

CLAUDIA RITA CORSO

EFEITO DO TRATAMENTO COM SINVASTATINA NOS PARÂMETROS
SENSORIAIS, MOTOR E MORFOLÓGICO EM MODELO DE NEUROPATIA
PERIFÉRICA

CURITIBA

Fevereiro/2015

CLAUDIA RITA CORSO

EFEITO DO TRATAMENTO COM SINVASTATINA NOS PARÂMETROS
SENSORIAIS, MOTOR E MORFOLÓGICO EM MODELO DE NEUROPATIA
PERIFÉRICA

Dissertação apresentada ao programa de Pós Graduação
em Farmacologia do Setor de Ciências Biológicas da
Universidade Federal do Paraná como requisito parcial
para obtenção do título de Mestre em Farmacologia.

Orientadora: Prof^a Dr^a Maria Fernanda de Paula Werner

CURITIBA

Fevereiro/2015

"Sucesso é você fazer o melhor que pode, nas diversas maneiras que puder. É somente ser honesto e autêntico, sempre olhar para frente, nunca olhar para trás. Acreditar no melhor que você pode ser e ter fé nas coisas que você faz. Esquecer os erros e torna-los lições valiosas... Nunca se dê por vencido naquilo que você faz... Para tudo existe um amanhã e uma chance para brilhar!"

Larry S. Chengges

AGRADECIMENTOS

A minha orientadora Prof^a Dr^a Maria Fernanda de Paula Werner, por me abrir as portas do mundo da ciência e me proporcionar grandes aprendizados profissionais e pessoais. Agradeço imensamente a amizade, a paciência e a dedicação.

Ao Prof^o Dr^o Daniel Fernandes Martins, docente da UNISUL (SC) por ensinar toda a técnica referente ao modelo experimental de esmagamento do nervo ciático, bem como por direcionar nas análises da função motora e análises histológicas.

Ao Prof^o José Ederaldo Queiroz Telles do Hospital de Clínicas, pela co-orientação e pelos conhecimentos patológicos passados acerca da morfologia do nervo ciático.

Ao técnico de laboratório do departamento de Biologia Celular da UFPR, Seu Nino, por toda a paciência e dedicação em me ensinar as técnicas histológicas.

A Stephanie Carvalho Borges do laboratório de histotécnica animal da Universidade Estadual de Maringá, pela colaboração e realização das histologias.

As minhas amigas e colegas de laboratório Luisa, Dani, Débora, Evana, Mari, Cris e Lari pela amizade, apoio e discussões científicas que também contribuíram para o meu crescimento.

A todos os funcionários e professores do departamento de Farmacologia da UFPR que de alguma forma contribuíram para a minha formação.

Aos meus pais, Irma e Moacir, por sempre estarem ao meu lado, pelo incentivo e por acreditarem no meu potencial.

Ao meu namorado, Felipe, pelo incansável apoio, compreensão, ajuda e companhia aos domingos e feriados quando precisava tratar meus animais.

A CAPES pelo auxílio financeiro.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	iii
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	v
RESUMO	viii
ABSTRACT	ix
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 DOR E TRANSMISSÃO DA INFORMAÇÃO NOCICEPTIVA.....	1
1.2 DOR NEUROPÁTICA E ALTERAÇÕES FISIOPATOLÓGICAS.....	6
1.2.1 Tratamento farmacológico da dor neuropática.....	12
1.3 ESTATINAS.....	13
2. OBJETIVOS	19
2.1 OBJETIVO GERAL.....	19
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	19
3. MATERIAIS E MÉTODOS	20
3.1 DROGAS E REAGENTES.....	20
3.2 ANIMAIS.....	20
3.3 NOCICEPÇÃO INDUZIDA PELA FORMALINA E AVALIAÇÃO DE EDEMA DE PATA.....	21
3.4 NEUROPATIA PERIFÉRICA INDUZIDA PELO ESMAGAMENTO DE NERVO CIÁTICO.....	21
3.4.1 Avaliação da alodinia mecânica.....	22
3.4.2 Avaliação da alodinia ao frio.....	23
3.4.3 Avaliação do Índice Funcional do Ciático (IFC) e Índice Estático do Ciático (IEC).....	24
3.4.4 Análise histológica.....	27

3.4.5 Determinação de proteína no nervo ciático.....	28
3.4.6 Determinação da atividade da enzima Mieloperoxidase (MPO).....	29
3.5.7 Determinação da atividade da enzima N-acetilglucosaminidase (NAG)....	29
3.5.8 Nocicepção induzida pelo mevalonato.....	30
3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	31
4. RESULTADOS.....	32
4.1 EFEITO DO TRATAMENTO COM SINVASTATINA NA NOCICEPÇÃO E EDEMA DE PATA INDUZIDO PELA FORMALINA.....	32
4.2 EFEITO DO TRATAMENTO COM SINVASTATINA NA NEUROPATIA PERIFÉRICA INDUZIDA PELO ESMAGAMENTO DE NERVO CIÁTICO.....	33
4.2.1 Efeito do tratamento com sinvastatina na alodinia mecânica.....	33
4.2.2 Efeito do tratamento com sinvastatina na alodinia ao frio.....	36
4.2.3 Efeito do tratamento com sinvastatina no Índice Funcional do Ciático (IFC) e Índice Estático do Ciático (IEC).....	37
4.2.4 Efeito do tratamento com sinvastatina na morfologia do nervo ciático.....	37
4.2.5 Efeito do tratamento com sinvastatina na atividade das enzimas Mieloperoxidase (MPO) e N-acetilglucosaminidase (NAG).....	40
4.2.6 Efeito do tratamento com sinvastatina no peso corporal.....	41
4.2.7 Efeito do tratamento com sinvastatina na nocicepção induzida pelo mevalonato.....	42
5. DISCUSSÃO.....	44
6. CONCLUSÃO.....	54
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	56

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: Representação esquemática da ativação do nociceptor.....	3
FIGURA 2: Mediadores periféricos envolvidos na sensibilização do nociceptor após inflamação.....	5
FIGURA 3: Alterações neuroplásticas associadas aos quadros de neuropatia por lesão traumática.....	8
FIGURA 4: Degeneração Walleriana.....	10
FIGURA 5: Biossíntese do colesterol = via do mevalonato.....	15
FIGURA 6: Pinça utilizada para realizar o esmagamento do nervo ciático.....	22
FIGURA 7: Suporte utilizado para avaliação de alodinia mecânica e ao frio. Aplicação de monofilamento de Von Frey sob a pata traseira.....	23
FIGURA 8: Instilação de acetona sob a pata para avaliação da alodinia ao frio.....	24
FIGURA 9: Pista de marcha utilizada para obtenção de imagens para avaliação do índice funcional do ciático (IFC) e índice estático do ciático (IEC).....	25
FIGURA 10: Imagens da vista inferior do animal. Durante a marcha e em repouso.....	25
FIGURA 11: Representação esquemática dos parâmetros avaliados para cálculo do IFC e IEC da pata normal e experimental.....	26
FIGURA 12: Representação das análises morfométricas de secções transversais de nervo ciático, exemplificando a medida da espessura da bainha de mielina e contagem de fibras.....	28
FIGURA 13: Efeito do tratamento com sinvastatina na fase neurogênica, inflamatória e no edema de pata na nocicepção induzida pela formalina.....	33
FIGURA 14: Efeito do tratamento com sinvastatina na alodinia mecânica no 3 ^o dia após a lesão, 6 ^o dia, 12 ^o dia, 18 ^o dia e durante 18 dias na 3 ^a hora após o tratamento.....	35
FIGURA 15: Efeito do tratamento com sinvastatina na alodinia ao frio induzido pela instilação de acetona.....	36

FIGURA 16: Efeito do tratamento com sinvastatina na função motora ciático avaliada pelo índice funcional do ciático (IFC) e índice estático do ciático (IEC).....	37
FIGURA 17: Imagens microscópicas obtidas de cortes transversais do nervo ciático 6 dias após lesão por esmagamento demonstrando morfologia neural.....	39
FIGURA 18: Análise quantitativa da recuperação morfológica do nervo ciático após lesão.....	40
FIGURA 19: Efeito do tratamento com sinvastatina na atividade das enzimas mieloperoxidase e N-acetilglucosaminidase no nervo ciático.....	41
FIGURA 20: Efeito do tratamento com sinvastatina no peso corporal após o esmagamento do nervo ciático durante 18 dias.....	42
FIGURA 21: Curva dose-resposta da nocicepção induzida pela injeção de mevalonato (i.pl.) em animais não neuropáticos, e efeito do tratamento com sinvastatina na nocicepção induzida pelo mevalonato 6 dias após o esmagamento do nervo ciático.....	43

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

- AIDS: síndrome da imunodeficiência adquirida
- AINES: anti-inflamatórios não esteroidais
- AMPA: ácido propiônico α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol
- ANOVA: análise de variância
- ASICs: canais iônicos sensíveis a ácido
- ASIC3: canal iônico sensível a ácido 3
- ATP: adenosina trifosfato
- AVC: acidente vascular cerebral
- BK: bradicinina
- CGRP: peptídeo relacionado ao gene da calcitonina
- CK: creatina quinase
- CoQ10: coenzima Q10
- Dimetilalil-PP: dimetilalil pirofosfato
- D.O.: densidade óptica
- E: pata experimental
- EIT: abertura dos dedos intermediários da pata experimental
- eNOS: óxido nítrico sintase endotelial
- EPL: comprimento da pegada da pata experimental
- E.P.M: erro padrão da média
- ETS: abertura total dos dedos da pata experimental
- EUA: Estados Unidos da América
- Farnesil-PP: farnesil pirofosfato
- FDA: agência regulamentadora de fármacos e alimentos dos EUA (*Food and Drug Administration*)
- g: gramas
- GABA: ácido γ -aminobutírico
- Geranil-PP: geranil pirofosfato
- GG-PP: geranilgeranil pirofosfato
- GPCR: receptor acoplado a proteína G
- GRD: gânglio da raiz dorsal
- GTPase: guanosina trifosfato hidrolase
- h: hora
- HDL: lipoproteína de alta densidade
- HMG-CoA: hidroximetilglutaril – coenzima A

HTAB: bromidrato de hexadeciltrimetilamônio
H₂O₂: peróxido de hidrogênio
IASP: Associação Internacional para o Estudo da Dor
IEC: índice estático do ciático
IFC: índice funcional do ciático
ILs: interleucinas
IL-6: interleucina 6
IL-1 β : interleucina -1 beta
iNOS: óxido nítrico sintase induzida
i.p.: intraperitoneal
i.pl: intraplantar
Isopentenil-PP: isopentenil pirofosfato
IT: abertura dos dedos intermediários
K2P: canais de potássio de dois poros
LDL: lipoproteína de baixa densidade
mg: miligrama
mGluR: receptor metabotrópico do glutamato
min: minutos
mm: milímetro
Morf: morfina
MPO: mieloperoxidase
N: pata normal
NAG: N-acetilglucosaminidase
NF-kB: fator nuclear kB
NGF: fator de crescimento neural
NIT: abertura dos dedos intermediários da pata normal
NMDA: N-metil-D-aspartato
NO: óxido nítrico
NPL: comprimento da pegada da pata normal
NTS: abertura total dos dedos da pata normal
PAG: substância periaquedutal
PGs: prostaglandinas
pH: potencial hidrogeniônico
PL: comprimento da pegada
PK: proteínas quinases
P2X: receptor de purinérgico ionotrópico
rACC: córtex singulado anterior rostral

RTK: receptor de tirosina quinases

s: segundos

s.c.: subcutâneo

Sinv 2: sinvastatina 2 mg/kg

Sinv 80: sinvastatina 80 mg/kg

SNC: sistema nervoso central

TMB: 3,3,5,5'-tetrametilbenzidina

TNF- α : fator de necrose tumoral alfa

TRKA: receptor de tirosina quinase A

TRP: receptor de potencial transitório

TRPA1: receptor de potencial transitório anquirina 1

TRPM8: receptor de potencial transitório melastatina 8

TRPV1: receptor de potencial transitório vanilóide 1

TRPV2: receptor de potencial transitório vanilóide 2

TRPV3: receptor de potencial transitório vanilóide 3

TRPV4: receptor de potencial transitório vanilóide 4

TS: abertura total dos dedos

Vei: veículo

VGCC: canais de cálcio dependente de voltagem

VLDL: lipoproteína de baixíssima densidade

v.o.: via oral

5-HT: serotonina

Xf: valor em log do último filamento de Von Frey utilizado

k: valor da sequência de respostas da tabela de Chaplan e colaboradores

δ : média das diferenças em log entre os estímulos de Von Frey

RESUMO

Estudos têm demonstrado que além de reduzir os níveis de colesterol através da inibição da HMG-CoA redutase, as estatinas, como a sinvastina, apresentam efeitos pleiotrópicos tais como ações anti-inflamatória, imunomodulatória e melhora da disfunção endotelial. No entanto, em relação a neuropatias periféricas, estudos mostram controvérsia sobre os efeitos neuroprotetores e de melhora da dor neuropática, tanto em doses elevadas quanto em doses baixas de sinvastatina. Além disso, relata-se que doses elevadas da sinvastatina podem aumentar o risco de desenvolver neuropatia periférica. Dessa maneira, o objetivo deste estudo foi investigar as evidências conflitantes sobre os efeitos da sinvastatina, comparando uma dose baixa e uma dose alta, em parâmetros sensoriais, motor e morfológico em modelo de neuropatia periférica induzida pelo esmagamento do nervo ciático em ratos. Inicialmente, ratos Wistar machos receberam por via oral veículo (salina, 1 ml/kg), sinvastatina (2 ou 80 mg/kg) ou morfina (2 mg/kg, s.c.), 1 h antes da injeção intraplantar de 50 µl de solução de formalina (2,5%) para avaliação de nocicepção química e edema de pata. O modelo de neuropatia periférica foi induzido pelo esmagamento de nervo ciático (nenhum procedimento em ratos falso operados) por 30 s. A avaliação da alodinia mecânica (método Von Frey up-down) e ao frio (teste da acetona), função motora (índice funcional do ciático e índice estático do ciático), análise histológica bem como a determinação de MPO e NAG e resposta nociceptiva induzida pelo mevalonato foram avaliadas após esmagamento do nervo. Os animais foram tratados por via oral com veículo, sinvastatina (2 ou 80 mg/kg) ou gabapentina (30 mg/kg) durante 18 dias. O tratamento com sinvastatina (2 e 80 mg/kg) atenuou a fase inflamatória induzida pela formalina, porém não diminuiu o edema de pata. No modelo de neuropatia periférica, a alodinia mecânica foi reduzida pela menor dose de sinvastatina até o 12º dia após a lesão, e por 18 dias pela gabapentina. Entretanto, nenhum dos tratamentos (sinvastatina e gabapentina) diminuíram a alodinia ao frio ou melhoraram a função motora após a lesão. Interessante, ambas as doses de sinvastatina demonstraram efeito neuroprotetor após a lesão, superior ao tratamento com gabapentina, preservando a bainha de mielina e o número de fibras mielinizadas. Além disso, a sinvastatina diminuiu a infiltração de neutrófilos no nervo ciático e somente a maior dose diminuiu a nocicepção induzida pelo mevalonato. Em conjunto, esses resultados indicam que a sinvastatina apresenta efeitos antialodínico e anti-inflamatório, concomitante com a preservação da morfologia do nervo ciático após a lesão. Além disso, a menor e a maior dose parecem ter seus efeitos antinociceptivos dependente e independente da via do mevalonato, respectivamente.

Palavras-chaves: sinvastatina, dor neuropática, nervo ciático, neuroproteção.

ABSTRACT

Studies have shown that in addition to reducing cholesterol levels by inhibiting HMG-CoA reductase inhibitors, statins, such as simvastatin, have pleiotropic effects such as anti-inflammatory, immunomodulatory and improvement in endothelial dysfunction. However, in peripheral neuropathies, studies show controversy over the neuroprotective effects and improvement of neuropathic pain, both in high doses and low doses of simvastatin. In addition, it is reported that high doses of simvastatin can increase the risk of developing peripheral neuropathy. Thus, this study aimed to investigate the conflicting evidence about the effects of simvastatin, comparing a low and high dose, in sensory, motor and morphological parameters in peripheral neuropathy model induced by sciatic nerve crush in rats. Male Wistar rats were orally treated with vehicle (saline, 1 ml/kg), simvastatin (2 and 80 mg/kg) or morphine (2 mg/kg, s.c.), 1 h before intraplantar injection (50 µl) of 2.5% formalin solution to evaluate chemical nociception and paw edema. The peripheral neuropathy model was induced by crushing the sciatic nerve using a non-serrated clamp (no sciatic crush in animals sham) for 30 s. Mechanical (von Frey up-down method) and cold allodynia (acetone test), motor function (measurement of sciatic functional and sciatic static index), histological analysis as well as MPO and NAG measurement and nociceptive response induced by mevalonate were evaluated after nerve crush. Animals were orally treated with vehicle, simvastatin (2 and 80 mg/kg) or gabapentin (30 mg/kg), during 18 days. Simvastatin treatment (2 and 80 mg/kg) reduced the inflammatory phase induced by formalin, but failed to decrease the paw edema. In the model of peripheral neuropathy, mechanical allodynia was reduced for the low dose of simvastatin until 12th day after injury, and for 18 days by gabapentin. However, none of the treatments (simvastatin and gabapentin) attenuated cold allodynia or improved the motor function. Interestingly, both doses of simvastatin showed neuroprotective effect after injury, superior to treatment with gabapentin, preserving the myelin sheath thickness and number of myelinated fibers. Furthermore, simvastatin inhibited neutrophil infiltration on sciatic nerve and only the higher dose diminished the nociception induced by mevalonate. These results indicate that simvastatin treatment has antiallodynic and anti-inflammatory effect concomitant with preservation of morphology of the sciatic nerve after injury. Moreover, the lowest and the highest dose seem to have antinociceptive effects dependent and independent of the mevalonate pathway, respectively.

Keywords: simvastatin, neuropathic pain, sciatic nerve, neuroprotection.

1. INTRODUÇÃO

1.1 DOR E TRANSMISSÃO DA INFORMAÇÃO NOCICEPTIVA

A dor é o grande sinalizador de alerta do organismo e tem essencial função protetora, constituindo um fenômeno complexo que envolve dimensões sensoriais, emocionais e comportamentais. Segundo a Associação Internacional sobre o Estudo de Dor (IASP) a dor é definida como uma “experiência sensorial e emocional desagradável, que é associada a uma lesão tecidual presente ou em potencial” (LOESER & TREEDE, 2008). A dor é um dos principais sintomas clínicos que levam os pacientes a procurar os centros de atendimento médico. Assim, a nocicepção exerce um importante papel biológico, pois atua como um mecanismo de defesa para manter a integridade do organismo. Por outro lado, as dores agudas e crônicas também promovem sofrimento, mudanças no humor, incapacidade de realização das tarefas diárias, comprometendo seriamente a qualidade de vida dos pacientes (RAOUF et al., 2010).

As regiões da cabeça e do corpo são inervadas por neurônios sensoriais cujos corpos celulares encontram-se nos gânglios trigeminiais e nos gânglios da raiz dorsal (GRD), respectivamente, enquanto que as projeções dentríticas encontram-se na periferia. Ambas as estruturas são agrupamentos de corpos celulares de neurônios, responsáveis por conduzir a informação gerada na periferia para o núcleo trigeminal caudal ou para o corno dorsal da medula espinhal, respectivamente (SESSLE, 2011). Essas estruturas, também chamadas de fibras nervosas aferentes primárias são responsáveis pela transmissão de estímulos nociceptivos (nociceptores) ou de estímulos não nocivos (mecanorreceptores de baixo limiar) até o sistema nervoso central (SNC). As fibras aferentes podem ser divididas em quatro subtipos diferentes e são classificadas com base na sua velocidade de condução (Fibras $A\alpha$ e $A\beta > 10$ m/s; fibras $A\delta$ 1-10 m/s, fibras C 1 m/s); diâmetro e mielinização: fibras de pequeno diâmetro e não mielinizadas (C) e médio a largo diâmetro mielinizadas ($A\delta$ e $A\alpha$, $A\beta$, respectivamente); e resposta a estímulos. As fibras $A\delta$ e C (nociceptores) incluem nociceptores térmicos, que são ativados em temperaturas acima de 45°C (fibras C) ou abaixo de 5°C (fibras $A\delta$); nociceptores mecânicos de alto limiar, que transmitem exclusivamente informações indicando uma força lesiva sobre a pele (fibras $A\delta$ e algumas fibras $A\beta$) e nociceptores polimodais que são ativados por estímulos mecânicos, térmicos e químicos (fibras C). E as fibras $A\alpha$ e $A\beta$ transmitem estímulos não nocivos, como por ex. uma brisa sobre a pele ou o toque, e são chamadas de

mecanorreceptores de baixo limiar (LEWIN & MOSHOURAB, 2004; SCHULMAN & STRICHARTZ, 2009). Adicionalmente, as fibras C podem ainda ser divididas em dois subtipos: peptidérgicas e não peptidérgicas. A subpopulação de fibras peptidérgicas é definida pela presença de um ou ambos neuropeptídeos, substância P e peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP), enquanto que as fibras não peptidérgicas são isolectina B4 positivas (GOLD & GEBHART, 2010).

Os terminais periféricos respondem a diferentes estímulos nocivos (térmicos, mecânicos ou químicos), através de diferentes receptores. Dentre esses receptores incluem-se os TRPs (receptor de potencial transitório), canais iônicos sensíveis a ácido (ASICs), receptor de serotonina (5-HT), receptores de adenosina trifosfato (ATP) P2X, receptor de tirosina quinase (TRKA), e numerosos receptores acoplados a proteína G (GPCRs) que indiretamente ativam canais iônicos (RAOUF et al., 2010). Atualmente, muitos genes de TRP tem sido identificados e a maioria são canais de cátions não seletivos. Muitos TRP são expressos no sistema nervoso, particularmente na periferia dos nociceptores, e são sensíveis na detecção de estímulos químicos, térmicos (frio e calor) e mecânicos. O receptor de potencial transitório vanilóide 1, TRPV1, pode ser ativado por capsaicina (princípio ativo das pimentas do gênero *Capsicum*), altas temperaturas (>43°C), prótons e endocanabinóides (FERNANDES et al., 2012; WANG & WOOLF, 2005). Além disso, o receptor TRPV1 também pode ser sensibilizado por mediadores inflamatórios, incluindo prostaglandinas (PGs), bradicinina (BK) e fator de crescimento neural (NGF) aos quais culminam na ativação de proteínas quinases (PK). Além dos receptores TRPV1, também são termorreceptores os receptores TRPV2, TRPV3 e TRPV4. Os receptores TRPM8 (receptor de potencial transitório melastatina 8) são descritos por serem ativados pelo mentol, que produz uma sensação de resfriamento. Já os receptores TRPA1 (receptor de potencial transitório anquirina 1), são importantes na resposta ao frio, sendo identificado quando ativado em temperaturas mais baixas ($\leq 18^\circ\text{C}$), além de ser ativado por compostos como o óleo de mostarda, cinamaldeído e wasabi (tempero picante proveniente da planta *Wasabia japonica* usado na comida japonesa) (WANG & WOOLF, 2005). Em relação aos estímulos mecânicos, de maneira geral, também são detectados por receptores TRPA1 além dos receptores TRPV3, TRPV4 e ASIC3 (FERNANDES et al., 2012; GOLD & GEBHART, 2010)

A ativação de um ou mais receptores nos terminais periféricos desencadeia uma série de eventos para permitir a transmissão do estímulo nociceptivo até o SNC. Quando um limiar de despolarização é alcançado nessas fibras, os canais de sódio dependente de voltagem são ativados, gerando um influxo de sódio para o interior da membrana, culminando em um potencial de ação. Entretanto, quando o canal de potássio abre, o efluxo deste íon age repolarizando a membrana, restabelecendo o equilíbrio dessa fibra.

Esse processo é repetido até a propagação do potencial de ação ao longo do axônio, chegando até os terminais pré-sinápticos, localizados na medula espinhal. Nesses terminais, o influxo de cálcio pelos VGCC (canais de cálcio dependente de voltagem), leva a liberação de neurotransmissores como o glutamato, que faz sinapse com a fibra de segunda ordem (também denominada de fibra aferente secundária) através de ativação de receptores ionotrópicos AMPA (ácido propiônico α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol), receptor NMDA (N-metil-D-aspartato) e receptor metabotrópico do glutamato (mGluR) (Fig. 1). Ocorrendo a sinapse, o estímulo nociceptivo é transmitido pelo neurônio de segunda ordem através de vias ascendentes até regiões específicas no cérebro onde o estímulo nociceptivo será codificado (RAOUF et al., 2010).

