O primeiro estudo feito em animais a relatar o efeito de retirada do tratamento com estatinas, feito por Laufs e colaboradores mostrou que a retirada do tratamento com estatinas em ratos normocolesterolêmicos resultou em um aumento transitório da Rho, causando uma supressão da produção de NO endotelial. O mecanismo molecular subjacente ocorre por feedback negativo na regulação da transcrição do gene Rho mediada pelo citoesqueleto de actina. (Laufs et al., 2000).

Em humanos, pacientes que foram internados com sintomas de síndrome coronariana aguda, que faziam tratamento com estatinas e seguiram durante 30 dias após a internação tiveram uma taxa reduzida de eventos coronarianos comparado com pacientes que não faziam uso de estatinas. Nos pacientes em que o tratamento com estatinas foi retirado após a internação, ocorreu um aumento no risco cardíaco em comparação aos pacientes que continuaram a receber estatinas, tendo uma tendência em ser maior que nos pacientes que nunca receberam estatinas. Isso foi relacionado a um aumento da taxa de eventos cardiovasculares durante a primeira semana após o início dos sintomas e foi independente dos níveis de colesterol (Heeschen et al., 2002).

O tratamento com atorvastatina conferiu proteção no AVC em 40% após a oclusão da artéria cerebral média seguido de reperfusão. A retirada do tratamento com estatinas, no entanto, resultou na perda da proteção ao AVC após 2 e 4 dias. Além disso, o tratamento com atorvastatina aumentou a expressão de eNOS e diminuiu a expressão de RhoA. No entanto após 2 dias de retirada do tratamento observou-se uma diminuição na expressão de eNOS e aumento na expressão de RhoA (Gertz et al., 2003). Isso está diretamente relacionado com a isoprenilação na sequência da biossíntese do colesterol (Figura 2) inibida pelas estatinas, a grande questão está nas mudanças causadas pela retirada do tratamento, sendo necessários mais estudos a respeito do mecanismo a respeito dessas mudanças.

De maneira diferente Vecchione e Brandes viram que em camundongos sem a subunidade gp91phox da NADPH oxidase (Figura 3), a acetilcolina não atenuou o fator relaxante do endotélio, bem como não teve aumento na geração de superóxido após a retirada do tratamento com atorvastatina quando comparado com os animais que eram selvagens e também sofreram a retirada do medicamento (Vecchione and Brandes, 2002).

Um contra ponto dos benefícios causados pelo tratamento com as estatinas, é o efeito da retirada abrupta desse tratamento, isso pode ser definido por uma serie de modificações intracelulares, podendo estar relacionada à ativação da via de biossíntese do colesterol, que durante o tratamento estava inibida, tendo como consequência o aumento dos níveis de isoprenoides, levando a ativação de determinadas pequenas GTPases que desencadeiam a disfunção vascular, enquanto que a via está inibida (durante o uso da estatina) favorece a proteção vascular.

4.4 – Epilepsia: aspectos gerais e modelos de estudo.

O termo epilepsia engloba uma diversidade de distúrbios que têm em comum uma predisposição aumentada à ocorrência de crises epiléticas. Alguns autores argumentam que para o diagnóstico de epilepsia são necessárias crises recorrentes (duas ou mais ocorridas em um intervalo superior a 24 horas) não provocadas secundariamente por doenças sistêmicas agudas, intoxicação, abuso ou abstinência

de substâncias ou insultos neurológicos agudos (Banerjee et al., 2009). A Associação Brasileira de Epilepsia, baseada nas propostas *International League Against Epilepsy* (ILAE), propõe que a ocorrência de pelo menos uma crise epiléptica associada a uma persistente alteração cerebral capaz de originar outras crises estabeleceria o diagnóstico de epilepsia. No entanto, sua definição ultrapassa esses conceitos, pois as crises epilépticas podem acarretar também danos cognitivos, comportamentais e sociais, com impacto na qualidade de vida não só do paciente, mas também da família desse paciente (Fisher et al., 2005).

A epilepsia é uma doença neurológica muito comum, cuja prevalência estimada é em torno de 1,5 e 2% da população mundial, afetando principalmente crianças e idosos, com um leve predomínio do sexo masculino (Teixeira e Salgado, 2004). Pessoas de todas as raças, sexos, condições socioeconômicas e regiões do planeta, podem ser acometidas. As quais podem sofrer algumas consequências, incluindo morte súbita, ferimentos, problemas psicológicos e transtornos mentais. Causando problemas sociais e econômicos nas pessoas acometidas pela doença (Neto e Marchetti, 2005).

A epilepsia tem maior probabilidade de se desenvolver nos primeiros 16 anos de vida, também é importante que se compreenda que de todas as crianças que desenvolveram epilepsia com menos de 16 anos, em um terço delas (cerca de 33%) haverá remissão e os ataques não vão voltar mais na idade adulta. As taxas de incidência anual de epilepsia na maioria dos estudos variam entre 122 a 190/100.000 habitantes de países em desenvolvimento. Essas altas taxas em países em desenvolvimento estão na sua maioria relacionadas a causas parasíticas (neurocisticercose), infecções intracranianas virais ou bacterianas, toco-traumatismo, traumatismo crânio-encefálico e doenças cerebrovasculares (Carpio and Hauser, 2009). Um estudo epidemiológico realizado em hospitais psiquiátricos mostra que o diagnóstico de epilepsia aparece em cerca de 10% dos pacientes internados (Kummer et al., 2005). Estima-se que no Brasil algo entre 530 e 890 mil pessoas com epilepsia e algum transtorno mental associado (Marchetti, 2004).

Apesar do uso de terapia com tratamento crônico, que é baseada na modulação do balanço inibição/excitação no córtex cerebral para prevenir as crises, até 30% dos pacientes sofrem de convulsões persistentes (Sander, 1993). Entre os pacientes que fizeram lobectomia temporal anterior, cerca de 80-90% relataram

estar livres das crises (Sillanpaa and Schmidt, 2006; Velasco et al., 2000). Considerando que um grande número de pacientes com epilepsia permanece refratário e não responsivo ao tratamento medicamentoso, surge a importância do estudo e do entendimento da fisiopatologia dos diferentes tipos de crises convulsivas e de síndromes epiléticas, para que se possam sugerir novas terapias, ou mesmo testar novas drogas com potencial anticonvulsivante. Nesse sentido, os modelos experimentais são de grande valia para o estudo da fisiopatologia envolvida nessas manifestações e na identificação de novas drogas com valor preditivo antiepilético.

Um esquema simples de classificação dos modelos animais experimentais de crises epiléticas e epilepsia é mostrado na figura 4. Para a descoberta de novas drogas antiepiléticas, é necessária a triagem de um grande número de compostos, onde os modelos animais devem ser de fácil execução, eficientes e preditivos com o que se tem na clínica. Isso explica porque os dois modelos mais simples de convulsão em camundongos e ratos, o modelo de crises epiléticas por eletrochoque máximo e o PTZ, que foram desenvolvidos a mais de 60 anos atrás, ainda são os modelos animais mais utilizados na busca de novas drogas anticonvulsivantes (Bialer and White, 2010).

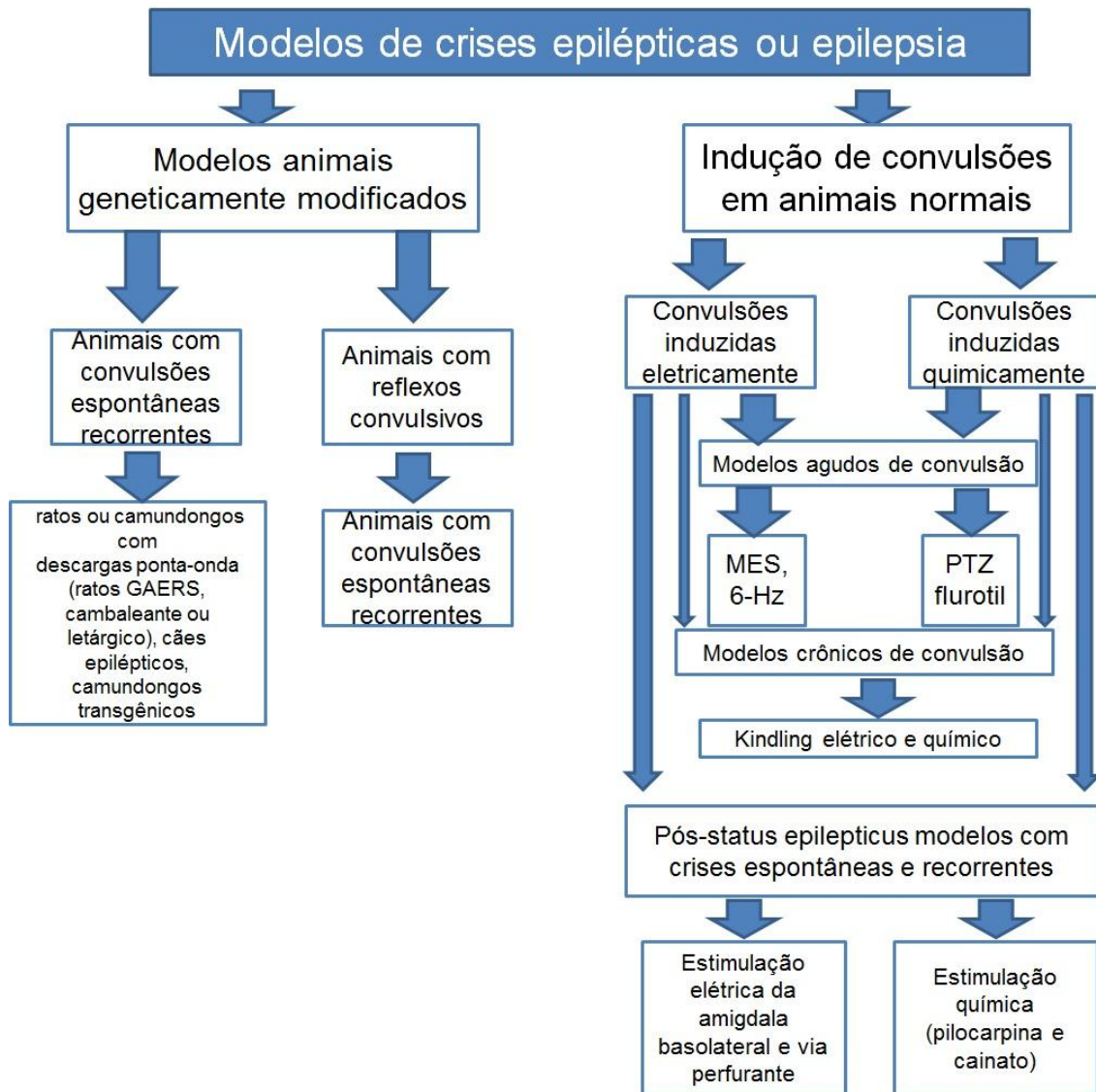


Figura 4: Uma visão geral dos modelos de crises epiléticas ou de epilepsia adaptado de (Loscher, 2011).

O PTZ antagoniza o receptor $GABA_A$, através de um provável antagonismo alostérico do canal de Cl^- associado a tal receptor (Figura 5) (Huang et al., 2001). O antagonismo do receptor $GABA_A$ causado pelo PTZ diminui as correntes de Cl^- , potencializando a neurotransmissão excitatória e desencadeando convulsões que são consideradas um bom modelo animal para convulsões generalizadas (Kupferberg, 2001).

Nesse sentido, é de especial interesse mencionar que a modulação das convulsões induzidas por PTZ pode ser particularmente relevante para o desenvolvimento de novas drogas anticonvulsivantes, visto que a supressão das

alterações eletroencefalográficas induzidas por PTZ possui alto valor preditivo para drogas clinicamente efetivas contra crises generalizadas do tipo ausência e tônico-clônicas (Dichter, 2007).

