



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CAMPUS FLORIANÓPOLIS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Jennyfer Karen Knorst

**Toxicidade tecidual hepática em camundongos expostos cronicamente à
rosuvastatina da pré-puberdade à maturidade sexual**

Florianópolis

2023

Jennyfer Karen Knorst

**Toxicidade tecidual hepática em camundongos expostos cronicamente à rosuvastatina
da pré-puberdade à maturidade sexual**

Trabalho de Conclusão de Curso submetido ao curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito para a obtenção do título de Licenciada em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Gabriel Adan Araujo Leite

Florianópolis
2023

Knorst, Jennyfer

Toxicidade tecidual hepática em camundongos expostos cronicamente à rosuvastatina da pré-puberdade à maturidade sexual / Jennyfer Knorst ; orientador, Gabriel Leite, 2023. 55 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Graduação em Ciências Biológicas, Florianópolis, 2023.

Inclui referências.

1. Ciências Biológicas. 2. Rosuvastatina. 3. Toxicidade Hepática. 4. Camundongos. I. Leite, Gabriel. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Graduação em Ciências Biológicas. III. Título.

Jennyfer Karen Knorst

Toxicidade tecidual hepática em camundongos expostos cronicamente à rosuvastatina da pré-puberdade à maturidade sexual

Este Trabalho de Conclusão de Curso foi julgado adequado para obtenção do título de Licenciada e aprovado em sua forma final pelo Curso de Ciências Biológicas.

Florianópolis, 05 de dezembro de 2023.

Coordenação do Curso

Prof. Dr. Gabriel Adan Araujo Leite
Orientador

Banca Examinadora

Profa. Dra. Virgínia Meneghini Lazzari
Universidade Federal de Santa Catarina

Profa. Dra. Kieiv Resende Sousa de Moura
Universidade Federal de Santa Catarina

Florianópolis, 2023.

AGRADECIMENTOS

Dedico aqui a todos aqueles que estiveram comigo nessa longa e árdua jornada. Primeiramente a minha mãe, Daniela, que em todos esses anos foi minha maior incentivadora e que não mediu nenhum esforço para que eu chegasse até aqui.

Ao meu amado companheiro, Jhonatan, que foi muito compreensivo, que é meu alicerce, meu apoio, minha alegria.

Às minhas amigas Emilyn, Rafaela, Jane e Beatriz, que mesmo distante, foram meu ombro amigo.

À minha melhor amiga Evelin, que conheci na graduação e que foi minha conselheira, meu ponto de alegria numa caminhada tão pedregosa e fria.

À minha melhor amiga de infância, Michele, que me encorajou, que me ensinou a ter paciência, que sempre esteve ao meu lado quando precisei e que me viu desabar e levantar várias vezes, sempre ao meu lado.

Também a Alice e a Tainara, que me ensinaram tudo o que eu sei sobre a vida laboratorial, tornando essa pesquisa possível e mais agradável, me encorajando quando tudo parecia dar errado.

Ao professor e orientador Gabriel, que me ensinou, me apoiou, que estava disponível quando necessário, que foi firme e persistente, não deixando que eu desanimasse e que me deu a chance de desfrutar da pesquisa.

A Universidade Federal de Santa Catarina, por me proporcionar um ensino superior público e de qualidade, por incentivar a pesquisa e à docência. A todos os professores que compartilharam seus conhecimentos.

Aos colegas do Laboratório de Reprodução e Toxicologia, pelo apoio e incentivo e pelas palavras de conforto.

Obrigada a todos amigos e familiares. Sem vocês eu não teria chegado até aqui. Obrigada pela paciência, pela força, pelo incentivo, pelas risadas, por me ouvirem, por lutarem essa batalha junto comigo.

RESUMO

Com a mudança do estilo de vida associada aos maus hábitos alimentares e a diminuição da prática de exercícios físicos, tem-se observado alterações no perfil lipídico humano, que incluem o aumento do colesterol total e do LDL-colesterol, bem como o aumento nas taxas de obesidade na população. Para tratar as alterações nos perfis lipídicos utiliza-se amplamente os medicamentos da classe das estatinas, dos quais destaca-se a rosuvastatina por apresentar maior melhora do perfil lipídico e poder ser utilizada desde a infância. Entretanto, são escassas as informações sobre a toxicidade hepática a longo prazo decorrente da exposição crônica à rosuvastatina desde a pré-puberdade até a vida adulta. Assim, buscou-se investigar os efeitos hepáticos decorrentes da exposição de camundongos *Swiss* a diferentes doses de rosuvastatina desde a pré-puberdade. Para tanto, foram utilizados camundongos machos com 23 dias de idade, que foram aleatoriamente distribuídos em três grupos experimentais: controle (veículo, solução salina 0,9%) e tratados com rosuvastatina nas doses de 1,5 ou 5,5 mg/Kg/dia. Os animais foram tratados do dia pós-natal (DPN) 23 até o DPN 80, quando foram monitorados o ganho de massa corporal e consumo de água e ração dos animais. Os camundongos foram eutanasiados no DPN 80, sendo aferida a massa corporal e coletados para a pesagem os órgãos de importância toxicológica, tais como o fígado, rins, encéfalo, coração, pulmão, baço e adrenais. Parte do lobo esquerdo do fígado foi destinado ao processamento histológico, seguido de colorações em hematoxilina e eosina, Picrosirius e hematoxilina, e ácido periódico-Schiff contraincolorado com hematoxilina. Os cortes foram avaliados quanto a presença de alterações histopatológicas e morfométricas nos diferentes compartimentos do órgão. Houve redução temporária de ganho de massa corporal nos grupos expostos a estatina, bem como redução do consumo hídrico e alimentar durante o tratamento. Ainda, foram constatadas alterações histopatológicas nos grupos tratados, tais como: dilatação sinusoidal, presença de infiltrados inflamatórios, hipertrofia de hepatócitos, indicativos de morte celular nos hepatócitos e aumento da presença de hepatócitos binucleados. Houve, ainda, aumento da área nuclear dos hepatócitos. Em suma, a exposição de camundongos machos à rosuvastatina, em diferentes doses, desde a pré-puberdade até a maturidade sexual promoveu redução temporária do ganho de massa corporal e do consumo hídrico e alimentar, além de ter gerado toxicidade hepática, evidenciada pelas diversas alterações histológicas e morfométricas do tecido hepático.

Palavras-chave: estatina; roedor; toxicidade; fígado.