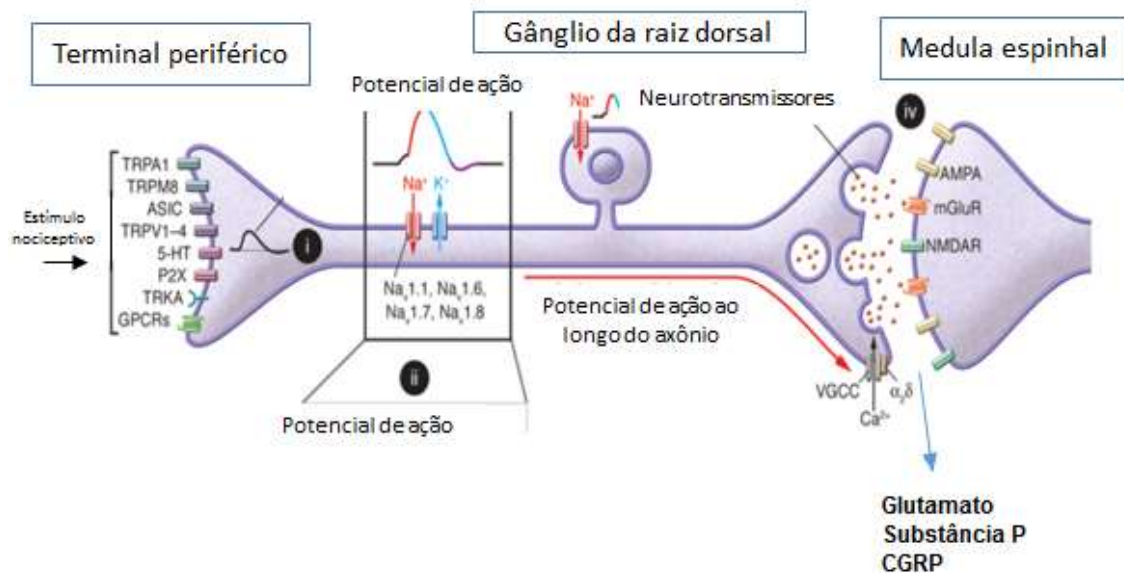


FIGURA 1: Representação esquemática da ativação do nociceptor. Receptores periféricos respondem a diferentes estímulos (i) gerando um potencial de ação e transmissão do potencial ao longo da fibra (ii). Na medula, ocorre a liberação de neurotransmissores, fazendo sinapses com o neurônio de segunda ordem (iv). (Figura modificada) (RAOUF et al., 2010).

A sinapse com o neurônio de segunda ordem ocorre na superfície do corno dorsal da medula espinhal, que é considerada uma unidade importante que realiza o processamento da informação sensorial, sendo dividida em lâminas (I – VI) (PETKO & ANTAL, 2012; SUZUKI & DICKENSON, 2005). A lâmina I na medula espinhal desempenha um papel chave na modulação da transmissão da informação nociceptiva

(SUZUKI & DICKENSON, 2005). As fibras C se conectam em lâminas superficiais na medula espinhal (lâminas I e II), enquanto que as fibras A β se conectam nas lâminas mais profundas (principalmente lâminas III e IV), e as fibras A δ se conectam tanto em lâmina superficial quanto em lâmina mais profunda (lâminas I e V) (DUBIN & PATAPOUTIAN, 2010). A partir da sinapse nessas lâminas os neurônios se projetam através de vias ascendentes para regiões do cérebro para transmitir o impulso nociceptivo. As vias ascendentes são estruturas neuronais específicas que ascendem para regiões específicas do cérebro, passando por múltiplas áreas supraespinhais, que irão fazer a percepção e a localização da sensação dolorosa. Entre as vias clássicas de transmissão destaca-se: o trato espinotalâmico que termina no núcleo ventrobasal do tálamo e projeta-se para o córtex, sendo uma estrutura relacionada com discriminação e motivação da sensação dolorosa além da percepção afetiva da dor; e o trato espinoparabraquial que termina no núcleo parabraquial conectando-se com o hipotálamo e amígdala, e está relacionado com componentes motivacionais e afetivos/aversivos da dor (MILLAN, 1999; SUZUKI & DICKENSON, 2005).

Quando ocorre lesão nos tecidos periféricos, esta pode estar associada com a liberação de mediadores químicos de células teciduais como mastócitos, macrófagos, neutrófilos, células do sistema imune e as próprias células lesadas. Com a migração dessas células, há liberação de mediadores químicos no local da lesão, como a 5-HT, histamina, fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), bradicinina (BK), PGs, interleucinas (ILs), adenosina, ATP entre outros. Muitos desses mediadores ligam-se em seus respectivos receptores presentes nos nociceptores resultando em aumento da excitabilidade do nociceptor, ocasionando a dor inflamatória (BASBAUM et al., 2009; SESSLE, 2011) (Fig. 2). Nessas condições a dor pode surgir por estímulos não nocivos (p. ex. toque) ou até espontaneamente sem qualquer estímulo. A dor inflamatória também é considerada adaptativa e protetora, por aumentar a sensibilidade sensorial, ajudando na cura do local envolvido na lesão, criando uma situação que desestimula o contato físico e movimento (WOOLF, 2010).

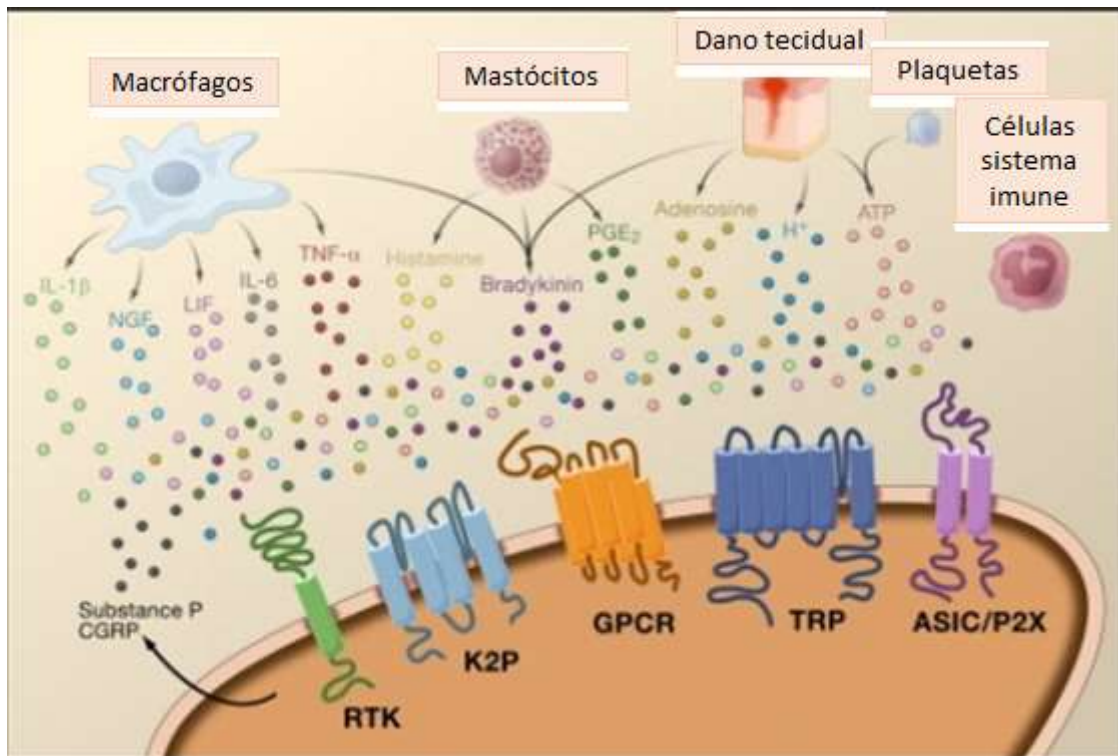


FIGURA 2: Mediadores periféricos envolvidos na sensibilização do nociceptor após inflamação. Os mediadores periféricos são liberados de células incluindo mastócitos, basófilos, plaquetas, macrófagos, neutrófilos, células endoteliais, queratinócitos e fibroblastos. Esta "sopa inflamatória" inclui moléculas de sinalização de 5-HT, histamina, glutamato, ATP, adenosina, substância P, peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP), BK, PGs, NGF, TNF- α , interleucina 1- β (IL-1 β), proteases extracelulares e prótons. Estes fatores atuam diretamente sobre o nociceptor através da ligação a um ou mais receptores, incluindo GPCR, os canais TRP, os ASICs, canais de potássio de dois poros (K2P) e receptor de tirosina quinases (RTK), como representado no terminal periférica do nociceptor. (Figura modificada) (BASBAUM et al., 2009).

Como processo adaptativo do organismo em condições dolorosas, existem mecanismos endógenos que modulam a transmissão da dor. Uma dessas modulações ocorrem através da via descendente inibitória e envolve diversas regiões do SNC, como hipotálamo, amígdala, cortex cingulado anterior rostral (rACC) e substância cinzenta periaquedutal (PAG) que liberam substâncias na medula espinhal, como endorfinas, 5-HT, noradrenalina e acetilcolina que se ligam a receptores específicos e modulam a transmissão da informação nociceptiva até o cérebro (OSSIPOV et al., 2010). Sob condições normais, existe um equilíbrio entre inibição e facilitação de transmissão sináptica da dor no sistema nervoso. Em pessoas com lesão no sistema nervoso há um

desequilíbrio entre a excitação e inibição desta transmissão ao cérebro (FINNERUP et al., 2007). Quando isso ocorre, a dor perde o caráter protetor, ocasionando dores crônicas devido muitas vezes, a plasticidade neuronal de doenças persistentes (ex. neuropatias e câncer) mantendo o quadro doloroso.

1.2 DOR NEUROPÁTICA E ALTERAÇÕES FISIOPATOLÓGICAS

Mais de um século atrás, reconheceu-se que uma série de distúrbios neurológicos são caracterizados por dor na área afetada por essas doenças. Desde então, tem se observado que a dor e outros sintomas neurológicos são devidos a doenças ou lesão no sistema nervoso periférico ou central, o que conduziu a designação de dor neuropática (BACKONJA, 2003).

Em condições patológicas, a dor pode tornar-se persistente, podendo durar meses ou até anos, resultante de um estado de má adaptação do organismo, devido a diversas alterações fisiopatológicas e emocionais, levando a situações altamente angustiantes para os pacientes (LE BARS et al., 2001). Essas alterações fisiopatológicas desencadeiam a dor neuropática, que pode estar presente em dores agudas, mas principalmente dentro das dores de origem crônica. Segundo estimativas, cerca de 20% a 30% dos pacientes que apresentam dores crônicas tem dor neuropática (BOUHASSIRA et al., 2008). Essa patologia é definida pela IASP como uma “dor que surge como consequência direta de uma lesão ou doença que acometem o sistema somatosensorial” (LOESER & TREEDE, 2008).

A definição de dor neuropática em 1994 resultou em grande debate na literatura, por ser demasiadamente ampla, e por não contemplar o sistema somatosensorial como afetado em condições de neuropatia (LOESER & TREEDE, 2008; MAX, 2002). Isso levou pesquisadores a desenvolverem uma nova definição sobre essa patologia em 2008. A referência para o sistema somatosensorial na nova definição foi derivada a partir de uma vasta gama de condições de dor neuropática que vão desde neuropatias periféricas até a dor central pós acidente vascular cerebral (AVC) (LOESER & TREEDE, 2008; TREEDE et al., 2008). Desde então, a quantidade de informação e pesquisa sobre os mecanismos envolvidos na dor neuropática, em estudos pré-clínicos e clínicos, tem crescido vastamente a fim de obter uma terapia mais eficaz para o tratamento da dor (BACKONJA, 2003).

A dor neuropática está relacionada a mudanças deletérias nos neurônios nociceptivos e mecanorreceptores de baixo limiar, afetando o sistema somatosensorial (BARON, 2009). É considerada uma condição mal adaptativa, visto que diminui extensivamente a qualidade de vida dos pacientes (WOOLF, 2010). Dentre os principais fatores que podem lesionar o sistema nervoso e resultar em dor neuropática estão: compressão do nervo (por ex. traumas, síndrome dolorosa complexa regional, neuralgia do trigêmio), doenças metabólicas (diabetes), infecções virais (herpes zoster, síndrome da imunodeficiência adquirida - AIDS), neurotoxicidade pelo uso crônico de drogas (etanol, vincristina, taxol), doenças auto-imunes (esclerose múltipla) e câncer (BARON, 2006; BOUHASSIRA et al., 2008; MENDELL & SAHENK, 2003). Os pacientes com dor neuropática demonstram sintomas sensoriais distintos que podem coexistir em diferentes combinações (BARON, 2006). A dor neuropática é descrita por pacientes com essa patologia como dores espontâneas em queimação, pontadas, formigamento ou choque elétrico (FINNERUP et al., 2007). O exame sensorial deve incluir testes de toque, picada de agulha, pressão, frio, calor, vibração e avaliação da atividade neuronal. As respostas podem ser classificadas em normal, diminuída ou aumentada para determinar se fenômenos sensoriais estão envolvidos (BARON, 2006).

Apesar das diferentes etiologias, todos esses fatores que podem desencadear a dor neuropática tem a mesma característica de afetar as vias nociceptivas. Nessas condições a dor pode se caracterizar como dor espontânea (a qual independe de estímulos sensoriais), hiperalgesia (aumento da dor a estímulos nocivos) e alodinia (estímulos não nocivos tornam-se dolorosos) (LOESER & TREEDE, 2008). O termo alodinia só é usado quando é conhecido que o estímulo teste não é capaz de ativar nociceptores. Em contrapartida, o termo hiperalgesia é usado para todos os tipos de aumento de sensibilidade de dor, e pode incluir-se nessa terminologia tanto a redução do limiar do nociceptor quanto o aumento na resposta supra limiar (LOESER & TREEDE, 2008).

Nos quadros de lesão traumática, algumas alterações ocorrem no SNC e periférico, desencadeando a dor neuropática. Essas alterações são conhecidas como alterações neuroplásticas. A neuroplasticidade resulta de uma cascata de eventos ao longo de neurônios nociceptivos e mecanorreceptores de baixo limiar (Fig. 3). Todos esses eventos contribuem em aumentar o *input* excitatório de dor até o cérebro, causando dor exagerada em pacientes com essa patologia, por aumento da excitabilidade (hiperexcitabilidade) (BARON, 2009; MAIHOFNER et al., 2010).

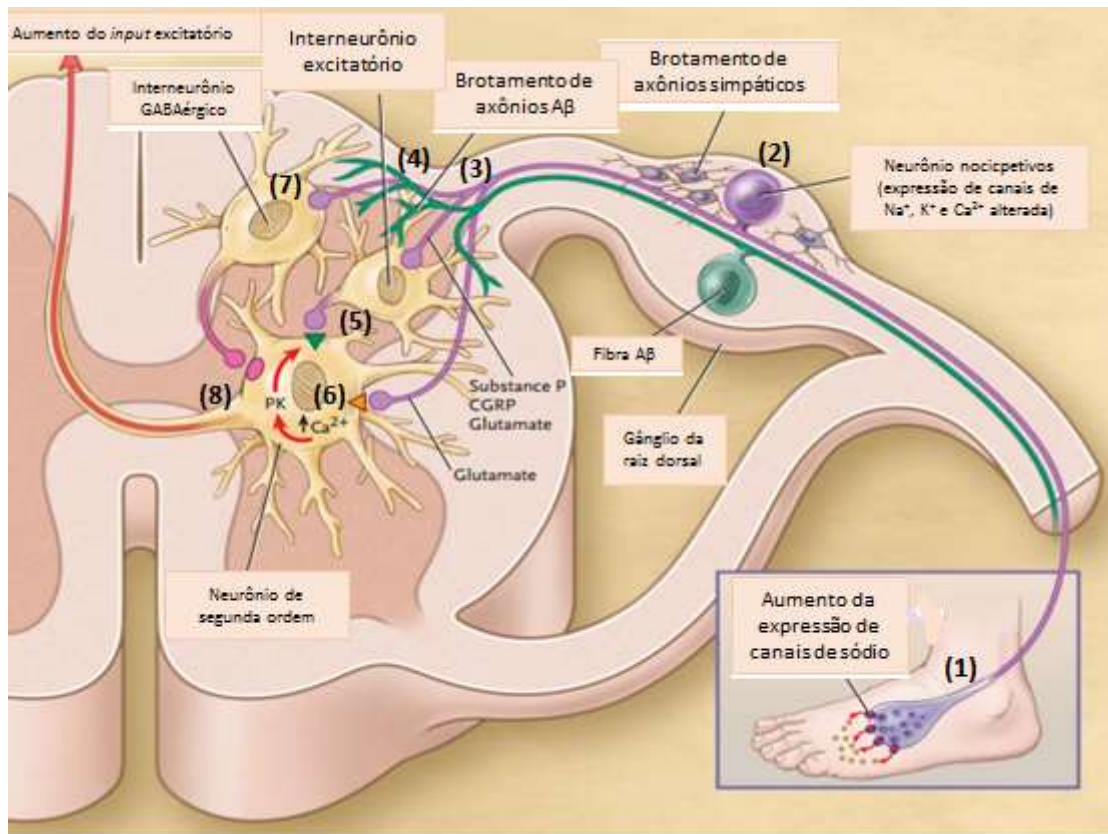


FIGURA 3: Alterações neuroplásticas associadas aos quadros de neuropatia por lesão traumática. Após a lesão do nervo periférico essas alterações se iniciam com aumento da expressão dos canais de sódio na periferia, causando descargas ectópicas e aumentando a geração de impulsos nervosos (1). Essas mudanças alcançam o SNC, e no GRD os axônios simpáticos brotam ao redor de corpos celulares (2). Chegando na medula espinhal, os neurônios nociceptivos se projetam para interneurônios espinhais excitatórios, aumentando a excitação do interneurônio por liberação de substância P, CGRP e glutamato (3). As fibras A β também sofrem alterações neuroplásticas: ocorrem brotamento dessas fibras em direção aos interneurônios excitatórios em lâminas superficiais da medula espinhal, fazendo com que a fibra A β passe a transmitir estímulos nociceptivos (4). Os neurônios de segunda ordem na medula espinhal, que normalmente são ativados por glutamato através de receptores ionotrópicos AMPA, também são induzidos a disparar espontaneamente através da ativação do receptor NMDA, ativado pelo interneurônio excitatório (5). Além disso, a excitação do neurônio de segunda ordem leva a um aumento do cálcio intracelular e ativação de PK que fosforilam proteínas intracelulares, tais como os receptores NMDA, aumentando o número desses receptores promovendo maior ativação do neurônio (6). Ademais, também ocorre inibição de interneurônios inibitórios, como por exemplo interneurônios GABAérgicos, que em condições normais funcionam inibindo a excitabilidade do neurônio de segunda

ordem por meio de infra-regulação de receptores GABA (ácido γ -aminobutírico), resultando na inibição da diminuição da corrente pós-sináptica (7). Todos esses eventos contribuem em aumentar o *input* excitatório até o cérebro (8). Receptores AMPA, triângulo laranja; receptores NMDA, triângulo verde; receptores GABA, círculo rosa. (Figura modificada) (MENDELL & SAHENK, 2003).

Frequentemente, lesões em nervos periféricos levam a formação de uma estrutura denominada neuroma. Essa estrutura também promove mudanças na excitabilidade ocasionando hipersensibilidade (LIU et al., 2001). Além disso, lesões em fibras nervosas no sistema nervoso periférico podem resultar em degeneração Walleriana, uma resposta inflamatória relacionada com a degeneração axonal (VARGAS & BARRES, 2007) (Fig. 4). Além dos macrófagos ativados que infiltram no nervo e GRD, o aumento da permeabilidade vascular permite que outras células também infiltram no local da lesão e participem da resposta inflamatória na dor neuropática, como neutrófilos, mastócitos, plaquetas e células do sistema imune. Também já foi observado níveis aumentados das enzimas mieloperoxidase (MPO) e N-acetilglucosaminidase (NAG) no local da lesão, indicando a infiltração de neutrófilos e macrófagos ativados, respectivamente (CAMARA et al., 2013; SILVA et al., 2013). Da mesma forma como descrito na dor inflamatória ocasionada por lesão tecidual, essas células liberam mediadores inflamatórios (TNF- α , BK, NGF e ILs) que irão sensibilizar fibras nociceptivas lesionadas e intactas no local da lesão, contribuindo para o processo inflamatório local e para o aumento da sensação dolorosa em pacientes com dor neuropática (BARON, 2006; FINNERUP et al., 2007).

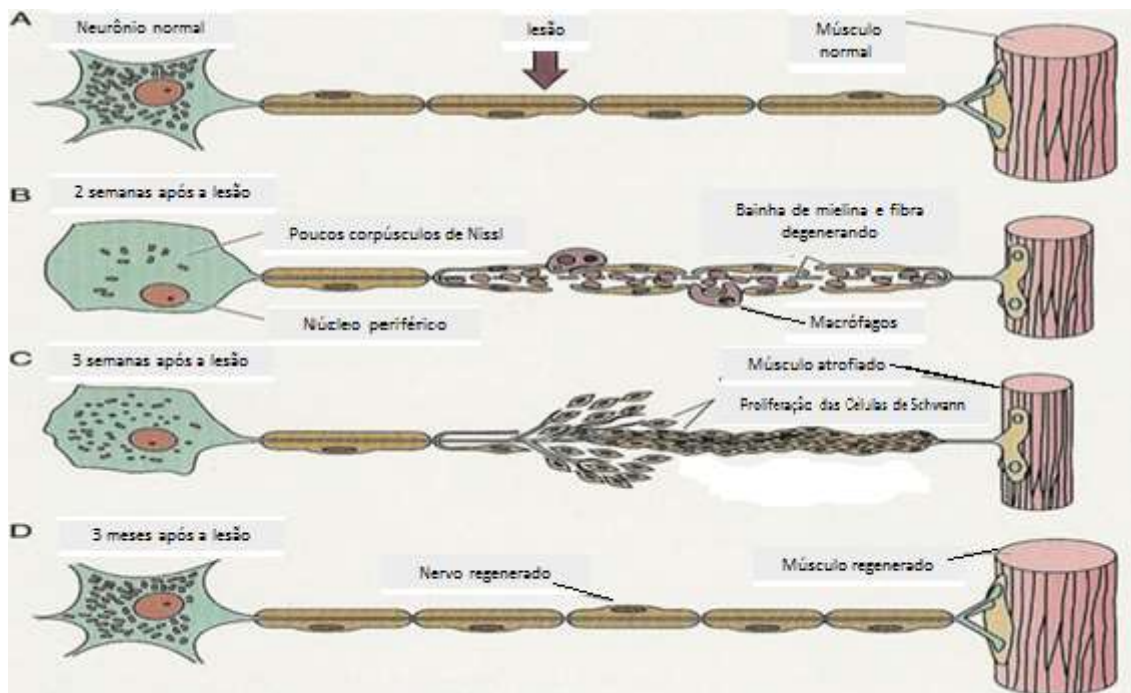


FIGURA 4: Degeneração Walleriana. Após a lesão ocorre degeneração axonal, seguida de degeneração axonal distal ao local da lesão, aumento da permeabilidade tecidual, rompimento da bainha de mielina, influxo de macrófagos, remoção dos detritos de mielina pelos macrófagos e aumento das células de Schwann, responsáveis pela mielinização do nervo, através da secreção de NGF, regenerando completamente o axônio (VARGAS & BARRES, 2007). (Figura modificada) (STUDYBLUE, 2014).

Algumas neuropatias periféricas de origem traumática, como esmagamento, compressão, estiramento, avulsão e secção parcial ou total de nervo, também afetam outros tecidos. Estas lesões resultam na parada da transmissão de impulsos nervosos aos tecidos adjacentes (devido a degeneração axonal) e, por conseguinte, na perda ou diminuição da sensibilidade e motricidade no território inervado, resultando em diminuição da função motora (MARTINS, 2009; PELLEGRINO & FRANZINI, 1963). Muitos pacientes que possuem a síndrome complexa regional, que está relacionada a compressão de nervos pós cirurgias, traumas e fraturas, também apresentam diminuição da função motora, sendo principalmente caracterizado por fraqueza motora (MAIHOFNER et al., 2010).

A maioria dos modelos de lesão de nervo periférico em roedores utilizam como alvo o nervo ciático (denominação popular) ou isquiático (denominação anatômica), pelo fácil acesso anatômico bem como pela facilidade na avaliação, visto que os testes são realizados na pata traseira do animal, em livre deambulação (BARROT, 2012). A lesão

de nervo ciático tem sido utilizada por mais de um século para investigar o processo de danos nos nervos, para avaliar a capacidade absoluta e relativa dos sistemas nervoso periférico e central pós axotomia, e para compreender o desenvolvimento da dor crônica em vários estados patológicos (SAVASTANO et al., 2014). Sabe-se que o nervo ciático é um nervo misto que contém axônios motores sensoriais, somáticos e autonômicos (SCHMALBRUCH, 1986), permitindo uma avaliação mais ampla dos processos dolorosos envolvidos em lesões ou doenças no SNC. Além disso, esse modelo de lesão procura mimetizar condições humanas da síndrome dolorosa complexa regional periférica que é associada a traumas, cirurgias e fraturas (SAVASTANO et al., 2014). Tem sido demonstrado que este modelo induz dor neuropática de longa duração (14 a 28 dias) em roedores, que é atribuída a mudanças na excitabilidade neuronal assim como no envolvimento de componentes inflamatórios, culminando em alodinia mecânica e alodinia ao frio e déficit da função motora em ratos (MARTINS et al., 2011; PAN et al., 2010; VAREJAO et al., 2004).

Estudos tem demonstrado que a sensibilidade anormal a dor altera a função da rede neuronal no corno da medula espinhal, e que as células gliais espinhais agem como um intermediário entre a lesão e a plasticidade neuronal a longo prazo, levando à amplificação da dor. As células gliais, como micróglia, astrócitos e oligodendrócitos, são responsáveis pelo suporte neuronal e constituem cerca de 70% da população de células no SNC (SANDKUHLER, 2009). As células gliais podem ser ativadas por neurotransmissores, como aminoácidos excitatórios e substância P, ATP, óxido nítrico (NO), PGs e BK. Após a ativação da micróglia, esta produz e libera citocinas, PGs, leucotrienos, NO, glutamato, enzimas proteolíticas e intermediários reativos de oxigênio que, por sua vez, causam um aumento na excitabilidade neuronal resultando em hiperalgesia (SANDKUHLER, 2009). Entretanto, a inadequada resposta da micróglia pode contribuir em atrasar o processo de degeneração Walleriana no SNC. A micróglia após ser ativada pode hipertrofiar e migrar sem se desenvolver totalmente em célula fagocítica. A micróglia também é chamada de “macrófago do SNC” e nos processos de degeneração Walleriana no SNC tem um papel importante na fagocitose de restos de mielina, facilitando o processo (VARGAS & BARRES, 2007).