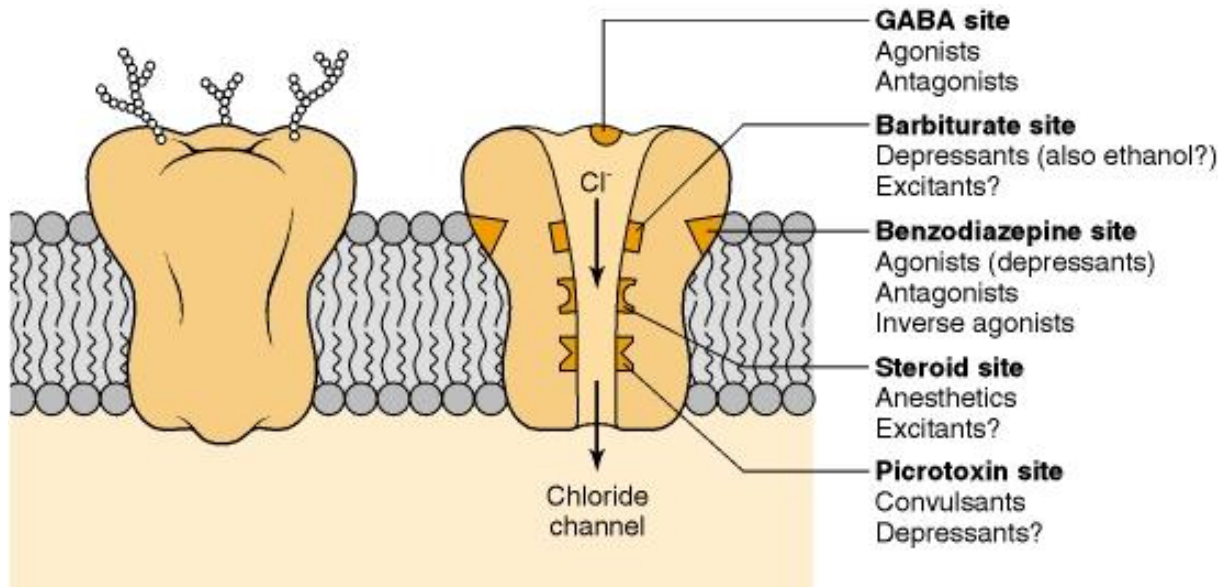


Figura 5: Representação do receptor GABA_A mostrando os respectivos sítios de ligação de alguns moduladores.

FULL-LENGTH ORIGINAL RESEARCH

Differential effects of atorvastatin treatment and withdrawal on pentylenetetrazol-induced seizures

*Vinícius Rafael Funck, †Clarissa Vasconcelos de Oliveira, †Letícia Meier Pereira, *Leonardo Magno Rambo, *Leandro Rodrigo Ribeiro, *†Luiz Fernando Freire Royes, *†Juliano Ferreira, *Gustavo Petri Guerra, †Ana Flávia Furian, ‡Maurício Schneider Oliveira, ‡Carlos Augusto Mallmann, †Carlos Fernando de Mello, and *†§Mauro Schneider Oliveira

*Postgraduate Program in Biological Sciences: Biochemistry, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, Brazil; †Postgraduate Program in Pharmacology, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, Brazil; ‡Postgraduate Program in Veterinary Medicine, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, Brazil; and §Federal University of Pampa at Itaqui, Itaqui, Brazil

SUMMARY

Purpose: Statins are selective inhibitors of 3-hydroxyl-3-methyl-glutaryl coenzyme A (HMG-CoA) reductase, the rate-limiting enzyme of the mevalonate pathway for cholesterol biosynthesis. Increasing evidence indicates that statins, particularly atorvastatin, are neuroprotective in several conditions, including stroke, cerebral ischemia, traumatic brain injury, and excitotoxic amino acid exposure. However, only a few studies have investigated whether statins modulate seizure activity. In the current study we investigated whether atorvastatin or simvastatin alters the seizures induced by pentylenetetrazol (PTZ), a classical convulsant.

Methods: Adult male Wistar rats were treated with atorvastatin or simvastatin for 7 days (10 mg/kg/day). Seizure activity was induced by PTZ (60 mg/kg, i.p.), and evaluated by behavioral and electrographic methods. Cholesterol levels were determined by a standard spectrophotometric method. Blood–brain barrier (BBB) permeability was assessed by the fluorescein method. Atorvastatin levels in the plasma and cerebral cortex were determined by high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry.

Key Findings: We found that oral atorvastatin treatment increased the latency to PTZ-induced general-

ized seizures. In contrast, when the 7-day atorvastatin treatment was withheld for 1 day (i.e., atorvastatin withdrawal), PTZ-induced seizures were facilitated, as evidenced by a decrease in the latency to clonic and generalized tonic–clonic seizures induced by PTZ. In contrast, simvastatin treatment for 7 days (10 mg/kg/day, p.o.), with or without withdrawal, did not alter PTZ-induced seizures. Interestingly, the effects of atorvastatin treatment and withdrawal were not accompanied by changes in plasma or cerebral cortex cholesterol levels or in the BBB permeability. Atorvastatin levels in the plasma and cerebral cortex after 7 days of treatment were above the half maximal inhibitory concentration for inhibition of HMG-CoA reductase, whereas atorvastatin was not detectable in the plasma or cerebral cortex following a 24 h wash-out period (atorvastatin withdrawal).

Significance: We conclude that atorvastatin treatment and withdrawal have differential effects on pentylenetetrazol-induced seizures, which are not related to changes in plasma or cerebral cortex cholesterol levels or in BBB permeability. Additional studies are necessary to evaluate the molecular mechanisms underlying our findings as well as its clinical implications.

KEY WORDS: Statin, Cholesterol, EEG, Epilepsy, Rat, Blood–brain barrier.

Originally identified as secondary metabolites of fungi by Endo and Kuroda (1976), statins comprehend a large group of natural and synthetic drugs that present potent cholesterol-lowering properties (Endo, 1992, 2010).

Accepted July 21, 2011; Early View publication XXXXX XX, 20XX.

Address correspondence to Mauro S. Oliveira, Universidade Federal do Pampa, Campus Itaqui, Rua Luiz Joaquim de Sá Britto, s/n, Itaqui 97650-000, RS, Brasil. E-mail: oliveira.ms@gmail.com

Wiley Periodicals, Inc.

© 2011 International League Against Epilepsy

Statins are competitive inhibitors of the rate-limiting enzyme of the mevalonate pathway for cholesterol biosynthesis, 3-hydroxyl-3-methyl-glutaryl coenzyme A reductase (HMG-CoA reductase, EC 1.1.1.88 or 1.1.1.34) (Istvan & Deisenhofer, 2001). By inhibiting HMG-CoA reductase in the liver, statins cause a decrease in cholesterol synthesis as well as an increase in the synthesis of low-density lipoprotein (LDL) receptors, resulting in an increased clearance of cholesterol and LDL from the bloodstream (Goldstein & Brown, 2009). Indeed, statins

represent a well-established class of drugs for the treatment of hypercholesterolemia and related atherosclerotic diseases, as several landmark clinical trials have demonstrated the benefit of lipid lowering with statins for the primary and secondary prevention of cardiovascular diseases, particularly coronary heart disease (Endres, 2005).

In addition to their cholesterol-lowering and cardiovascular protective properties, several experimental and clinical studies have shown that statins exert a number of pleiotropic and neuroprotective actions. In fact, retrospective clinical evidence suggests that long-term statin administration may not only reduce stroke risk but may also improve outcome (Endres, 2005). Moreover, statins augment cerebral blood flow and confer significant protection in animal models of stroke (Nagotani et al., 2005), cerebral ischemia (Laufs et al., 2000), traumatic brain injury (Lu et al., 2004), and excitotoxicity (Zacco et al., 2003). For instance, it has been shown that treatment with atorvastatin decreases cerebral infarct size after transient cerebral ischemia in normocholesterolemic mice and in spontaneously hypertensive stroke-prone rats (Laufs et al., 2000; Nagotani et al., 2005). In addition, atorvastatin administration after controlled cortical impact significantly reduced neurologic functional deficits and increased neuronal survival and synaptogenesis in the rat hippocampus (Lu et al., 2004). Moreover, treatment with statins substantially reduced lactate dehydrogenase release caused by exposure of embryonic mouse neocortical cultures to *N*-methyl-D-aspartate (NMDA) (Zacco et al., 2003), further suggesting strong protective actions for statins in excitotoxicity-related conditions.

In light of the reported neuroprotective actions of statins, it is worth mentioning that excitotoxic cell death and seizure generation and spreading may share common mechanisms (Bazan et al., 2002), and, therefore, neuroprotective compounds may display anticonvulsant activity and vice versa. However, only a few studies have addressed this point, with differing results. For instance, Lee et al. (2008) have shown that an oral treatment with atorvastatin efficiently decreased kainate-induced seizures and associated hippocampal neuron death. On the other hand, Ramirez et al. (2011) have shown that atorvastatin exacerbated kainate-induced seizures in mice and that simvastatin was highly effective in reducing the severity of seizures induced by kainate. In addition, Serbanescu et al. (2004) have shown that lovastatin exacerbates atypical absence seizures. Therefore, to further investigate the effect of statins on seizure activity, in the current study, we investigated whether atorvastatin or simvastatin treatment alters the behavioral and electrographic seizures induced by pentylenetetrazol (PTZ), a convulsant that has been widely used in the study of mechanisms of seizure generation, spreading, and termination, as well as development and

screening of new compounds with anticonvulsant activity (White et al., 2006).

EXPERIMENTAL PROCEDURES

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 with the goal of keeping the number of animals used to a minimum, as well as their suffering. These protocols 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 and simvastatin for animal treatment were extracted from commercially available capsules (Lipitor, Pfizer, São Paulo, Brazil and Zocor, Merck Sharp & Dohme, São Paulo, Brazil respectively). Their identity and purity were checked by nuclear resonance methods and were >98%. Mobile phase reagents for high-performance liquid chromatography (HPLC) were obtained from J.T. Baker (Avantor Performance Materials, Phillipsburg, NJ, U.S.A.). All the other reagents were purchased from Sigma (St. Louis, MO, U.S.A.).

Drug administration protocol

In order to investigate the effects of atorvastatin treatment on PTZ-induced seizures, we used three different protocols, as follows:

Experiment 1 (acute treatment): The effect of the acute systemic administration of atorvastatin or simvastatin on seizure activity induced by PTZ was investigated by administering atorvastatin (10 mg/kg, p.o.) or its vehicle (sterile saline solution – 0.9% NaCl, p.o.), 30 min before the injection of PTZ (60 mg/kg, i.p.). Atorvastatin and simvastatin doses and schedules for administration were chosen based on previous studies (Lau et al., 2006; Lee et al., 2008; Piermartiri et al., 2009) or on pilot experiments.

Experiment 2 (repeated treatment): Atorvastatin, simvastatin, or vehicle was given orally for 7 days (10 mg/kg/day), and the last administration was 30 min before PTZ injection.

Experiment 3 (statin withdrawal): In this set of experiments, animals were treated exactly as described above for experiment 2, except that treatment was withheld for 1 day and, therefore, the injection of PTZ occurred 24 h after the last injection of atorvastatin, simvastatin, or vehicle.

Behavioral seizure evaluation

Immediately after the injection of PTZ the animals were transferred to a round open field and were video-monitored for 20 min for the appearance of clonic and generalized seizures, according to Ferraro et al. (1999). Accordingly, clonic seizures are episodes characterized by typical partial clonic activity affecting the face, head, vibrissae, and forelimbs. Such clonic events are short, typically lasting 1–2 s, and can occur either individually or in multiple discrete episodes before generalization and over time. Generalized convulsive episodes are characterized by generalized whole-body clonus involving all four limbs and tail, rearing, wild running and jumping, sudden loss of upright posture, and autonomic signs, such as hypersalivation and defecation. The duration of generalized seizures was variable, but typically involved behavioral changes lasting for 30–60 s, followed by a quiescent period. During the 20-min observation period, the latencies to clonic and generalized seizures were measured. Seizure activity and its modulation by statin treatment was confirmed electrographically in a subset of animals ($n = 5$ per group), as described below.

Surgical procedures

Animals were anesthetized with Equithesin (1% phenobarbital, 2% magnesium sulfate, 4% chloral hydrate, 42% propylene glycol, 11% ethanol, 3 ml/kg, i.p.) and placed in a rodent stereotaxic apparatus. Under stereotaxic guidance, two stainless steel screw electrodes were placed over the parietal cortex, along with a ground lead positioned over the nasal sinus. The electrodes were connected to a multipin socket and were fixed to the skull with dental acrylic cement. Chloramphenicol (200 mg/kg, i.p.) was administered immediately before the surgical procedure. After surgery, all rats received a single subcutaneous injection of 0.01 mg/kg buprenorphine hydrochloride for amelioration of pain.