ABSTRACT

With the lifestyle change associated with poor eating habits and the reduction in physical exercise, changes in the human lipid profile have been observed, which include an increase in total cholesterol and LDL-cholesterol, as well as an increase in levels of obesity in the population. To treat changes in lipid profiles, drugs from the statin class are widely used, of which rosuvastatin stands out as it shows greater improvement in the lipid profile and can be used since childhood. However, there is little information on long-term liver toxicity resulting from chronic exposure to rosuvastatin from pre-puberty to adulthood. Therefore, we investigated the hepatic effects resulting from the exposure of Swiss mice to different doses of rosuvastatin since pre-puberty. For this purpose, 23-day-old male mice were used, which were randomly distributed into three experimental groups: control (vehicle, 0.9% saline solution) and treated with rosuvastatin at the doses of 1.5 or 5.5 mg/kg. /day. The animals were treated from postnatal day (PND) 23 until PND 80 when the animals' body mass gain and water and food consumption were monitored. The mice were euthanized on PND 80 when body mass was measured and organs of toxicological importance, such as the liver, kidneys, brain, heart, lung, spleen, and adrenal glands, were collected and weighed. Part of the left lobe of the liver was destined for histological processing, followed by staining with hematoxylin and eosin, Picrosirius and hematoxylin, and periodic acid-Schiff counterstained with hematoxylin. The sections were evaluated for the presence of histopathological and morphometric changes in the different compartments of the organ. There was a temporary reduction in body mass gain in the groups exposed to statins, as well as a reduction in water and food consumption during part of treatment. Furthermore, several histopathological changes were found in the treated groups, as follows: sinusoidal dilation, the presence of inflammatory infiltrates, hepatocyte hypertrophy, indicative of cell death in hepatocytes, and an increase in the presence of binucleated hepatocytes. There was also an increase in the nuclear area of hepatocytes. In summary, the exposure of male mice to rosuvastatin, at different doses, from pre-puberty to sexual maturity promoted a temporary reduction in body mass gain and water and food consumption, in addition to generating liver toxicity, evidenced by several changes in histological and morphometric measurements of liver tissue.

Keywords: statin; rodent; toxicity; liver.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mecanismos de ação das estatinas.....	15
Figura 2. Delineamento experimental.....	26
Figura 3. Ganho de massa corporal dos animais dos grupos controle e tratados com rosuvastatina.....	30
Figura 4. Consumo de água dos animais dos grupos controle e expostos a rosuvastatina.....	31
Figura 5. Consumo de ração dos animais dos grupos controle e tratados com rosuvastatina.....	31
Figura 6. Fotomicrografias do fígado dos animais dos grupos experimentais corados com hematoxilina e eosina.....	33
Figura 7. Fotomicrografias do fígado dos animais dos grupos experimentais corados com picrossirius e hematoxilina.....	34
Figura 8. Fotomicrografia do fígado dos animais dos grupos experimentais corados com ácido periódico de Schiff.....	35

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Principais características das estatinas.....	16
Tabela 2. Síntese dos resultados obtidos após exposição à rosuvastatina em comparação ao grupo controle.....	29
Tabela 3. Massa dos órgãos vitais dos animais dos grupos controle e tratados com rosuvastatina.....	32
Tabela 4. Estereologia do tecido hepático realizada em área periférica dos lóbulos hepáticos dos animais dos grupos controle e tratados com rosuvastatina após coloração com picrossirius e hematoxilina.....	36
Tabela 5. Estereologia do tecido hepático realizada em região de veia centrolobular nos animais dos grupos controle e tratados com rosuvastatina após coloração de picrossirius e hematoxilina.....	37
Tabela 6. Estereologia do tecido hepático realizada em área periférica dos lóbulos hepáticos dos grupos controle e tratados com rosuvastatina após coloração com ácido periódico de Schiff.....	37
Tabela 7. Morfometria dos hepatócitos dos grupos controle e tratados com rosuvastatina.....	38

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- BMP – *Morphogenic bone proteins*
- CCB – Centro de Ciências Biológicas
- CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais
- COBEA – Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
- CD31 – *Cluster* de diferenciação 31
- CREB – *cAMP Response Element-binding protein*
- CK – Creatinina quinase
- DG0 – Dia gestacional zero
- DPN – Dia pós-natal
- FGF – *Fibroblast growth factor*
- FoxA – *Forkhead-Box-A*
- FOXO – *Forkhead box protein O*
- GATA – *Guanine-adenine and thymine-adenine repeats*
- G6PD – Glicose-6-fosfato desidrogenase
- g – Gramas
- HDL – Lipoproteína de alta densidade
- HE – Hematoxilina e Eosina
- HNF – *Hepatocyte Nuclear Factor*
- ICAM-1 – *The intercellular adhesion molecule*
- IGF – *Insulin-like Growth Factor*
- Kg- Quilograma
- LDL – Lipoproteína de baixa densidade
- NOTCH – *Neurogenic locus notch homolog protein*
- PAS – Ácido periódico-Schiff
- PPAR – *Peroxisome Proliferator-Activadet Receptors*
- VAP-1 – *Vascular adhesion protein-1*
- Wnt – *Wingless-related integration site*
- µm – Micrômetro
- β (TGF-β) – Fator de crescimento transformador beta

LISTA DE SÍMBOLOS

°C – Graus Celsius

% – Por cento

< – Inferior/menor

SUMÁRIO

1. Introdução	13
1.1. Sedentarismo, hábitos de vida e doenças na atualidade.....	13
1.2 Estatinas.....	14
1.3 Rosuvastatina.....	17
1.4 Fígado: Desenvolvimento, estrutura e função.....	19
2. Justificativa	22
3. Hipótese	23
4. Objetivos	24
4.1. Objetivo geral.....	24
4.2. Objetivos específicos.....	24
5. Materiais e Métodos	25
5.1 Obtenção de camundongos prenhes e das ninhadas.....	25
5.2 Delineamento experimental.....	25
5.3 Ganho de massa corporal, e consumo de água e ração.....	26
5.4 Eutanásia, coleta e pesagem dos órgãos.....	27
5.5 Análises histopatológicas e morfométricas.....	27
5.6 Análises estatísticas.....	28
6. Resultados	29
6.1 Ganho de massa corporal.....	30
6.2 Consumo de água e ração.....	30
6.3 Massa dos órgãos vitais.....	32
6.4. Análise histopatológica do fígado.....	32
6.5 Morfometria hepática.....	36
7. Discussão	39
8. Conclusão	45
9. Referências	46
Anexo A - Certificado de aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Santa Catarina	54
Anexo B - Emenda de aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Santa Catarina	55

1. INTRODUÇÃO

1.1.SEDENTARISMO, HÁBITOS DE VIDA E DOENÇAS NA ATUALIDADE

Atualmente, observa-se na sociedade uma série de conveniências, tais como escadas rolantes, elevadores, *home office* e entregas por aplicativo, porém, associados a esses benefícios, surgiram o sedentarismo e hábitos alimentares inadequados (PANDEY; CHAWLA; GUCHHAIT, 2015; PURCINO; LÚCIA; MORAES, 2016; SSEWANYANA et al., 2018). Houve, ainda, uma mudança nos padrões alimentares e na prática de exercícios físicos, com dietas empobrecidas em nutrientes e ricas em gorduras, especialmente provenientes de *fast-foods*, enquanto os automóveis se tornaram a escolha predominante para a locomoção da população (PURCINO; LÚCIA; MORAES, 2016).