1.2.1 Tratamento farmacológico da dor neuropática

Devido à complexidade das alterações fisiopatológicas envolvidas na dor neuropática, a busca por um agente terapêutico eficaz no controle dessa patologia constitui um grande desafio para a comunidade médico-científica. A primeira linha de tratamento empregado nos processos dolorosos neuropáticos incluem anticonvulsivantes (inibidores da subunidade $\alpha 2\delta$ de canais de cálcio, p.ex. gabapentina, e inibidores dos canais de sódio, p.ex. carbamazepina), antidepressivos (tricíclicos, p.ex. imipramina, e inibidores da receptação de noradrenalina e serotonina, p.ex. venlafaxina) e adesivos tópicos de lidocaína a 5% (KUKKAR et al., 2013). Outras opções para o tratamento dessas condições, porém apenas como terapia coadjuvante, são opióides ou anti-inflamatórios não esteroidais (AINES) (SAKATA, 2008; SZCZUDLIK et al., 2014). A gabapentina, de maneira geral, vem sendo amplamente utilizada para o tratamento de diferentes dores neuropáticas, pois o seu bloqueio da subunidade dos canais de cálcio $\alpha 2\delta 1$ causa diminuição da entrada de cálcio nas terminações nervosas e assim regula a liberação de neurotransmissores no corno dorsal da medula (MEHTA et al., 2014). Além disso, a ligação na subunidade $\alpha 2\delta 1$ também leva a diminuição da expressão de canais de cálcio nos neurônios do corno dorsal da medula, diminuindo as descargas ectópicas (KUKKAR et al., 2013).

De maneira geral, a terapia farmacológica atual de doenças subjacentes para quadros de neuropatias dolorosas não protege ou restaura o nervo, mas sim proporcionam apenas alívio dos sintomas (FINNERUP et al., 2013). Entretanto, o efeito terapêutico desses fármacos é limitado devido a vários efeitos adversos e por muitas vezes não diminuir suficientemente a sensação dolorosa dos pacientes. Tem sido documentado que a gabapentina, apesar de ter um perfil de segurança favorável, tem uma variabilidade farmacocinética não linear que torna difícil prever a dose adequada ou quais os pacientes são susceptíveis a atingir uma resposta clínica significativa (KUKKAR et al., 2013; SABATOWSKI et al., 2004). Além disso, o uso de anticonvulsivantes também está associado ao aparecimento de tonturas, sonolência, ganho de peso e edema periférico (MEHTA et al., 2014; STAHL et al., 2013). Os antidepressivos tricíclicos de forma geral também podem gerar ganho de peso, além de efeitos anticolinérgicos, hipotensão ortostática, efeitos cardiovasculares, podendo até ser letal em altas doses (BRIX FINNERUP et al., 2013; SANSONE & SANSONE, 2008). Os AINES e os opióides, apesar de serem utilizados apenas como coadjuvantes na terapêutica da dor neuropática, também causam efeitos colaterais. O uso de AINES está associado ao aparecimento de úlceras estomacais e da redução da função plaquetária,

enquanto que os opióides promovem constipação intestinal, depressão respiratória, dependência, náuseas e vômitos (SAKATA, 2008).

De maneira geral, o emprego do arsenal terapêutico disponível raramente resulta no controle eficaz e seguro da dor, uma vez que muitos pacientes continuam refratários aos tratamentos, seja pela persistência das crises ou por efeitos colaterais intoleráveis. Diante deste contexto, novos fármacos para o tratamento das dores crônicas são urgentemente necessários, e tem se tornado um desafio para pesquisadores, uma vez que a dor crônica está principalmente associada com alterações adaptativas, tais como a neuroplasticidade em vários níveis do sistema nervoso (MAIHOFNER et al., 2010).

1.3 ESTATINAS

As estatinas são uma classe de drogas utilizadas como hipocolesterolêmicos, inibindo a síntese de colesterol através da inibição da hidroximetilglutaril-coenzima A (HMG-CoA) redutase, enzima passo limitante na via de biossíntese do colesterol, também chamada de via do mevalonato (SCHACHTER, 2005). Além disso, as estatinas aumentam os receptores de LDL (lipoproteína de baixa densidade) na membrana do fígado, passando a remover mais VLDL (lipoproteína de baixíssima densidade) e LDL circulante, diminuindo a concentração plasmática de LDL colesterol (SIRTORI, 2014). As estatinas tem efeitos benéficos em outros parâmetros lipídicos, incluindo o aumento das concentrações de HDL (lipoproteína de alta densidade) e diminuição das concentrações de triglicerídeos (MARON et al., 2000).

As estatinas tem ganhado grande importância terapêutica devido a seus efeitos pleiotrópicos, ou seja, efeitos que vão além do seu efeito principal (hipocolesterolêmico). Dentre esses efeitos destacam-se: propriedades anti-inflamatória, imunomoduladora, antitrombogênica e de melhora da disfunção endotelial (PATHAK et al., 2013; SHI et al., 2011; WU et al., 2008). Além disso, muitos estudos clínicos de larga escala demonstraram que as estatinas também tem efeitos benéficos cardiovasculares, reduzindo significativamente a morbidade e a mortalidade de pacientes através da diminuição dos níveis de lipoproteínas aterogênicas, incluindo a inibição da apolipoproteína B100 (SCHACHTER, 2005).

Os humanos e as células animais podem obter o colesterol por dois mecanismos que ocorrem no fígado. O primeiro mecanismo é a síntese de colesterol chamada de síntese *de novo*, na via do mevalonato, sendo a enzima HMG-CoA redutase

extremamente importante nessa biossíntese (GOLDSTEIN & BROWN, 1984). A produção de colesterol, por sua vez, também é importante na produção de lipoproteínas, vitamina D, ácidos biliares e hormônios esteróides, além de ser importante na composição de membranas lipídicas das células e dos neurônios (bainha de mielina), funcionando como membrana protetora das células (CHRISTIANS et al., 1998; DIETSCHY & WILSON, 1970a, 1970b, 1970c). Um segundo modo de obter colesterol é pela endocitose de receptores de LDL de colesterol proveniente da dieta. Uma vez que o colesterol não é solúvel em água, a molécula lipídica sofre endocitose mediada por receptores LDL na glândula adrenal e no fígado (GOLDSTEIN & BROWN, 1984).

O mevalonato, produzido através da reação de três moléculas da Coenzima A, além de produzir o colesterol também produz inúmeros compostos intermediários como isopentenil pirofosfato (isopentenil-PP), dimetilalil pirofosfato (dimetilalil-PP), geranyl pirofosfato (geranyl-PP), farnesil pirofosfato (farnesil-PP) e geranylgeranyl pirofosfato (GG-PP) (Fig. 5). O farnesil-PP e o GG-PP por sua vez, são extremamente importantes em várias modificações pós-transducionais de proteínas intracelulares através da Rho GTPase (guanosina trifosfato hidrolase), e da família da Rac, Ras, Rho, e que promove interação proteína-proteína e tem diversas ações celulares como apoptose, crescimento e diferenciação celular, expressão gênica, transportes nuclear, proteico e lipídico e influencia diversas vias de sinalização inflamatória (CASEY & SEABRA, 1996). A inibição da enzima HMG-CoA redutase, por sua vez, resulta na diminuição da produção desses compostos, resultando, conseqüentemente, em diminuição de isoprenilação das GTPases, afetando algumas funções celulares (BHALLA et al., 2014).

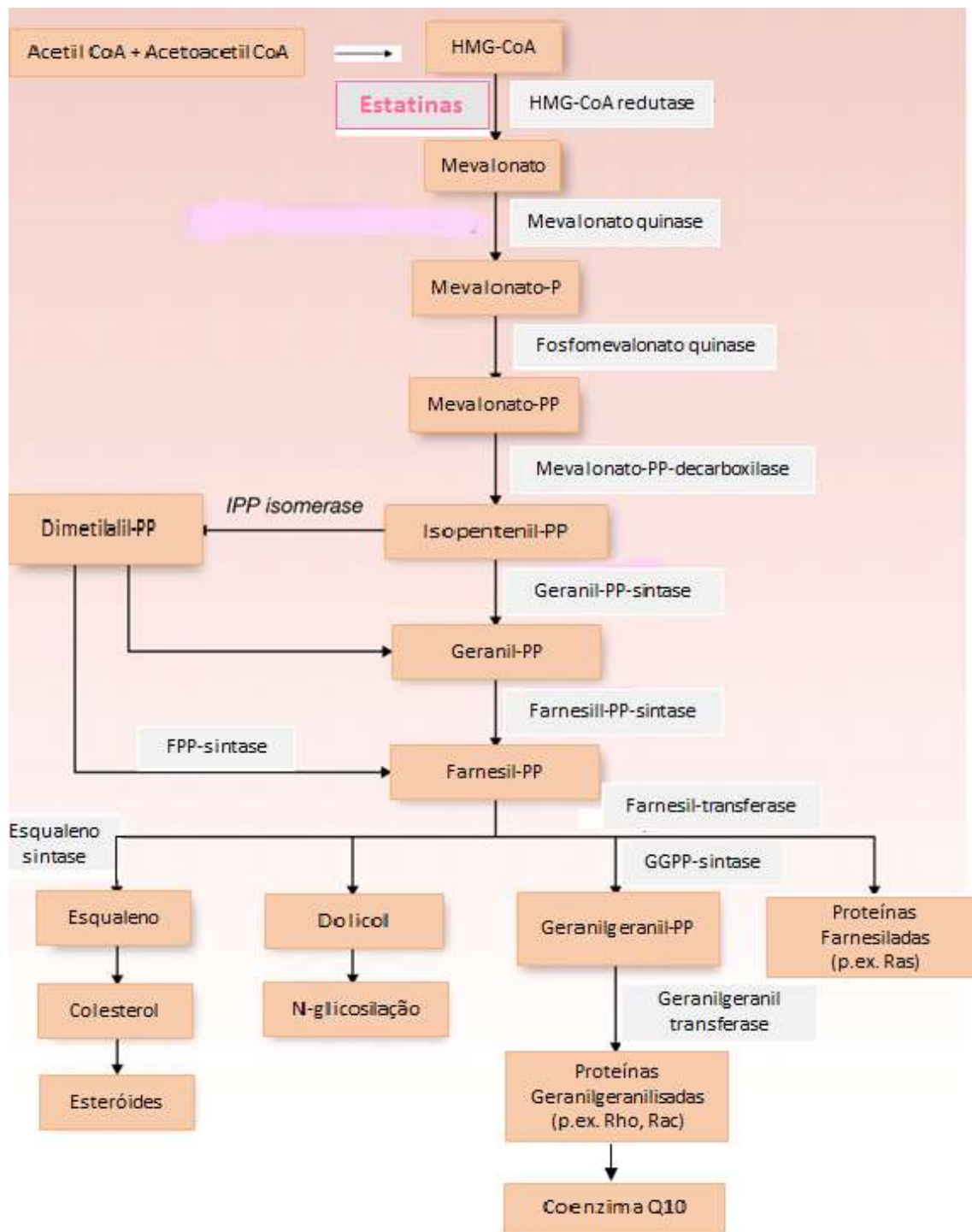


FIGURA 5: Biossíntese do colesterol = via do mevalonato. (Figura modificada) (THURNHER et al., 2012).

As estatinas começaram a ser estudadas no Japão no início da década de 70 por Akyra Endo. A primeira estatina descrita foi nomeada compactina, um metabólito isolado do fungo *Penicillium citrinum* que mostrou potente atividade em inibir a síntese

de colesterol *in vitro* e *in vivo*, com estrutura semelhante a HMG-CoA (substrato da HMG-CoA redutase). Na mesma década, o laboratório farmacêutico Merck, interessado na descoberta dos inibidores da HMG-CoA redutase, isolou uma estrutura do fungo *Aspergillus terreus*, mais tarde chamada de lovastatina, que mostrou excelentes resultados *in vitro* reduzindo os níveis de LDL circulante. Após diversos testes clínicos que evidenciaram a diminuição do colesterol em pacientes com hipercolesterolemia, e com poucos efeitos adversos, a lovastatina foi aprovada pela agência reguladora de fármacos e alimentos dos EUA, o FDA (*Food and Drug Administration*) sendo a primeira estatina comercializada em Setembro de 1987. Desde então, 6 estatinas, incluindo 2 estruturas semi-sintéticas (sinvastatina e pravastatina) e 4 estruturas sintéticas (fluvastatina, atorvastatina, rosuvastatina e pitavastatina) foram introduzidas no mercado (ENDO, 2010).

A atorvastatina, fluvastatina, lovastatina e sinvastatina são compostos relativamente lipofílicos devido a suas estruturas moleculares, enquanto que a pravastatina e a rosuvastatina são mais hidrofílicas. A maioria das estatinas comerciais estão na forma de hidroxí ácidos ativos, com exceção da lovastatina e da sinvastatina que são pró drogas na forma de lactonas. Todas as estatinas são absorvidas rapidamente após administração, atingindo um pico plasmático de concentração em 4 h (SCHACHTER, 2005). A maioria das estatinas (com exceção da pravastatina e parcialmente da rosuvastatina) sofrem metabolismo de primeira passagem e a biodisponibilidade sistêmica cai para 5-30% da dose administrada (SIRTORI, 2014). As estatinas são predominantemente metabolizadas pela família de enzimas citocromo P450, e a principal via de eliminação é pela bile após o metabolismo hepático (SCHACHTER, 2005).

Recentemente, uma série de estudos experimentais pré clínicos vem indicando valor terapêutico das estatinas em relação ao tratamento de diferentes distúrbios neurodegenerativos e em diferentes modelos de dor neuropática por lesão traumática e metabólica (associada ao diabetes), mostrando um potencial efeito antinociceptivo, diminuindo hiperalgesia térmica e mecânica, além de efeitos antiinflamatórios (BHALLA et al., 2014; CHU et al., 2012; GHOLAMI et al., 2008; LI et al., 2009; OHSAWA et al., 2011; SHI et al., 2011). Além disso, também tem sido demonstrado efeito neuroprotetor e de melhora da função motora com o tratamento com estatinas em ratos em modelos neuropatia (traumática e metabólica), melhorando parâmetros relacionados a morfologia, condutividade das fibras nervosas e função motora (CAMERON et al., 2003; PAN et al., 2010; XAVIER et al., 2012). Também existem evidências dos efeitos benéficos das estatinas em estudos clínicos. Foi demonstrado que em pacientes com diabetes mellitus tipo 2 o tratamento com estatinas preveniu o desenvolvimento de

neuropatia sensorial periférica. O estudo ainda relata, que esses efeitos benéficos parecem ser independentes do efeito do metabolismo de lipoproteínas (DAVIS et al., 2008).

Entretanto, também são relatados efeitos adversos na terapêutica com estatinas em pacientes que fazem uso desse fármaco. Estudos de farmacovigilância encontraram casos de efeitos tóxicos ao fígado, apesar de ser em baixa incidência. Esses efeitos tóxicos hepáticos estão associados com o aumento de transaminases e, portanto, o tratamento com estatinas deve ser usado com cautela em pacientes que tenham algum comprometimento hepático (SIRTORI, 2014). Um dos efeitos adversos mais comuns que acometem pacientes em tratamento com as estatinas são as miopatias (doenças musculares). Dentre as miopatias destacam-se a mialgia, a miosite e a rabdomiólise. A mialgia se caracteriza por fraqueza muscular, dor e sensibilidade sem qualquer elevação da creatina quinase (CK) e está presente em cerca de 25% dos pacientes que fazem uso de estatinas. Tem sido relatado que o aumento da CK pode estar associado ao aparecimento de miopatias (MARON et al., 2000). A CK é uma enzima importante no fornecimento de energia aos músculos, usando o ATP como fonte. Já a miosite consiste na elevação de CK com ou sem sintoma muscular. Um outro efeito adverso muito importante das estatinas é a rabdomiólise, um efeito raro, mas extremamente grave, que consiste na ruptura das fibras musculares por decorrência de uma lesão muscular. Essas fibras podem entrar na corrente circulatória causando graves problemas renais quando filtradas pelos rins, podendo até ser fatal. A rabdomiólise está associada com o aumento de CK 10 vezes superior ao normal. No entanto, esses efeitos adversos musculares também podem aparecer com nível de CK normal. (FERNANDEZ et al., 2011). Também tem sido sugerido que um dos mecanismos responsável pelos efeitos adversos musculares é a diminuição da Coenzima Q10 (CoQ10), um metabólito produzido na via do mevalonato, na qual é muito importante na respiração celular (PARKER et al., 2013). Outras hipóteses incluem, inibição dos canais de cloro a nível da membrana muscular, mecanismo pelo qual pode resultar em paralisia após altas doses de estatinas; e indução da expressão do gene atrogin-1, que está envolvido na atrofia muscular esquelética (MARTINI et al., 2009; PIERNO et al., 2006; YAMMOTO et al., 2004). Mais recentemente, foi descrito que as estatinas também podem aumentar o risco de incidência de diabetes em pacientes, corroborando ao que foi demonstrado previamente em modelos animais, em que as estatinas aumentam a resistência à insulina (NAPLES et al., 2008; RIDKER et al., 2012).

Ao contrário dos efeitos terapêuticos em modelos de dor neuropática relatados anteriormente, existem estudos pré-clínicos que também demonstram ausência de efeitos benéficos das estatinas, tanto *in vitro* quanto *in vivo* (MANN et al., 2010;

MURINSON et al., 2012). Também foi relatado que a sinvastatina tem efeitos deletérios no SNC, inibindo a remielinização das fibras no modelo experimental de esclerose múltipla induzida por cuprizona (MIRON et al., 2009). Além dos experimentos pré-clínicos, um grande número de estudos clínicos correlacionam que o longo tratamento com estatinas pode aumentar o risco de desenvolver neuropatia periférica e induzir efeitos neurotóxicos, porém que não são evidentes em baixas doses de algumas estatinas (abaixo de 10 mg) (BROWN, 2008; FERNANDEZ et al., 2011; GAIST et al., 2002; JEPPESEN et al., 1999; PHAN et al., 1995; ZIAJKA & WEHMEIER, 1998). E de maneira importante, recentemente o FDA relatou a importância da utilização com cautela da sinvastatina em maiores doses (40 e 80 mg) em pacientes que fazem uso crônico dessa estatina, visto o aumento do risco de desenvolvimento de dores neuropáticas (FDA, 2014).

Em linhas gerais, existe divergência na literatura a respeito dos reais efeitos das estatinas nas neuropatias periféricas. Desse modo, existe a necessidade de estudos experimentais específicos para avaliar as evidências conflitantes do efeito do tratamento crônico com baixas e altas doses de estatinas na neuropatia periférica, correlacionando com parâmetros sensoriais, motor e morfológico. Nesse sentido, a hipótese do presente estudo é investigar os efeitos conflitantes do tratamento com sinvastatina em baixa e alta dose, utilizando um modelo de neuropatia periférica, representado pelo esmagamento de nervo ciático em ratos, mimetizando a dor neuropática em pacientes com síndrome dolorosa complexa regional periférica, causada após lesões, cirurgias, fraturas ou traumas. O conhecimento dos reais efeitos das sinvastatina na dor neuropática é importante para explicar o comportamento dessa estatina frente a essa patologia e a discrepância encontrada na literatura até o momento, contribuindo dessa forma, com a elucidação dos efeitos da sinvastatina na neuropatia para a comunidade médico-científica.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o potencial efeito antinociceptivo do tratamento agudo com uma baixa (2 mg/kg) e alta (80 mg/kg) dose de sinvastatina na nocicepção química induzida pela formalina, bem como investigar as evidências conflitantes sobre o efeito do tratamento crônico com baixa e alta dose de sinvastatina em modelo de neuropatia periférica, representado pelo esmagamento de nervo ciático, avaliando parâmetros sensoriais (nocicepção), motor (função do nervo) e morfológico (mielinização dos nervos), comparando os efeitos com fármacos de referência, utilizando técnicas farmacológicas, bioquímicas e histológicas.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Investigar o efeito do tratamento agudo com uma dose baixa (2 mg/kg) e alta (80 mg/kg) de sinvastatina em modelo experimental de nocicepção química induzida pela formalina;

- Analisar o efeito do tratamento crônico com doses baixa e alta de sinvastatina na alodinia mecânica e ao frio em modelo de neuropatia periférica induzida pelo esmagamento de nervo ciático;

- Avaliar o efeito do tratamento crônico com doses baixa e alta de sinvastatina na função motora na neuropatia periférica;

- Avaliar o efeito do tratamento crônico com doses baixa e alta de sinvastatina no processo inflamatório relacionado a neuropatia;

- Analisar o efeito do tratamento crônico com doses baixa e alta de sinvastatina sobre a mielinização do nervo ciático após a lesão;

- Investigar o efeito do tratamento agudo com sinvastatina nas respostas nociceptivas induzidas pelo mevalonato em animais neuropático.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. DROGAS E REAGENTES

Para a execução dos protocolos experimentais foram utilizados: Sinvastatina (Zocor[®], Merck, São Paulo, Brasil), Gabapentina (Derma Formulações, Curitiba, Brasil), Quetamina, Xilasina (Syntec, São Paulo, Brasil), Peróxido de hidrogênio, etanol, ácido acético, formaldeído, sulfato de alumínio e potássio (Neon Reagentes, São Paulo, Brasil), Reagente de Bradford (Bio Rad, Hercules, CA, USA), Citrato de sódio, dimetilformamida (Merck Biosciences, Darmstadt, Alemanha), TMB (3,3,5,5'-tetrametilbenzidina), NAG (N-acetil-β-D glucosaminidase), albumina de soro bovino (BSA), paraplast, HTAB (Bromidrato de Hexadeciltrimetilamônio), morfina, azocarmin B, R-(-)-mevalonolactona (Sigma-Aldrich Co., St Louis, USA), Acetato de sódio, eosina amarelada, xilol, azul de anilina, fosfato de potássio monobásico, fosfato de potássio bibásico, cloreto de sódio (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil), Ácido pícrico (Labimpex, São Paulo, Brasil), Glicerina, glicina (Santa Cruz Biotechnology[®], EUA), Azul de anilina (Hoechst do Brasil, Novo Hamburgo, RS, Brasil), Permunt (Fisher Chemicals, Loughborough, Leicestershire, Reino Unido), Ácido fosfotúngstico (Anidrol, Diadema, São Paulo), Dimetilsulfóxido (DMSO) (Isofar, Duque de Caxias, RJ). As drogas utilizadas nos tratamentos (sinvastatina, gabapentina e morfina) foram trituradas e diluídas em salina (cloreto de sódio à 0,9%) e o mevalonato diluído em 10% de DMSO (solução à 5%) e 90% de salina.

3.2. ANIMAIS

Os experimentos foram conduzidos usando ratos machos da linhagem Wistar (190-210g) mantidos em 22 ± 2 °C sobre o ciclo claro escuro de 12 h e acesso livre a água e ração. Os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética de Experimentação Animal da Universidade Federal do Paraná sob o nº 661. Os estudos foram conduzidos em acordo com os "Princípios de Cuidados de Animais de Laboratório" (NIH, 2014) e com as diretrizes éticas para a investigação de dor experimental em animais conscientes de acordo com as normas da IASP (ZIMMERMANN, 1983). Os animais foram aclimatizados no laboratório por pelo menos 24 h antes dos testes e foram usados somente uma vez nos experimentos.

3.3. NOCICEPÇÃO INDUZIDA PELA FORMALINA E AVALIAÇÃO DE EDEMA DE PATA

Para avaliação da nocicepção induzida pela formalina, os animais foram colocados em funis de vidro pelo menos 15 min antes da injeção de formalina, ou até cessar todo o comportamento exploratório. Os animais foram tratados por via oral com veículo (salina, 1 ml/kg), sinvastatina (2 e 80 mg/kg) ou por via subcutânea com morfina (2 mg/kg), 1 h antes da injeção intraplantar de 50 µl de solução de formalina à 2,5% (0.92% formaldeído em salina) na pata traseira direita. Os animais foram observados em blocos de 0 a 5 min (primeira fase – fase neurogênica) e 25 a 60 min (segunda fase – fase inflamatória) e o número de *flinches* (levantar da pata) na pata injetada foi considerado como indicativo de nocicepção. Além disso, a espessura da pata (em mm) foi medida com o auxílio de um paquímetro (MT-045B, Shangai Metal Great Tools Co, Shangai, China) ao nível do metatarso da pata, antes da injeção (0), 1 e 3 h após a injeção de formalina, e o resultado foi expresso em diferença (Δ) da espessura da pata antes e após a injeção de formalina (em mm). O aumento na espessura da pata foi considerado indicativo de edema.

3.4. NEUROPATIA PERIFÉRICA INDUZIDA PELO ESMAGAMENTO DE NERVO CIÁTICO

Para o procedimento cirúrgico os animais foram anestesiados por via intraperitoneal com quetamina (50 mg/kg) e xilasina (10 mg/kg). Após a verificação do estado de consciência do animal, através do pinçamento da cauda e das pregas interdigitais, os animais foram posicionados do lado direito, efetuou-se a tricotomia da área a ser operada (coxa direita) e feita assepsia do local. Em seguida fez-se uma incisão, próximo ao trocânter maior do fêmur e a fossa poplítea, ao nível da inserção dos músculos ísquio-tibiais. Para exposição do nervo ciático, os músculos semitendinosos e reto femoral foram cuidadosamente divulsionados.