EEG recordings

The procedures for electroencephalography (EEG) recording were carried out as described previously (Oliveira et al., 2008), and the protocol of drug administration used in this set of experiments was the same used as described above. At the day of the experiment, each animal was transferred to an acrylic glass cage (25 × 25 × 40 cm) and habituated for 20 min before EEG recording. The rat was then connected to the lead socket in a swivel inside a Faraday's cage, and EEG was concomitantly recorded using a Neuro-map EQSA260 digital encephalographer (Neurotec, Itajubá, MG, Brazil). Routinely, a 10-min baseline recording was obtained to establish an adequate control period. EEG signals were amplified, filtered (0.1–70.0 Hz, bandpass), digitalized (sampling rate 256 Hz), and stored in a personal computer for off-line analysis. Seizures were defined by the occurrence of episodes consisting of the following alterations in the recording leads (McCull et al., 2003): isolated

sharp waves ($\geq 1.5 \times$ baseline); multiple sharp waves ($\geq 2 \times$ baseline) in brief spindle episodes ($\geq 1 \text{ s} \geq 5 \text{ s}$); multiple sharp waves ($\geq 2 \times$ baseline) in longer spindle episodes ($\geq 5 \text{ s}$); spikes ($\geq 2 \times$ baseline) plus slow waves; multispikes ($\geq 2 \times$ baseline, ≥ 3 spikes/complex) plus slow waves; and major seizure (repetitive spikes plus slow waves obliterating background rhythm, $\geq 5 \text{ s}$). Rhythmic scratching of the electrode headset rarely caused artifacts, which were easily identified and discarded.

Cholesterol determination

Rats were killed by decapitation and the whole blood and the brain were quickly obtained. The blood was collected in heparinized tubes, incubated at room temperature for 30 min, and then centrifuged at 1,500 *g* for 10 min at room temperature for plasma separation. The cortices were rapidly dissected and homogenized in 20 volumes of 2:1 (v/v) chloroform/methanol to extract brain total lipids. Organic solvents were evaporated to dryness under a gentle stream of nitrogen at room temperature, and the residue was reconstituted to 1 ml with 0.9% NaCl. Levels of cholesterol in plasma and cerebral samples were determined by a standard colorimetric method (Trinder, 1969), using a commercially available kit (Labtest, Lagoa Santa, MG, Brazil). Protein content of brain samples was spectrophotometrically determined by the method of Bradford (1976), using bovine serum albumin (BSA, 1 mg/ml) as standard.

Blood–brain barrier (BBB) permeability assay

BBB permeability to small molecular mass compounds was determined according to Olsen et al. (2007), with minor modifications. Briefly, animals were treated with atorvastatin exactly as described above, except that they were injected intraperitoneally with 100 mg sodium fluorescein in 1 ml sterile saline instead of PTZ. Animals were anesthetized with Equithesin 45 min after the sodium fluorescein injection and transcardially perfused with 200 ml of ice cold saline solution (0.9% NaCl, containing 1 IU/ μ l of heparin) to remove blood from the intravascular compartment. The blood was collected by cardiac puncture, and plasma was separated as described above. The cerebral cortex was quickly removed, weighed, and homogenized 1:10 (w/v) in sterile phosphate-buffered saline. Protein was precipitated from brain and plasma samples with 20% trichloroacetic acid followed by centrifugation at 1,500 *g* for 10 min to remove potential background fluorescence. The supernatants were collected and analyzed in a spectrofluorometer (Hitachi) using an excitation wavelength of 480 nm and an emission wavelength of 538 nm. A standard curve for quantification of sodium fluorescein in the samples was generated by simultaneously analyzing samples of known sodium fluorescein concentration in 10% trichloroacetic acid. The degree of BBB permeability was measured as the ratio of sodium fluorescein in a gram of brain tissue per the amount of sodium fluorescein in 1 ml of plasma (Olsen et al., 2007).

Atorvastatin analysis by liquid chromatography tandem mass spectroscopy (LC-MS/MS)

Rats were killed by decapitation and the plasma and the cerebral cortex were obtained quickly as described above. Plasma (0.5 ml) was diluted with 0.5 ml water and 4.5 ml acetonitrile and vortex-mixed for 20 min. The resulting mixture was centrifuged at 16,600 g for 15 min and the upper liquid phase was then transferred to a glass tube and evaporated to dryness at 40°C (1,500 Pa). The resulting residue was reconstituted in 1 ml with acetonitrile-to-water acetic acid 0.2% (1:1, v/v) and levels of atorvastatin were analyzed by LC-MS/MS. The cerebral cortex was dissected out, weighed, and homogenized 1:5 (w/v) with acetonitrile-to-zinc sulfate ratio 200 mM (1:1, v/v) and extraction procedures were the same as for plasma samples, with the exception that the resulting residue was reconstituted in 2 ml with acetonitrile-to-water acetic acid ratio 0.2% (1:1, v/v).

An Agilent series 1,200 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, U.S.A.) liquid chromatography with a XDB-C₁₈ column (4.6 × 150 mm, 5 μm particles; Agilent) was used for the separation of atorvastatin. The mobile phase was water ammonium acetate 0.005 M and acetonitrile/water ammonium acetate 0.005 M (9:1, v/v) and separation was performed by isocratic elution 60:40 (v/v) during 5 min. The flow rate was 0.5 ml/min and injection volume was 20 μl. Atorvastatin standard stock solution was prepared by dissolving all dust in acetonitrile-to-water 90:10 (v/v). The stock standard solution was then diluted with acetonitrile-to-water acetic acid ratio 0.2% (5:5, v/v) to furnish working standard solution at concentrations of 0.01, 0.1, 1, 10, and 20 ng/ml.

Mass spectrometry was performed using an API 5500 triple quadrupole mass analyzer fitted with an electrospray ionization (ESI) source (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, U.S.A.). Detection of atorvastatin was carried out in multiple reaction-monitoring (MRM) positive ion mode, and the ion transitions monitored were 559 (m/z) (precursor ion) and 440 (m/z) (ion quantitation), 466 (m/z), and 380 (m/z) (ion qualification). The limit of detection of this method was 0.01 ng atorvastatin/ml.

Statistical analyses

Latencies to clonic and generalized seizures were analyzed by the Mann-Whitney test and presented as median and interquartile ranges. Cerebral and plasma cholesterol and fluorescein levels were analyzed by parametric one-way analysis of variance (ANOVA) and expressed as mean and standard error of the mean. A probability of $p < 0.05$ was considered statistically significant.

RESULTS

The first experiment was aimed to investigate whether a single oral administration of atorvastatin or simvastatin

(10 mg/kg; 30 min before PTZ) alters the latency to PTZ-induced seizures. No significant differences were found between atorvastatin, simvastatin, or vehicle-treated rats regarding the latency to clonic or generalized seizures induced by PTZ (Fig. 1; Mann-Whitney test).

On the other hand, we found that treatment with atorvastatin for 7 days (10 mg/kg/day, p.o.) delayed PTZ-induced generalized seizures. Statistical analysis revealed that atorvastatin increased the latency to PTZ-induced generalized, but not to clonic seizures (Fig. 2A,B; Mann-Whitney test). Representative EEG studies presented in Fig. 2C–F show that atorvastatin treatment delayed PTZ-induced generalized seizures, but did not alter seizure-associated wave patterns in the EEG recordings, which appeared as a combination of multispike plus slow waves, multiple sharp waves, and major seizure activity in a 2–3 Hz high-amplitude activity in all recording leads.

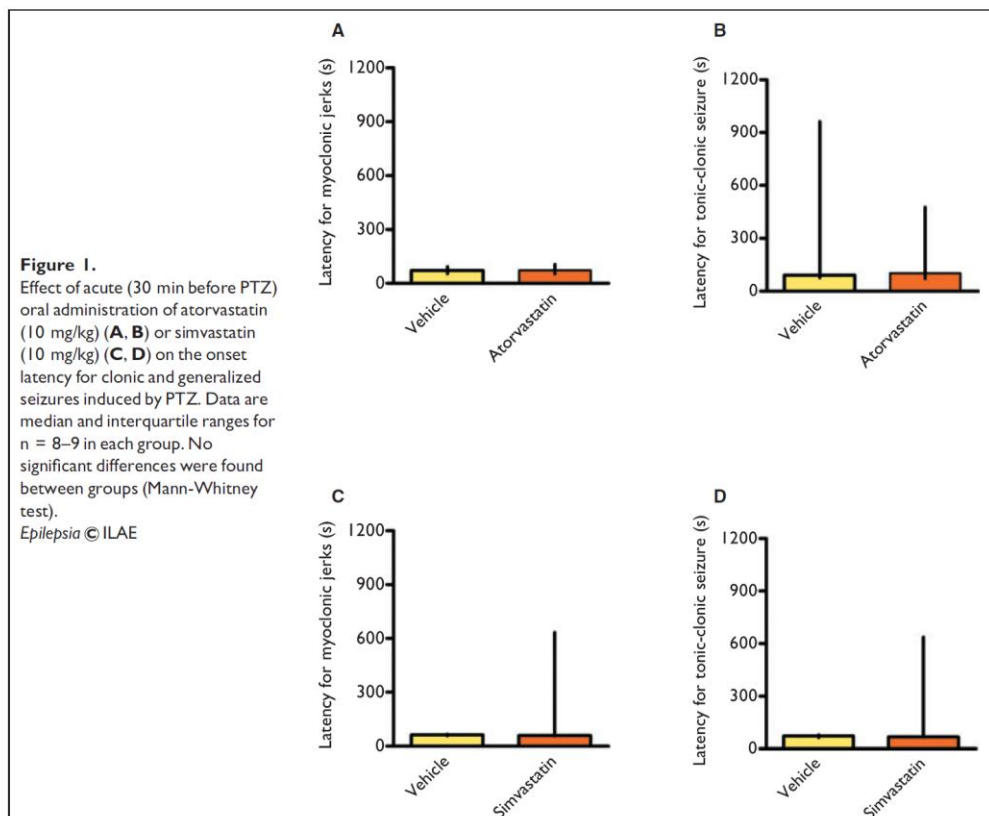
Because statin withdrawal abrogates stroke protection in mice (Gertz et al., 2003), we decided to test whether atorvastatin withdrawal alters PTZ-induced seizures. Atorvastatin was given for 7 days (10 mg/kg/day, p.o.), and 24 h after the last administration of atorvastatin, PTZ was injected. Interestingly, 1-day atorvastatin withdrawal facilitated PTZ-induced seizures, measured as decreased latency to clonic and generalized seizures (Fig. 3A,B; Mann-Whitney test). Nevertheless, atorvastatin withdrawal did not alter the electrographic pattern of PTZ-induced seizures, since it was identical to that presented by animals treated with vehicle plus PTZ (Fig. 3C–F).

In contrast, simvastatin treatment for 7 days (10 mg/kg/day, p.o.), with or without withdrawal did not alter PTZ-induced seizures, since we did not detect any change in the latency to clonic and generalized seizures across the different treatment schedules (Fig. 4A,B; Mann-Whitney test).

In order to shed some light on the mechanisms underlying the seizure-modulating effects of atorvastatin treatment and withdrawal, we measured atorvastatin levels in the plasma and cerebral cortex of atorvastatin-treated animals (10 mg/kg/day for 7 days, p.o.) by LC-MS/MS. Atorvastatin levels after 7 days of treatment were 19.97 ± 6.33 pmol/ml in the plasma and 179.92 ± 15.31 pmol/g wet tissue in the cerebral cortex (Table 1). On the other hand, atorvastatin was not detectable in the plasma or cerebral cortex following a 24 h washout period (atorvastatin withdrawal) (Table 1).

In order to investigate whether the effects of atorvastatin treatment and withdrawal on pentylenetetrazol-induced seizures were related to changes in plasma or brain cholesterol levels, we measured the levels of this lipid in the plasma and in the cerebral cortex of rats treated for 7 days with atorvastatin (10 mg/kg/day, p.o.). No significant changes in brain or plasma cholesterol levels were detected after 7 days of atorvastatin treatment (Fig. 5A,B; one-way ANOVA). In a similar way, we did not detect any effect of simvastatin treatment or withdrawal on plasma or cerebral cortex cholesterol levels (data not shown).