Esses maus hábitos e o sedentarismo resultaram no aumento significativo nos índices de obesidade, acarretando consigo diversas comorbidades, tais como *diabetes mellitus* tipo 2, hipertensão arterial, acúmulo de gordura no fígado, doenças cardiovasculares e dislipidemias (MAGALHÃES, 2022; RESNICOW et al., 1991). No Brasil, esses distúrbios não afetam apenas adultos, mas também impactam crianças e adolescentes, passando de 9% em 2022, para 17,1% em 2023, um aumento de 90% no índice de obesidade entre jovens, conforme dados do Ministério da Saúde (AGÊNCIA BRASIL, 2023). A hipertensão e a resistência à insulina tornam-se cada vez mais prevalentes nessa faixa etária devido à obesidade pediátrica, resultado de dietas inadequadas e mudanças no estilo de vida (VIJAYAKANTHI et al., 2021).

Estudos diversos evidenciam que o sedentarismo e a obesidade são os principais contribuintes para alterações no perfil lipídico sérico, manifestando-se no aumento das concentrações séricas de LDL-colesterol, VLDL-colesterol e colesterol total, além da redução do HDL-colesterol (BLASCO; ASCASO, 2019; GONZÁLEZ JIMÉNEZ; ÁLVAREZ FERRE, 2011; MATÍA MARTÍN; LECUMBERRI PASCUAL; CALLE PASCUAL, 2007; NISSEN et al., 2006; POIRIER; DESPRÉS, 2003).

As doenças hepáticas podem evoluir desde esteatose simples até esteato-hepatite, fibrose avançada e cirrose. Mais de 60% dos pacientes com dislipidemias apresentam esteatose hepática, enquanto mais de 70% dos indivíduos com esteato-hepatite apresentam dislipidemias (KHAN et al., 2019).

A detecção precoce de doenças hipercolesterolêmicas possibilita a implementação de intervenções, como a adoção de uma dieta adequada, a prática regular de atividade física e o uso de medicamentos apropriados, resultando em uma significativa redução nos níveis de colesterol e na probabilidade de desenvolver outras condições relacionadas a essa comorbidade (GRUNDY, 2000).

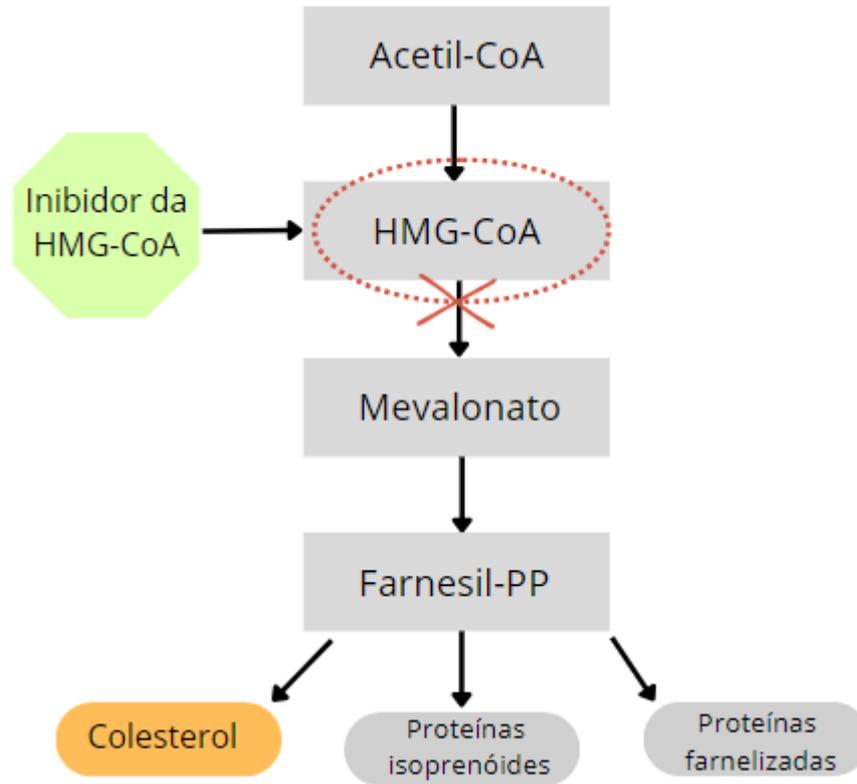
1.2. ESTATINAS

As estatinas representam o grupo medicamentoso mais amplamente empregado no tratamento de comorbidades como as dislipidemias (BLASCO; ASCASO, 2019). Estes agentes, como moduladores de lipídios, desempenham um papel crucial na redução da carga de lipoproteínas aterogênicas no soro, tais como na diminuição das lipoproteínas de baixa densidade (LDL-colesterol), simultaneamente reduzindo os níveis de triglicerídeos e elevando os níveis séricos de lipoproteínas de alta densidade (HDL-colesterol), exercendo, assim, vários efeitos pleiotrópicos nos vasos sanguíneos (SPRENGER; SEPPI; POEWE, 2012).

Atuando primariamente no fígado, as estatinas alcançam o tecido hepático por meio da circulação, onde passam por biotransformação antes de serem excretadas na forma de bile (FONSECA et al., 2005). Estas substâncias atuam como inibidores da enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A (HMG-CoA) redutase, reduzindo a síntese do colesterol (CORSINI et al., 1999). O alvo primário das estatinas são os hepatócitos, visando inibir a enzima HMG-CoA redutase por meio de ligação competitiva a essa enzima. Isso resulta na redução da conversão de HMG-CoA em ácido mevalônico, um precursor do colesterol (CORSINI et al., 1999), e na inibição não competitiva com o co-substrato de NADPH (SPRENGER; SEPPI; POEWE, 2012).

O sítio ativo da HMG-CoA redutase é a região da enzima onde ocorre a ligação com o substrato (HMG-CoA) e onde ocorrem as reações químicas. As estatinas são moléculas que se assemelham estruturalmente ao HMG-CoA e competem com esse substrato pelo acesso ao sítio ativo da enzima. A semelhança estrutural permite que as estatinas se encaixem no sítio ativo da HMG-CoA redutase, inibindo sua atividade, impedindo que a HMG-CoA redutase se torne funcional (CORSINI et al., 1999; LOURE-VALE, MARTINEZ, 2002). Na Figura 1 é possível observar os mecanismos de ação da estatina.

Figura 1 – Mecanismos de ação da estatina.



Fonte: Adaptado de Loure-vale; Martinez (2002).

Algumas estatinas, como lovastatina, pravastatina e sinvastatina, são derivadas de fermentação fúngica (STANCU; SIMA, 2001). Outras, como fluvastatina, atorvastatina e rosuvastatina, são de origem sintética e são administradas como compostos ativos (na forma ácida). Por outro lado, lovastatina e sinvastatina são administradas como formas inativas (lactona) e, no fígado, passam por hidrólise enzimática para se converterem em formas ativas (STANCU; SIMA, 2001).

As estatinas hidrofílicas, como pravastatina e rosuvastatina, dependem de uma captação hepática mediada por transportadores. Em contraste, as estatinas lipofílicas, como atorvastatina, lovastatina, fluvastatina, pitavastatina, sinvastatina e cerivastatina, difundem-se passivamente pela membrana celular, resultando em uma menor hepatosseletividade. Essas estatinas lipofílicas têm a capacidade de se difundir para outros tecidos além do fígado (WARD; WATTS; ECKEL, 2019). Na Tabela 1 é possível observar as características das diferentes estatinas disponíveis no mercado.