Com o auxílio de uma pinça hemostática não serrilhada (Fig. 6) realizou-se o esmagamento do nervo ciático por 30 s, apertando até o primeiro estágio da gramalheira da pinça, aproximadamente 10 mm da trifurcação do nervo ciático (MARTINS et al., 2011). Nos animais *sham* (falso operados), o mesmo procedimento cirúrgico foi realizado, porém sem esmagamento do nervo.

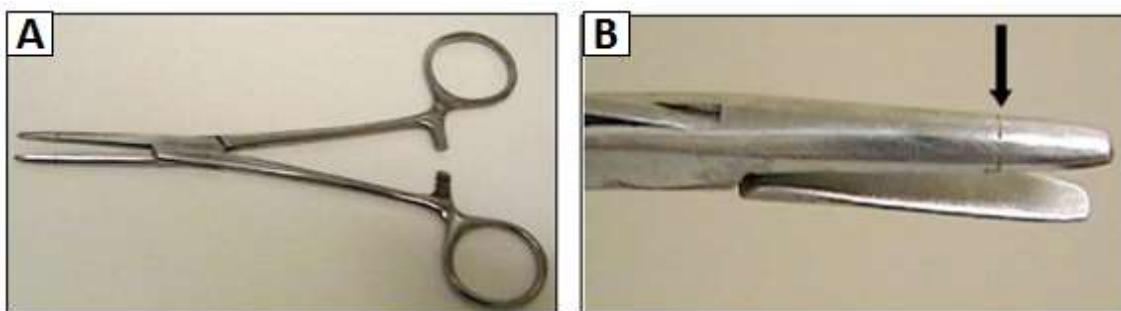


FIGURA 6: Pinça utilizada para realizar o esmagamento do nervo ciático. Modelo da pinça utilizada (A); a seta mostra o local para realizar o esmagamento, onde é mostrado o aspecto não serrilhado da pinça (B) (MARTINS, 2009).

Os tratamentos foram iniciados no 1º dia após a cirurgia com veículo (salina, 1 ml/kg), sinvastatina (2 e 80 mg/kg) ou gabapentina (controle positivo, 30 mg/kg), repetidamente durante 18 dias, e o peso corporal foi monitorado todos os dias.

3.4.1. Avaliação da alodinia mecânica

Para avaliações da alodinia mecânica e ao frio os animais foram alocados em caixas de acrílico individuais (18 cm × 11 cm × 20 cm) sobre uma tela, em uma plataforma elevada que permite o livre acesso a pata traseira do animal (Fig. 7). A alodinia mecânica foi avaliada utilizando monofilamentos de Von Frey usando o método up & down. Após os animais estarem ambientados ao aparato descrito anteriormente, uma série de oito monofilamentos calibrados para produzir forças de 0,4; 0,6; 1; 2; 4; 8; 15 e 26 g foram aplicados sob a pata traseira direita por 8 segundos ou até o animal apresentar uma resposta nociceptiva como retirada ou lambida da pata (Fig. 7). A avaliação foi iniciada com o filamento de 8 g. Na ausência de resposta, filamentos de força maior foram aplicados, consecutivamente, até a resposta de retirada da pata. Na presença de resposta, filamentos de força menor eram aplicados até a ausência de resposta nociceptiva. Entre as aplicações, foi mantido um intervalo de 2 min. Os filamentos foram aplicados 6 vezes e a sequência de resposta foi utilizada para o cálculo do 50% do limiar de retirada da pata (em g) utilizando a tabela de Chaplan e colaboradores (CHAPLAN et al., 1994) e a seguinte fórmula:

$$50\% \text{ do limiar} = \frac{10^{(x_f + k\delta)}}{10000}$$

Onde,

X_f = valor (em log) do último filamento de Von Frey utilizado

k = valor da sequência de respostas da tabela de Chaplan e colaboradores

δ = média da diferença de log entre os estímulos de Von Frey

As medidas de alodinia mecânica foram feitas antes da cirurgia (basal) e nos dias 3, 6, 12 e 18 após o esmagamento, avaliando-se por até 6 horas após os tratamentos. Uma diminuição no limiar de 50% de retirada da pata foi indicativo de alodinia mecânica (WERNER et al., 2007).

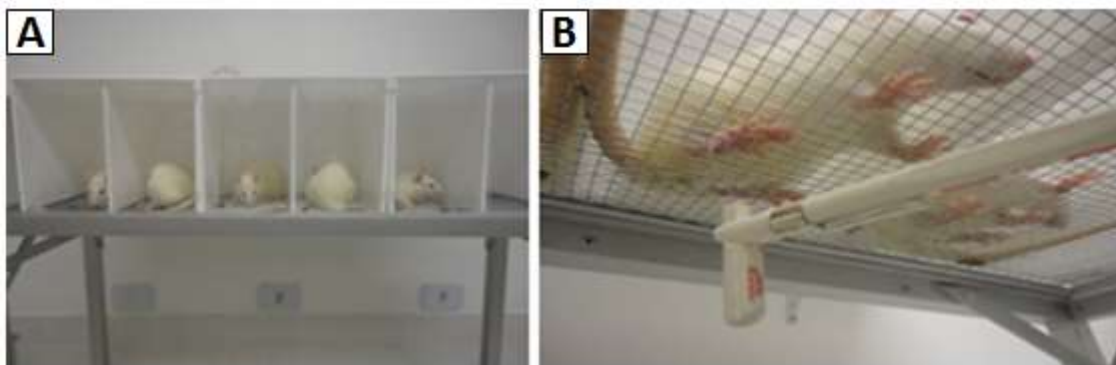


FIGURA 7: Suporte utilizado para avaliação de alodinia mecânica e ao frio (A). Aplicação de monofilamento de Von Frey sob a pata traseira direita (B).

3.4.2. Avaliação da alodinia ao frio

O procedimento utilizado foi semelhante ao descrito previamente (FLATTERS & BENNETT, 2004), com algumas modificações. Para realização da avaliação da alodinia ao frio, os animais foram acondicionados na mesma plataforma descrita anteriormente. Após os animais estarem ambientados, a alodinia ao frio foi medida através da instilação de 100 μ l de acetona sob a pata traseira direita (Fig. 8). A resposta foi avaliada durante 40 segundos e atribuído uma escala em escores de 0 a 3 de acordo com a resposta nociceptiva, sendo: 0, nenhuma resposta; 1, rápida retirada, chacoalhar da pata; 2, retirada da pata prolongada ou repetidos chacoalhar da pata; e 3, repetidos chacoalhar

da pata com lambida da pata. A acetona foi instilada três vezes sob a pata, com um intervalo de 5 minutos entre as instilações, e os escores individuais anotados até 40 segundos e somados após as três instilações. O escore mínimo foi 0 e o escore máximo possível considerado foi 9 (KUKAR *et al.* 2013). As medidas da alodinia ao frio foram feitas nos mesmos dias descrito na medida alodinia mecânica, e a instilação de acetona foi feita na 3ª hora após cada tratamento.

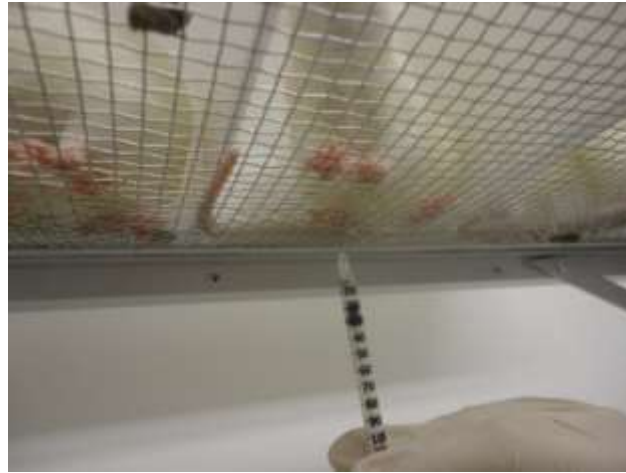


FIGURA 8: Instilação de acetona sob a pata para avaliação da alodinia ao frio.

3.4.3. Avaliação do Índice Funcional do Ciático (IFC) e Índice Estático do Ciático (IEC)

Para avaliação do IFC e IEC os animais foram colocados para caminhar em uma pista de marcha de madeira, com fundo de vidro, medindo 42 x 8,5 x 9 cm com uma caixa escura no final do corredor para induzir o animal a caminhar na direção da mesma, como descrito previamente (DE MEDINACELI, 1995) (Fig. 9).



FIGURA 9: Pista de marcha utilizada para obtenção de imagens para avaliação do índice funcional do ciático (IFC) e índice estático do ciático (IEC).

Abaixo da pista foi posicionado uma câmera da marca Sony Cyber-shot DSC-W35 a fim de filmar a caminhada dos animais. As imagens foram capturadas utilizando o programa Windows Movie Maker (Microsoft Windows, v. 2.0) enquanto o animal estava caminhando para a avaliação do índice funcional do ciático, e para cálculo do índice estático do ciático o animal foi mantido parado na pista para obtenção das imagens (Fig. 10).

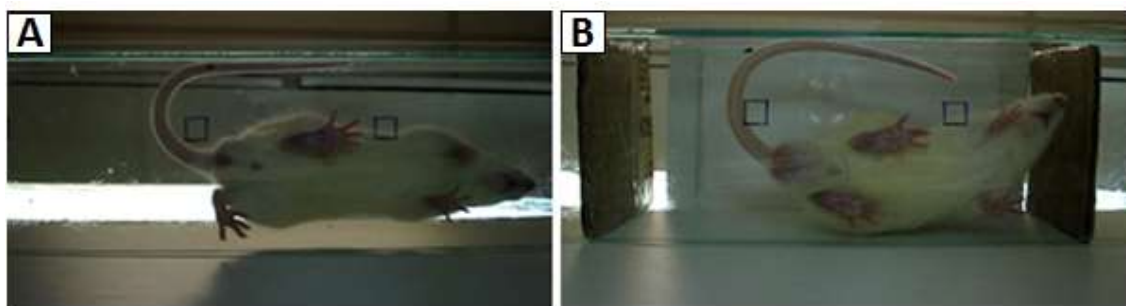


FIGURA 10: Imagens da vista inferior do animal. Durante a marcha (A), e em repouso (B).

As imagens foram analisadas através do software Image Pro Plus 6.0 (Media Cybernetics, Bethesda, MD, USA) utilizando os seguintes parâmetros: comprimento da pegada (PL); abertura total dos dedos, do 1º ao 5º (TS); abertura dos dedos

intermediários, do 2º ao 4º (IT); para o cálculo do IFC, e TS e IT para o cálculo do IEC (Fig. 11) (BAIN et al., 1989). Para ambos (IFC e IEC) foram capturadas imagens da pata experimental (EPL, ETS, EIT) e da pata normal (NPL, NTS, NIT).

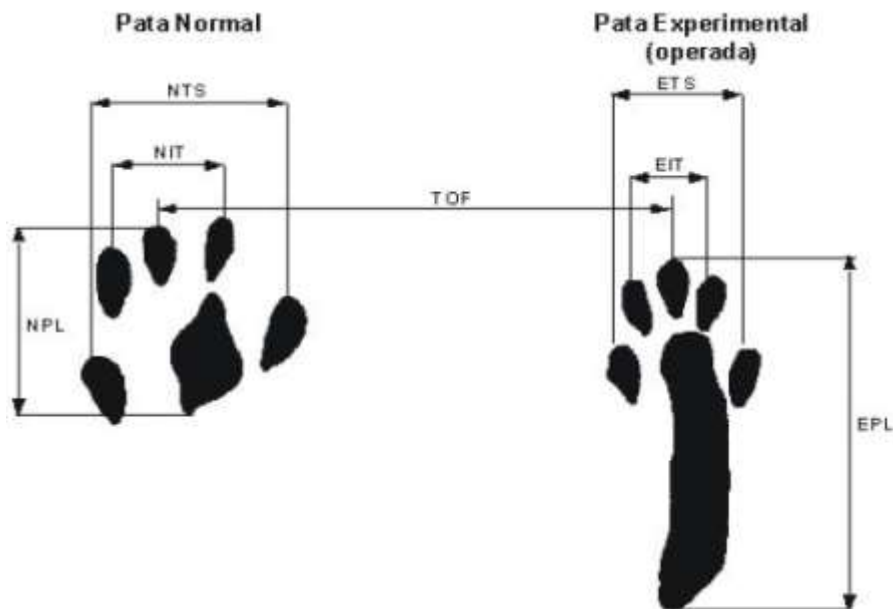


FIGURA 11: Representação esquemática dos parâmetros avaliados para cálculo do IFC e IEC da pata normal (N) e experimental (E). PL: comprimento da pata; TS: abertura total dos dedos (1º ao 5º); IT: abertura dos dedos intermediários (2º ao 4º) (RASO, 2002).

Os dados obtidos foram analisados através da equação abaixo desenvolvida por de Medinaceli (DE MEDINACELI et al., 1982) e adaptada por Bain (BAIN et al., 1989) e Hare (HARE et al., 1992).

$$IFC = - 38,3 \times \frac{(EPL - NPL)}{NPL} + 109,5 \times \frac{(ETS - NTS)}{NTS} + 13,3 \times \frac{(EIT - NIT)}{NIT} - 8,8$$

$$IEC = [(108,44 \times TSF) + (31,85 \times ITSF)] - 5,49$$

Valores correspondentes a 0 indicam uma função motora normal, e valores próximos ou iguais a -100 corresponde a total disfunção motora na pata experimental

(MARTINS et al., 2011). Cada imagem foi analisada por um único observador utilizando a média de três mensurações para cálculo do IFC e IEC. As avaliações do IFC e IEC foram feitas antes da cirurgia (basal) e nos dias 1, 3, 6, 12 e 18 após a lesão.

3.4.4. Análise histológica

Toda a técnica histológica foi realizada em colaboração com o Laboratório de Histotécnica Animal do Departamento de Ciências Morfológicas na Universidade Estadual de Maringá, pela doutoranda Stephanie Carvalho Borges, sob a supervisão da Prof^a Nilza Cristina Buttow.

Sabendo que as estatinas inibem a síntese de colesterol e este é um fator importante para a produção de bainha de mielina no nervo (MIRON et al., 2009) amostras de nervo ciático foram coletadas a fim de verificar se a sinvastatina poderia comprometer a morfologia do nervo após a lesão por esmagamento. Os animais foram eutanaziados no 6º dia e o nervo ciático direito (porção distal ao local da lesão) foi rapidamente coletado e submerso em solução fixadora de Bouin (solução saturada de ácido pícrico 70%, formaldeído 25% e ácido acético 5%). Após 24 h as amostras foram lavadas com álcool 70% até a remoção de toda a solução fixadora, e em seguida processadas pela técnica de rotina de inclusão de paraplast. Essa técnica consiste em mergulhar as amostras em soluções crescentes de graduação alcoólica, e em seguida em xilol, por determinado tempo, a fim de incluir o paraplast. O paraplast é uma mistura de parafina com polímeros plásticos e com dimetilsulfóxido, que permite melhor penetração e infiltração (aderência) ao tecido para facilitar a obtenção de cortes histológicos. Os passos seguidos para inclusão do paraplast foram:

Álcool 70% 45 min, Álcool 80% 45 min, Álcool 90% 45 min, Álcool 95% 45 min, Álcool 100% I 40 min, Álcool 100% II 40 min, Álcool/Xilol 30 min, Xilol I 15 min, Xilol II 5 min, Paraplast I 1 h, Paraplast II 2 h.

Após a inclusão em paraplast as amostras foram cortadas em micrótomo (Micrótomo Rotativo Leica Biosystems, RM 2125, São Paulo, Brasil) em 5 µm de espessura, esticadas em banho quente (37°C), colocadas em estufa por 24 h para que os cortes sejam aderidos a lâmina, e coradas seguindo a técnica de Tricrômico de Azan. Esta técnica permite corar bainha de mielina e citoplasma em róseo e tecido conjuntivo e fibras colágenas em azul. A etapa de coloração consiste em hidratar os cortes em solução decrescente de graduação alcoólica, por determinado tempo, para inclusão dos corantes que são hidrofílicos, e em seguida, desidratar os cortes em concentrações

crescentes de álcool e em seguida em xilol, para montagem em lâmina com a cola permount. A sequência e tempos de incubação foram:

Xilol I 10 min, Xilol II 10 min, Álcool 100% 1 min, Álcool 90% 1 min, Álcool 80% 1 min, Álcool 70% 1 min, Secagem em estufa 5 min, Água destilada 1 min, Azocarmin B 0,5% 10 min, Lavar em água destilada 10 s, Álcool 70% 5 min, Ácido fosfotúngstico 5% 10 min, Azul de anilina 2,5% 20 min, Água acética 1% 3 min, Álcool acético 1% 3 min, Álcool 80% 5 min, Álcool 90% 5 min, Álcool 100% 5 min, Álcool/Xilol 10 s, Xilol I 10 min, Xilol II 10 min.

Em seguida foram obtidas imagens através de um microscópio motorizado Axio Imager Z2 (Carl Zeiss, Jena, DE), equipado com um scanner automatizado VSlide (Metasystems, Altusheim, DE, v.2.0). As imagens foram importadas para o software Image Pro Plus para análises morfométricas, como medida da espessura da bainha de mielina (μm) e contagem do número de fibras (por mm^2) (Fig.12). Para obter esses parâmetros, foram obtidas 10 fotos de cada animal em diferentes campos, no aumento de 100x, e foi escolhida uma área representativa onde fosse possível contar 10 axônios mielinizados inteiros. Para obter o valor de cada animal foi feita uma média dos valores. Campos com dobras ou componentes do tecido mal preservado nos cortes histológicos foram excluídos (MARTINS et al., 2011). Todas as quantificações morfométricas foram feitas de maneira cega e por um único observador.

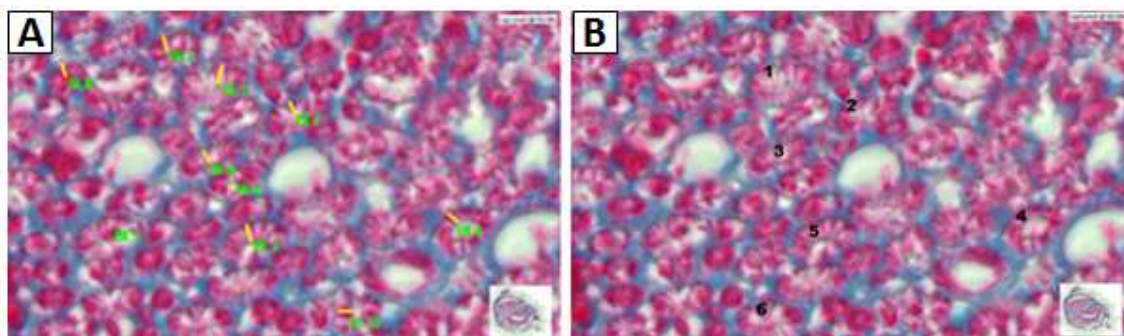


FIGURA 12: Representação das análises morfométricas de secções transversais de nervo ciático, exemplificando a medida da espessura da bainha de mielina (A) e contagem de fibras (B).

3.4.5. Determinação da concentração de proteína no nervo ciático

A concentração de proteína foi estimada de acordo com o método Bradford, usando albumina de soro bovino como padrão (1,0 – 0,01562 mg/ml) e realizadas de

acordo com a instrução do fabricante. Após os animais serem eutanaziados, o nervo ciático direito foi coletado e as amostras foram homogeneizadas com 1 ml de Tampão Fosfato [80 mM (98% fosfato de sódio monobásico e 2% de fosfato de sódio dibásico, p.H 6,5) e HTAB (Bromidrato de Hexadeciltrimetilamônio) à 0,5%, utilizando homogeneizador, e posteriormente centrifugadas (11000g por 20 min à 4°C) em microcentrífuga refrigerada de alta velocidade (5415 R – Eppendorf do Brasil, São Paulo, SP, BR). Em placa de 96 poços foi coletado, em duplicada, 5 µl do sobrenadante do homogenato e, posteriormente adicionado 250 µl de solução de Bradford (80% de água destilada e 20% de Reagente de Bradford) e a reação foi incubada a 37°C durante 30 min. A dosagem de proteína foi determinada espectrofotometricamente a 590nm, utilizando como padrão a concentração de albumina de soro bovino descrita anteriormente (BRADFORD, 1976).

3.4.6. Determinação da atividade da enzima Mieloperoxidase (MPO)

A MPO é uma enzima encontrada nos grânulos azurófilos de neutrófilos que migram para o local do estímulo inflamatório nas fases iniciais do processo inflamatório após a lesão, e é comumente utilizada como marcador indireto dessas células. Para avaliar a infiltração de neutrófilos, a atividade dessa enzima foi mensurada no nervo ciático dos ratos após 12 dias do esmagamento do nervo. O método realizado foi de acordo com o descrito por Bradley (BRADLEY et al., 1982) e modificado por De Young (DE YOUNG et al., 1989).

Conforme descrito anteriormente, a partir do homogenato centrifugado, o sobrenadante foi coletado (30 µl), em duplicata, em placa de 96 poços e adicionado 220 µl de uma solução reacional [100 µL de tampão fosfato 80 mM (p.H 6,5); 85 µL de tampão fosfato 22 mM (98% fosfato de sódio monobásico e 2% de fosfato de sódio dibásico, p.H 6,5); 15 µL de H₂O₂ 0,017%]. A reação foi iniciada com 3,3,5,5'-tetrametilbenzidina (TMB), incubada por 3 min a 37 °C, e interrompida pela adição de 30 µl de acetato de sódio 1,46 M (pH = 3,0) em cada poço. A atividade enzimática foi determinada em espectrofotômetro a 620 nm e os resultados foram expressos como unidade de densidade óptica (D.O) por mg de proteína.

3.4.7. Determinação da atividade da enzima N-acetilglucosaminidase (NAG)

A NAG é uma enzima presente em altos níveis em macrófagos ativados, e sua atividade é comumente utilizada como marcador de infiltração tardia de células

mononucleares no processo inflamatório, a fim de combater o dano no local da lesão. Para determinação da atividade da NAG, amostras de nervo ciático foram coletadas no 18º dia após a cirurgia e o método utilizado foi semelhante ao descrito por Bailey (BAILEY, 1988). A atividade da NAG é baseada na hidrólise do p-nitrofenil-N-acetil- β -D-glucosamina (substrato) em N-acetil- β -D-glucosamida liberando o p-nitrofenol. Para obtenção do sobrenadante foi realizado o mesmo procedimento descrito anteriormente. Sobre o sobrenadante (25 μ l), foi adicionado 25 μ l do substrato e a reação iniciada com 100 μ l de tampão citrato (5 mM, pH 4,5). Posteriormente, a reação foi incubada por 60 min à 37 °C e interrompida com 100 μ l de tampão glicina (200 mM, pH 10,4) em cada poço. A atividade da NAG foi determinada por espectrofotômetro a 405 nm e os resultados foram expressos em unidade de densidade óptica (D.O.)/mg de proteína.

3.4.8. Nocicepção induzida pelo mevalonato

Já foi demonstrado que a administração intratecal de mevalonato, composto produzido pela ativação da HMG-CoA redutase na biossíntese do colesterol, induz comportamentos nociceptivos (OHSAWA et al., 2008). A fim de determinar se o efeito antinociceptivo da sinvastatina está relacionado com a inibição da via do mevalonato, essa droga foi aplicada por via intraplantar. Primeiramente, doses crescentes de mevalonato (0.001, 0.01, 0.1, 1, 10 e 20 μ mol/50 μ l) ou veículo (DMSO + salina, 50 μ l) foram administrados pela via intraplantar na pata direita de ratos normais (não neuropáticos), a fim de verificar as respostas nociceptivas frente a essa droga e para identificar a dose que não tenha respostas nociceptivas significativas em animais normais para, posteriormente, ser aplicada em animais submetidos a neuropatia periférica, para avaliar se há sensibilização dos animais neuropáticos na dose escolhida e o se o tratamento com sinvastatina é capaz de reverter o efeito. Os animais foram observados por 30 min e o número de *flinches* foi considerado como indicativo de nocicepção. Posteriormente, os animais foram operados para indução de neuropatia, como descrito anteriormente. Somente no 6º dia após o esmagamento do nervo ciático, os animais foram tratados por via oral com sinvastatina (2 e 80 mg/kg) ou veículo (salina 1 ml/kg), ou por via subcutânea com morfina (2 mg/kg), 1 h antes da injeção de mevalonato (1 μ mol/50 μ l, i.pl.) ou veículo (DMSO + salina, 50 μ l, i.pl.) e o número de *flinches* foi contabilizado por 30 min.

3.5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram expressos com a média \pm erro padrão da média (E.P.M.) com 5-8 animais por grupo. Todos os dados foram submetidos ao teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov. Os dados que se apresentaram fora da normalidade e/ou para variáveis qualitativas foram transformados em logaritmo e submetidos a análise de variância (ANOVA) de duas vias seguida pelo pós-teste de Newman Keuls. Para os testes que apresentaram dados dentro do teste de normalidade e/ou variáveis quantitativas foi aplicado ANOVA de uma via seguida pelo pós-teste de Newman Keuls. Os dados foram analisados através do programa Statsoft Statistica (Statsoft Statistica Software, Oklahoma, EUA, v 7.0), e os gráficos foram construídos utilizando o software Graph Prisma (GraphPad Software, San Diego, EUA, v 5.0). Os valores de $p < 0,05$ foram considerados como indicativo de significância.