Atorvastatin and PTZ-Induced Seizures



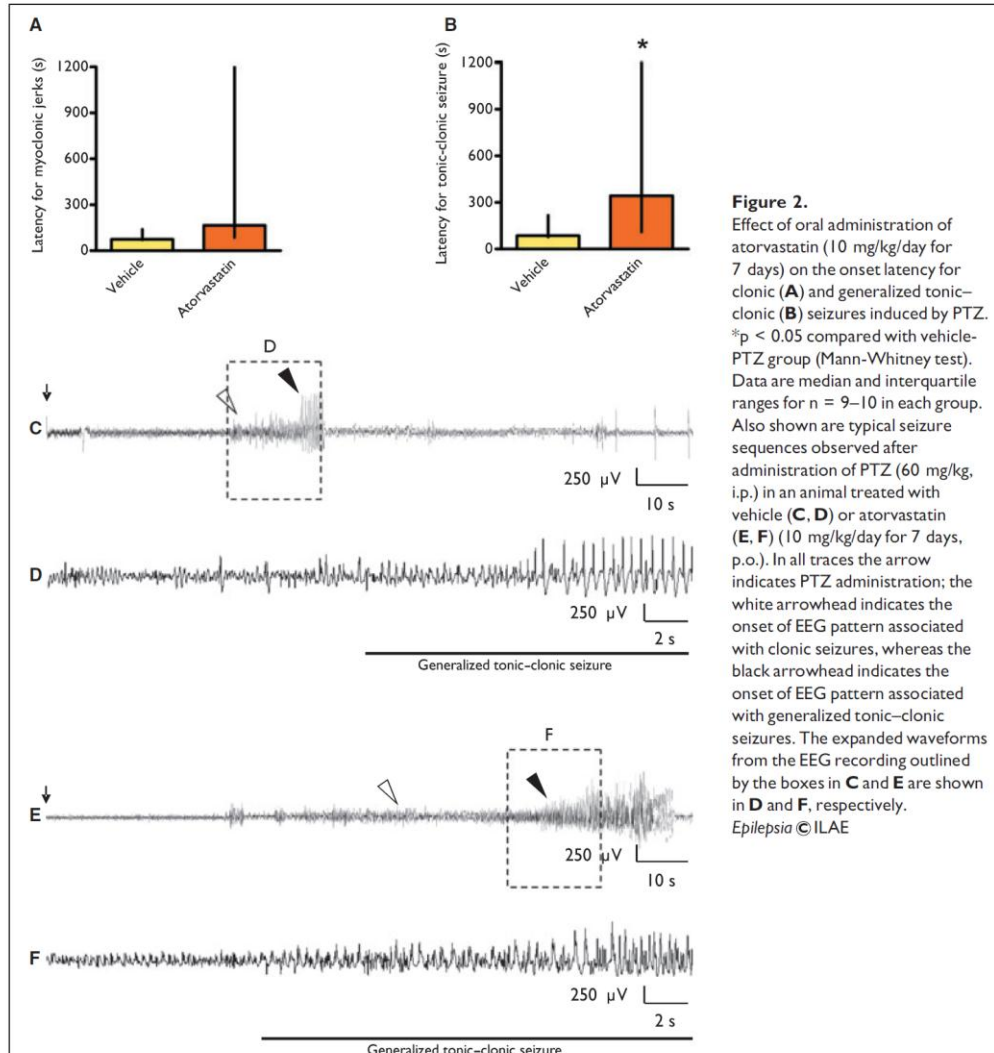
Because modulation in seizure activity might be attributable to changes in the access of the convulsant into the brain, we evaluated the BBB permeability after the different atorvastatin treatments. No significant changes in the fluorescein content (brain-to-plasma fluorescence ratio) were detected after atorvastatin treatment (Fig. 6; one-way ANOVA).

DISCUSSION

In the present study we showed that oral atorvastatin, but not simvastatin, treatment for 7 days increased the latency to PTZ-induced generalized seizures. In contrast, when the 7-day atorvastatin treatment was withheld for 1 day (i.e., atorvastatin withdrawal), PTZ-induced seizures were facilitated, as evidenced by a decrease in the latency to clonic and generalized seizures. Interestingly, the effects of atorvastatin treatment and withdrawal were not accompanied by changes in plasma or cerebral cortex cholesterol levels,

despite the presence of pharmacologically relevant concentrations of atorvastatin in plasma and brain tissue. Finally, we did not detect any effect of atorvastatin treatment or withdrawal on the BBB permeability, as measured by the fluorescein technique.

Increasing evidence indicates that statins, particularly atorvastatin, show beneficial effects in several excitotoxic conditions, including stroke (Nagotani et al., 2005), cerebral ischemia (Laufs et al., 2000), traumatic brain injury (Lu et al., 2004), and glutamate exposure (Zacco et al., 2003). However, only a few studies have investigated whether statin treatment modulates seizure activity. In agreement with our present results, it has been shown that oral atorvastatin treatment (10 mg/kg/day for 7 days) significantly reduces the severity of kainate-induced seizures and the number of wet dog shakes, a hallmark of kainate-induced seizure activity (Lee et al., 2008). In addition, a similar oral atorvastatin treatment (10 mg/kg/day for 7 days) prevents the occurrence of clonic and/or tonic

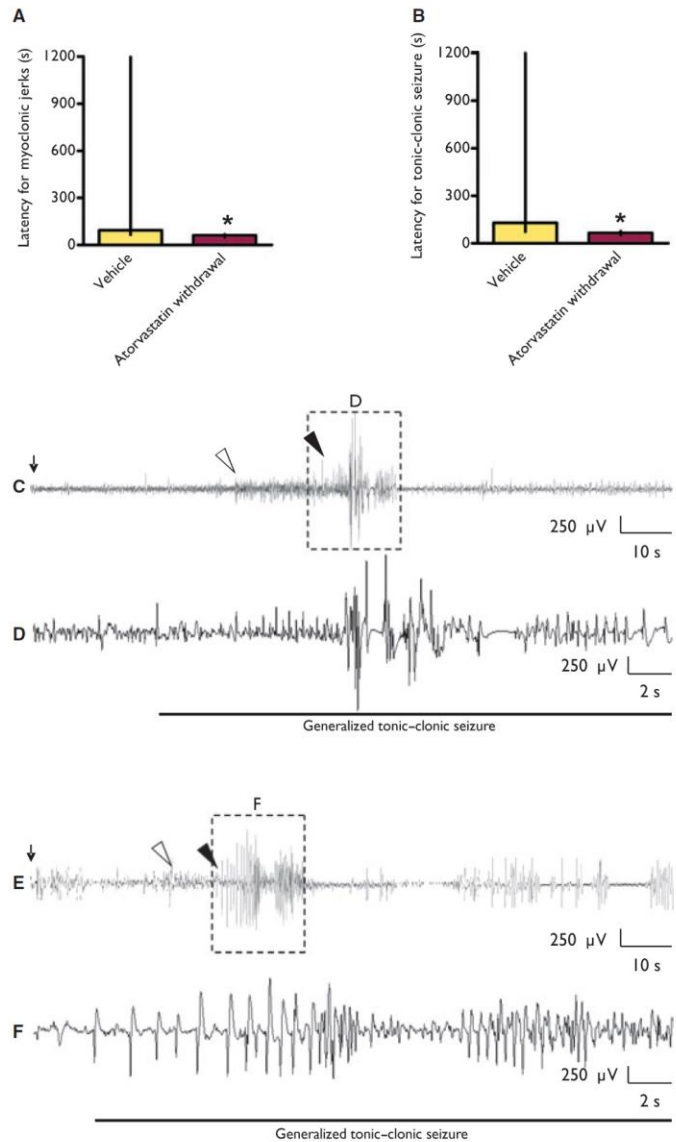


seizures induced by the intracerebroventricular injection of quinolinic acid in about one third of challenged mice (Piermartiri et al., 2009), further suggesting anticonvulsant properties for atorvastatin. However, it has also been reported that a single injection of atorvastatin (10 mg/kg, 30 min after kainate administration) does not alter seizure and wet dog shake scores, suggesting that acute atorvastatin does not reduce kainate-induced seizures (Lee et al., 2008). These results are, to some extent, in agreement with our results,

since we did not find any effect of a single injection of atorvastatin on PTZ-induced seizures. Moreover, it has been shown that lovastatin administration (100 mg/kg) at postnatal days 2, 8, 14, and 20 significantly increases cortical spike-and-wave discharge duration at postnatal days 59–60 in Long–Evans rats, a rat strain that has a spontaneous tendency to display cortical spike-and-wave discharges resembling those observed in atypical absence seizures (Serbanescu et al., 2004). Although it is difficult to

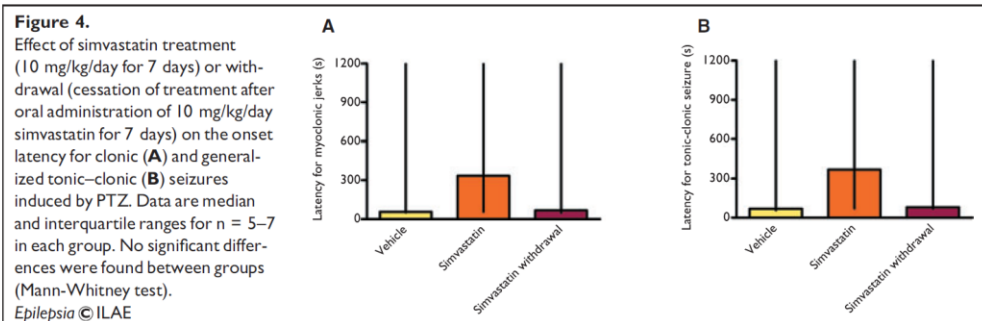
Epilepsia, **(*)1–11, 2011
doi: 10.1111/j.1528-1167.2011.03261.x

Figure 3. Effect of atorvastatin withdrawal (cessation of treatment after oral administration of 10 mg/kg/day atorvastatin for 7 days) on the onset latency for clonic (A) and generalized tonic-clonic (B) seizures induced by PTZ. * $p < 0.05$ compared with vehicle-PTZ group (Mann-Whitney test). Data are median and interquartile ranges for $n = 12$ in each group. Also shown are typical seizure sequences observed after administration of PTZ (60 mg/kg, i.p.) in an animal treated with vehicle (C, D) or atorvastatin (E, F) (10 mg/kg/day for 7 days, p.o.) and submitted to treatment withdrawal. In all traces the arrow indicates PTZ administration; the white arrowhead indicates the onset of EEG pattern associated with clonic seizures, whereas the black arrowhead indicates the onset of EEG pattern associated with generalized tonic-clonic seizures. The expanded waveforms from the EEG recording outlined by the boxes in C and E are shown in D and F, respectively. *Epilepsia* © ILAE



determine the reasons for such a discrepancy, there are methodologic differences that may account for it, including the statin used, the type and duration of treatment, the nature of the convulsant stimulus used, and the experimental design itself. For instance, a comparative study investigat-

ing the effects of most of commercially available statins (simvastatin, lovastatin, fluvastatin, pravastatin, and atorvastatin) on neuron damage and memory impairment induced by the systemic administration of kainate revealed that simvastatin was the most effective statin in reducing the



deleterious effects caused by kainate, including the severity of seizures, excitotoxicity, oxidative damage, neuritic dystrophy, and apoptosis in the hippocampus and other limbic structures of the brain cortex (Ramirez et al., 2011). In contrast, atorvastatin exacerbated seizures in 100% of the mice and also increased the percentage of those that developed status epilepticus after kainic acid administration, suggesting the existence of key differences between the mechanisms underlying simvastatin and atorvastatin effects.

In addition to the currently reported protective effect of atorvastatin treatment against PTZ-induced seizures, we found that atorvastatin withdrawal facilitated the occurrence of PTZ-induced seizures, as evidenced by a decrease in the latency to clonic and generalized seizures. Interestingly, clinical and experimental evidence suggests that statin therapy withdrawal may be associated with deleterious rebound phenomenon. For instance, one study in patients with stable coronary heart disease showed a threefold increase in thrombotic vascular events after simvastatin treatment was stopped and continued with relatively lower doses of fluvastatin (Thomas & Mann, 1998). Moreover, a subgroup analysis of the Platelet Receptor Inhibition in Ischemic Syndrome Management Study has demonstrated increased event rates in patients with acute coronary syndromes after withdrawal of statins (Heeschen et al., 2002). In addition, cerivastatin or atorvastatin withdrawal elicited oxidative stress and endothelial dysfunction (i.e., impaired endothe-

lium-dependent relaxation) in mice (Vecchione & Brandes, 2002) and rapid loss of statin-mediated protection in mouse models of cerebral ischemia and thrombus formation (Gertz et al., 2003). Altogether, these findings constitute strong evidence that statin withdrawal causes important deleterious rebound effects. At present it is not possible to point out the molecular mechanisms underlying the rebound effect elicited by atorvastatin withdrawal, but it is interesting to note that atorvastatin levels in the plasma and cerebral cortex were not detectable after stopping atorvastatin treatment for 1 day. Interestingly, this fact is in agreement with the study by Johnson-Anuna et al. (2005), who have reported that very low levels of lovastatin and simvastatin and no pravastatin were present in the cerebral cortex of chronically statin-treated mice 24 h after treatment cessation.