Tabela 1 – Características principais das estatinas.

Medicamento	Derivado	Solubilidade	Formulário Administrado	Metabolismo	Excreção
Atorvastatina	Sintético	Lipofílico	Hidroxiácido ativo	CYP3A4	Hepático
Cerivastatina *	Sintético	Lipofílico	Hidroxiácido ativo	Vários CYP3A4	Hepático
Fluvastatina	Sintético	Lipofílico	Hidroxiácido ativo	CYP2C9	Hepático
Lovastatina	Fúngico	Lipofílico	Lactona inativa	CYP3A4	Hepático
Pitavastatina	Sintético	Lipofílico	Hidroxiácido ativo	Não-CYP450 CYP2C9/19-Limitado	Hepático
Pravastatina	Fúngico	Hidrofilico	Hidroxiácido ativo	Não-CYP450	Hepático e Renal
Rosuvastatina	Sintético	Hidrofilico	Hidroxiácido ativo	Não-CYP450 CYP2C9/2-Limitado	Hepático e Renal
Sinvastatina	Fúngico	Lipofílico	Lactona inativa	CYP3A4	Hepático

CYP= citocromo

* retirada do mercado

Fonte: Traduzido de Ward; Watts; Eckel (2019).

Os efeitos esperados da inibição da formação de colesterol pelos hepatócitos incluem a redução da reserva intracelular de colesterol, desencadeando medidas homeostáticas. Entre elas, destaca-se o estímulo à síntese de mais receptores e o aumento da atividade do receptor de LDL-colesterol na membrana celular. Essa resposta resulta na remoção do colesterol da corrente sanguínea e na internalização do conteúdo de colesterol pelos hepatócitos. Além disso, espera-se uma diminuição na produção e um aumento na depuração hepática de VLDL-colesterol (LOURE-VALE, MARTINEZ, 2002).

A interação medicamentosa entre estatinas e outros fármacos é reconhecida, e o uso excessivo pode levar à rabdomiólise devido à elevada concentração desses medicamentos nos músculos (ERIKSSON; ANGELIN; SJÖBERG, 2005). Por exemplo, a administração concomitante de estatinas com antifúngico azólico pode promover o desenvolvimento de miopatias, disfunção hepática, insuficiência renal e hipotireoidismo (MARON; FAZIO; LINTON, 2000).

Mais de 72% de todos os eventos adversos relacionados às estatinas estão associados a problemas musculares, como mialgias, miopatias e miosite, com elevação da creatinina quinase (CK). Além disso, foram relatados outros efeitos, como tendinopatias, distúrbios nos tendões e artralguas (WARD; WATTS; ECKEL, 2019).

Há sugestões de que os efeitos colaterais da terapia com estatinas podem estar relacionados ao desenvolvimento de *diabetes mellitus* tipo 2, doenças neurológicas e neurocognitivas, hepatotoxicidade, toxicidade renal, entre outros (WARD; WATTS; ECKEL, 2019). Acredita-se que a toxicidade esteja ligada à inibição da HMG-CoA redutase e a efeitos

celulares e subcelulares diretos ou combinados. No entanto, outros fatores possíveis, como genética, efeitos metabólicos e imunológicos, a dose, idade, sexo e comorbidades do paciente, podem estar envolvidos na determinação do grau de toxicidade (WARD; WATTS; ECKEL, 2019).

1.3. ROSUVASTATINA

A rosuvastatina, uma estatina sintética, exerce sua ação diretamente no fígado, inibindo a HMG-CoA redutase com seu substrato, por meio do grupo funcional do ácido heptanóico, sendo posteriormente excretada pelos rins (ISTVAN, 2002). Sua alta seletividade aos hepatócitos é atribuída a um grupo fenil fluorado e um grupo polar metilsufonamida (LONG et al., 2011). Por ser uma molécula hidrofílica, não requer conversão metabólica para se tornar solúvel em água, reduzindo interações medicamentosas (LONG et al., 2011). Devido à sua baixa lipofilicidade, maior seletividade hepática, baixa interatividade com o citocromo P450 hepático (CYP) e metabolismo mínimo, a rosuvastatina demonstra eficácia e ampla utilização (KHAN et al., 2019).

Disponível em diferentes doses no mercado, a rosuvastatina (5 mg, 10 mg, 20 mg e 40 mg) atinge sua máxima concentração plasmática entre 3 e 5 horas após a ingestão, com uma meia-vida de aproximadamente 19 horas. A eliminação ocorre principalmente por excreção biliar (dois terços) e renal (o restante), com apenas 10% da dose metabolizada (WHITE, 2002; RUBBA; MAROTTA; GENTILE, 2009).

Comparada a outras estatinas, a rosuvastatina destaca-se por sua eficácia na melhora dos perfis lipídicos, devido a ações antioxidantes, anti-inflamatórias e antitrombóticas. Sua administração é considerada segura a partir dos 6 anos de idade (CORTESE et al., 2016). Com quatro vezes mais afinidade pelo sítio ativo da enzima do que a HMG-CoA, a rosuvastatina, em doses iniciais no tratamento contínuo de adultos, reduz os perfis de LDL-colesterol em até 82%, superando outras estatinas como atorvastatina e sinvastatina (WHITE, 2002).

Estudos clínicos indicam que a rosuvastatina reduz em até 53% o LDL-colesterol e a aterosclerose coronariana (NISSEN et al., 2006). Comparada com outras estatinas como atorvastatina, pravastatina e sinvastatina, apresenta até 63% mais eficácia na redução do LDL-colesterol plasmático quando administrada em doses diárias de 5 a 40 mg, diminuindo também

os níveis de triglicérides, lipoproteínas aterogênicas, e proporcionando um perfil lipídico mais favorável (RUBBA; MAROTTA; GENTILE, 2009; SPRENGER; SEPPI; POEWE, 2012).

Entretanto, seu uso prolongado suscita preocupações. A rosuvastatina, devido à hidrofiliabilidade, pode causar efeitos extra-hepáticos, incluindo toxicidade muscular (NISSEN et al., 2006). O risco de desenvolvimento de *diabetes mellitus* tipo 2, aumento dos níveis de hemoglobina glicada em idosos quando coadministrada com outros fármacos (KOSTAPANOS; MILIONIS; ELISAF, 2010) e a ocorrência de miopatias também são associados ao uso prolongado deste medicamento (NISSEN et al., 2006; SPRENGER; SEPPI; POEWE, 2012; WARD; WATTS; ECKEL, 2019).

Estudos apontam que 28% dos pacientes em tratamento com 20 mg/dia de rosuvastatina desenvolveram *diabetes mellitus* tipo 2, evidenciando uma correlação, apesar da redução relativa nos níveis de LDL-colesterol. Além disso, houve uma maior incidência de depressão nestes pacientes (WARD; WATTS; ECKEL, 2019).