4. RESULTADOS

4.1. EFEITO DO TRATAMENTO COM SINVASTATINA NA NOCICEPÇÃO E EDEMA DE PATA INDUZIDO PELA FORMALINA

O tratamento agudo com sinvastatina nas doses de 2 e 80 mg/kg não reduziu a primeira fase da nocicepção induzida pela formalina, mas foi capaz de atenuar a segunda fase (fase inflamatória) em $50 \pm 9\%$ e $55 \pm 9\%$, respectivamente, quando comparado ao grupo veículo (516 ± 13 *flinches*). A morfina, opióide utilizado como controle positivo, foi capaz de reduzir as duas fases ($81 \pm 4\%$ e $99 \pm 0\%$, respectivamente) (Fig. 13A e 13B). Além das respostas nociceptivas, a injeção de formalina aumentou a espessura da pata em relação ao valor basal (3,60 mm) em $49 \pm 17\%$ e $47 \pm 12\%$ em 1 e 3 h, respectivamente, após a injeção de formalina no grupo controle (veículo), caracterizando o aparecimento de edema. No entanto, o tratamento com sinvastatina (2 e 80 mg/kg) não preveniu o aumento da espessura da pata em relação aos seus respectivos valores basal de 3,92 mm e 3,59 mm (na 1^a h: $37 \pm 8\%$ e $55 \pm 8\%$; na 3^a h: $45 \pm 7\%$ e $62 \pm 6\%$, respectivamente (Fig. 13C).

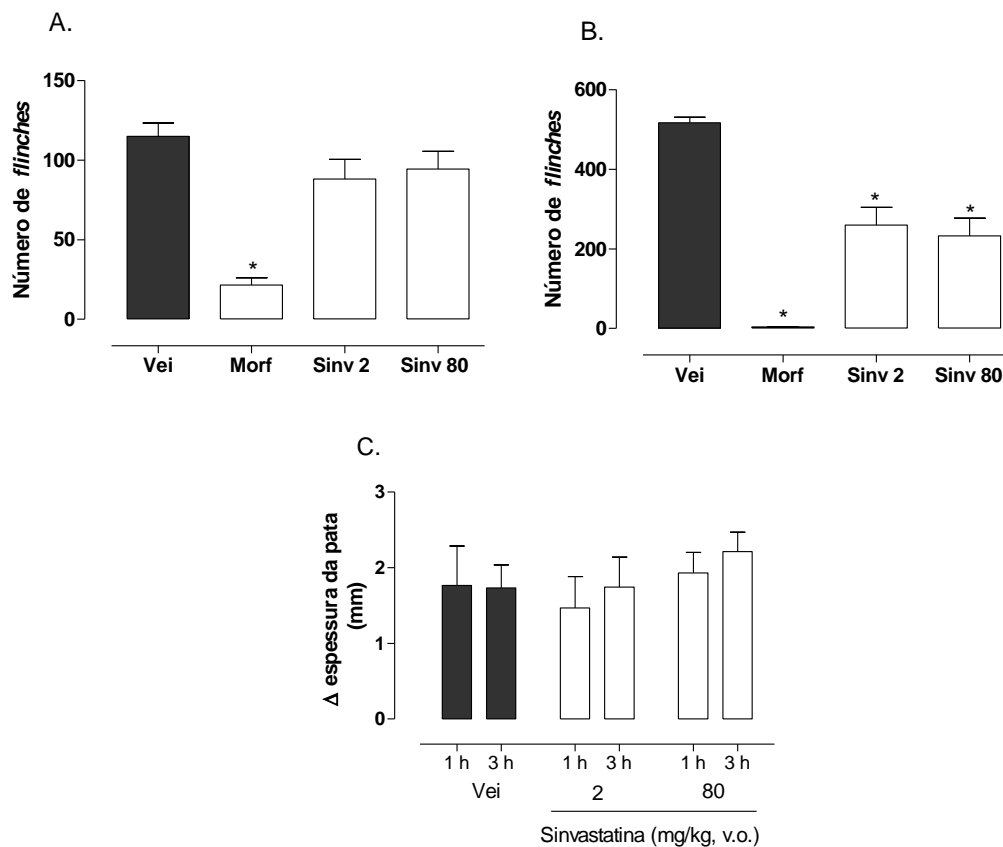


FIGURA 13: Efeito do tratamento com sinvastatina na fase neurogênica (A), inflamatória (B) e no edema de pata (C) na nocicepção induzida pela formalina. Os animais foram tratados com sinvastatina (2 e 80 mg/kg, v.o), morfina (2 mg/kg, s.c) ou veículo (salina 1 ml/kg, v.o) 1 h antes da injeção de formalina 2,5% (50 μ l/i.pl.). Os dados foram expressos como média \pm erro padrão da média (E.P.M.) com 5-8 animais por grupo. Asterisco denotam $p < 0.05$ quando comparado ao grupo controle (veículo) e ao edema de pata basal do grupo controle (veículo), respectivamente (ANOVA de uma via seguida pelo pós-teste de Newman-Keuls para o gráfico A e B, e ANOVA de duas vias seguida pelo pós-teste de Newman-Keuls para o gráfico C).

4.2. EFEITO DO TRATAMENTO COM SINVASTATINA NA NEUROPATIA PERIFÉRICA INDUZIDA PELO ESMAGAMENTO DE NERVO CIÁTICO

4.2.1. Efeito do tratamento com sinvastatina na alodinia mecânica

O esmagamento do nervo ciático induziu alodinia mecânica a partir do 3^a dia após a cirurgia, a qual manteve-se durante 18 dias, observada através da redução da

força correspondente a 50% de limiar de retirada da pata de 12 ± 2 g (respostas basais pré-cirurgia) para 3 ± 2 g (pós-cirurgia). O tratamento com gabapentina, utilizada como controle positivo, reduziu a alodinia mecânica durante todos os dias de avaliação (3^o ao 18^o dia) em $100 \pm 17\%$, $100 \pm 18\%$, $95 \pm 17\%$ e $100 \pm 27\%$, respectivamente, quando comparado ao grupo veículo (Fig. 14E). Relevante, o tratamento com sinvastatina diminuiu a alodinia mecânica nos dias 3, 6 e 12 após lesão do nervo. No 3^a dia após a lesão do nervo, a alodinia mecânica foi reduzida por até 6 horas pela sinvastatina 2 mg/kg e somente por 3 horas pela sinvastatina 80 mg/kg (na 3^a hora: 52 ± 14 e $66 \pm 20\%$, respectivamente) (Fig. 14A). No 6^o dia somente o tratamento com sinvastatina 2 mg/kg reduziu a alodinia mecânica por até 6 h (na 3^a hora: $75 \pm 16\%$) (Fig. 14B). No 12^a dia o tratamento com sinvastatina 2 mg/kg reduziu a alodinia mecânica na 3^a hora e na 4^a hora, e o tratamento com sinvastatina 80 mg/kg reduziu apenas a 3^a hora (na 3^a hora: $52 \pm 22\%$ e $53 \pm 23\%$, respectivamente) (Fig. 14C). E por fim, no 18^o dia, o tratamento com sinvastatina (2 e 80 mg/kg) reduziu a alodinia mecânica apenas na 1^a e na 4^a hora após o tratamento (Fig. 14D).

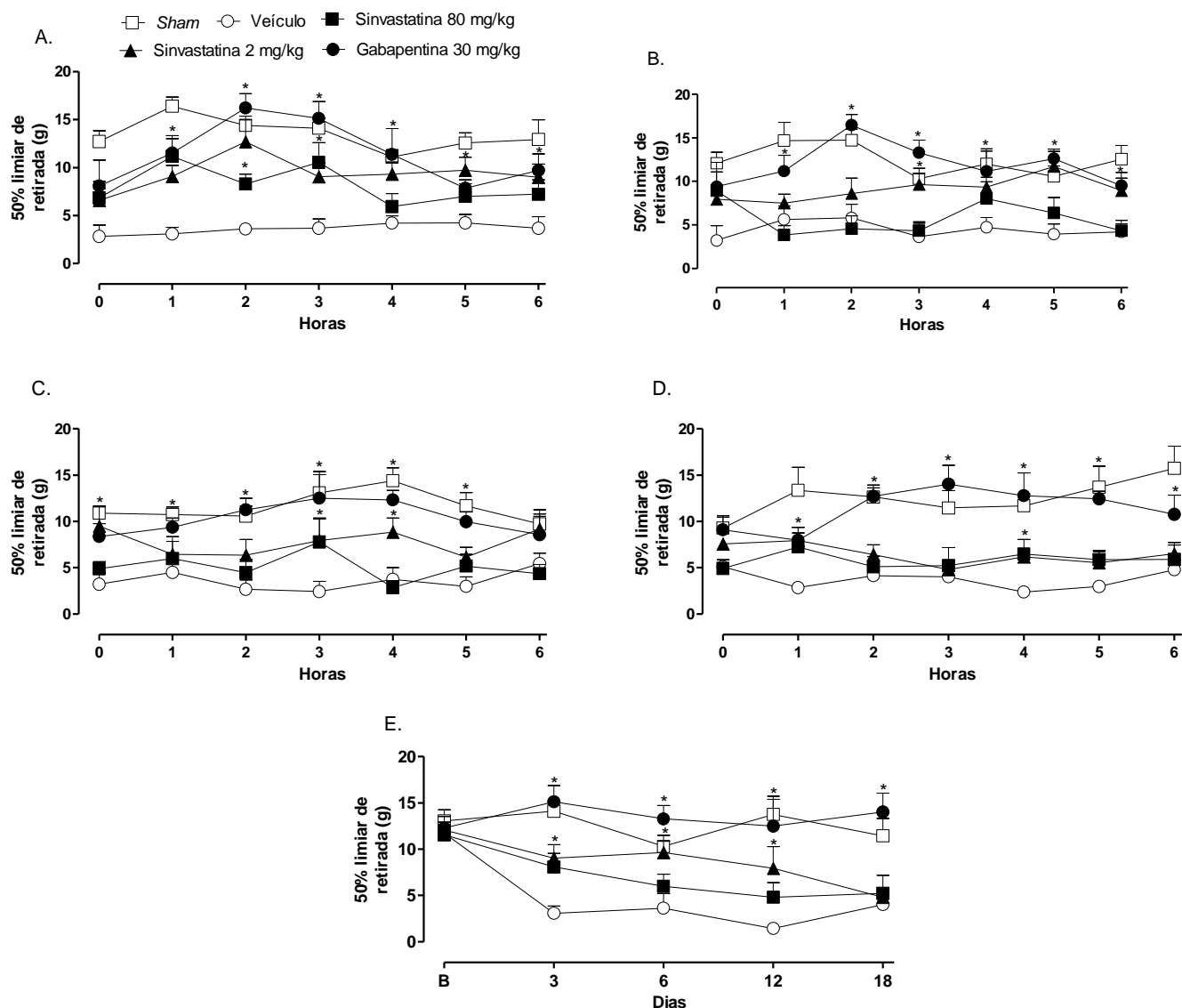


FIGURA 14: Efeito do tratamento com sinvastatina na alodinia mecânica no 3º dia após a lesão (A), 6º dia (B), 12º dia (C), 18º dia (D) e durante 18 dias na 3ª hora após o tratamento (E). Os dados representam 50% do limiar de retirada da pata traseira direita avaliada por monofilamentos calibrados com diferentes forças em gramas. Os animais foram tratados durante 18 dias com sinvastatina (2 e 80 mg/kg, v.o), gabapentina (30 mg/kg, v.o.) ou veículo (salina 1 ml/kg, v.o). Cada ponto da curva representa a média ± erro padrão da média (E.P.M.) com 5-8 animais por grupo. Asteriscos indicam $p < 0.05$ quando comparado com grupo controle (veículo) (ANOVA de duas vias seguida pelo pós-teste Newman Keuls).

4.2.2. Efeito do tratamento com sinvastatina na alodinia ao frio

Como ilustrado na fig. 15, o esmagamento do nervo ciático induziu um aumento pronunciado e sustentado no número de respostas nociceptivas induzido pela instilação de acetona na pata traseira direita, no grupo controle (veículo). Nos animais do grupo *sham* não houve alterações na resposta a esse estímulo, mantendo os valores basais pré-cirúrgicos. A alodinia ao frio foi bem evidente no 3º dia após lesão, aumentando as respostas (escores) no 6º dia (6 ± 1 e 8 ± 0 , respectivamente) no grupo veículo. No entanto, o tratamento com sinvastatina (2 e 80 mg/kg) e gabapentina não foi capaz de atenuar a alodinia ao frio induzida pela acetona (3º ao 18º dia) (Fig. 15).

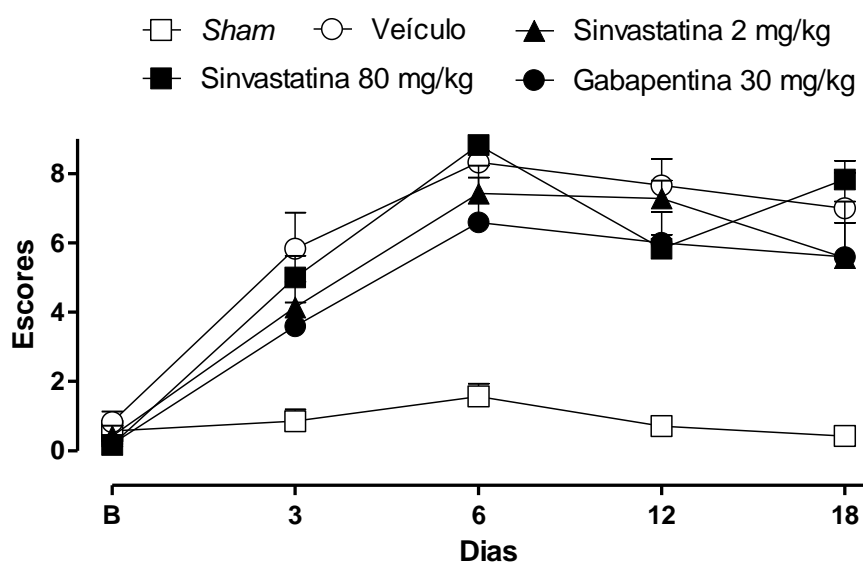


FIGURA 15: Efeito do tratamento com sinvastatina na alodinia ao frio induzido pela instilação de acetona sob a pata traseira direita durante 18 dias após esmagamento do nervo ciático. Os escores foram registrados como indicativo de resposta nociceptiva logo após a instilação de acetona sob a pata. Os animais foram tratados durante 18 dias com sinvastatina (2 e 80 mg/kg, v.o.), gabapentina (30 mg/kg, v.o.) ou veículo (salina 1 ml/kg, v.o.). Os dados foram expressos como média \pm erro padrão da média (E.P.M.) com 5-7 animais por grupo. (ANOVA de duas vias seguida pelo pós-teste de Newman Keuls).

4.2.3. Efeito do tratamento com sinvastatina no Índice Funcional do Ciático (IFC) e Índice Estático do Ciático (IEC)

O esmagamento do nervo ciático promoveu uma perda pronunciada na função motora, conforme demonstrado pelo índice funcional do ciático (IFC) e índice estático do ciático (IEC), desde o 1º dia até o 12º dia, mantendo os valores próximos a -100, demonstrando perda da função motora. Os animais *sham* demonstram função motora normal em ambos os índices avaliados, mantendo os valores próximos a 0. No entanto, não foi observado sinais de prejuízo no último dia, mostrando uma melhora *per se* nesses parâmetros. Curiosamente, tanto o tratamento com sinvastatina (2 e 80 mg/kg) quanto com gabapentina foram ineficazes em melhorar a função motora durante os dias avaliados (Fig. 16).

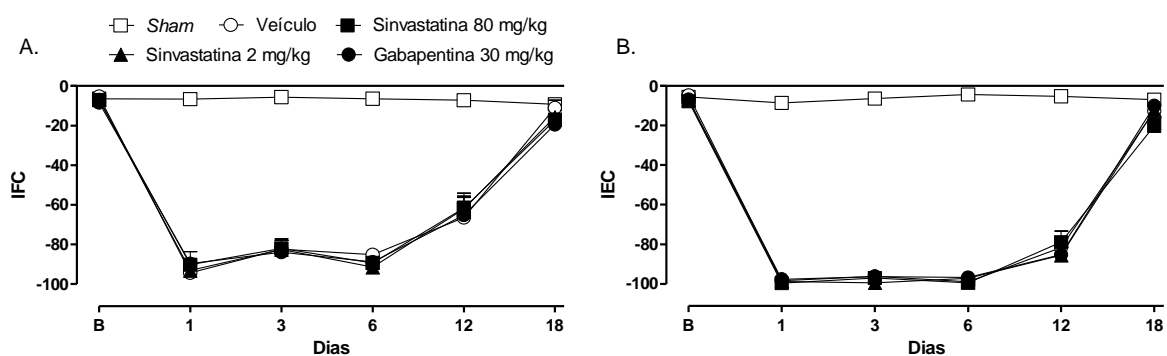


FIGURA 16: Efeito do tratamento com sinvastatina na função motora avaliada pelo índice funcional do ciático (IFC) no painel A e índice estático do ciático (IEC) no painel B, durante 18 dias. Os animais foram colocados em uma pista de caminhada e a imagem das passadas foi avaliada iniciando no 1º dia após a cirurgia, e mais quatro vezes durante todo o período. O tratamento foi semelhante ao descrito anteriormente. Cada ponto representa a média \pm erro padrão da média (E.P.M.) com 6-8 animais por grupo. (ANOVA de duas vias seguida pelo pós-teste de Newman Keuls)

4.2.4. Efeito do tratamento com sinvastatina na morfologia do nervo ciático

A análise histológica demonstrou que nos animais *sham* (Fig. 17A) há preservação da morfologia neural com bainha de mielina apresentando diâmetro e

espessura normal. No entanto, após a lesão no nervo ciático em animais tratados com veículo (Fig. 17B), foi observado degeneração neural e desmielinização, diminuição do diâmetro e da espessura da bainha de mielina (diminuição da espessura em $55 \pm 6\%$) e do número de fibras/mm² ($89 \pm 5\%$), e aumento do número de axônios com inchaço axonal, quando comparado com o grupo *sham*. Da mesma maneira, no grupo tratado com gabapentina (Fig. 17E) também é possível observar diminuição do diâmetro e da espessura da bainha de mielina, inchaço axonal e desmielinização das fibras. Contudo, no grupo dos animais tratados com sinvastatina 2 mg/kg (Fig. 17C) e 80 mg/kg (Fig. 17D) houve uma melhora desses parâmetros, pois foi verificado redução de axônios com inchaço axonal, preservação do diâmetro e da espessura da bainha de mielina (aumento da espessura em 24 e 19%, respectivamente) bem como preservação de fibras mielinizadas/mm² (55 e 58%, respectivamente) (Fig. 17 e 18).

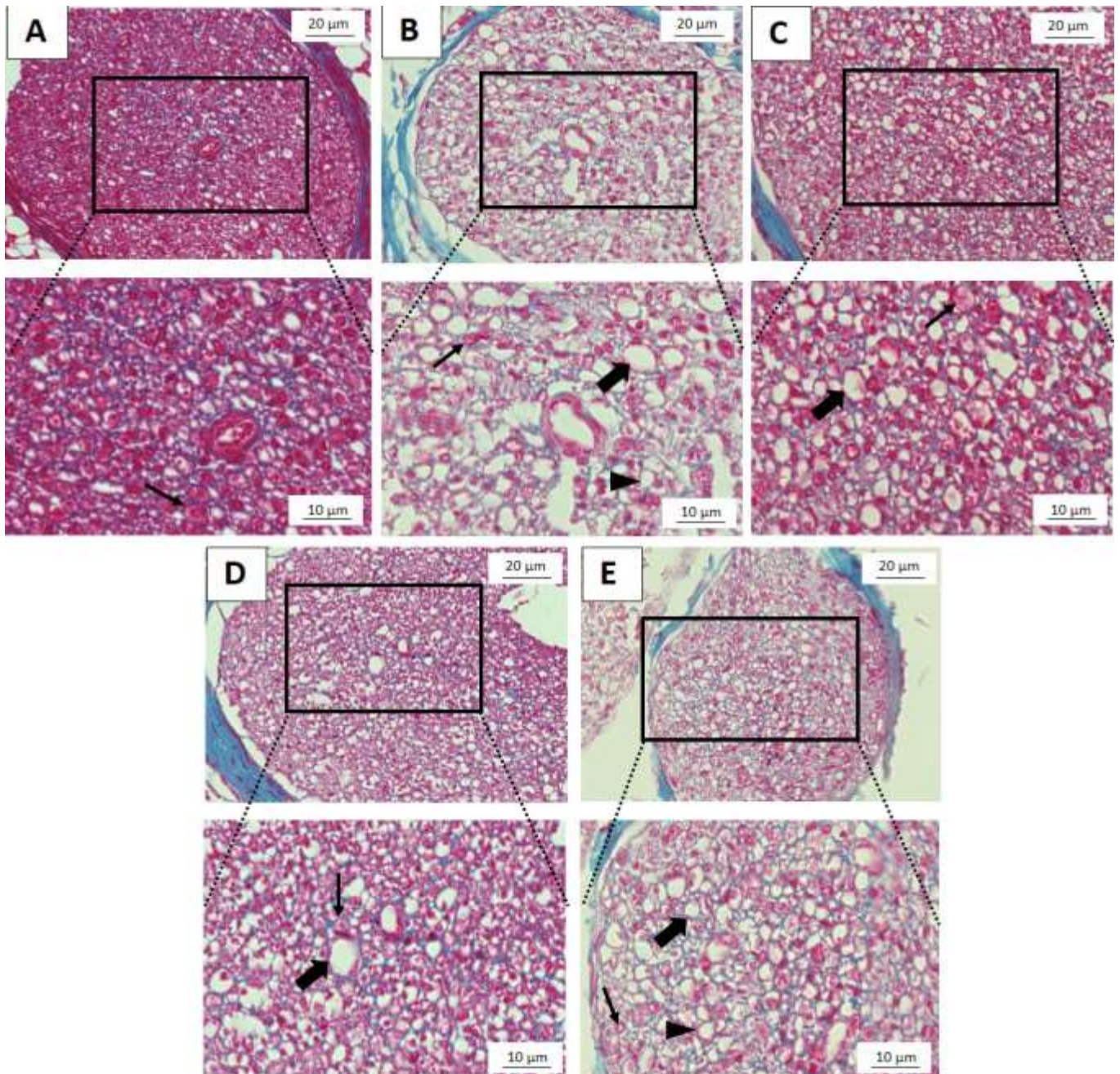


FIGURA 17: Imagens microscópicas obtidas de cortes transversais do nervo ciático 6 dias após lesão por esmagamento demonstrando morfologia neural de animais *sham* (Painel A), neuropático tratado com veículo (Painel B), neuropático tratado com simvastatina 2 mg/kg (Painel C), neuropático tratado com simvastatina 80 mg/kg (Painel D) e neuropático tratado com gabapentina 30 mg/kg (Painel E). Diâmetro da bainha de mielina (→). Inchaço axonal (➔). Desmielinização (▶). As amostras foram coradas em Tricrômico de Azan e observadas em microscópio óptico no aumento de 20x e 40x (barra de escala 20 µm e 10 µm, respectivamente).

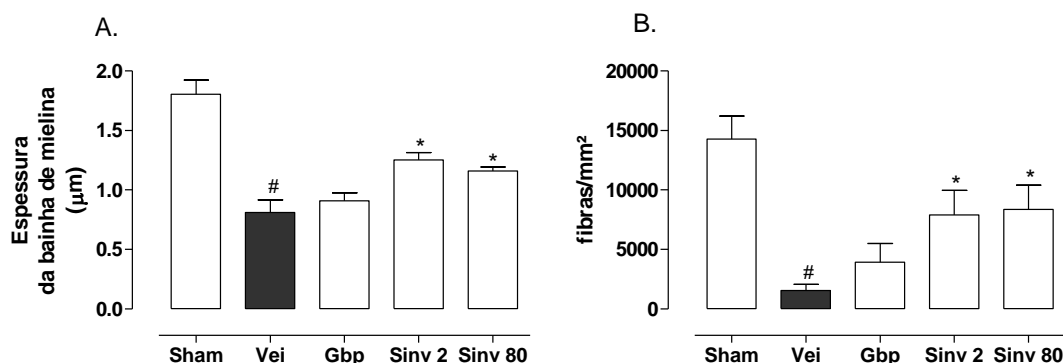


FIGURA 18: Análise quantitativa da recuperação morfológica do nervo ciático após lesão. O painel A mostra a espessura da bainha de mielina e o painel B, fibras/mm². Esses parâmetros foram avaliados 6 dias após a lesão, com o tratamento com sinvastatina (2 e 80 mg/kg, v.o), gabapentina (30 mg/kg, v.o.) ou veículo (salina 1 ml/kg, v.o). Os dados foram expressos com a média ± erro padrão da média (E.P.M.) com 4-5 animais por grupo. Asteriscos e cerquilha indicam p<0.05 quando comparados ao grupo controle (veículo) e ao grupo sham, respectivamente. (ANOVA de uma via seguido pelo pós-teste de Newman-Keuls).

4.2.5. Efeito do tratamento com sinvastatina na atividade das enzimas Mieloperoxidase (MPO) e N-acetilglucosaminidase (NAG)

A lesão induzida pelo esmagamento do nervo ciático resultou em um aumento da atividade da MPO e da NAG em $258 \pm 87\%$ e $147 \pm 37\%$, respectivamente, quando comparado aos animais *sham*. O tratamento com sinvastatina (2 e 80 mg/kg) após 12 dias, inibiu a atividade da MPO em $67 \pm 8\%$ e $56 \pm 7\%$, respectivamente, quando comparados com o grupo controle (veículo) (Fig. 19). Porém, não houve diminuição na atividade da enzima NAG pelo tratamento com sinvastatina (2 e 80 mg/kg). Da mesma forma, o tratamento com gabapentina não diminuiu os níveis da atividade da MPO e da NAG.