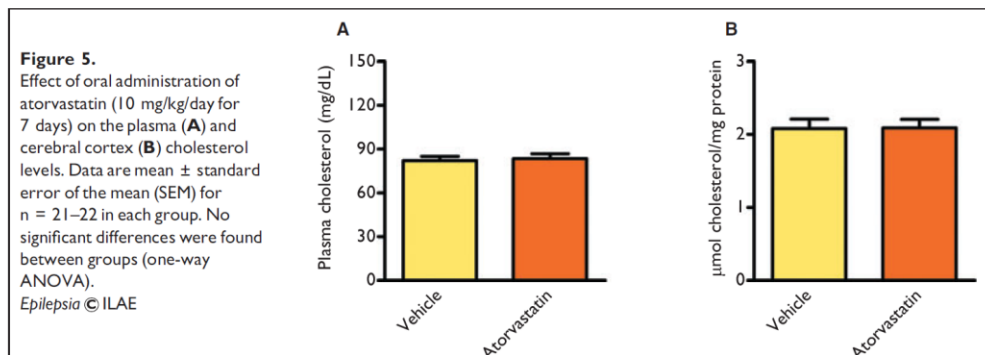
In light of the seizure-modulating effects of atorvastatin treatment and withdrawal, we asked whether these effects were dependent on cholesterol levels, since some studies have pointed out a link between cholesterol levels and seizures. For instance, a progressive disorder characterized by accumulation of free cholesterol in lysosomes, Niemann-Pick disease type C, includes seizures as a clinical sign (Turpin et al., 1991). Therefore, we determined the levels of cholesterol in the plasma and cerebral cortex of atorvastatin-treated rats. In our experimental conditions, no significant changes in plasma or brain cholesterol levels were detected after 7 days of atorvastatin treatment, which is to some extent intriguing, since we detected atorvastatin in the plasma and cerebral cortex at levels above the half maximal inhibitory concentration for inhibition of HMG-CoA reductase (Shitara & Sugiyama, 2006). Interestingly, these levels are very similar to those seen with other statins after a 21-day oral treatment in mice (Johnson-Anuna et al., 2005). In this context, it is tempting to propose that the presently reported differential effects of atorvastatin treatment and withdrawal on PTZ-induced seizures are not related to changes in plasma or cerebral cortex cholesterol levels. This is in agreement with several other studies that have not found changes in plasma or brain cholesterol levels after similar protocols of statin treatment (Laufs et al., 2000;

Table 1. Atorvastatin levels in the plasma or cerebral cortex of rats after oral atorvastatin treatment (10 mg/kg/day for 7 days) or withdrawal

Treatment	Plasma (pmol/ml)	Cerebral cortex (pmol/g wet tissue)
Vehicle	N.D.	N.D.
Atorvastatin	19.97 ± 6.33	179.92 ± 15.31
Atorvastatin withdrawal	N.D.	N.D.

N.D., not detectable.
Data are mean ± standard error of the mean for $n = 5$ in each group.

Atorvastatin and PTZ-Induced Seizures



Gertz et al., 2003; Lee et al., 2008). In addition, it has been demonstrated that atorvastatin modulates the activity of NMDA receptor and the dynamics of intracellular calcium in neuronal cultures exposed to glutamate regardless of changes in cholesterol levels and even in the presence of mevalonate (Bösel et al., 2005). Notwithstanding, it has been showed that lovastatin exacerbates atypical absence seizures with only minimal effects on brain sterols (Serbanescu et al., 2004), further suggesting that statins may modulate neuronal activity independently of changes in cholesterol levels. However, we cannot rule out that total cholesterol measurement in the plasma or cerebral cortex may not permit the detection of a rapid, transient, or highly localized reduction in cholesterol in a given area, which

might determine the seizure-modulating effects of atorvastatin treatment and withdrawal.

Increasing clinical and experimental evidence suggests that BBB dysfunction is an important etiologic factor in seizure disorders (Seiffert et al., 2004; Marchi et al., 2007a,b; Marchi et al., 2010; Friedman & Dingledine, 2011; Marchi et al., 2011). For instance, mannitol-induced BBB leakage causes focal motor seizures in patients undergoing intraarterial chemotherapy to treat primary brain lymphomas (Marchi et al., 2007a,b), and focal BBB disruption by direct application of bile salts in the rat somatosensory cortex causes the appearance of long-lasting epileptiform discharges (Seiffert et al., 2004). Moreover, either decreased or increased susceptibility to convulsant drugs might be attributable to changes in the access of these convulsants into the brain (Vezzani et al., 1989). In this context, we investigated whether atorvastatin treatment or withdrawal alters BBB permeability. Interestingly, it has been demonstrated that atorvastatin prevents BBB breakdown in several experimental paradigms (Kahles et al., 2007; Taoufiq et al., 2011). However, it may not be effective in preventing and/or restoring BBB damage in some conditions. In fact, van Vliet et al. (2011) have shown that atorvastatin treatment (10 mg/kg for 14 days) did not affect BBB leakage (measured by the fluorescein technique) during epileptogenesis triggered by an electrically induced episode of status epilepticus. Here, we did not detect changes in the brain levels of fluorescein after the different schedules of atorvastatin treatment, indicating that BBB permeability is not altered by atorvastatin treatment or withdrawal and that atorvastatin is not able to tighten up a healthy BBB in vivo, as it should be before PTZ administration. Therefore, we conclude that the currently reported effects of atorvastatin treatment and withdrawal on PTZ-induced seizures are not related to changes in BBB permeability to small compounds.

In addition, although it is worth mentioning that neuroprotective compounds may display anticonvulsant activity, and vice versa, it seems unlikely that the seizure-modulating properties of atorvastatin treatment and withdrawal are

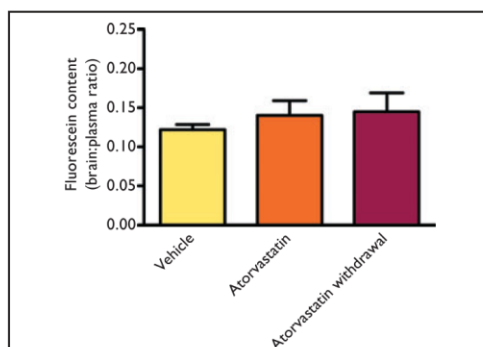


Figure 6. Fluorescein content in the cerebral cortex of rats submitted to oral atorvastatin treatment (10 mg/kg/day for 7 days) or withdrawal (cessation of treatment after oral administration of 10 mg/kg/day atorvastatin for 7 days). Data are mean \pm standard error of the mean (SEM) for $n = 4-5$ in each group. No significant differences were found between groups (one-way ANOVA).
Epilepsia © ILAE

related to its ability to protect neurons and other brain cells from death (i.e., neuroprotection). Because PTZ is used primarily to induce acute single seizures of short duration (typically <60 s) without long-term survival, there is a general consensus in the literature that neuropathology after PTZ-induced seizures is negligible (Velisek, 2006). In this context, it seems clear that the molecular mechanisms underlying the effects of atorvastatin are not necessarily the same as for its neuroprotective properties, and further studies are needed to determine the molecular mechanisms underlying the seizure-modulating properties of atorvastatin.

In summary, in the present study, we showed that atorvastatin treatment for 7 days increased the latency to PTZ-induced seizures, whereas abrupt cessation of the 7-day atorvastatin treatment (i.e., atorvastatin withdrawal) decreases the latency to the seizures induced by PTZ. To our knowledge, the currently reported facilitation of PTZ-induced seizures by statin withdrawal is the first study showing that cessation of statin treatment may predispose to the occurrence of seizures. Additional studies in human beings are necessary to evaluate the clinical implications of our findings. In this context, some studies have evaluated the impact of antiepileptic drugs on the cholesterol management during statin therapy (for a review please see Candrilli et al., 2010), but, to the best of our knowledge, no study has evaluated whether statins interfere with the efficacy of antiepileptic drugs in patients with epilepsy. Nevertheless, given the widespread use of atorvastatin and the high prevalence of epilepsy, the possibility that atorvastatin (and possibly other statins) could have multiple effects on the efficacy and safety of antiepileptic therapy emerges as an intriguing point.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by CNPq (grants #150905/2009-0, #306469/2009-0 and #301552/2007-0), Fapergs (grant #10/0685-8), PIBIC (grant #507049/2010-1), and Capes.

DISCLOSURE

None of the authors has any conflict of interest to disclose. We confirm that we have read the Journal's position on issues involved in ethical publication and affirm that this report is consistent with those guidelines.

REFERENCES

- Bazan NG, Tu B, Rodriguez de Turco EB. (2002) What synaptic lipid signaling tells us about seizure-induced damage and epileptogenesis. *Prog Brain Res* 135:175–185.
- Bösel J, Gandor F, Harms C, Synowitz M, Harms U, Djoufack PC, Megow D, Dirnagl U, Hörtnagl H, Fink KB, Endres M. (2005) Neuroprotective effects of atorvastatin against glutamate-induced excitotoxicity in primary cortical neurons. *J Neurochem* 92:1386–1398.
- Bradford M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248–254.
- Candrilli SD, Manjunath R, Davis KL, Gidal BE. (2010) The association between antiepileptic drug and HMG-CoA reductase inhibitor co-medication and cholesterol management in patients with epilepsy. *Epilepsy Res* 91:260–266.
- Endo A. (1992) The discovery and development of HMG-CoA reductase inhibitors. *J Lipid Res* 33:1569–1582.
- 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.
- Endres M. (2005) Statins and stroke. *J Cereb Blood Flow Metab* 25:1093–1110.
- Ferraro T, Golden G, Smith G, St Jean P, Schork N, Mulholland N, Ballas C, Schill J, Buono R, Berrettini W. (1999) Mapping loci for pentylene-tetrazol-induced seizure susceptibility in mice. *J Neurosci* 19:6733–6739.
- Friedman A, Dingledine R. (2011) Molecular cascades that mediate the influence of inflammation on epilepsy. *Epilepsia* 52(Suppl. 3):33–39.
- 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.
- Goldstein J, Brown M. (2009) The LDL receptor. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 29:431–438.
- Heeschen C, Hamm C, Laufs U, Snapinn S, Böhm M, White H; Investigators PRIMSMP. (2002) Withdrawal of statins increases event rates in patients with acute coronary syndromes. *Circulation* 105:1446–1452.
- Istvan E, Deisenhofer J. (2001) Structural mechanism for statin inhibition of HMG-CoA reductase. *Science* 292:1160–1164.
- Johnson-Anuna LN, Eckert GP, Keller JH, Igbavboa U, Franke C, Fechner T, Schubert-Zsilavecz M, Karas M, Müller WE, Wood WG. (2005) Chronic administration of statins alters multiple gene expression patterns in mouse cerebral cortex. *J Pharmacol Exp Ther* 312:786–793.
- Kahles T, Luedike P, Endres M, Galla HJ, Steinmetz H, Busse R, Neumann-Haefelin T, Brandes RP. (2007) NADPH oxidase plays a central role in blood-brain barrier damage in experimental stroke. *Stroke* 38:3000–3006.
- Lau Y, Okochi H, Huang Y, Benet L. (2006) Pharmacokinetics of atorvastatin and its hydroxy metabolites in rats and the effects of concomitant rifampicin single doses: relevance of first-pass effect from hepatic uptake transporters, and intestinal and hepatic metabolism. *Drug Metab Dispos* 34:1175–1181.
- Laufs U, Gertz K, Huang P, Nickenig G, Böhm M, Dirnagl U, Endres M. (2000) Atorvastatin upregulates type III nitric oxide synthase in thrombocytes, decreases platelet activation, and protects from cerebral ischemia in normocholesterolemic mice. *Stroke* 31:2442–2449.
- Lee J, Won J, Singh A, Singh I. (2008) Statin inhibits kainic acid-induced seizure and associated inflammation and hippocampal cell death. *Neurosci Lett* 440:260–264.
- Lu D, Goussev A, Chen J, Pannu P, Li Y, Mahmood A, Chopp M. (2004) Atorvastatin reduces neurological deficit and increases synaptogenesis, angiogenesis, and neuronal survival in rats subjected to traumatic brain injury. *J Neurotrauma* 21:21–32.
- Marchi N, Angelov L, Masaryk T, Fazio V, Granata T, Hernandez N, Hallene K, Diglaw T, Franic L, Najm I, Janigro D. (2007a) Seizure-promoting effect of blood-brain barrier disruption. *Epilepsia* 48:732–742.
- Marchi N, Tierney W, Alexopoulos AV, Puvenna V, Granata T, Janigro D. (2007b) The etiological role of blood-brain barrier dysfunction in seizure disorders. *Cardiovasc Psychiatry Neurol* 2011:482415.
- Marchi N, Teng Q, Ghosh C, Fan Q, Nguyen MT, Desai NK, Bawa H, Rasmussen P, Masaryk TK, Janigro D. (2010) Blood-brain barrier damage, but not parenchymal white blood cells, is a hallmark of seizure activity. *Brain Res* 1353:176–186.
- Marchi N, Tierney W, Alexopoulos AV, Puvenna V, Granata T, Janigro D. (2011) The etiological role of blood-brain barrier dysfunction in seizure disorders. *Cardiovasc Psychiatry Neurol* 2011 doi:10.1155/2011/482415.
- McColl C, Horne M, Finkelstein D, Wong J, Berkovic S, Drago J. (2003) Electroencephalographic characterisation of pentylene-tetrazole-induced seizures in mice lacking the alpha 4 subunit of the neuronal nicotinic receptor. *Neuropharmacology* 44:234–243.
- Nagotani S, Hayashi T, Sato K, Zhang W, Deguchi K, Nagano I, Shoji M, Abe K. (2005) Reduction of cerebral infarction in stroke-prone spontaneously hypertensive rats by statins associated with amelioration of oxidative stress. *Stroke* 36:670–672.