A coadministração de rosuvastatina com medicamentos que aumentam sua concentração sanguínea pode causar efeitos deletérios nos rins (KOSTAPANOS; MILIONIS; ELISAF, 2010). Alguns efeitos de medicamentos coadministrados com a rosuvastatina *in vitro* e *in vivo*, indicaram que a rosuvastatina não tem interação clinicamente significativa com o citocromo P450 (KOSTAPANOS; MILIONIS; ELISAF, 2010). A rosuvastatina é um substrato para determinadas proteínas transportadoras, bem como para o transportador de captação OATP1B1 e o transportador de efluxo BCRP do fígado, entretanto, a administração simultânea de rosuvastatina cálcica com medicamentos que são inibidores dessas proteínas resultam numa maior concentração plasmática de rosuvastatina, que, por consequência, acarreta um maior risco de miopatia (ORAL, 1999).

Diferentemente de outras estatinas, a rosuvastatina não apresenta interação medicamentosa com antifúngicos, tornando-se segura para coadministração (SPRENGER; SEPPI; POEWE, 2012). No entanto, são escassos os estudos sobre os efeitos da rosuvastatina na estrutura e função hepática, bem como sua eficácia e toxicidade, o que motiva o presente estudo em camundongos, buscando avaliar possíveis danos hepáticos causados pela administração crônica desde a pré-puberdade.

1.4. FÍGADO: ESTRUTURA, DESENVOLVIMENTO E FUNÇÃO

O fígado desempenha um papel fundamental em diversos processos fisiológicos, abrangendo o metabolismo de macronutrientes, suporte ao sistema imunológico, regulação do volume sanguíneo, homeostase lipídica e de colesterol, controle das vias de sinalização do crescimento, degradação dos xenobióticos, armazenamento de glicose, metabolização de proteínas e aminoácidos, além de ser o maior responsável por secretar proteínas no sangue, oxidar lipídios, empacotar e secretar o excesso dessas moléculas, para que sejam armazenadas em outros tecidos, como o tecido adiposo (TREFTS; GANNON; WASSERMAN, 2017; ELIAS, 1954).

Composto por diferentes tipos celulares, incluindo hepatócitos, colangiócitos, células de Kupffer, células estreladas e células endoteliais sinusoidais, o fígado exhibe uma complexa organização. Os hepatócitos são responsáveis por diversas funções hepáticas e apresentam expressão gênica e atividade metabólica distintas em cada zona do órgão (HAO, 2020; TREFTS; GANNON; WASSERMAN, 2017).

Os colangiócitos são as células que revestem o lúmen dos ductos biliares, e as células estreladas armazenam vitamina A quando estão em estado quiescente e organizam e depositam colágeno no fígado quando o órgão apresenta-se lesionado (TREFTS; GANNON; WASSERMAN, 2017). As células de Kupffer são macrófagos residentes no fígado e desempenham papéis pró- e anti-inflamatórios na cicatrização de feridas hepáticas (HAO, 2020; TREFTS; GANNON; WASSERMAN, 2017)

Por fim, as células endoteliais sinusoidais formam placas crivadas e fenestradas para revestir o lúmen sinusoidal, criando poros que variam de 50 a 180 nm em humanos ou de 50 a 280 nm em camundongos e ratos. Esta organização celular é a responsável por permitir a troca de proteínas e de outras moléculas (TREFTS; GANNON; WASSERMAN, 2017).

Em humanos, o desenvolvimento pré-natal hepático se dá por um programa complexo de diferenciação celular que é iniciado por gradientes de sinais exógenos, sinais de localização celular e vários fatores de transcrição (HAO, 2020). As células precursoras do parênquima hepático, os hepatoblastos, surgem do intestino anterior a partir do endoderma definitivo, e vão originar os hepatócitos e colangiócitos. Os fatores de crescimento de fibroblastos (FGF) e as proteínas morfogênicas ósseas (BMP) que derivam do mesoderma cardiogênico e do septo transversal são os primeiros sinais para o desenvolvimento do broto hepático (TREFTS; GANNON; WASSERMAN, 2017).

Após a formação do broto hepático, dá-se origem às células progenitoras bipotenciais conhecidas como hepatoblastos que se diferenciam ainda mais nas células do parênquima hepático: os hepatócitos e os colangiócitos (TREFTS; GANNON; WASSERMAN, 2017; HAO, 2020).

Em camundongos, por volta do dia embrionário 8, a parede ventral do endoderma do intestino anterior começa o desenvolvimento em direção a formação do tecido hepático, onde há liberação de FGF pelo mesoderma cardiogênico adjacente e de BMP advindas do mesênquima do septo transversal (DUNCAN, 2003).

Após o dia embrionário 9, as células do endoderma do intestino anterior iniciam a proliferação e diferenciação em hepatoblastos, gerando a formação do broto hepático (ZHAO; DUNCAN, 2005). Logo após a formação do broto hepático e a migração dos hepatoblastos do intestino anterior para formar cordões em direção ao septo transversal, as células hepáticas passam por uma segunda diferenciação celular, formando um conjunto celular hepático complexo, composto em sua maioria por hepatócitos e colangiócitos (ZHAO; DUNCAN, 2005; DUNCAN, 2003).

Em camundongos adultos, os vasos sanguíneos do fígado consistem em ramos de artéria hepática e veias portais, enquanto os vasos eferentes são constituídos pelas veias centrolobulares, estando conectadas por capilares conhecidos como sinusoides. Nesses sinusoides podemos encontrar células fagocíticas como as células de Kupffer, e células endoteliais fenestradas que são altamente especializadas e facilitam o transporte seletivo entre o sangue e o hepatócito. Assim como em humanos, o fígado do roedor expressa fatores de transcrição, como FoxA e GATA, além de expressar o gene de albumina (ZHAO; DUNCAN, 2005)

Já no fim da gestação (34-37 semanas em humanos e 18-21 dias em camundongos e ratos), o fígado passa por mudanças metabólicas, onde para de consumir a glicose e começa a produzir e armazená-la, devido a uma diminuição da expressão da enzima glicolítica glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD), acompanhado do aumento das enzimas necessárias para os processos gliconeogênicos e glicogênicos, que serão fundamentais para o metabolismo hepático na vida pós-natal. No período perinatal, vários fatores de transcrição são expressos, tais como CREB, FOXO, PPAR e HNF, os quais regulam a expressão de enzimas essenciais e a diferenciação funcional do armazenamento de glicogênio e a gliconeogênese. (TREFTS; GANNON; WASSERMAN, 2017).

O fígado também é responsável pela síntese, captação, empacotamento e secreção dos lipídios e de lipoproteínas. A síntese e a secreção biliar permitem que o fígado absorva lipídios

durante a digestão, formando quilomícrons que depois serão direcionados para o sistema linfático e para a corrente sanguínea. Então, a partir destes quilomícrons, ácidos graxos são extraídos pela lipoproteína lipase, que são transportados até os hepatócitos por proteínas transportadoras, por exemplo, proteínas de transporte de ácidos gordos 2, 4 e 5 e CD36 (NAKAGAKI et al., 2018; TREFTS; GANNON; WASSERMAN, 2017).