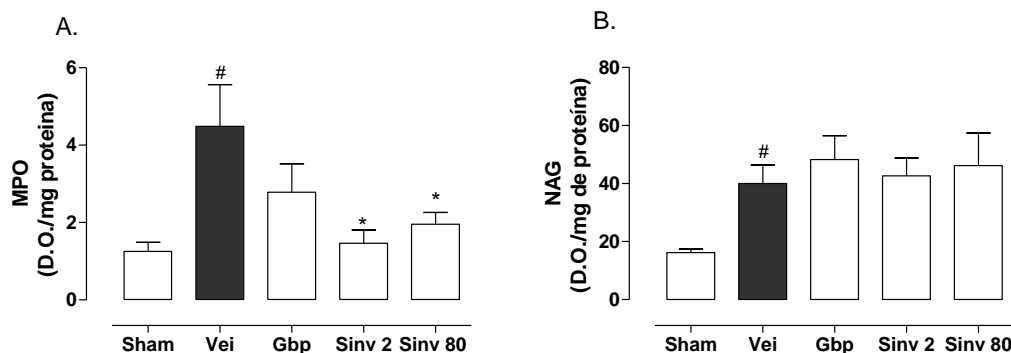


FIGURA 19: Efeito do tratamento com sinvastatina na atividade das enzimas mieloperoxidase (A, MPO, 12^o dia) e N-acetilglucosaminidase (B, NAG, 18^o dia) no nervo ciático. Durante todo o período os animais foram tratados com sinvastatina (2 e 80 mg/kg, v.o), gabapentina (30 mg/kg, v.o.) ou veículo (salina 1 ml/kg, v.o). Os dados foram expressos com a média \pm erro padrão da média (E.P.M.) com 5-6 animais por grupo. Asteriscos e cerquilha representam $p < 0.05$ quando comparado ao grupo controle (veículo) e ao grupo sham, respectivamente. (ANOVA de uma via seguido pelo pós-teste de Newman-Keuls).

4.2.6. Efeito do tratamento com sinvastatina no peso corporal

No monitoramento do peso corporal, observou-se que 10 dias após o esmagamento do nervo, o tratamento com sinvastatina 80 mg/kg reduziu significativamente o ganho de peso corporal (redução de 13%) quando comparado aos animais tratados com veículo. Não foram observadas diferenças nos grupos sinvastatina 2 mg/kg e gabapentina (Fig. 20).

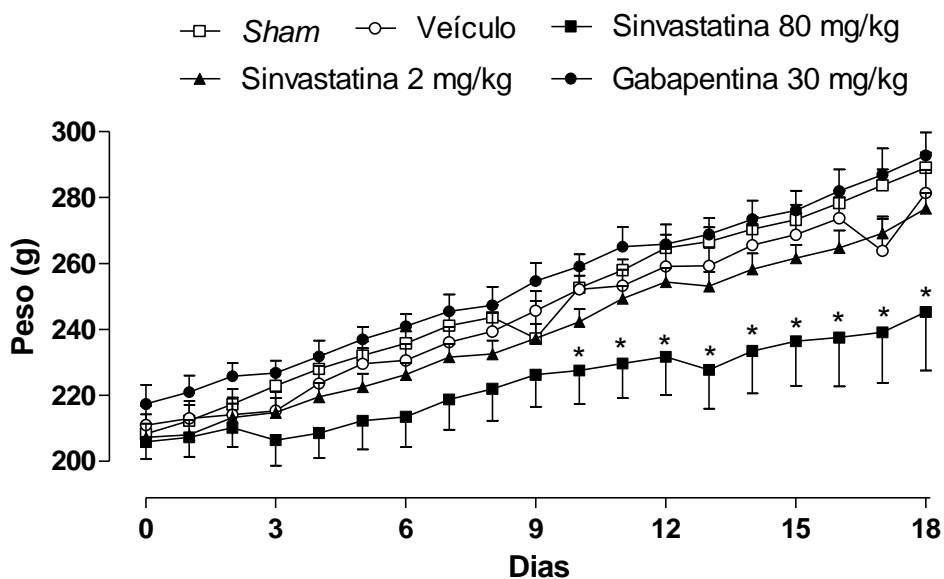


FIGURA 20: Efeito do tratamento com sinvastatina no peso corporal após o esmagamento do nervo ciático durante 18 dias. Os animais foram tratados com sinvastatina (2 e 80 mg/kg, v.o), gabapentina (30 mg/kg, v.o.) ou veículo (salina 1 ml/kg, v.o). Os dados foram expressos como média \pm erro padrão da média (E.P.M.) com 6-8 animais por grupo. Asteriscos indicam $p < 0.05$ quando comparado ao grupo controle (veículo) (ANOVA de duas vias seguida pelo pós-teste de Newman Keuls).

4.2.7. Efeito do tratamento com sinvastatina na nocicepção induzida pelo mevalonato

Em animais normais, a injeção intraplantar de veículo (DMSO + salina) não induziu comportamentos considerados como nociceptivos, uma vez que o número de *flinches* (levantar de pata) ficou em torno de 3 ± 1 eventos, durante os 30 min de observação. Por outro lado, a injeção intraplantar de mevalonato (0,001; 0,01; 0,1; 1; 10 e 20 $\mu\text{mol}/50 \mu\text{l}$), promoveu comportamentos nociceptivos em animais normais, aumentando o número de *flinches* em 21 ± 10 , 16 ± 8 , 14 ± 6 , 4 ± 2 , 12 ± 4 , 27 ± 4 , respectivamente. No entanto, com doses menores em relação à dose de 1 $\mu\text{mol}/50 \mu\text{l}$ ocorreu um aumento no comportamento nociceptivo, resultando em uma curva dose-resposta em forma de “U” (Fig. 21A). Como a dose de 1 $\mu\text{mol}/50 \mu\text{l}$ não promoveu respostas nociceptivas significativas em animais normais, foi a dose selecionada para a avaliação da sensibilização de animais neuropáticos frente a essa dose, e se o tratamento com sinvastatina é capaz de reverter o efeito. No 6º dia após o esmagamento do nervo ciático,

a injeção de mevalonato (1 $\mu\text{mol}/50 \mu\text{l}$, i.pl.) aumentou o número de *flinches* em $154 \pm 35\%$ comparado com o grupo que recebeu veículo (valor basal: 28 ± 6 *flinches*; salina v.o. e DMSO + salina i.pl.). A morfina, utilizada como controle positivo, diminuiu o número de *flinches* em $88 \pm 2\%$ e o tratamento com sinvastatina 80 mg/kg diminuiu o número de *flinches* em $38 \pm 5\%$, quando comparado aos animais que receberam injeção intraplantar de mevalonato e foram pré tratados por via oral com veículo (salina). No entanto, o tratamento com sinvastatina 2 mg/kg não diminuiu a nocicepção induzida pelo mevalonato (Fig. 21B).

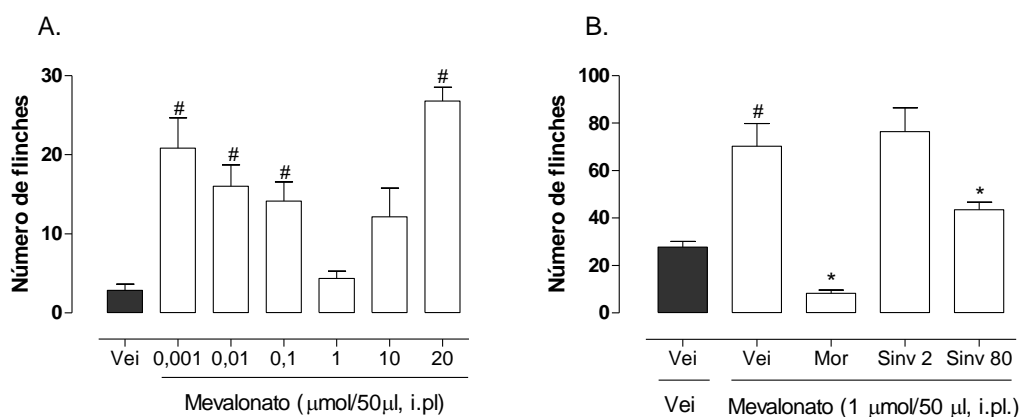


FIGURA 21: Curva dose-resposta da nocicepção induzida pela injeção de mevalonato (i.pl.) em animais não neuropáticos (painel A), e efeito do tratamento com sinvastatina na nocicepção induzida pelo mevalonato 6 dias após o esmagamento do nervo ciático (painel B). Seis dias após a cirurgia, os animais foram tratados uma única vez com sinvastatina (2 e 80 mg/kg, v.o.), veículo (1 ml/kg, v.o.) ou morfina (2 mg/kg, s.c.), 1 h antes da injeção de mevalonato (1 $\mu\text{mol}/50\mu\text{l}$ /pata) ou veículo (DMSO + salina, 50 μl /pata). Os dados foram expressos com a média \pm erro padrão da média (E.P.M.) com 5-7 animais por grupo. Asteriscos e cerquilha indicam $p < 0.05$ quando comparado aos grupos veículo (v.o.) + mevalonato (i.pl.) e veículo (v.o.) + veículo (i.pl.), respectivamente. (ANOVA de uma via seguido pelo pós-teste de Newman Keuls).

5. DISCUSSÃO

A extensa procura dos pesquisadores por novos agentes terapêuticos para aliviar a dor neuropática tem revelado o potencial das estatinas. Há evidências crescentes de estudos pré-clínicos, que indicam que as estatinas potencialmente diminuem a dor neuropática e possuem efeito neuroprotetor, tanto em doses baixas quanto em doses mais elevadas. Porém, existem estudos clínicos que sugerem que as estatinas estão associadas com o desenvolvimento de dor neuropática e com efeitos deletérios aos neurônios, principalmente em doses elevadas (BHALLA et al., 2014; FDA, 2014). Dessa forma, este estudo avaliou os efeitos do tratamento crônico com uma dose baixa (2 mg/kg) e uma elevada (80 mg/kg) de sinvastatina sobre as funções sensoriais e motoras, bem como sobre parâmetros morfológicos, usando um modelo experimental de neuropatia periférica em ratos, representado pelo esmagamento do nervo ciático, para tentar esclarecer os efeitos da sinvastatina neste modelo.

Inicialmente, para avaliar se as doses escolhidas (2 e 80 mg/kg) para o estudo apresentam algum efeito antinociceptivo, os animais foram submetidos ao teste da formalina. O primeiro resultado obtido no presente estudo confirmou os efeitos antinociceptivos produzidos pela sinvastatina na dor induzida pela formalina em ratos. O tratamento agudo com sinvastatina nas doses de 2 e 80 mg/kg reduziu a segunda fase, relacionada ao componente inflamatório no modelo da formalina. Nossos dados estão de acordo com outros estudos da literatura, que também demonstraram que tanto a sinvastatina (1 – 300 mg/kg, v.o.) quanto a atorvastatina (3 - 100 mg/kg, v.o.) foram capazes de reduzir a segunda fase da formalina (GARCIA et al., 2011; MIRANDA et al., 2011), e a sinvastatina administrada pelas vias intraperitoneal (20 e 40 mg/kg) ou intratecal (5 e 50 nmol) em camundongo, também inibiu a segunda fase no teste da formalina (OHSAWA et al., 2008; OHSAWA et al., 2012). A formalina é uma substância química clássica utilizada como modelo de dor, e que possibilita o estudo de edema associado a resposta inflamatória. Considerando os possíveis mecanismos de ação envolvidos no efeito antinociceptivo da sinvastatina na segunda fase do teste da formalina, foi demonstrada a inibição da ativação de micróglia, da PK ativada por mitógeno p38 e da ativação/liberação de mediadores inflamatórios incluindo IL-1 β , IL-6, TNF- α e da enzima óxido nítrico sintase induzida (iNOS) (CHEN et al., 2013; FERRO et al., 2000). Ainda nos parâmetros inflamatórios, foi demonstrado que o tratamento agudo oral com sinvastatina (40 mg/kg) e atorvastatina (10 mg/kg) inibiu o edema de pata induzido pela carragenina (JAISWAL & SONTAKKE, 2012). Entretanto, nós não observamos o efeito antiedematogênico do tratamento com sinvastatina no edema de

pata induzido pela formalina. Uma possível explicação para essa aparente discrepância pode estar relacionada as diferentes substâncias utilizadas para a indução do edema (carragenina x formalina), ou ainda, as diferentes doses de sinvastatina empregadas em nosso estudo. No entanto, considerando que assim como o fármaco controle (morfina), a sinvastatina promoveu um efeito antinociceptivo, prosseguimos a investigação sobre os efeitos da sinvastatina no modelo de neuropatia periférica.

Foi notável que o modelo de esmagamento do nervo ciático em nossos experimentos induziu alodinia mecânica, alodinia ao frio e prejuízo na função motora na pata ipsilateral dos ratos tratados com veículo. Tanto a alodinia mecânica como ao frio foram observadas desde o terceiro dia até o ultimo dia de avaliação do estudo (décimo oitavo dia). Nossos resultados mostraram que o tratamento com sinvastatina de 2 mg/kg reduziu a alodinia mecânica do 3º ao 12ª dia, sendo que o efeito antialodínico manteve-se até a 6ª hora de avaliação no 3º e 6º dia. Da mesma maneira, Shi e colaboradores (SHI et al., 2011) também mostraram efeitos benéficos com doses maiores de sinvastatina (10 e 20 mg/kg, v.o.) após a ligadura parcial do nervo ciático em camundongos. Entretanto, em nossas condições experimentais, a maior dose (80 mg/kg) de sinvastatina não apresentou efeito antialodínico mais pronunciado ou duradouro quando comparado com a menor dose. Outro dado importante é que o tratamento diário com as duas doses de sinvastatina não mantiveram o efeito antialodínico mecânico até o último dia de avaliação. Conforme citado anteriormente, um estudo mostrou que o tratamento oral diário com sinvastatina (10 e 20 mg/kg) em camundongos após a lesão do nervo, reduziu a sensibilidade mecânica por 14 dias (SHI et al., 2011). Essa diferença entre os resultados pode ser explicada pelo diferente modelo experimental de neuropatia periférica utilizado (ligadura parcial de nervo ciático x esmagamento de nervo ciático) e modelo animal (camundongos x ratos). Contudo, nosso estudo evidenciou que a atividade antialodínica da sinvastatina foi um pouco mais evidente e duradoura com a dose de 2 mg/kg quando comparada a dose de 80 mg/kg, embora não tenha sido encontrado diferenças estatísticas significativas entre as doses. Estudos prévios também documentaram melhor eficácia com doses menores de estatinas, como a rosuvastatina e atorvastatina (10 e 3 mg/kg, respectivamente) em relação a maiores doses (20 e 30 mg/kg, respectivamente) em aliviar a dor neuropática após lesão periférica de nervo (ligadura parcial e constrição crônica de nervo ciático, respectivamente) (PATHAK et al., 2013; SHI et al., 2011). Analisando a angiogênese, também foi observado que doses menores de estatinas foram mais eficazes em induzir proliferação, migração e diferenciação celular *in vitro* e *in vivo* em um modelo de angiogênese tumoral (WEIS et al., 2002).

Com relação as características farmacocinéticas, tem sido reportado que estatinas hidrofílicas aliviam melhor a dor neuropática quando comparadas a estatinas hidrofóbicas, através da inibição hepática da HMG-CoA redutase, levando a redução de dos metabólitos intermediários da via do mevalonato. Além disso, sabe-se que a rosuvastatina (uma estatina hidrofílica) é mais potente em inibir a enzima HMG-CoA redutase com uma concentração inibitória de 50% de cerca de 17 vezes maior que a sinvastatina (estatina lipofílica). Além disso, essa estatina possui parcialmente metabolismo de primeira passagem, mantendo a sua biodisponibilidade um pouco maior em relação a estatinas que sofrem total metabolismo de primeira passagem (SHI et al., 2011; SIRTORI, 2014). A sinvastatina é uma pró-droga na forma de lactona, hidrofóbica, com meia vida curta e possui total metabolismo de primeira passagem (FUKAMI et al., 1993; SHI et al., 2011; SIRTORI, 2014; WU et al., 2008). De fato, as propriedades hidrofóbicas da sinvastatina e a diminuição da biodisponibilidade desse fármaco devido ao metabolismo de primeira passagem podem explicar, em parte, por que o efeito antialodínico não foi mantido até o último dia de avaliação da alodinia mecânica na dor neuropática, bem como porque a maior dose não apresentou efeitos antialodínicos mais duradouro após o esmagamento de nervo.

A alodinia ao frio também é um dos sintomas comuns que caracterizam a dor neuropática. Em nosso modelo, como mencionado anteriormente, foi possível observar aumento da sensibilidade ao frio, caracterizado por alodinia ao frio, logo após a cirurgia, mantendo-se durante todo o período de avaliação nos animais tratados com veículo. Nossos dados demonstraram que ambas as doses de sinvastatina (2 e 80 mg/kg) não tiveram nenhum efeito antialodínico ao frio durante os dias observados. Da mesma maneira, foi demonstrado que tanto o tratamento com sinvastatina quanto com atorvastatina (10, 30 e 100 mg/kg) não foi capaz de diminuir a alodinia ao frio no modelo de neuropatia induzida pela oxiplatina em camundongos (OHSAWA et al., 2014). É possível especular que cada tipo de alodinia (mecânico e frio) recruta mecanismos diferentes para detecção e transmissão do estímulo nociceptivo e não nocivo até o SNC em animais sensibilizados, e que a sinvastatina impede a detecção e/ou transmissão de estímulos mecânico e não de estímulos não nocivos ao frio, e por isso essa estatina demonstrou efeitos antialodínicos mecânicos mas não teve nenhum efeito antialodínico ao frio. Entretanto, esse mecanismo e a hipótese sugerida ainda necessita ser melhor elucidada.

Um dado importante foi a constatação de que o tratamento prolongado com a maior dose de sinvastatina não piorou o quadro de dor neuropática já instalado, avaliado pela alodinia mecânica e ao frio, ao contrário do que se relatada que maiores doses de sinvastatina podem desenvolver dor neuropática (FDA, 2014). Além disso, apesar dos

parâmetros relacionados a toxicidade muscular não terem sido avaliados, a única diferença entre os animais tratados com a baixa e a alta dose de sinvastatina foi a diminuição do ganho de peso, a qual foi evidente nos animais tratados com sinvastatina 80 mg/kg.

Muitos estudos demonstraram que a gabapentina, um anticonvulsivante comumente utilizado para o tratamento da dor neuropática em pacientes, quando administrada por via intraperitoneal em roedores apresenta, da mesma forma, excelentes efeitos antialodínicos na dor neuropática (ALLCHORNE et al., 2012; AMIN & HOSSEINZADEH, 2012; GUNDUZ et al., 2011; KUKKAR et al., 2013; MA et al., 2011). Inicialmente, nós utilizamos a mesma via para administração desse anticonvulsivante em nossos experimentos, diluindo esse fármaco em salina (cloreto de sódio à 0,9%) estéril. Porém, mesmo utilizando a dose de 30 mg/kg, nós observamos que por essa via os animais tinham sintomas de depressão do SNC (sonolência, pêlo eriçado e arqueamento da cauda), além de causar contorções abdominais, após a injeção, caracterizando dor visceral (pH da solução 6,0). Dessa maneira, optou-se em continuar os experimentos administrando a gabapentina por via oral, excluindo esses efeitos. Dados da literatura comprovam que o tratamento crônico com gabapentina (10 e 30 mg/kg) por via oral atenuou a alodinia mecânica após lesão por constrição crônica no nervo ciático (GREGOIRE et al., 2012) mas não teve nenhum efeito na alodinia ao frio (teste da acetona) induzido pela oxiplatina (10, 30 e 100 mg/kg, v.o.) (OHSAWA et al., 2014). De maneira semelhante, nossos resultados mostraram um significativo efeito antialodínico mecânico da gabapentina por até 18 dias após o esmagamento do nervo ciático, mas nenhum efeito foi observado na alodinia ao frio induzido pela acetona.

Além da dor que surge como consequência da lesão do nervo, a função motora também é prejudicada/interrompida após o esmagamento do nervo, devido a diminuição de impulsos nervosos aos tecidos subjacentes ao local da lesão, por degeneração neural (PELLEGRINO & FRANZINI, 1963). Nossos resultados mostraram que ambos os tratamentos, sinvastatina e gabapentina, não tiveram efeito em melhorar a função motora após o esmagamento do nervo ciático, controverso com que foi documentado anteriormente, que o tratamento com estatinas (sinvastatina, 20 mg/kg, i.p. por 21 dias e atorvastatina, 5 mg/kg, v.o., por 7 dias) melhorou a função motora após a lesão (PAN et al., 2010; XAVIER et al., 2012). Entretanto, foi notável que não há disfunção motora no último dia avaliado (18º dia), mostrando uma melhora *per se* em animais lesionados. Na mesma direção, foi demonstrado que no modelo de esmagamento de nervo ciático os animais recuperam a função motora *per se* entre 14 e 28 dias após a lesão (MARTINS et al., 2011; PAN et al., 2010). Sabe-se que diminuição da função motora está relacionada com a diminuição dos impulsos nervosos nas fibras lesadas até a periferia,

e os fármacos utilizados como analgésicos nessas condições, não recuperam a fibra lesada, diminuindo somente a transmissão e/ou detecção da informação nociceptiva até o SNC. Dessa maneira, sugere-se que os efeitos antialodínicos da sinvastatina e da gabapentina não parecem estar correlacionados com a melhora da função motora avaliada por esses testes, ou ainda, que estes efeitos antialodínicos não sejam suficientes para melhorar a função motora.

Com relação a morfologia neural após o esmagamento do nervo, nossos resultados mostraram que o tratamento com sinvastatina (2 e 80 mg/kg) preservou, em parte, a morfologia do nervo ciático após 6 dias da lesão, preservando a espessura da bainha de mielina e o número de fibras mielinizadas/mm² quando comparado aos animais lesionados que receberam apenas veículo. Após a lesão, é possível observar no grupo controle (veículo) degeneração Walleriana observando-se degeneração neural com desmielinização, diminuição do diâmetro e da espessura da bainha de mielina, inchaço axonal e, conseqüentemente, diminuição no número de fibras mielinizadas. Foi possível notar que o tratamento com sinvastatina em ambas as doses preservaram esses parâmetros morfológicos. Da mesma maneira, estudos também revelaram uma preservação da morfologia do nervo ciático com o tratamento com sinvastatina (20 mg/kg, i.p.) em 21 dias após a lesão (XAVIER et al., 2012). Pode-se sugerir que um dos prováveis mecanismos responsáveis pelo efeito neuroprotetor da sinvastatina, seja um efeito anti-inflamatório, diminuindo o processo inflamatório envolvido na degeneração Walleriana, preservando a morfologia do nervo. No entanto, mais estudos são necessários para comprovar tal hipótese. Ademais, esse estudo clarificou os efeitos conflitantes na literatura a respeito do efeito da sinvastatina na morfologia do nervo, contribuindo em confirmar que a sinvastatina tem efeitos benéficos na morfologia do nervo após uma lesão traumática, embora dados da literatura indiquem que a inibição da síntese de colesterol pode prejudicar a função do nervo (mielinização, crescimento axonal e formação de sinapses, entre outros) e contribuir para o desenvolvimento de neuropatias (BHALLA et al., 2014). Neste caso, a inibição da síntese de colesterol pelo tratamento com sinvastatina parece não estar envolvido nos processos de degeneração/recuperação da morfologia neural, demonstrando ser um efeito neuroprotetor independente da produção de colesterol. Entretanto, o tratamento com gabapentina não preservou a morfologia do nervo, controverso com estudos prévios que mostraram que a gabapentina (100 mg/kg) induz regeneração neural após a constrição crônica do nervo ciático em três dias de tratamento (ARCOS et al., 2013). Com base nesses achados, podemos sugerir que baixas doses de sinvastatina poderiam ser utilizadas como coadjuvante com a gabapentina para tratamento da dor neuropática

causada por lesão de nervos, visto que além de possuir efeitos antialodínicos, a sinvastatina apresenta um efeito neuroprotetor adicional em comparação a gabapentina.

Com relação a função motora e melhora da morfologia do nervo, tem sido relatado que uma boa remielinização neural pode estar acompanhada de uma baixa performance funcional (DE MEDINACELI, 1995), que é consistente com nossos resultados que mostraram que ambas as doses de sinvastatina, apesar de terem apresentado efeitos neuroprotetores, não melhoraram a função motora. Ou ainda, os efeitos neuroprotetores de ambas as doses podem ter sido insuficientes para melhorar a função motora avaliada pelos índices do ciático.