Epilepsia. **(*)1–11, 2011
doi: 10.1111/j.1528-1167.2011.03261.x

- Oliveira M, Furian A, Royes L, Figuera M, Fiorenza N, Castelli M, Machado P, Bohrer D, Veiga M, Ferreira J, Cavalheiro E, Mello C. (2008) Cyclooxygenase-2/PGE2 pathway facilitates pentylenetetrazol-induced seizures. *Epilepsy Res* 79:14–21.
- Olsen A, Morrey J, Smeed D, Sidwell R. (2007) Correlation between breakdown of the blood–brain barrier and disease outcome of viral encephalitis in mice. *Antiviral Res* 75:104–112.
- Piermartiri T, Vandresen-Filho S, de Araújo Herculano B, Martins W, Dal'agnolo D, Stroeh E, Carqueja C, Boeck C, Tasca C. (2009) Atorvastatin prevents hippocampal cell death due to quinolinic acid-induced seizures in mice by increasing Akt phosphorylation and glutamate uptake. *Neurotox Res* 16:106–115.
- Ramirez C, Tercero I, Pineda A, Burgos JS. (2011) Simvastatin is the statin that most efficiently protects against kainate-induced excitotoxicity and memory impairment. *J Alzheimers Dis* 24:161–174.
- Seiffert E, Dreier JP, Ivens S, Bechmann I, Tomkins O, Heinemann U, Friedman A. (2004) Lasting blood–brain barrier disruption induces epileptic focus in the rat somatosensory cortex. *J Neurosci* 24:7829–7836.
- Serbanescu I, Ryan M, Shukla R, Cortez M, Snead OC, Cunnane S. (2004) Lovastatin exacerbates atypical absence seizures with only minimal effects on brain sterols. *J Lipid Res* 45:2038–2043.
- Shitara Y, Sugiyama Y. (2006) Pharmacokinetic and pharmacodynamic alterations of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A (HMG-CoA) reductase inhibitors: drug–drug interactions and interindividual differences in transporter and metabolic enzyme functions. *Pharmacol Ther* 112:71–105.
- Taoufiq Z, Pino P, N'dilimabaka N, Arrouss I, Assi S, Soubrier F, Rebollo A, Mazier D. (2011) Atorvastatin prevents *Plasmodium falciparum* cytoadherence and endothelial damage. *Malar J* 10:52.
- Thomas M, Mann J. (1998) Increased thrombotic vascular events after change of statin. *Lancet* 352:1830–1831.
- Trinder P. (1969) Simple turbidimetric method for the determination of serum cholesterol. *Ann Clin Biochem* 6:165–166.
- Turpin JC, Masson M, Baumann N. (1991) Clinical aspects of Niemann-Pick type C disease in the adult. *Dev Neurosci* 13:304–306.
- van Vliet EA, Holtman L, Aronica E, Schmitz LJ, Wadman WJ, Gorter JA. (2011) Atorvastatin treatment during epileptogenesis in a rat model for temporal lobe epilepsy. *Epilepsia* 52:1319–1330.
- Vecchione C, Brandes R. (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.
- Velisek L. (2006) Models of chemically-induced acute seizures. In Pitkänen A, Schwartzkroin PA, Moshé S (Eds) *Models of seizures and epilepsy*. Elsevier, Burlington, MA, pp. 127–152.
- Vezzani A, Stasi M, Wu H, Castiglioni M, Weckermann B, Samanin R. (1989) Studies on the potential neurotoxic and convulsant effects of increased blood levels of quinolinic acid in rats with altered blood–brain barrier permeability. *Exp Neurol* 106:90–98.
- White HS, Smith-Yockman M, Srivastava A, Wilcox KS. (2006) Therapeutic assays for the identification and characterization of antiepileptic and antiepileptogenic drugs. In Pitkänen A, Schwartzkroin PA, Moshé S (Eds) *Models of seizures and epilepsy*. Elsevier, Burlington, MA, pp. 539–549.
- Zacco A, Togo J, Spence K, Ellis A, Lloyd D, Furlong S, Piser T. (2003) 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors protect cortical neurons from excitotoxicity. *J Neurosci* 23:11104–11111.

6. DISCUSSÃO

Vários estudos clínicos e experimentais têm mostrado que além de baixar o colesterol, as estatinas exercem efeitos pleiotrópicos e neuroprotetores. Evidências clínicas mostraram que a administração de estatinas a longo prazo não apenas reduz o risco de derrame, mas também aumenta a melhora dos pacientes que sofreram derrame (Endres, 2005). Além disso, as estatinas aumentam o fluxo sanguíneo cerebral conferindo uma significativa proteção em modelos animais como no AVC, isquemia cerebral, lesão cerebral, lesão cerebral traumática e excitotoxicidade (Laufs et al., 2000; Lu et al., 2004; Nagotani et al., 2005; Zacco et al., 2003). Considerando esse efeito neuroprotetor das estatinas pode-se dizer que a excitotoxicidade e a geração de convulsões podem compartilhar mecanismos comuns (Bazan et al., 2002), e, portanto, compostos neuroprotetores podem exibir atividade anticonvulsivante.

No entanto, poucos estudos têm abordado o assunto, os quais ainda divergem entre si mostrando resultados diferentes considerando o modelo usado. Como mostrado por Lee e colaboradores a atorvastatina diminuiu as convulsões induzidas pelo ácido caínico, associada à morte neuronal (Lee et al., 2008a). Por outro lado, Ramires e colegas mostraram que a atorvastatina exacerbou as convulsões induzidas por cáinato em camundongos e a sinvastatina diminuiu a gravidade das convulsões (Ramires et al., 2011).

Levando em consideração todos os trabalhos anteriormente descritos, o presente estudo mostrou que o tratamento com atorvastatina por via oral durante sete dias aumentou de forma significativa a latência para convulsão generalizada induzida por PTZ, do mesmo modo, o tratamento com sinvastatina não causou alteração nas latências para a convulsão induzida por PTZ. Porém, o tratamento com atorvastatina por sete dias com a retirada do tratamento 24 horas antes da injeção de PTZ, causou uma diminuição na latência para a convulsão clônica e generaliza. De modo interessante, esses efeitos do tratamento com atorvastatina e sua retirada por um dia não foram acompanhadas por alterações no colesterol plasmático ou do córtex cerebral, apesar da atorvastatina estar presente em concentrações relevantes tanto no córtex como no plasma. Sendo confirmado, por não haver efeito sobre a barreira hemato encefálica (BHE) no tratamento com atorvastatina ou na retirada.

Considerando que as mudanças no acesso dos agentes convulsivantes para cérebro pode aumentar ou diminuir a suscetibilidade para as convulsões (Vezzani et

al., 1989), investigou-se o tratamento com atorvastatina ou a retirada do tratamento altera a permeabilidade da BHE, onde não houve mudanças nos níveis de fluoresceína em ambos os tratamentos. Embora tenha sido demonstrado que a atorvastatina impede o rompimento da BHE em alguns modelos experimentais (Kahles et al., 2007; Taoufiq et al., 2011), foi visto que a atorvastatina não é capaz de alterar a BHE saudável *in vivo*. Conclui-se que as mudanças nas convulsões causadas pelos tratamentos com a atorvastatina não estão relacionados com mudanças na BHE.

Poucos estudos relacionam o uso das estatinas, com as crises convulsivas ou modelos animais de convulsão. Alguns trabalhos mostraram resultados semelhantes àqueles aqui mostrados, onde o tratamento com atorvastatina (10 mg/kg/sete dias) reduz significativamente a gravidade das convulsões induzidas por cainato e o número de movimentos de cachorro molhado característico das convulsões induzidas por cainato (Lee et al., 2008a). Outro trabalho com o mesmo tratamento, impede a ocorrência de convulsões clônicas e generalizadas induzida pela injeção intracerebroventricular de ácido quinolínico em um terço dos camundongos desafiados (Piermartiri et al., 2009), sugerindo propriedades anticonvulsivantes da atorvastatina. No entanto, também tem sido relatado que o tratamento com atorvastatina (10 mg/kg, 30 min após a administração de cainato) não altera as latências e os movimentos de cachorro molhado, o que sugere que o tratamento agudo com atorvastatina não altera as convulsões induzidas por cainato. Esses resultados em até certo ponto estão de acordo com o que foi mostrado aqui neste trabalho, uma vez que não foi encontrado qualquer efeito em uma única injeção de atorvastatina em convulsões induzidas por PTZ. Por outro lado, a lovastatina (100 mg/kg) administrada nos dias 2, 8, 14 e 20 pós-parto aumentam a duração das descargas ponta-onda no córtex de ratos Long-Evans que tem tendência a ter descargas ponta-onda de forma espontânea, semelhantes as observadas em crises de ausência atípicas (Serbanescu et al., 2004). Embora seja difícil determinar as razões para tal discrepância, existem diferenças metodológicas que podem ser responsáveis por isto, como o tipo e a duração do tratamento, a natureza do agente convulsivante utilizado e o desenho experimental utilizado. Um trabalho que exemplifica essas diferenças é um estudo comparativo elaborado por Ramirez e colegas investigaram os danos neuronais a e perda de memória induzida pela administração sistêmica de cainato comparado com a maioria das estatinas

disponíveis no mercado (sinvastatina, lovastatina, fluvastatina, pravastatina, atorvastatina), onde foi visto que a sinvastatina foi mais eficaz na redução dos efeitos deletérios causados pelo cainato, incluindo a gravidade das crises, excitotoxicidade, dano oxidativo, distrofias neuríticas e apoptose no hipocampo e outras estruturas límbicas do córtex (Ramirez et al., 2011). Mas, ao contrario disso, a atorvastatina exacerbou as convulsões em todos os animais e aumentou a porcentagem daqueles que desenvolveram *status epilepticus* após a administração de ácido caínico. Sugerindo então, a existência de diferenças fundamentais entre os mecanismos subjacentes da sinvastatina e os efeitos causados pela atorvastatina, assim como é descrito nos resultados apresentados nessa dissertação.

Sendo de grande importância o agente convulsivante utilizado nesse modelo, é necessário saber que o PTZ é comumente utilizado de forma aguda, para induzir uma única convulsão generalizada, com duração menor que um minuto, sem sobrevivência a longo prazo, quanto a isso, há um consenso geral na literatura que a neuropatologia após as convulsões induzidas pelo PTZ é insignificante (Velisek, 2006). Neste contexto, parece claro que os mecanismos moleculares subjacentes aos efeitos da atorvastatina não são necessariamente os mesmos de suas propriedades neuroprotetoras. Embora possa se mencionar que compostos neuroprotetores podem exibir atividade anticonvulsivante e vice-versa, parece improvável que a modulação das convulsões causadas pelo tratamento com atorvastatina e a sua retirada estar relacionado com a sua capacidade de proteger ou não os neurônios e outras células cerebrais da apoptose.