O armazenamento de ácido graxo serve para fonte de energia interna e para outros órgãos, a partir de produtos cetogênicos. Durante a alimentação, o fígado também fornece substratos lipídicos ao organismo, e transforma ácidos graxos e glicerol em triglicerídeos, que através do empacotamento em partículas de lipoproteínas de densidade muito baixa, são liberadas para circulação sanguínea, e chegam aos outros órgãos e tecidos para serem utilizados como fonte de energia. Qualquer falha no sistema de captação de lipídios, pode ocasionar deficiência de vitaminas em órgãos específicos ou em todo o corpo (NAKAGAKI et al., 2018; TREFTS; GANNON; WASSERMAN, 2017; HAO, 2020).

Ainda, é fundamental a manutenção da homeostase do colesterol, molécula que mantém a fluidez da membrana, onde o excesso dessa molécula pode resultar numa dinâmica inadequada da membrana e estimular processos patológicos que contribuem para aterosclerose e doenças cardiovasculares (NAKAGAKI et al., 2018; TREFTS; GANNON; WASSERMAN, 2017). O fígado é um órgão crítico para a síntese e quebra de proteínas, sendo a albumina a mais abundante e que contribui para 55% do total de proteínas plasmáticas (TREFTS; GANNON; WASSERMAN, 2017).

Ademais, a albumina é essencial para manutenção do volume sanguíneo e do transporte de outras moléculas, como os lipídios e os hormônios. Além de secretar proteínas, o fígado secreta fatores de crescimento, peptídeos e metaboliza aminoácidos para fornecer energia aos hepatócitos (TREFTS; GANNON; WASSERMAN, 2017; HAO, 2020).

A compreensão da fisiologia hepática é crucial, considerando as implicações graves que as doenças hepáticas podem ter na saúde, incluindo morbidades e mortalidade (TREFTS; GANNON; WASSERMAN, 2017). Assim, os camundongos *Swiss* foram usados nessa pesquisa devido às suas semelhanças genéticas e fisiológicas com seres humanos, sendo considerados organismos-modelo que possibilitaram a investigação de toxicidade tecidual hepática após exposição à rosuvastatina desde a pré-puberdade até a maturidade sexual.

2. JUSTIFICATIVA

Considerando que a rosuvastatina é amplamente utilizada para o tratamento das dislipidemias e para a prevenção de doenças cardiovasculares em humanos, e que o fígado é um dos principais órgãos-alvo para a metabolização das estatinas, este estudo buscou investigar a possível toxicidade hepática em camundongos expostos cronicamente à rosuvastatina da pré-puberdade a maturidade sexual, a fim de indicar uma possível toxicidade sistêmica ocasionada pelas exposições de longo prazo.

3. HIPÓTESE

A exposição crônica de camundongos machos à rosuvastatina, iniciada na pré-puberdade, resultará em toxicidade hepática, manifestada por danos teciduais e alterações morfométricas significativas no fígado, sobretudo em doses mais elevadas do medicamento.

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Investigar os efeitos hepáticos decorrentes da exposição de camundongos machos a diferentes doses de rosuvastatina desde a pré-puberdade até a maturidade sexual.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o estado de saúde geral dos camundongos através do consumo de água e de ração, e do ganho de massa corporal.
- Analisar o efeito da exposição de camundongos à rosuvastatina sobre a massa dos órgãos vitais.
- Investigar os possíveis danos teciduais hepáticos em camundongos tratados com rosuvastatina.
- Avaliar os efeitos do tratamento com rosuvastatina na morfometria hepática de camundongos machos.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 OBTENÇÃO DE CAMUNDONGAS PRENHES E DAS NINHADAS

Este estudo utilizou camundongos adultos da linhagem *Swiss*, sendo 8 machos com 80 dias de idade e peso aproximado de 40 g, além de 15 fêmeas adultas com 70 dias de idade e peso aproximado de 30 g. Os animais foram obtidos do Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina, no Campus de Florianópolis.

Os camundongos foram mantidos em um ambiente controlado, com ciclo de luz de 12 horas de claro e 12 horas de escuro, e temperatura constante de 23°C. Eles foram alojados em gaiolas de polietileno, contendo maravalha autoclavada como substrato, no Biotério Experimental de Mamíferos e Roedores do CCB/UFSC (sala 110C). Todos os animais tiveram acesso à água filtrada e ração para roedores *ad libitum*, e as condições de saúde foram monitoradas regularmente para detectar sinais de desconforto, tais como perda de apetite, perda de pelos, piloereção e diarreia.

Para obter os animais a serem tratados, as fêmeas nulíparas em fase de proestro, identificadas por análises de lavado vaginal (CALIGIONI, 2009), foram acasaladas com machos durante a fase escura do ciclo claro-escuro. O dia zero de prenhez (DG0) foi determinado pela presença de *plug* vaginal na manhã seguinte ou por lavagem vaginal seguida pela confirmação da presença de espermatozoides no lavado de fêmeas em estro. As fêmeas prenhes e lactantes foram mantidas em gaiolas individuais.

Após o nascimento da prole, o número de filhotes foi reduzido para oito, com a presença de 4 machos e 4 fêmeas. Neste estudo, foram utilizados apenas os filhotes do sexo masculino, enquanto os filhotes do sexo feminino foram destinados a outro estudo.

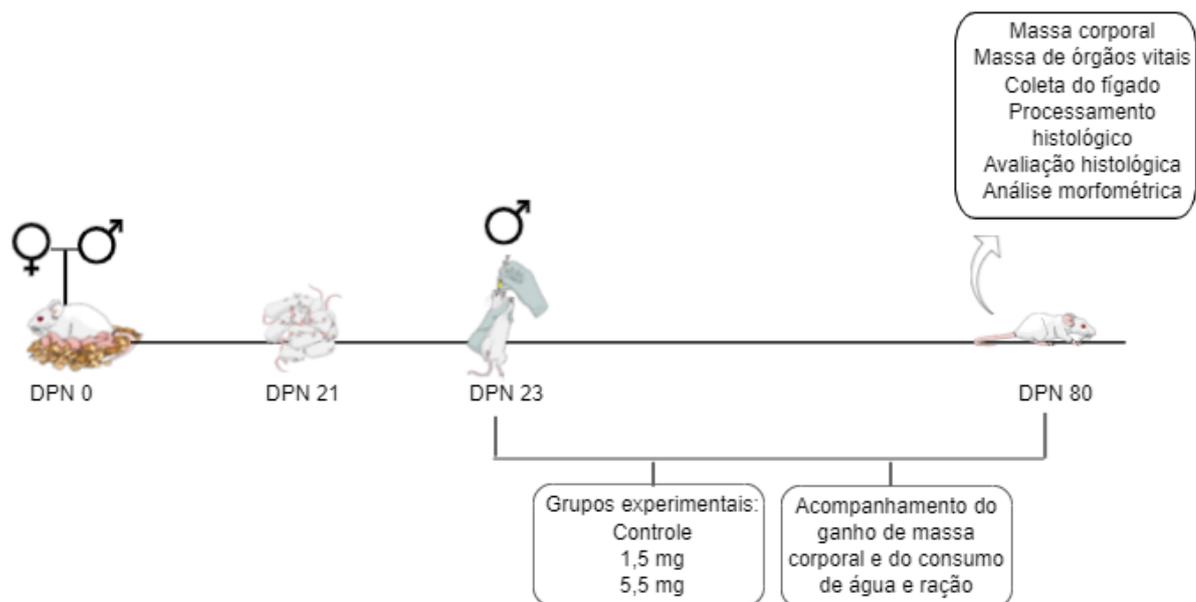
5.2. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