De acordo com alguns estudos prévios sobre as estatinas na mielinização neural, tem-se demonstrado efeitos duais, representados tanto por regeneração como por degeneração neural, em diferentes modelos experimentais. No modelo de lesão de medula espinhal em ratos, a administração de uma dose baixa de atorvastatina (5 mg/kg, v.o.) durante 7 dias reduziu parâmetros como perda neuronal, destruição axonal e desmielinização (PANNU et al., 2007). Além disso, baixas doses de sinvastatina (0,5 ou 1 mg/kg), administradas oralmente por 14 dias, também melhoraram a sobrevivência neuronal no modelo de lesão traumática cerebral em ratos (MAHMOOD et al., 2009). Ainda em relação a sinvastatina em menor dose (1 mg/kg), porém administrada por via intravenosa, esta também foi capaz de exibir efeitos neuroprotetores no modelo de lesão de nervo por isquemia e reperfusão (GHOLAMI et al., 2008). Tem sido relatado que em modelos de neuropatia diabética induzida por estreptozotocina, a rosuvastatina também mostrou melhorar a função do nervo, agindo nas fibras de pequeno e largo diâmetro melhorando a condutividade, além de diminuir a hiperalgesia térmica em ratos (CAMERON et al., 2003). Existem ainda evidências dos efeitos benéficos das estatinas em estudos clínicos em pacientes com diabetes mellitus tipo 2, com diagnóstico de alta sensibilidade e especificidade para polineuropatia distal simétrica. Tanto o tratamento com estatinas quanto com fibratos preveniu contra o desenvolvimento de neuropatia sensorial periférica e que esses efeitos benéficos parecem ser independentes do efeito do metabolismo de lipoproteínas das estatinas (DAVIS et al., 2008). Desse modo, as estatinas ganharam interesse como potenciais drogas para o tratamento de doenças envolvendo lesões traumáticas, incluindo lesão de nervos, além dos seus indiscutíveis efeitos na terapia de redução de colesterol. Entretanto, os efeitos benéficos ainda necessitam ser melhores avaliados em humanos para confirmar a relevância clínica.

Por outro lado, usando o modelo de desmielinização induzida por cuprizona em camundongos, a fim de mimetizar a esclerose múltipla, o tratamento prolongado (~21 dias) com sinvastatina (2 mg/kg) administrado por via intraperitoneal, bloqueou a diferenciação de células progenitoras para células maduras, inibindo a remielinização

no SNC (MIRON et al., 2009). Além disso, estudos recentes *in vitro* em cultura de neurônios e células de Schwann mostraram que o tratamento com fluvastatina por 7 dias resultou em perda de neurônios motores espinhais de maneira dose dependente, e que ainda, a administração de sinvastatina em altas doses mostrou ser tóxica a essas células, o que pode explicar em parte a exacerbação de doenças neuromusculares nos pacientes em tratamento com estatinas (MURINSON et al., 2012). Em relação aos estudos clínicos, existe um grande número de evidências que correlacionam que o tratamento crônico com estatinas em pacientes, pode aumentar o risco de desenvolver neuropatia periférica e induzir efeitos neurotóxicos, porém que não são evidentes em baixas doses (BROWN, 2008; FERNANDEZ et al., 2011; GAIST et al., 2002; JEPPESEN et al., 1999; PHAN et al., 1995; ZIAJKA & WEHMEIER, 1998). Na mesma direção, é sugerido que pacientes que fazem uso de sinvastatina em doses altas (40 e 80 mg) podem aumentar o risco de desenvolver neuropatias periféricas (FDA, 2014; WEST et al., 2014).

Nesse propósito, considerando o aspecto sensorial, o tratamento com as duas doses de sinvastatina não exacerbaram a alodinia mecânica nos animais com lesão no ciático. Contudo, não podemos aferir se o mesmo tratamento com a sinvastatina poderia causar comportamentos nociceptivos nos animais, uma vez que não avaliamos este efeito *per se*.

Após a lesão de nervos periféricos ou lesão de tecidos, ocorre liberação de mediadores inflamatórios por células teciduais que infiltram no local da lesão. A MPO é encontrada nos grânulos azurófilos de neutrófilos, uma célula inflamatória, e é comumente usada como marcador indireto de tecido contendo neutrófilos que migram no sítio da lesão na fase inicial da inflamação (CAMARA et al., 2013). De fato, os resultados obtidos revelaram um aumento da infiltração de neutrófilos, determinado pelo aumento da enzima MPO, 12 dias após a lesão no nervo ciático, em animais tratados com veículo. Contudo, foi possível observar que ambas as doses de sinvastatina reduziram a infiltração de neutrófilos no local da lesão, sugerindo um possível efeito anti-inflamatório dessa estatina. Também tem sido reportado uma redução na atividade da MPO com o tratamento intraperitoneal de sinvastatina (5 mg/kg) após lesão por reperfusão isquêmica (ZHAO et al., 2014). Contudo, a gabapentina não reduziu esse parâmetro inflamatório. Por outro lado, células mononucleares são células de infiltração mais tardia nos processos inflamatórios, e podem ser quantificadas mensurando a atividade da enzima lisossomal N-acetilglucosaminidase (NAG), presente em altos níveis em macrófagos ativados (BAILEY, 1988). Neste caso, ambos os tratamentos (sinvastatina e gabapentina) não diminuíram os níveis da NAG no 18º dia após o esmagamento do ciático. Em experimentos *in vitro* de Aikawa e colaboradores (AIKAWA

et al., 2001) foi demonstrado que a cerivastatina foi capaz de reduzir a proliferação de macrófagos no tecido aórtico. O mecanismo sob o qual ocorre essa redução pode ser através da modulação da atividade do fator nuclear kB (NF-kB) e prenilação de pequenas proteínas sinalizadoras Rho (CHASE et al., 2002; IKEDA et al., 2000; WONG et al., 2001). Contudo, apesar da cerivastatina apresentar efeito em diminuir a proliferação de macrófagos, esse mecanismo pode não estar correlacionado com a capacidade de infiltração dessas células no nervo ciático.

Sabe-se que no processo de degeneração Walleriana, células teciduais como macrófagos e leucócitos infiltram no local da lesão, e juntamente com as células de Schwann participam do processo de degeneração axonal. Os macrófagos e as células de Schwann expressam em suas membranas citocinas e os leucócitos que migram para o local da lesão iniciam o processo inflamatório (BHALLA et al., 2014). Nesse sentido, nós observamos que a sinvastatina inibiu a migração neutrofílica (célula leucocitária) no local da lesão, o que pode nos sugerir, mais uma vez, que o efeito neuroprotetor da sinvastatina seja, de fato, um efeito anti-inflamatório, reduzindo o processo inflamatório na degeneração Walleriana.

Até o momento, nosso conjunto de dados mostra que o tratamento crônico com a sinvastatina, nas doses de 2 e 80 mg/kg, promoveu um efeito antinociceptivo no teste da formalina, efeito antialodínico frente a estimulação mecânica, preservação da morfologia neural e redução da infiltração de neutrófilos, o que sugerem que em nosso estudo, os efeitos benéficos observados podem estar correlacionados ao efeito anti-inflamatório desta estatina. Embora este estudo não tenha avaliado os níveis de citocinas no nervo dos animais neuropáticos, existem vários estudos em animais experimentais que sugerem que as estatinas são capazes de atenuar a dor neuropática por mecanismos independentes da redução do colesterol (BHALLA et al., 2014; CHU et al., 2012; GHOLAMI et al., 2008; SHI et al., 2011; XAVIER et al., 2012).

Dentre os mecanismos propostos, as estatinas podem aumentar a expressão da eNOS (óxido nítrico sintase endotelial) visando aumentar a perfusão neural e inibir a atividade da iNOS, reduzindo a resposta inflamatória (CAMERON et al., 2003; CHU et al., 2012; LI et al., 2005). Adicionalmente, através da redução da ativação de células gliais como micróglia e astrócitos, as estatinas diminuem a liberação de citocinas, corroborando na redução da excitabilidade neuronal (LUO et al., 1996; MILLIGAN & WATKINS, 2009). Mais ainda, a redução da liberação de espécies reativas de oxigênio, juntamente com a inibição da liberação de mediadores inflamatórios derivados de leucócitos tem sido implicados na preservação do dano neural (BHALLA et al., 2014; HOLTHUSEN & ARNDT, 1995)

No entanto, o mecanismo de ação clássico dessa classe de fármacos consiste em inibir a enzima HMG-CoA redutase, reduzindo a formação endógena de mevalonato e seus derivados. Ohsawa e colaboradores (OHSAWA et al., 2008) observaram que a injeção intratecal de mevalonato em camundongos induziu hiperalgesia térmica ao calor, e sugeriram que o mevalonato é capaz de sensibilizar a transmissão nociceptiva a nível espinhal. De fato, em ratos não operados, demonstramos, pela primeira vez, que a injeção intraplantar de mevalonato também foi capaz de induzir comportamentos nociceptivos, o que reforça a hipótese de que o mevalonato, os metabólitos ou proteínas isopreniladas derivadas desta via enzimática, são importantes na modulação nociceptiva.

Porém, de maneira intrigante, nós observamos que doses crescentes do mevalonato em animais normais, induziu curva dose-resposta em forma de “U” em relação ao número de *flinches*. A medida que as doses de mevalonato aumentam até a dose de 1 $\mu\text{mol}/50 \mu\text{l}$, o efeito nociceptivo é diminuído alcançando o fundo da curva em U. A medida que a dose aumenta, o efeito nociceptivo aumenta também, aumentando as respostas, resultando na subida da curva novamente. Estudos recentes demonstraram que um dos primeiros metabólitos da via do mevalonato, o isopentenil-PP, inibe TRPV3 e TRPA1 em cultura de células de rim, neurônios sensoriais e queratinócitos (BANG et al., 2011; OHSAWA et al., 2008). Dessa maneira, dentre os possíveis mecanismos para o efeito hipernociceptivo descendente até a dose de 1 $\mu\text{mol}/50 \mu\text{l}$, podemos sugerir que a produção desse metabólito com efeito antinociceptivo esteja diminuindo as respostas nociceptivas nos animais. Entretanto, foi documentado que a forma isômera do isopentenil-PP, o dimetilalil-PP induziu respostas nociceptivas através da ativação do TRPV4, e o metabólito seguinte ao geranyl-PP, o farnesil-PP, induziu comportamentos nociceptivos e ativou o TRPV3 em cultura de queratinócitos (BANG et al., 2010, 2012). Dessa forma, nós hipotetizamos que o mevalonato em doses superiores a 1 $\mu\text{mol}/50 \mu\text{l}$ pode aumentar a produção de metabólitos que favorecem a nocicepção, aumentando os comportamentos nociceptivos em animais normais. No entanto, para confirmar essas hipóteses seriam necessários novos estudos inibindo as enzimas envolvidas, a mevalonato pirofosfato decarboxilase e farnesil pirofosfato sintase que produzem seus respectivos metabólitos, o isopentenil-PP e o farnesil-PP, para observar se há ou não reversão das respostas observadas.

De maneira semelhante, em animais neuropáticos, a injeção intraplantar de mevalonato induziu respostas nociceptivas significativamente maiores quando comparado aos animais normais, indicando sensibilização dos animais frente a dose de 1 $\mu\text{mol}/50 \mu\text{l}$. Apesar de ser reconhecido que a neuroplasticidade associada a lesão de nervos aumenta e facilita a transmissão nociceptiva, até o presente momento não é

possível explicar como o mevalonato endógeno ou exógeno estaria atuando para exacerbar a dor neuropática. No entanto, como mencionado anteriormente, estudos recentes demonstraram que metabólitos do mevalonato podem atuar como moduladores de receptores TRPs, o que pode contribuir para a manutenção da dor.

Vários estudos utilizam a incubação de estatinas com ou sem o mevalonato para investigar se a inibição da enzima HMG-CoA redutase é a responsável pelos efeitos observados. Em cultura primária de neurônios de córtex de rato, a atorvastatina preveniu a neurotoxicidade e morte neuronal induzida por glutamato, sendo que este efeito não foi revertido pelo mevalonato, indicando que o efeito protetor da estatina é independente da clássica inibição enzimática (BOSEL et al., 2005). Ainda levando em consideração o envolvimento da via do mevalonato no mecanismo antinociceptivo das estatinas, Ohsawa e colaboradores (OHSAWA et al., 2012) observaram que o efeito antinociceptivo da sinvastatina na segunda fase do teste da formalina foi revertido pela co-administração intratecal de mevalonato. O mesmo grupo também demonstrou que na neuropatia diabética induzida por estreptozotocina em camundongos, os efeitos anti-hiperalgésico ao calor e anti-alodínico mecânico promovido pelo tratamento intraperitoneal com sinvastatina (20 mg/kg), foram revertidos pelo tratamento com mevalonato (30 mg/kg, i.p.), relacionando o efeito analgésico da sinvastatina na neuropatia diabética ao mecanismo de ação clássico deste fármaco (OHSAWA et al., 2011). Curiosamente, nos animais neuropáticos do nosso estudo, a menor dose de sinvastatina (2 mg/kg) não reduziu a nocicepção induzida pelo mevalonato, enquanto que a maior dose (80 mg/kg) promoveu o efeito antinociceptivo. Neste contexto, podemos sugerir que a sinvastatina pode exercer seus efeitos antinociceptivos de maneira dependente (dose menor) e/ou independente (dose maior) da inibição da enzima HMG-CoA redutase (ou da via do mevalonato), dependendo da dose empregada. Contudo, mais estudos são necessários para comprovar a importância da via do mevalonato no desenvolvimento e manutenção de quadros dolorosos.

Os resultados do presente trabalho demonstram que a sinvastatina apresenta efeitos antialodínicos mecânico, concomitante com a preservação da morfologia do nervo ciático e diminuição da atividade neutrofílica. Além disso, sugere-se que os efeitos antialodínicos da menor dose da sinvastatina seja dependente da via do mevalonato, enquanto que a maior dose parece ter seus efeitos analgésicos independente da via. Contudo, considerando o efeito antialodínico, a sinvastatina tem um efeito menos sustentado e evidente quando comparado a gabapentina, uma das terapias padrão para o tratamento da dor neuropática.

6. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos demonstraram que:

- ✓ A sinvastatina em ambas doses (2 e 80 mg/kg) reduziram a fase inflamatória da nocicepção induzida pela formalina;
- ✓ O tratamento com sinvastatina na menor dose (2 mg/kg) apresentou efeitos antialodínicos mecânico, reduzindo a sensibilidade mecânica até o 12º dia após a lesão do nervo ciático;
- ✓ O tratamento com a maior dose de sinvastatina (80 mg/kg) reduziu a alodinia mecânica somente no 3º dia após a lesão do nervo ciático;
- ✓ Os tratamento com sinvastatina (2 e 80 mg/kg) ou gabapentina não diminuíram a alodinia ao frio no modelo de neuropatia periférica;
- ✓ Os tratamento com sinvastatina (2 e 80 mg/kg) ou gabapentina não promoveram a melhora da função motora após a lesão do nervo ciático;
- ✓ O tratamento com sinvastatina (2 e 80 mg/kg) preservou a morfologia do nervo ciático (espessura da bainha de mielina e o número de fibras/mm²) após 6 dias da lesão por esmagamento, porém a gabapentina não teve efeito neuroprotetor;
- ✓ O tratamento com sinvastatina (2 e 80 mg/kg) reduziu a infiltração de neutrófilos no 12º dia após a lesão do nervo ciático, mas não reduziu a infiltração de macrófagos no 18º dia após a lesão;
- ✓ O tratamento agudo com sinvastatina 80 mg/kg reduziu a nocicepção induzida pelo mevalonato, porém a menor dose não apresentou nenhum efeito.

Em conjunto, esses resultados contribuíram em clarificar os efeitos da sinvastatina na dor neuropática, mostrando que a sinvastatina tem efeitos benéficos, reduzindo a alodinia mecânica, porém apenas a menor dose apresentou efeitos antialodínicos mais duradouros. De maneira importante, apesar da sinvastatina não melhorar a função motora, nós confirmamos que essa estatina preservou a morfologia do nervo após lesão. Além disso, nossos estudos sugerem que sinvastatina tem efeitos anti-inflamatórios, reduzindo a dor inflamatória induzida pela formalina e inibindo a infiltração de neutrófilos após esmagamento do nervo ciático, e que esse efeito anti-inflamatório da sinvastatina pode estar relacionado com o efeito neuroprotetor e antialodínico da sinvastatina na neuropatia periférica. Ademais, a nocicepção induzida pelo mevalonato nos indica que o bloqueio da síntese do mevalonato endógeno, de seus metabólitos intermediários e/ou de proteínas prenilhadas sejam responsáveis pelos efeitos analgésicos da menor dose da sinvastatina (dependente da via do mevalonato), e que a maior dose parece ter seus efeitos antialodínicos independente da via do mevalonato. Na mesma direção, não foi observado agravamento dos parâmetros sensoriais na dor neuropática com a maior dose, indicando que essa dose parece não contribuir para o desenvolvimento de neuropatias. No entanto, é possível observar que os efeitos antilodínicos da gabapentina, tratamento usualmente utilizado para a dor neuropática, são mais proeminentes que as doses de sinvastatina empregadas. Assim sendo, é possível indicar que um tratamento coadjuvante com a menor dose da sinvastatina e a gabapentina, possa obter mais efeitos benéficos, produzindo melhores efeitos antialodínicos, além de preservar a morfologia neural pelo tratamento com sinvastatina. Porém, mais estudos são necessários para investigar esses efeitos e para elucidar o mecanismo analgésico e anti-inflamatório da sinvastatina, bem como a investigação da importância da via do mevalonato no desenvolvimento e manutenção de quadros dolorosos.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AIKAWA, M.; RABKIN, E.; SUGIYAMA, S.; VOGLIC, S. J.; FUKUMOTO, Y.; FURUKAWA, Y.; SHIOMI, M.; SCHOEN, F. J., & LIBBY, P. An HMG-CoA reductase inhibitor, cerivastatin, suppresses growth of macrophages expressing matrix metalloproteinases and tissue factor in vivo and in vitro. **Circulation**. v. 103, n. 2, p. 276-283, 2001
- ALLCHORNE, A. J.; GOODING, H. L.; MITCHELL, R., & FLEETWOOD-WALKER, S. M. A novel model of combined neuropathic and inflammatory pain displaying long-lasting allodynia and spontaneous pain-like behaviour. **Neurosci Res**. v. 74, n. 3-4, p. 230-238, 2012
- AMIN, B., & HOSSEINZADEH, H. Evaluation of aqueous and ethanolic extracts of saffron, *Crocus sativus* L., and its constituents, safranal and crocin in allodynia and hyperalgesia induced by chronic constriction injury model of neuropathic pain in rats. **Fitoterapia**. v. 83, n. 5, p. 888-895, 2012
- ARCOS, M.; PALANCA, J. M.; MONTES, F., & BARRIOS, C. Antioxidants and gabapentin prevent heat hypersensitivity in a neuropathic pain model. **J Invest Surg**. v. 26, n. 3, p. 109-117, 2013
- BACKONJA, M. M. Defining neuropathic pain. **Anesth Analg**. v. 97, n. 3, p. 785-790, 2003
- BAILEY, P. J. Sponge implants as models. **Methods Enzymol**. v. 162, n. p. 327-334, 1988
- BAIN, J. R.; MACKINNON, S. E., & HUNTER, D. A. Functional evaluation of complete sciatic, peroneal, and posterior tibial nerve lesions in the rat. **Plast Reconstr Surg**. v. 83, n. 1, p. 129-138, 1989
- BANG, S.; YOO, S.; YANG, T. J.; CHO, H., & HWANG, S. W. Farnesyl pyrophosphate is a novel pain-producing molecule via specific activation of TRPV3. **J Biol Chem**. v. 285, n. 25, p. 19362-19371, 2010
- BANG, S.; YOO, S.; YANG, T. J.; CHO, H., & HWANG, S. W. Isopentenyl pyrophosphate is a novel antinociceptive substance that inhibits TRPV3 and TRPA1 ion channels. **Pain**. v. 152, n. 5, p. 1156-1164, 2011
- BANG, S.; YOO, S.; YANG, T. J.; CHO, H., & HWANG, S. W. Nociceptive and pro-inflammatory effects of dimethylallyl pyrophosphate via TRPV4 activation. **Br J Pharmacol**. v. 166, n. 4, p. 1433-1443, 2012

- BARON, R. Mechanisms of disease: neuropathic pain--a clinical perspective. **Nat Clin Pract Neurol**. v. 2, n. 2, p. 95-106, 2006
- BARON, R. Neuropathic pain: a clinical perspective. **Handb Exp Pharmacol**. v. n. 194, p. 3-30, 2009
- BARROT, M. Tests and models of nociception and pain in rodents. **Neuroscience**. v. 211, n. p. 39-50, 2012
- BASBAUM, A. I.; BAUTISTA, D. M.; SCHERRER, G., & JULIUS, D. Cellular and molecular mechanisms of pain. **Cell**. v. 139, n. 2, p. 267-284, 2009
- BHALLA, S.; SINGH, N., & JAGGI, A. S. Statins: Do They Aggravate or Ameliorate Neuropathic Pain? **J Pain**. v. 15, n. 11, p. 1069-1080, 2014
- BOSEL, J.; GANDOR, F.; HARMS, C.; SYNOWITZ, M.; HARMS, U.; DJOUFACK, P. C.; MEGOW, D.; DIRNAGL, U.; HORTNAGL, H.; FINK, K. B., & ENDRES, M. Neuroprotective effects of atorvastatin against glutamate-induced excitotoxicity in primary cortical neurones. **J Neurochem**. v. 92, n. 6, p. 1386-1398, 2005
- BOUHASSIRA, D.; LANTERI-MINET, M.; ATTAL, N.; LAURENT, B., & TOUBOUL, C. Prevalence of chronic pain with neuropathic characteristics in the general population. **Pain**. v. 136, n. 3, p. 380-387, 2008
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem**. v. 72, n. p. 248-254, 1976
- BRADLEY, P. P.; PRIEBAT, D. A.; CHRISTENSEN, R. D., & ROTHSTEIN, G. Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker. **J Invest Dermatol**. v. 78, n. 3, p. 206-209, 1982
- BRIX FINNERUP, N.; HEIN SINDRUP, S., & STAEHELIN JENSEN, T. Management of painful neuropathies. **Handb Clin Neurol**. v. 115, n. p. 279-290, 2013
- BROWN, W. V. Safety of statins. **Curr Opin Lipidol**. v. 19, n. 6, p. 558-562, 2008
- CAMARA, C. C.; RAMOS, H. F.; DA SILVA, A. P.; ARAUJO, C. V.; GOMES, A. S.; VALE, M. L.; BARBOSA, A. L.; RIBEIRO, R. A.; BRITO, G. A.; COSTA, C. M., & ORIA, R. B. Oral gabapentin treatment accentuates nerve and peripheral inflammatory responses following experimental nerve constriction in Wistar rats. **Neurosci Lett**. v. 556, n. p. 93-98, 2013

- CAMERON, N.; COTTER, M.; INKSTER, M., & NANGLE, M. Looking to the future: diabetic neuropathy and effects of rosuvastatin on neurovascular function in diabetes models. **Diabetes Res Clin Pract.** v. 61 Suppl 1, n. p. S35-39, 2003
- CASEY, P. J., & SEABRA, M. C. Protein prenyltransferases. **J Biol Chem.** v. 271, n. 10, p. 5289-5292, 1996
- CHAPLAN, S. R.; BACH, F. W.; POGREL, J. W.; CHUNG, J. M., & YAKSH, T. L. Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. **J Neurosci Methods.** v. 53, n. 1, p. 55-63, 1994
- CHASE, A. J.; BOND, M.; CROOK, M. F., & NEWBY, A. C. Role of nuclear factor-kappa B activation in metalloproteinase-1, -3, and -9 secretion by human macrophages in vitro and rabbit foam cells produced in vivo. **Arterioscler Thromb Vasc Biol.** v. 22, n. 5, p. 765-771, 2002
- CHEN, X. Y.; LI, K.; LIGHT, A. R., & FU, K. Y. Simvastatin attenuates formalin-induced nociceptive behaviors by inhibiting microglial RhoA and p38 MAPK activation. **J Pain.** v. 14, n. 11, p. 1310-1319, 2013
- CHRISTIANS, U.; JACOBSEN, W., & FLOREN, L. C. Metabolism and drug interactions of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors in transplant patients: are the statins mechanistically similar? **Pharmacol Ther.** v. 80, n. 1, p. 1-34, 1998
- CHU, L. W.; CHEN, J. Y.; YU, K. L.; CHENG, K. I.; WU, P. C., & WU, B. N. Neuroprotective and anti-inflammatory activities of atorvastatin in a rat chronic constriction injury model. **Int J Immunopathol Pharmacol.** v. 25, n. 1, p. 219-230, 2012
- DAVIS, T. M.; YEAP, B. B.; DAVIS, W. A., & BRUCE, D. G. Lipid-lowering therapy and peripheral sensory neuropathy in type 2 diabetes: the Fremantle Diabetes Study. **Diabetologia.** v. 51, n. 4, p. 562-566, 2008
- DE MEDINACELI, L. Interpreting nerve morphometry data after experimental traumatic lesions. **J Neurosci Methods.** v. 58, n. 1-2, p. 29-37, 1995
- DE MEDINACELI, L.; FREED, W. J., & WYATT, R. J. An index of the functional condition of rat sciatic nerve based on measurements made from walking tracks. **Exp Neurol.** v. 77, n. 3, p. 634-643, 1982
- DE YOUNG, L. M.; KHEIFETS, J. B.; BALLARON, S. J., & YOUNG, J. M. Edema and cell infiltration in the phorbol ester-treated mouse ear are temporally separate and can be differentially modulated by pharmacologic agents. **Agents Actions.** v. 26, n. 3-4, p. 335-341, 1989