Atualmente as estatinas são utilizadas amplamente pela população mundial, por ter como principal efeito a diminuição nos níveis de colesterol, através da inibição da sua síntese endógena. Além de que, alguns estudos tem apontado uma relação entre os níveis de colesterol e convulsões, como por exemplo, uma desordem progressiva caracterizada pelo acúmulo de colesterol livre nos lisossomos, conhecido como Doença de Niemann-Pick do tipo C, sendo as convulsões um sinal clínico da doença (Turpin et al., 1991). Isso chamou a atenção para relação entre os níveis de colesterol e o efeito do tratamento com atorvastatina e retirada modulando as convulsões induzidas por PTZ, motivando a determinação dos níveis de colesterol no córtex e soro dos ratos tratados com atorvastatina. Considerando as condições experimentais utilizadas, não foram detectadas diferenças significativas nos animais tratados com atorvastatina por sete dias em

relação ao grupo controle, o que é de certa forma intrigante, uma vez que foi detectada atorvastatina no plasma e no córtex cerebral em níveis acima da IC50 para a inibição da HMG-CoA redutase (Shitara and Sugiyama, 2006). Curiosamente, estes níveis são muito semelhantes aos encontrados com outras estatinas depois de um tratamento de 21 dias por via oral em camundongos (Johnson-Anuna et al., 2005). Embora não se descarta que a medição do colesterol total no plasma ou no córtex cerebral, pode não ser capaz de detectar uma redução rápida, transitório ou localizado em altas concentrações em algumas áreas que podem determinar o efeito da modulação das convulsões pelo tratamento com atorvastatina e sua retirada. No entanto, é tentador dizer que os efeitos diferenciais da atorvastatina aqui relatados, são independentes dos níveis de colesterol no córtex e no soro, pois isso já foi relatado em outros estudos, onde não foi encontradas alterações do colesterol plasmático ou do córtex, utilizando o tratamento com estatinas (Gertz et al., 2003; Laufs et al., 2000; Lee et al., 2008a). Bem como, foi mostrado que a atorvastatina modula a atividade do receptor NMDA e da dinâmica do cálcio intracelular em culturas de neurônios expostos ao glutamato, independentemente de mudanças nos níveis de colesterol, mesmo na presença de mevalonato (Bosel et al., 2005).

Muitas evidências clínicas e experimentais sugerem que a retirada abrupta do tratamento com as estatinas pode estar associada a efeitos de rebote deletérios. Por exemplo, um estudo em pacientes com doença coronariana estável, mostrou um aumento de três vezes nos eventos vasculares trombolíticos após a interrupção do tratamento com sinvastatina seguida de tratamento com doses baixas de fluvastatina (Thomas and Mann, 1998). Em uma análise de um subgrupo na inibição dos receptores plaquetários no Estudo de Gestão da Síndrome Isquêmica demonstrou que aumentou a taxa de eventos em pacientes com síndrome coronariana aguda após a retirada do tratamento com estatinas (Heeschen et al., 2002). Além disso, a retirada da cerivastatina ou atorvastatina causou estresse oxidativo e disfunção endotelial (prejudicando o fator relaxante do endotélio) em camundongos (Vecchione and Brandes, 2002). Nos resultados aqui apresentados, foi mostrado o efeito protetor do tratamento com atorvastatina contra convulsões induzidas por PTZ, mas também foi constatado que a retirada do tratamento facilitou a ocorrência de convulsões induzidas por PTZ, evidenciada pela diminuição da latência para convulsão clônica e generalizada. Isso exalta que os resultados constituem uma forte evidência de que a retirada do tratamento com estatinas causa efeito de rebote

ou piora em relação ao estado clínico durante o tratamento. Sendo interessante destacar que os níveis de atorvastatina no plasma e no córtex não foram detectáveis após a interrupção do tratamento por um dia. Resultados semelhantes foram apresentados por (Johnson-Anuna et al., 2005) e colaboradores, onde os níveis de lovastatina e sinvastatina estavam em níveis muito baixos e a pravastatina não foi detectada após 24 horas da interrupção do tratamento em camundongos (Johnson-Anuna et al., 2005).

Pelo fato de ainda não se saber os exatos mecanismos moleculares pelos quais ocorrem os efeitos pleiotrópicos das estatinas bem como os seus efeitos deletérios de retirada, podemos especular alguns pontos na rota de formação do colesterol que ainda podem ser investigados. Supondo que a inibição da HMG-CoA redutase cause um acúmulo de HMG-CoA, é interessante a possibilidade de que este possa de alguma forma ser transportado até a mitocôndria e servir para a formação de corpos cetônicos, visto que dietas cetogênicas são comumente utilizadas como um adjuvante da terapia medicamentosa anticonvulsivante em indivíduos com epilepsia (Caraballo, 2011; Noh et al., 2008). Contudo, essa discussão é especulativa por natureza, pois para que ocorra a formação de corpos cetônicos é necessário que algumas enzimas da β -oxidação dos ácidos graxos estejam ativas, bem como as enzimas HMG-CoA sintase e liase devem catalisar a formação de corpos cetônicos a partir da HMG-CoA, no interior da mitocôndria.

Atualmente não é possível apontar os mecanismos moleculares subjacentes aos efeitos do tratamento e da retirada do tratamento com atorvastatina, e mais estudos são necessários para determinar os mecanismos moleculares relacionadas à modulação das convulsões pelo tratamento com atorvastatina e o efeito causado pela retirada do tratamento, bem como as implicações clínicas desses resultados.

7. CONCLUSÃO

Conclusões Parciais

1. Apenas uma dose das estatinas atorvastatina ou sinvastatina não é capaz de exercer efeitos sobre as convulsões induzidas por PTZ.
2. O tratamento por 7 dias com atorvastatina protegeu contra as convulsões induzidas por PTZ.
3. A indução das convulsões por PTZ 24h após o término do tratamento crônico com atorvastatina facilitou as convulsões induzidas por PTZ.
4. O tratamento ou retirada do tratamento com sinvastatina não alterou convulsões induzidas por PTZ.
5. A modulação das convulsões pelo tratamento e retirada da atorvastatina, não está relacionado a mudanças no colesterol plasmático e no córtex.
6. A modulação das convulsões pelo tratamento e retirada da atorvastatina, não está relacionado a alterações na permeabilidade da barreira hematoencefálica.
7. Os níveis de atorvastatina no plasma e no córtex após sete dias de tratamento estavam acima do IC50 para a inibição da HMG-CoA redutase, enquanto que a atorvastatina não foi detectada tanto no plasma quanto no córtex após 24 horas do término do tratamento.

Conclusão Geral

Tendo em vista os resultados obtidos neste trabalho, conclui-se que o tratamento com atorvastatina por 7 dias protege contra as convulsões induzidas por PTZ, visto que tal tratamento aumentou a latência para convulsão generalizada induzida por este agente convulsivante. Por outro lado, a interrupção abrupta do tratamento de sete dias com atorvastatina diminuiu a latência para convulsões mioclônicas e generalizadas induzidas por PTZ. O mesmo efeito não foi visto com o tratamento e retirada da sinvastatina o que demonstra que esse efeito depende do tipo de estatina utilizada. Por fim, conclui-se que os efeitos da atorvastatina não ocorrem por mudanças na permeabilidade da BHE ou nos níveis de colesterol sérico ou do córtex cerebral.

8. REFERÊNCIAS

- Amarenco, P., Goldstein, L.B., Messig, M., O'Neill, B.J., Callahan, A., 3rd, Sillesen, H., Hennerici, M.G., Zivin, J.A., Welch, K.M., 2009. Relative and cumulative effects of lipid and blood pressure control in the Stroke Prevention by Aggressive Reduction in Cholesterol Levels trial. *Stroke*. 40, 2486-92.
- Banerjee, P.N., Filippi, D., Allen Hauser, W., 2009. The descriptive epidemiology of epilepsy-a review. *Epilepsy Res*. 85, 31-45.
- Bazan, N.G., Tu, B., Rodriguez de Turco, E.B., 2002. What synaptic lipid signaling tells us about seizure-induced damage and epileptogenesis. *Prog Brain Res*. 135, 175-85.
- Berger, C., Xia, F., Maurer, M.H., Schwab, S., 2008. Neuroprotection by pravastatin in acute ischemic stroke in rats. *Brain Res Rev*. 58, 48-56.
- Bertolini, S., Bon, G.B., Campbell, L.M., Farnier, M., Langan, J., Mahla, G., Pauciullo, P., Sirtori, C., Egros, F., Fayyad, R., Nawrocki, J.W., 1997. Efficacy and safety of atorvastatin compared to pravastatin in patients with hypercholesterolemia. *Atherosclerosis*. 130, 191-7.
- Bialer, M., White, H.S., 2010. Key factors in the discovery and development of new antiepileptic drugs. *Nat Rev Drug Discov*. 9, 68-82.
- Bosel, J., Gandor, F., Harms, C., Synowitz, M., Harms, U., Djoufack, P.C., Megow, D., Dirnagl, U., Hortnagl, H., Fink, K.B., Endres, M., 2005. Neuroprotective effects of atorvastatin against glutamate-induced excitotoxicity in primary cortical neurones. *J Neurochem*. 92, 1386-98.
- Buxbaum, J.D., Cullen, E.I., Friedhoff, L.T., 2002. Pharmacological concentrations of the HMG-CoA reductase inhibitor lovastatin decrease the formation of the Alzheimer beta-amyloid peptide in vitro and in patients. *Front Biosci*. 7, a50-9.
- Caraballo, R.H., 2011. Nonpharmacologic treatments of Dravet syndrome: focus on the ketogenic diet. *Epilepsia*. 52 Suppl 2, 79-82.
- Carpio, A., Hauser, W.A., 2009. Epilepsy in the developing world. *Curr Neurol Neurosci Rep*. 9, 319-26.
- Cui, X., Chopp, M., Zacharek, A., Roberts, C., Lu, M., Savant-Bhonsale, S., Chen, J., 2009. Chemokine, vascular and therapeutic effects of combination Simvastatin and BMSC treatment of stroke. *Neurobiol Dis*. 36, 35-41.
- Daimon, M., Aomi, S., Kawamata, T., Kurosawa, H., 2004. Pravastatin, a 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitor, reduces delayed neuronal

- death following transient forebrain ischemia in the adult rat hippocampus. *Neurosci Lett.* 362, 122-6.
- Dichter, M.A., 2007. Innovative clinical trial designs for future antiepileptic drugs. *Epilepsia.* 48 Suppl 1, 26-30.
- Endo, A., Kuroda, M., Tsujita, Y., 1976. ML-236A, ML-236B, and ML-236C, new inhibitors of cholesterologenesis produced by *Penicillium citrinum*. *J Antibiot (Tokyo).* 29, 1346-8.
- Endres, M., Laufs, U., Liao, J.K., Moskowitz, M.A., 2004. Targeting eNOS for stroke protection. *Trends Neurosci.* 27, 283-9.
- Endres, M., 2005. Statins and stroke. *J Cereb Blood Flow Metab.* 25, 1093-110.
- Erturk, S., Onal, A., Muge Cetin, S., 2003. Analytical methods for the quantitative determination of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors in biological samples. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 793, 193-205.
- Fisher, R.S., van Emde Boas, W., Blume, W., Elger, C., Genton, P., Lee, P., Engel, J., Jr., 2005. Epileptic seizures and epilepsy: definitions proposed by the International League Against Epilepsy (ILAE) and the International Bureau for Epilepsy (IBE). *Epilepsia.* 46, 470-2.
- Gertz, K., Laufs, U., Lindauer, U., Nickenig, G., Bohm, M., Dirnagl, U., Endres, M., 2003. Withdrawal of statin treatment abrogates stroke protection in mice. *Stroke.* 34, 551-7.
- Ghosh, A., Roy, A., Matras, J., Brahmachari, S., Gendelman, H.E., Pahan, K., 2009. Simvastatin inhibits the activation of p21ras and prevents the loss of dopaminergic neurons in a mouse model of Parkinson's disease. *J Neurosci.* 29, 13543-56.
- Groemping, Y., Rittinger, K., 2005. Activation and assembly of the NADPH oxidase: a structural perspective. *Biochem J.* 386, 401-16.
- Handattu, S.P., Garber, D.W., Monroe, C.E., van Groen, T., Kadish, I., Nayyar, G., Cao, D., Palgunachari, M.N., Li, L., Anantharamaiah, G.M., 2009. Oral apolipoprotein A-I mimetic peptide improves cognitive function and reduces amyloid burden in a mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiol Dis.* 34, 525-34.