No dia pós-natal (DPN) 21, realizou-se o desmame e a distribuição randômica dos filhotes nos diferentes grupos experimentais. Os filhotes do sexo masculino foram alocados em

três grupos experimentais (n=10/grupo), com um ou dois filhotes de cada ninhada por grupo experimental. Estes receberam veículo (solução salina a 0,9%), 1,5 mg/kg/dia ou 5,5 mg/kg/dia de rosuvastatina diluída em veículo, administrada por via oral através do método de gavagem, do DPN 23 até a maturidade sexual, no DPN 80 (Figura 2). As doses de tratamento foram determinadas considerando a conversão de doses entre seres humanos e camundongos, levando em consideração a área da superfície corporal das espécies em questão (REAGAN-SHAW; NIHAL; AHMAD, 2008), e as dosagens de rosuvastatina disponíveis no mercado.

O experimento está em conformidade com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Santa Catarina, sob o número de protocolo 1688170919.

Figura 2 – Delineamento experimental.



Fonte: Elaborada pela autora (2023).

5.3. GANHO DE MASSA CORPORAL E CONSUMO DE ÁGUA E RAÇÃO

Os camundongos foram pesados em dias alternados durante todo o experimento para acompanhamento do ganho de massa corporal. Além disso, foram registrados a cada três dias

o consumo de água e ração desde o início dos tratamentos até imediatamente antes da eutanásia dos animais (SILVA et al., 2020). A partir desses dados, foram obtidos o consumo médio diário de água e ração pelos animais, bem como o ganho de massa corporal médio dos camundongos.

5.4. EUTANÁSIA, COLETA E PESAGEM DOS ÓRGÃOS

No DPN 80, os roedores machos foram inicialmente pesados e posteriormente submetidos à eutanásia por inalação de isoflurano, seguida de deslocamento cervical. Foi realizada a coleta e pesagem do fígado, de ambos os rins, coração, pulmão, encéfalo, baço e adrenal, sendo o fígado o órgão de maior interesse para este estudo. Os demais órgãos foram descartados após a pesagem. Os procedimentos estão em conformidade com o método descrito por Leite et al. (2018).

5.5. ANÁLISES HISTOPATOLÓGICAS E MORFOMÉTRICAS

No DNP 80, após a coleta, um fragmento do lobo esquerdo do fígado foi fixado na solução modificada de Davidson por 24 horas (LATENDRESSE et al., 2002), que posteriormente foi processado histologicamente para inclusão em parafina. Os cortes foram realizados no micrótomo LEICA RM2255, de forma não-seriada, com uma distância de 50 µm entre eles, visando obter três seções de diferentes regiões de cada órgão. Ainda, os cortes de fígado foram seccionados com uma espessura de 4 µm, sendo corados com hematoxilina e eosina (HE) para avaliação histopatológica geral em microscopia de luz.

Além disso, cortes adicionais foram obtidos e corados com Picrosirius e contracorados com hematoxilina para avaliação qualitativa do conteúdo de colágeno no tecido hepático (LATTOUF et al., 2014), e com Ácido periódico-Schiff e hematoxilina para análise qualitativa do conteúdo de polissacarídeos neutros, como é o caso do glicogênio hepático, conforme protocolo de Fu e Campbell-Thompson (2017).

As análises histopatológicas e morfométricas foram realizadas em ensaio cego. No fígado foi avaliado o aspecto geral dos hepatócitos, dos capilares sinusoides, das artérias e veias

hepáticas, ductos biliares e células de Kupffer (WALLIG et al, 2018). Ainda, foram analisados os seguintes *endpoints*: presença de necrose; esteatose (lipidose microvesicular ou macrovesicular); acidofilia citoplasmática ou retração nuclear dos hepatócitos, que são indicativos de morte celular; presença de infiltrado inflamatório; atrofia ou hipertrofia de células hepáticas; dilatação vascular; e depósito de pigmentos como a lipofuscina (CATTLEY, CULLEN, 2018). Todas essas alterações são características da presença de toxicidade hepática (WALLIG et al., 2018).

As fotomicrografias foram obtidas no microscópio Olympus BX 41 acoplado com câmera específica. Para as análises de estereologia do tecido hepático e de mensuração das áreas nos hepatócitos, foram utilizadas as fotomicrografias obtidas, que foram analisadas utilizando o programa ImageJ.

As análises morfométricas foram realizadas nos hepatócitos, a fim de mensurar a área nuclear, área total celular e a área citoplasmática dessas células. Adicionalmente, foram realizadas análises estereológicas a partir das fotomicrografias obtidas de cortes corados com Picrosirius e hematoxilina (18 fotomicrografias por animal, sendo 9 de áreas centrais e 9 de áreas periféricas dos lóbulos hepáticos) e Ácido periódico-Schiff (9 fotomicrografias por animal de áreas periféricas de lóbulos hepáticos) para mensuração da porcentagem ocupada pelos diferentes componentes teciduais, como os hepatócitos, capilares sinusoides, veia centrolobular (quando presente), células de Kupffer, abundância de glicogênio citoplasmático, conteúdo de fibras de colágeno e demais componentes do tecido hepático.

5.6. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os dados foram testados para normalidade e homoscedasticidade pelo teste de Shapiro-Wilk. Em seguida, os dados que apresentaram avaliação contínua ao longo do experimento, tais como o consumo de água e ração e o ganho de massa corporal, foram analisados pelo teste *Two-way* ANOVA complementados com o teste post-hoc de Tukey. Os demais parâmetros foram analisados através dos testes *One-way* ANOVA ou Kruskal-Wallis, seguidos pelos testes *post-hoc* de Tukey ou Dunn, respectivamente, dependendo da natureza da distribuição dos dados. As diferenças foram consideradas significativas quando $p \leq 0,05$.

6. RESULTADOS

A Tabela 2 sintetiza os resultados obtidos ao final do experimento após o tratamento dos camundongos com rosuvastatina desde a pré-puberdade.

Tabela 2 - Síntese dos resultados obtidos após exposição à rosuvastatina, em comparação ao grupo controle.