- DIETSCHY, J. M., & WILSON, J. D. Regulation of cholesterol metabolism. **N Engl J Med.** v. 282, n. 21, p. 1179-1183, 1970a
- DIETSCHY, J. M., & WILSON, J. D. Regulation of cholesterol metabolism. 3. **N Engl J Med.** v. 282, n. 22, p. 1241-1249, 1970b
- DIETSCHY, J. M., & WILSON, J. D. Regulation of cholesterol metabolism. I. **N Engl J Med.** v. 282, n. 20, p. 1128-1138, 1970c
- DUBIN, A. E., & PATAPOUTIAN, A. Nociceptors: the sensors of the pain pathway. **J Clin Invest.** v. 120, n. 11, p. 3760-3772, 2010
- ENDO, A. A historical perspective on the discovery of statins. **Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci.** v. 86, n. 5, p. 484-493, 2010
- FDA. Food and Drug Administration. Disponível em: <http://www.fda.gov/drugs/drugsafety/ucm256581.htm>. Acesso em: 22/09/2014
- FERNANDES, E. S.; FERNANDES, M. A., & KEEBLE, J. E. The functions of TRPA1 and TRPV1: moving away from sensory nerves. **Br J Pharmacol.** v. 166, n. 2, p. 510-521, 2012
- FERNANDEZ, G.; SPATZ, E. S.; JABLECKI, C., & PHILLIPS, P. S. Statin myopathy: a common dilemma not reflected in clinical trials. **Cleve Clin J Med.** v. 78, n. 6, p. 393-403, 2011
- FERRO, D.; PARROTTO, S.; BASILI, S.; ALESSANDRI, C., & VIOLI, F. Simvastatin inhibits the monocyte expression of proinflammatory cytokines in patients with hypercholesterolemia. **J Am Coll Cardiol.** v. 36, n. 2, p. 427-431, 2000
- FINNERUP, N. B.; SINDRUP, S. H., & JENSEN, T. S. Chronic neuropathic pain: mechanisms, drug targets and measurement. **Fundam Clin Pharmacol.** v. 21, n. 2, p. 129-136, 2007
- FINNERUP, N. B.; SINDRUP, S. H., & JENSEN, T. S. Management of painful neuropathies. **Handb Clin Neurol.** v. 115, n. p. 279-290, 2013
- FLATTERS, S. J., & BENNETT, G. J. Ethosuximide reverses paclitaxel- and vincristine-induced painful peripheral neuropathy. **Pain.** v. 109, n. 1-2, p. 150-161, 2004
- FUKAMI, M.; MAEDA, N.; FUKUSHIGE, J.; KOGURE, Y.; SHIMADA, Y.; OGAWA, T., & TSUJITA, Y. Effects of HMG-CoA reductase inhibitors on skeletal muscles of rabbits. **Res Exp Med (Berl).** v. 193, n. 5, p. 263-273, 1993

- GAIST, D.; JEPPESEN, U.; ANDERSEN, M.; GARCIA RODRIGUEZ, L. A.; HALLAS, J., & SINDRUP, S. H. Statins and risk of polyneuropathy: a case-control study. **Neurology**. v. 58, n. 9, p. 1333-1337, 2002
- GARCIA, G. G.; MIRANDA, H. F.; NORIEGA, V.; SIERRALTA, F.; OLAVARRIA, L.; ZEPEDA, R. J., & PRIETO, J. C. Antinociception induced by atorvastatin in different pain models. **Pharmacol Biochem Behav**. v. 100, n. 1, p. 125-129, 2011
- GHOLAMI, M. R.; ABOLHASSANI, F.; PASBAKHSH, P.; AKBARI, M.; SOBHANI, A.; ESHRAGHIAN, M. R.; KAMALIAN, N.; AMOLI, F. A.; DEHPOUR, A. R., & SOHRABI, D. The effects of simvastatin on ischemia-reperfusion injury of sciatic nerve in adult rats. **Eur J Pharmacol**. v. 590, n. 1-3, p. 111-114, 2008
- GOLD, M. S., & GEBHART, G. F. Nociceptor sensitization in pain pathogenesis. **Nat Med**. v. 16, n. 11, p. 1248-1257, 2010
- GOLDSTEIN, J. L., & BROWN, M. S. Progress in understanding the LDL receptor and HMG-CoA reductase, two membrane proteins that regulate the plasma cholesterol. **J Lipid Res**. v. 25, n. 13, p. 1450-1461, 1984
- GREGOIRE, S.; MICHAUD, V.; CHAPUY, E.; ESCHALIER, A., & ARDID, D. Study of emotional and cognitive impairments in mononeuropathic rats: effect of duloxetine and gabapentin. **Pain**. v. 153, n. 8, p. 1657-1663, 2012
- GUNDUZ, O.; OLTULU, C.; GUVEN, R.; BULDUM, D., & ULUGOL, A. Pharmacological and behavioral characterization of the saphenous chronic constriction injury model of neuropathic pain in rats. **Neurol Sci**. v. 32, n. 6, p. 1135-1142, 2011
- HARE, G. M.; EVANS, P. J.; MACKINNON, S. E.; BEST, T. J.; BAIN, J. R.; SZALAI, J. P., & HUNTER, D. A. Walking track analysis: a long-term assessment of peripheral nerve recovery. **Plast Reconstr Surg**. v. 89, n. 2, p. 251-258, 1992
- HOLTHUSEN, H., & ARNDT, J. O. Nitric oxide evokes pain at nociceptors of the paravascular tissue and veins in humans. **J Physiol**. v. 487 (Pt 1), n. p. 253-258, 1995
- II, M.; NISHIMURA, H.; KUSANO, K. F.; QIN, G.; YOON, Y. S.; WECKER, A.; ASAHARA, T., & LOSORDO, D. W. Neuronal nitric oxide synthase mediates statin-induced restoration of vasa nervorum and reversal of diabetic neuropathy. **Circulation**. v. 112, n. 1, p. 93-102, 2005
- IKEDA, U.; SHIMPO, M.; OHKI, R.; INABA, H.; TAKAHASHI, M.; YAMAMOTO, K., & SHIMADA, K. Fluvastatin inhibits matrix metalloproteinase-1 expression in human vascular endothelial cells. **Hypertension**. v. 36, n. 3, p. 325-329, 2000

- JAISWAL, S. R., & SONTAKKE, S. D. Experimental evaluation of analgesic and anti-inflammatory activity of simvastatin and atorvastatin. **Indian J Pharmacol.** v. 44, n. 4, p. 475-479, 2012
- JEPPESEN, U.; GAIST, D.; SMITH, T., & SINDRUP, S. H. Statins and peripheral neuropathy. **Eur J Clin Pharmacol.** v. 54, n. 11, p. 835-838, 1999
- KUKKAR, A.; BALI, A.; SINGH, N., & JAGGI, A. S. Implications and mechanism of action of gabapentin in neuropathic pain. **Arch Pharm Res.** v. 36, n. 3, p. 237-251, 2013
- LE BARS, D.; GOZARIU, M., & CADDEN, S. W. Animal models of nociception. **Pharmacol Rev.** v. 53, n. 4, p. 597-652, 2001
- LEWIN, G. R., & MOSHOURAB, R. Mechanosensation and pain. **J Neurobiol.** v. 61, n. 1, p. 30-44, 2004
- LI, B.; MAHMOOD, A.; LU, D.; WU, H.; XIONG, Y.; QU, C., & CHOPP, M. Simvastatin attenuates microglial cells and astrocyte activation and decreases interleukin-1beta level after traumatic brain injury. **Neurosurgery.** v. 65, n. 1, p. 179-185; discussion 185-176, 2009
- LIU, C. N.; RABER, P.; ZIV-SEFER, S., & DEVOR, M. Hyperexcitability in sensory neurons of rats selected for high versus low neuropathic pain phenotype. **Neuroscience.** v. 105, n. 1, p. 265-275, 2001
- LOESER, J. D., & TREEDE, R. D. The Kyoto protocol of IASP Basic Pain Terminology. **Pain.** v. 137, n. 3, p. 473-477, 2008
- LUO, L.; HENSCH, T. K.; ACKERMAN, L.; BARBEL, S.; JAN, L. Y., & JAN, Y. N. Differential effects of the Rac GTPase on Purkinje cell axons and dendritic trunks and spines. **Nature.** v. 379, n. 6568, p. 837-840, 1996
- MA, L. L.; LIU, W.; HUANG, Y. G.; YANG, N., & ZUO, P. P. Analgesic effect of gabapentin in a rat model for chronic constrictive injury. **Chin Med J (Engl).** v. 124, n. 24, p. 4304-4309, 2011
- MAHMOOD, A.; GOUSSEV, A.; KAZMI, H.; QU, C.; LU, D., & CHOPP, M. Long-term benefits after treatment of traumatic brain injury with simvastatin in rats. **Neurosurgery.** v. 65, n. 1, p. 187-191; discussion 191-182, 2009
- MAIHOFNER, C.; SEIFERT, F., & MARKOVIC, K. Complex regional pain syndromes: new pathophysiological concepts and therapies. **Eur J Neurol.** v. 17, n. 5, p. 649-660, 2010

- MANN, C. M.; LEE, J. H.; HILLYER, J.; STAMMERS, A. M.; TETZLAFF, W., & KWON, B. K. Lack of robust neurologic benefits with simvastatin or atorvastatin treatment after acute thoracic spinal cord contusion injury. **Exp Neurol**. v. 221, n. 2, p. 285-295, 2010
- MARON, D. J.; FAZIO, S., & LINTON, M. F. Current perspectives on statins. **Circulation**. v. 101, n. 2, p. 207-213, 2000
- MARTINI, C.; TRAPANI, L.; NARCISO, L.; MARINO, M.; TRENTALANCE, A., & PALLOTTINI, V. 3-hydroxy 3-methylglutaryl coenzyme A reductase increase is essential for rat muscle differentiation. **J Cell Physiol**. v. 220, n. 2, p. 524-530, 2009
- MARTINS, D. F. Mobilização neural como recurso terapêutico na recuperação funcional e morfológica do nervo ciático de ratos após lesão traumática. 70 p. Dissertação de mestrado em Neurociências. **Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis**. 2009
- MARTINS, D. F.; MAZZARDO-MARTINS, L.; GADOTTI, V. M.; NASCIMENTO, F. P.; LIMA, D. A.; SPECKHANN, B.; FAVRETTO, G. A.; BOBINSKI, F.; CARGNIN-FERREIRA, E.; BRESSAN, E.; DUTRA, R. C.; CALIXTO, J. B., & SANTOS, A. R. Ankle joint mobilization reduces axonotmesis-induced neuropathic pain and glial activation in the spinal cord and enhances nerve regeneration in rats. **Pain**. v. 152, n. 11, p. 2653-2661, 2011
- MAX, M. B. Clarifying the definition of neuropathic pain. **Pain**. v. 96, n. 3, p. 406-407; author reply 407-408, 2002
- MEHTA, S.; MCINTYRE, A.; DIJKERS, M.; LOH, E., & TEASELL, R. W. Gabapentinoids Are Effective in Decreasing Neuropathic Pain and Other Secondary Outcomes After Spinal Cord Injury: A Meta-Analysis. **Arch Phys Med Rehabil**. v. n. p. 2014
- MENDELL, J. R., & SAHENK, Z. Clinical practice. Painful sensory neuropathy. **N Engl J Med**. v. 348, n. 13, p. 1243-1255, 2003
- MILLAN, M. J. The induction of pain: an integrative review. **Prog Neurobiol**. v. 57, n. 1, p. 1-164, 1999
- MILLIGAN, E. D., & WATKINS, L. R. Pathological and protective roles of glia in chronic pain. **Nat Rev Neurosci**. v. 10, n. 1, p. 23-36, 2009
- MIRANDA, H. F.; NORIEGA, V.; OLAVARRIA, L.; ZEPEDA, R. J.; SIERRALTA, F., & PRIETO, J. C. Antinociception and anti-inflammation induced by simvastatin in algesiometric assays in mice. **Basic Clin Pharmacol Toxicol**. v. 109, n. 6, p. 438-442, 2011

- MIRON, V. E.; ZEHNTNER, S. P.; KUHLMANN, T.; LUDWIN, S. K.; OWENS, T.; KENNEDY, T. E.; BEDELL, B. J., & ANTEL, J. P. Statin therapy inhibits remyelination in the central nervous system. **Am J Pathol.** v. 174, n. 5, p. 1880-1890, 2009
- MURINSON, B. B.; HAUGHEY, N. J., & MARAGAKIS, N. J. Selected statins produce rapid spinal motor neuron loss in vitro. **BMC Musculoskelet Disord.** v. 13, n. p. 100, 2012
- NAPLES, M.; FEDERICO, L. M.; XU, E.; NELKEN, J., & ADELI, K. Effect of rosuvastatin on insulin sensitivity in an animal model of insulin resistance: evidence for statin-induced hepatic insulin sensitization. **Atherosclerosis.** v. 198, n. 1, p. 94-103, 2008
- NIH. National Institute of Health. Disponível em: <http://grants.nih.gov/grants/olaw/references/laba94.htm>. Acesso em: 22/09/2014
- OHSAWA, M.; AASATO, M.; HAYASHI, S. S., & KAMEI, J. RhoA/Rho kinase pathway contributes to the pathogenesis of thermal hyperalgesia in diabetic mice. **Pain.** v. 152, n. 1, p. 114-122, 2011
- OHSAWA, M.; MUTOH, J., & HISA, H. Mevalonate sensitizes the nociceptive transmission in the mouse spinal cord. **Pain.** v. 134, n. 3, p. 285-292, 2008
- OHSAWA, M.; MUTOH, J.; YAMAMOTO, S.; ONO, H., & HISA, H. Effect of spinally administered simvastatin on the formalin-induced nociceptive response in mice. **J Pharmacol Sci.** v. 119, n. 1, p. 102-106, 2012
- OHSAWA, M.; OTAKE, S.; MURAKAMI, T.; YAMAMOTO, S.; MAKINO, T., & ONO, H. Gabapentin prevents oxaliplatin-induced mechanical hyperalgesia in mice. **J Pharmacol Sci.** v. 125, n. 3, p. 292-299, 2014
- OSSIPOV, M. H.; DUSSOR, G. O., & PORRECA, F. Central modulation of pain. **J Clin Invest.** v. 120, n. 11, p. 3779-3787, 2010
- PAN, H. C.; YANG, D. Y.; OU, Y. C.; HO, S. P.; CHENG, F. C., & CHEN, C. J. Neuroprotective effect of atorvastatin in an experimental model of nerve crush injury. **Neurosurgery.** v. 67, n. 2, p. 376-388; discussion 388-379, 2010
- PANNU, R.; CHRISTIE, D. K.; BARBOSA, E.; SINGH, I., & SINGH, A. K. Post-trauma Lipitor treatment prevents endothelial dysfunction, facilitates neuroprotection, and promotes locomotor recovery following spinal cord injury. **J Neurochem.** v. 101, n. 1, p. 182-200, 2007

- PARKER, B. A.; GREGORY, S. M.; LORSON, L.; POLK, D.; WHITE, C. M., & THOMPSON, P. D. A randomized trial of coenzyme Q10 in patients with statin myopathy: rationale and study design. **J Clin Lipidol.** v. 7, n. 3, p. 187-193, 2013
- PATHAK, N. N.; BALAGANUR, V.; LINGARAJU, M. C.; MORE, A. S.; KANT, V.; KUMAR, D.; KUMAR, D., & TANDAN, S. K. Antihyperalgesic and anti-inflammatory effects of atorvastatin in chronic constriction injury-induced neuropathic pain in rats. **Inflammation.** v. 36, n. 6, p. 1468-1478, 2013
- PELLEGRINO, C., & FRANZINI, C. An Electron Microscope Study of Denervation Atrophy in Red and White Skeletal Muscle Fibers. **J Cell Biol.** v. 17, n. 2, p. 327-349, 1963
- PETKO, M., & ANTAL, M. Propriospinal pathways in the dorsal horn (laminae I-IV) of the rat lumbar spinal cord. **Brain Res Bull.** v. 89, n. 1-2, p. 41-49, 2012
- PHAN, T.; MCLEOD, J. G.; POLLARD, J. D.; PEIRIS, O.; ROHAN, A., & HALPERN, J. P. Peripheral neuropathy associated with simvastatin. **J Neurol Neurosurg Psychiatry.** v. 58, n. 5, p. 625-628, 1995
- PIERNO, S.; DIDONNA, M. P.; CIPPONE, V.; DE LUCA, A.; PISONI, M.; FRIGERI, A.; NICCHIA, G. P.; SVELTO, M.; CHIESA, G.; SIRTORI, C.; SCANZIANI, E.; RIZZO, C.; DE VITO, D., & CONTE CAMERINO, D. Effects of chronic treatment with statins and fenofibrate on rat skeletal muscle: a biochemical, histological and electrophysiological study. **Br J Pharmacol.** v. 149, n. 7, p. 909-919, 2006
- RAOUF, R.; QUICK, K., & WOOD, J. N. Pain as a channelopathy. **J Clin Invest.** v. 120, n. 11, p. 3745-3752, 2010
- RASO, V. V. M. Os efeitos do ultra-som terapêutico no tratamento das lesões por esmagamento do nervo ciático de ratos. 59 p. Dissertação de mestrado em Bioengenharia. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. **Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto.** 2002
- RIDKER, P. M.; PRADHAN, A.; MACFADYEN, J. G.; LIBBY, P., & GLYNN, R. J. Cardiovascular benefits and diabetes risks of statin therapy in primary prevention: an analysis from the JUPITER trial. **Lancet.** v. 380, n. 9841, p. 565-571, 2012
- SABATOWSKI, R.; GALVEZ, R.; CHERRY, D. A.; JACQUOT, F.; VINCENT, E.; MAISONOBE, P.; VERSAVEL, M., & STUDY, G. Pregabalin reduces pain and improves sleep and mood disturbances in patients with post-herpetic neuralgia: results of a randomised, placebo-controlled clinical trial. **Pain.** v. 109, n. 1-2, p. 26-35, 2004
- SAKATA, R. K. I., A.M. Fármacos para tratamento da dor. v. n. 1ª EDIÇÃO. SÃO PAULO: MANOLE, p. 2008

- SANDKUHLER, J. Models and mechanisms of hyperalgesia and allodynia. **Physiol Rev.** v. 89, n. 2, p. 707-758, 2009
- SANSONE, R. A., & SANSONE, L. A. Pain, pain, go away: antidepressants and pain management. **Psychiatry (Edgmont).** v. 5, n. 12, p. 16-19, 2008
- SAVASTANO, L. E.; LAURITO, S. R.; FITT, M. R.; RASMUSSEN, J. A.; GONZALEZ POLO, V., & PATTERSON, S. I. Sciatic nerve injury: a simple and subtle model for investigating many aspects of nervous system damage and recovery. **J Neurosci Methods.** v. 227, n. p. 166-180, 2014
- SCHACHTER, M. Chemical, pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of statins: an update. **Fundam Clin Pharmacol.** v. 19, n. 1, p. 117-125, 2005
- SCHMALBRUCH, H. Fiber composition of the rat sciatic nerve. **Anat Rec.** v. 215, n. 1, p. 71-81, 1986
- SCHULMAN, J. M., & STRICHARTZ, G. R. Princípios da Farmacologia: Farmacologia dos Anestésicos Locais. Rio de Janeiro, 131-145, 2009.
- SESSLE, B. J. Peripheral and central mechanisms of orofacial inflammatory pain. **Int Rev Neurobiol.** v. 97, n. p. 179-206, 2011
- SHI, X. Q.; LIM, T. K.; LEE, S.; ZHAO, Y. Q., & ZHANG, J. Statins alleviate experimental nerve injury-induced neuropathic pain. **Pain.** v. 152, n. 5, p. 1033-1043, 2011
- SILVA, M. A.; TREVISAN, G.; KLAFKE, J. Z.; ROSSATO, M. F.; WALKER, C. I.; OLIVEIRA, S. M.; SILVA, C. R.; BOLIGON, A. A.; FLORES, F. C.; DE BONA SILVA, C.; ATHAYDE, M. L., & FERREIRA, J. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of Aloe saponaria Haw on thermal injury in rats. **J Ethnopharmacol.** v. 146, n. 1, p. 393-401, 2013
- SIRTORI, C. R. The pharmacology of statins. **Pharmacol Res.** v. 88, n. p. 3-11, 2014
- STAHL, S. M.; PORRECA, F.; TAYLOR, C. P.; CHEUNG, R.; THORPE, A. J., & CLAIR, A. The diverse therapeutic actions of pregabalin: is a single mechanism responsible for several pharmacological activities? **Trends Pharmacol Sci.** v. 34, n. 6, p. 332-339, 2013
- STUDYBLUE. Cell and Tissue Response to Injury in the CNS. Disponível em: <https://www.studyblue.com/notes/n/cell-and-tissue-response-to-injury-in-the-cns/deck/5936424>. Acesso em: 29/10/2014

- SUZUKI, R., & DICKENSON, A. Spinal and supraspinal contributions to central sensitization in peripheral neuropathy. **Neurosignals**. v. 14, n. 4, p. 175-181, 2005
- SZCZUDLIK, A.; DOBROGOWSKI, J.; WORDLICZEK, J.; STEPIEN, A.; KRAJNIK, M.; LEPPERT, W.; WORON, J.; PRZEKLASA-MUSZYNSKA, A.; KOCOT-KEPSKA, M.; ZAJACZKOWSKA, R.; JANECKI, M.; ADAMCZYK, A., & MALEC-MILEWSKA, M. Diagnosis and management of neuropathic pain: review of literature and recommendations of the Polish Association for the Study of Pain and the Polish Neurological Society - Part Two. **Neurol Neurochir Pol**. v. 48, n. 6, p. 423-435, 2014
- THURNHER, M.; NUSSBAUMER, O., & GRUENBACHER, G. Novel aspects of mevalonate pathway inhibitors as antitumor agents. **Clin Cancer Res**. v. 18, n. 13, p. 3524-3531, 2012
- TREEDE, R. D.; JENSEN, T. S.; CAMPBELL, J. N.; CRUCCU, G.; DOSTROVSKY, J. O.; GRIFFIN, J. W.; HANSSON, P.; HUGHES, R.; NURMIKKO, T., & SERRA, J. Neuropathic pain: redefinition and a grading system for clinical and research purposes. **Neurology**. v. 70, n. 18, p. 1630-1635, 2008
- VAREJAO, A. S.; CABRITA, A. M.; MEEK, M. F.; BULAS-CRUZ, J.; MELO-PINTO, P.; RAIMONDO, S.; GEUNA, S., & GIACOBINI-ROBECCHI, M. G. Functional and morphological assessment of a standardized rat sciatic nerve crush injury with a non-serrated clamp. **J Neurotrauma**. v. 21, n. 11, p. 1652-1670, 2004
- VARGAS, M. E., & BARRES, B. A. Why is Wallerian degeneration in the CNS so slow? **Annu Rev Neurosci**. v. 30, n. p. 153-179, 2007
- WANG, H., & WOOLF, C. J. Pain TRPs. **Neuron**. v. 46, n. 1, p. 9-12, 2005
- WEIS, M.; HEESCHEN, C.; GLASSFORD, A. J., & COOKE, J. P. Statins have biphasic effects on angiogenesis. **Circulation**. v. 105, n. 6, p. 739-745, 2002
- WERNER, M. F.; KASSUYA, C. A.; FERREIRA, J.; ZAMPRONIO, A. R.; CALIXTO, J. B., & RAE, G. A. Peripheral kinin B(1) and B(2) receptor-operated mechanisms are implicated in neuropathic nociception induced by spinal nerve ligation in rats. **Neuropharmacology**. v. 53, n. 1, p. 48-57, 2007
- WEST, B.; WILLIAMS, C. M.; JILBERT, E.; JAMES, A. M., & HAINES, T. P. Statin use and peripheral sensory perception: a pilot study. **Somatosens Mot Res**. v. 31, n. 2, p. 57-61, 2014
- WONG, B.; LUMMA, W. C.; SMITH, A. M.; SISKI, J. T.; WRIGHT, S. D., & CAI, T. Q. Statins suppress THP-1 cell migration and secretion of matrix metalloproteinase 9 by inhibiting geranylgeranylation. **J Leukoc Biol**. v. 69, n. 6, p. 959-962, 2001

- WOOLF, C. J. What is this thing called pain? **J Clin Invest.** v. 120, n. 11, p. 3742-3744, 2010
- WU, H.; LU, D.; JIANG, H.; XIONG, Y.; QU, C.; LI, B.; MAHMOOD, A.; ZHOU, D., & CHOPP, M. Simvastatin-mediated upregulation of VEGF and BDNF, activation of the PI3K/Akt pathway, and increase of neurogenesis are associated with therapeutic improvement after traumatic brain injury. **J Neurotrauma.** v. 25, n. 2, p. 130-139, 2008
- XAVIER, A. M.; SERAFIM, K. G.; HIGASHI, D. T.; VANAT, N.; FLAIBAN, K. K.; SIQUEIRA, C. P.; VENANCIO, E. J., & RAMOS SDE, P. Simvastatin improves morphological and functional recovery of sciatic nerve injury in Wistar rats. **Injury.** v. 43, n. 3, p. 284-289, 2012
- YAMMOTO, A.; SUDO, H., & ENDO, A. Therapeutic effects of ml-236B in primary hypercholesterolemia. 1980. **Atheroscler Suppl.** v. 5, n. 3, p. 43-50, 2004
- ZHAO, Y.; FENG, Q.; HUANG, Z.; LI, W.; CHEN, B.; JIANG, L.; WU, B.; DING, W.; XU, G.; PAN, H.; WEI, W.; LUO, W., & LUO, Q. Simvastatin inhibits inflammation in ischemia-reperfusion injury. **Inflammation.** v. 37, n. 5, p. 1865-1875, 2014
- ZIAJKA, P. E., & WEHMEIER, T. Peripheral neuropathy and lipid-lowering therapy. **South Med J.** v. 91, n. 7, p. 667-668, 1998
- ZIMMERMANN, M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. **Pain.** v. 16, n. 2, p. 109-110, 1983