- Heeschen, C., Hamm, C.W., Laufs, U., Snapinn, S., Bohm, M., White, H.D., 2002. Withdrawal of statins increases event rates in patients with acute coronary syndromes. *Circulation*. 105, 1446-52.
- 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, H2210-5.
- Huang, R.Q., Bell-Horner, C.L., Dibas, M.I., Covey, D.F., Drewe, J.A., Dillon, G.H., 2001. Pentylentetrazole-induced inhibition of recombinant gamma-aminobutyric acid type A (GABA(A)) receptors: mechanism and site of action. *J Pharmacol Exp Ther*. 298, 986-95.
- Huang, X., Chen, H., Miller, W.C., Mailman, R.B., Woodard, J.L., Chen, P.C., Xiang, D., Murrow, R.W., Wang, Y.Z., Poole, C., 2007. Lower low-density lipoprotein cholesterol levels are associated with Parkinson's disease. *Mov Disord*. 22, 377-81.
- Jick, H., Zornberg, G.L., Jick, S.S., Seshadri, S., Drachman, D.A., 2000. Statins and the risk of dementia. *Lancet*. 356, 1627-31.
- Johnson-Anuna, L.N., Eckert, G.P., Keller, J.H., Igbavboa, U., Franke, C., Fechner, T., Schubert-Zsilavec, M., Karas, M., Muller, W.E., Wood, W.G., 2005. Chronic administration of statins alters multiple gene expression patterns in mouse cerebral cortex. *J Pharmacol Exp Ther*. 312, 786-93.
- Kahles, T., Luedike, P., Endres, M., Galla, H.J., Steinmetz, H., Busse, R., Neumann-Haefelin, T., Brandes, R.P., 2007. NADPH oxidase plays a central role in blood-brain barrier damage in experimental stroke. *Stroke*. 38, 3000-6.
- Kajinami, K., Brousseau, M.E., Ordovas, J.M., Schaefer, E.J., 2004. CYP3A4 genotypes and plasma lipoprotein levels before and after treatment with atorvastatin in primary hypercholesterolemia. *Am J Cardiol*. 93, 104-7.
- Kummer, A., Nunes, G.C., Campos, N.M., Lauer, H., Teixeira Junior, A.L., 2005. [Frequency of epilepsy in psychiatric inpatients]. *Rev Bras Psiquiatr*. 27, 165-6.
- Kupferberg, H., 2001. Animal models used in the screening of antiepileptic drugs. *Epilepsia*. 42 Suppl 4, 7-12.
- Kureishi, Y., Luo, Z., Shiojima, I., Bialik, A., Fulton, D., Lefer, D.J., Sessa, W.C., Walsh, K., 2000. The HMG-CoA reductase inhibitor simvastatin activates the

- protein kinase Akt and promotes angiogenesis in normocholesterolemic animals. *Nat Med.* 6, 1004-10.
- Laufs, U., Liao, J.K., 1998. Post-transcriptional regulation of endothelial nitric oxide synthase mRNA stability by Rho GTPase. *J Biol Chem.* 273, 24266-71.
- Laufs, U., Endres, M., Custodis, F., Gertz, K., Nickenig, G., Liao, J.K., Bohm, M., 2000. Suppression of endothelial nitric oxide production after withdrawal of statin treatment is mediated by negative feedback regulation of rho GTPase gene transcription. *Circulation.* 102, 3104-10.
- Lee, J.K., Won, J.S., Singh, A.K., Singh, I., 2008a. Statin inhibits kainic acid-induced seizure and associated inflammation and hippocampal cell death. *Neurosci Lett.* 440, 260-4.
- Lee, S.T., Chu, K., Park, J.E., Hong, N.H., Im, W.S., Kang, L., Han, Z., Jung, K.H., Kim, M.W., Kim, M., 2008b. Atorvastatin attenuates mitochondrial toxin-induced striatal degeneration, with decreasing iNOS/c-Jun levels and activating ERK/Akt pathways. *J Neurochem.* 104, 1190-200.
- Loscher, W., 2011. Critical review of current animal models of seizures and epilepsy used in the discovery and development of new antiepileptic drugs. *Seizure.* 20, 359-68.
- Lu, D., Goussev, A., Chen, J., Pannu, P., Li, Y., Mahmood, A., Chopp, M., 2004. Atorvastatin reduces neurological deficit and increases synaptogenesis, angiogenesis, and neuronal survival in rats subjected to traumatic brain injury. *J Neurotrauma.* 21, 21-32.
- 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, 475-83.
- Marchetti, R.L., 2004. [Epilepsy in the shadow of Brazilian psychiatry]. *Rev Bras Psiquiatr.* 26, 67-8.
- Mayanagi, K., Katakam, P.V., Gaspar, T., Domoki, F., Busija, D.W., 2008. Acute treatment with rosuvastatin protects insulin resistant (C57BL/6J ob/ob) mice against transient cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab.* 28, 1927-35.
- Morena, M., Cristol, J.P., Senecal, L., Leray-Moragues, H., Krieter, D., Canaud, B., 2002. Oxidative stress in hemodialysis patients: is NADPH oxidase complex the culprit? *Kidney Int Suppl.* 109-14.

- Mutez, E., Duhamel, A., Defebvre, L., Bordet, R., Destee, A., Kreisler, A., 2009. Lipid-lowering drugs are associated with delayed onset and slower course of Parkinson's disease. *Pharmacol Res.* 60, 41-5.
- Nagotani, S., Hayashi, T., Sato, K., Zhang, W., Deguchi, K., Nagano, I., Shoji, M., Abe, K., 2005. Reduction of cerebral infarction in stroke-prone spontaneously hypertensive rats by statins associated with amelioration of oxidative stress. *Stroke.* 36, 670-2.
- Niemi, M., Schaeffeler, E., Lang, T., Fromm, M.F., Neuvonen, M., Kyrklund, C., Backman, J.T., Kerb, R., Schwab, M., Neuvonen, P.J., Eichelbaum, M., Kivistö, K.T., 2004. High plasma pravastatin concentrations are associated with single nucleotide polymorphisms and haplotypes of organic anion transporting polypeptide-C (OATP-C, SLCO1B1). *Pharmacogenetics.* 14, 429-40.
- Noh, H.S., Kim, Y.S., Choi, W.S., 2008. Neuroprotective effects of the ketogenic diet. *Epilepsia.* 49 Suppl 8, 120-3.
- Ostrowski, S.M., Wilkinson, B.L., Golde, T.E., Landreth, G., 2007. Statins reduce amyloid-beta production through inhibition of protein isoprenylation. *J Biol Chem.* 282, 26832-44.
- Piermartiri, T.C., Vandresen-Filho, S., de Araujo Herculano, B., Martins, W.C., Dal'agnolo, D., Stroeh, E., Carqueja, C.L., Boeck, C.R., Tasca, C.I., 2009. Atorvastatin prevents hippocampal cell death due to quinolinic acid-induced seizures in mice by increasing Akt phosphorylation and glutamate uptake. *Neurotox Res.* 16, 106-15.
- Pugh, M.J., Knoefel, J.E., Mortensen, E.M., Amuan, M.E., Berlowitz, D.R., Van Cott, A.C., 2009. New-onset epilepsy risk factors in older veterans. *J Am Geriatr Soc.* 57, 237-42.
- Ramirez, C., Tercero, I., Pineda, A., Burgos, J.S., 2011. Simvastatin is the statin that most efficiently protects against kainate-induced excitotoxicity and memory impairment. *J Alzheimers Dis.* 24, 161-74.
- Sacks, F.M., Pfeffer, M.A., Moye, L.A., Rouleau, J.L., Rutherford, J.D., Cole, T.G., Brown, L., Warnica, J.W., Arnold, J.M., Wun, C.C., Davis, B.R., Braunwald, E., 1996. The effect of pravastatin on coronary events after myocardial infarction in patients with average cholesterol levels. Cholesterol and Recurrent Events Trial investigators. *N Engl J Med.* 335, 1001-9.

- Sander, J.W., 1993. Some aspects of prognosis in the epilepsies: a review. *Epilepsia*. 34, 1007-16.
- Selley, M.L., 2005. Simvastatin prevents 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced striatal dopamine depletion and protein tyrosine nitration in mice. *Brain Res*. 1037, 1-6.
- Serbanescu, I., Ryan, M.A., Shukla, R., Cortez, M.A., Snead, O.C., 3rd, Cunnane, S.C., 2004. Lovastatin exacerbates atypical absence seizures with only minimal effects on brain sterols. *J Lipid Res*. 45, 2038-43.
- Shitara, Y., Sugiyama, Y., 2006. Pharmacokinetic and pharmacodynamic alterations of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A (HMG-CoA) reductase inhibitors: drug-drug interactions and interindividual differences in transporter and metabolic enzyme functions. *Pharmacol Ther*. 112, 71-105.
- Sillanpaa, M., Schmidt, D., 2006. Natural history of treated childhood-onset epilepsy: prospective, long-term population-based study. *Brain*. 129, 617-24.
- Stuve, O., Youssef, S., Steinman, L., Zamvil, S.S., 2003. Statins as potential therapeutic agents in neuroinflammatory disorders. *Curr Opin Neurol*. 16, 393-401.
- Taoufiq, Z., Pino, P., N'Dilimabaka, N., Arrouss, I., Assi, S., Soubrier, F., Rebollo, A., Mazier, D., 2011. Atorvastatin prevents *Plasmodium falciparum* cytoadherence and endothelial damage. *Malar J*. 10, 52.
- Thomas, M., Mann, J., 1998. Increased thrombotic vascular events after change of statin. *Lancet*. 352, 1830-1.
- Transon, C., Leemann, T., Dayer, P., 1996. In vitro comparative inhibition profiles of major human drug metabolising cytochrome P450 isozymes (CYP2C9, CYP2D6 and CYP3A4) by HMG-CoA reductase inhibitors. *Eur J Clin Pharmacol*. 50, 209-15.
- Turpin, J.C., Masson, M., Baumann, N., 1991. Clinical aspects of Niemann-Pick type C disease in the adult. *Dev Neurosci*. 13, 304-6.
- van Vliet, E.A., Holtman, L., Aronica, E., Schmitz, L.J., Wadman, W.J., Gorter, J.A., 2011. Atorvastatin treatment during epileptogenesis in a rat model for temporal lobe epilepsy. *Epilepsia*. 52, 1319-30.

- 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, 173-9.
- Velasco, A.L., Boleaga, B., Brito, F., Jimenez, F., Gordillo, J.L., Velasco, F., Velasco, M., 2000. Absolute and relative predictor values of some non-invasive and invasive studies for the outcome of anterior temporal lobectomy. *Arch Med Res.* 31, 62-74.
- Vezzani, A., Stasi, M.A., Wu, H.Q., Castiglioni, M., Weckermann, B., Samanin, R., 1989. Studies on the potential neurotoxic and convulsant effects of increased blood levels of quinolinic acid in rats with altered blood-brain barrier permeability. *Exp Neurol.* 106, 90-8.
- Wahner, A.D., Bronstein, J.M., Bordelon, Y.M., Ritz, B., 2008. Statin use and the risk of Parkinson disease. *Neurology.* 70, 1418-22.
- Wang, A., Yu, B.N., Luo, C.H., Tan, Z.R., Zhou, G., Wang, L.S., Zhang, W., Li, Z., Liu, J., Zhou, H.H., 2005. Ile118Val genetic polymorphism of CYP3A4 and its effects on lipid-lowering efficacy of simvastatin in Chinese hyperlipidemic patients. *Eur J Clin Pharmacol.* 60, 843-8.
- Wang, Q., Tang, X.N., Yenari, M.A., 2007. The inflammatory response in stroke. *J Neuroimmunol.* 184, 53-68.
- Wang, Q., Zengin, A., Deng, C., Li, Y., Newell, K.A., Yang, G.Y., Lu, Y., Wilder-Smith, E.P., Zhao, H., Huang, X.F., 2009. High dose of simvastatin induces hyperlocomotive and anxiolytic-like activities: The association with the up-regulation of NMDA receptor binding in the rat brain. *Exp Neurol.* 216, 132-8.
- Wolozin, B., Kellman, W., Russeau, 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, 1439-43.
- Zacco, A., Togo, J., Spence, K., Ellis, A., Lloyd, D., Furlong, S., Piser, T., 2003. 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors protect cortical neurons from excitotoxicity. *J Neurosci.* 23, 11104-11.