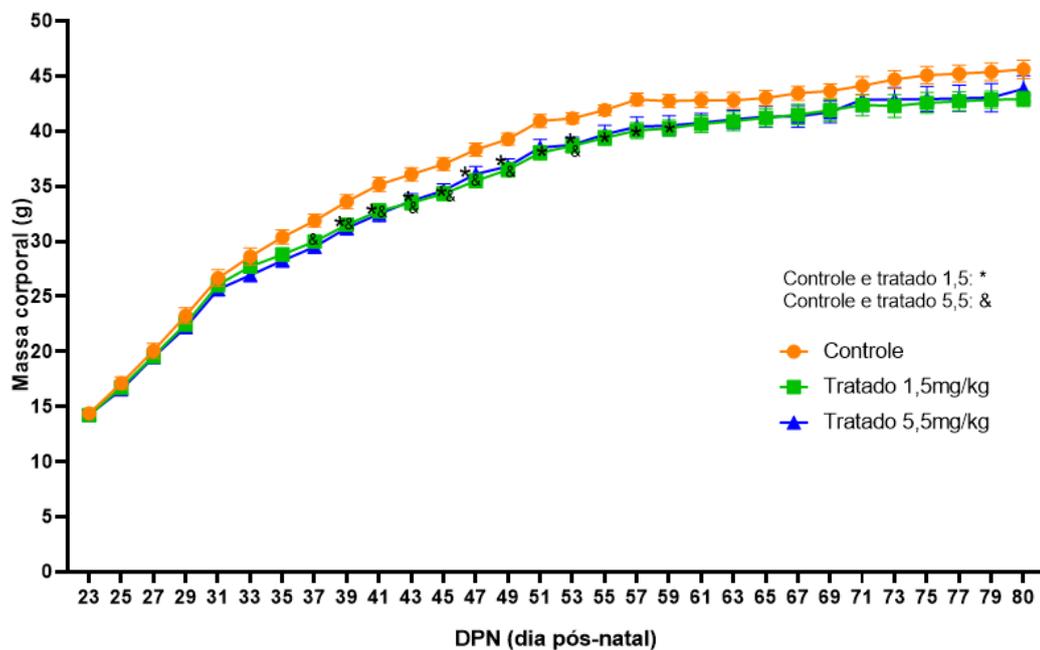
Parâmetros	Diferença entre os grupos	
Tratamento do dia DPN 23 até DPN 80		
Massa do fígado	=	
Massa dos demais órgãos	=	
Ganho de massa corporal	↓ 1,5 mg/Kg e 5,5mg/Kg	
Consumo de água	↓ 1,5 mg/Kg e 5,5mg/Kg	
Consumo de ração	↓ 1,5 mg/Kg e 5,5mg/Kg	
Histopatologia hepática		
Dilatação dos capilares sinusóides	↑ 1,5 mg/Kg	↑↑ 5,5mg/Kg
Indicativo de morte celular	↑ 1,5 mg/Kg	↑↑ 5,5mg/Kg
Hipertrofia dos hepatócitos	↑ 1,5 mg/Kg	↑↑ 5,5mg/Kg
Hepatócitos binucleados	↑ 1,5 mg/Kg	↑↑ 5,5mg/Kg
Infiltrados inflamatórios	↑ 1,5 mg/Kg	↑↑ 5,5mg/Kg
Estereologia hepática da região central do lóbulo hepático - (Picrosirius e hematoxilina)		
Núcleo dos hepatócitos	=	
Citoplasma	=	
Colágeno	=	
Capilares sinusóides	↑ 1,5 mg/Kg e 5,5mg/Kg	
Células de Kupffer	=	
Demais componentes	=	
Estereologia hepática da periferia do lobúlo hepático - (Picrosirius e hematoxilina)		
Núcleo dos hepatócitos	=	
Citoplasma	=	
Colágeno	=	
Capilares sinusóides	↑ 1,5 mg/Kg e 5,5mg/Kg	
Células de Kupffer	=	
Demais componentes	=	
Estereologia hepática (Ácido periódico-Schiff)		
Núcleo dos hepatócitos	=	
Citoplasma com glicogênio	=	
Citoplasma sem glicogênio	=	
Capilares sinusóides	↑ 1,5 mg/Kg e 5,5mg/Kg	
Células de Kupffer	=	
Demais componentes	=	

Avaliações realizadas neste estudo e seus principais desfechos. Uma seta indica que houve diferença em relação ao grupo controle e duas setas indicam diferenças ainda mais acentuadas em relação ao grupo controle.

6.1. GANHO DE MASSA CORPORAL

Houve redução no ganho de massa corporal dos grupos tratados com rosuvastatina nas doses de 1,5 mg/Kg e 5,5 mg/Kg, quando comparado ao grupo controle. No grupo de menor dose a redução do ganho de massa ocorreu do DPN 41 ao DPN 59 enquanto que no grupo exposto a maior dose a diferença foi observada do DPN 37 ao DPN 53, embora não de maneira uniforme em todas as idades avaliadas neste grupo experimental (Figura 3).

Figura 3 - Ganho da massa corporal dos animais dos grupos controle e tratados com rosuvastatina.

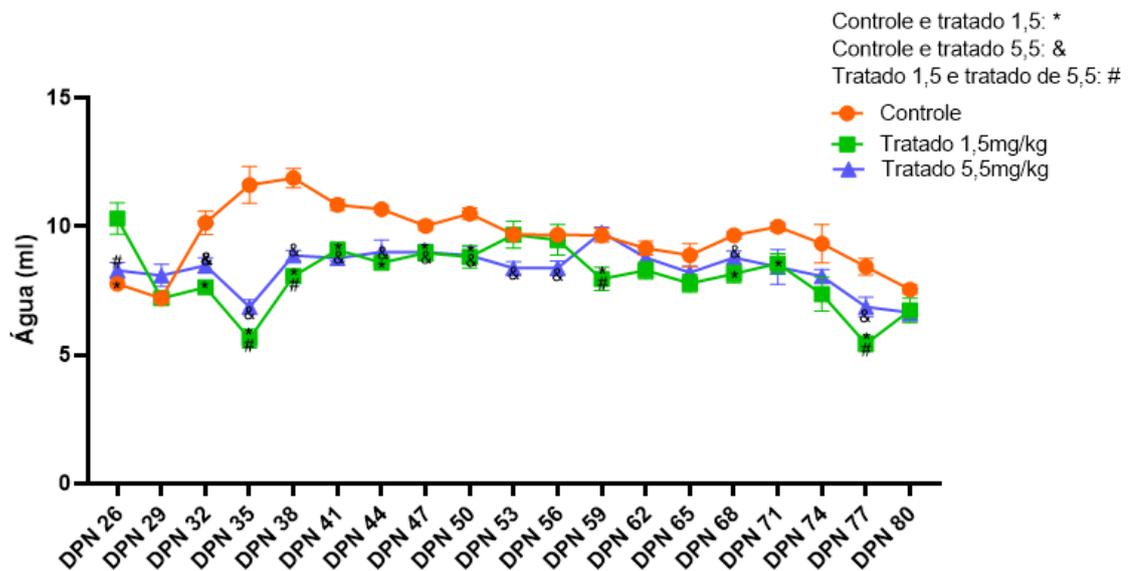


Os valores estão expressos como média \pm erro padrão da média (EPM). *Two-way* ANOVA seguida de teste *post-hoc* de Tukey. $p < 0,05$.

6.2. CONSUMO DE ÁGUA E RAÇÃO

O consumo de água mostrou-se reduzido nos grupos tratados com 1,5 mg/kg e 5,5 mg/kg do medicamento em comparação com o grupo controle, em diferentes períodos do tratamento (Figura 4).

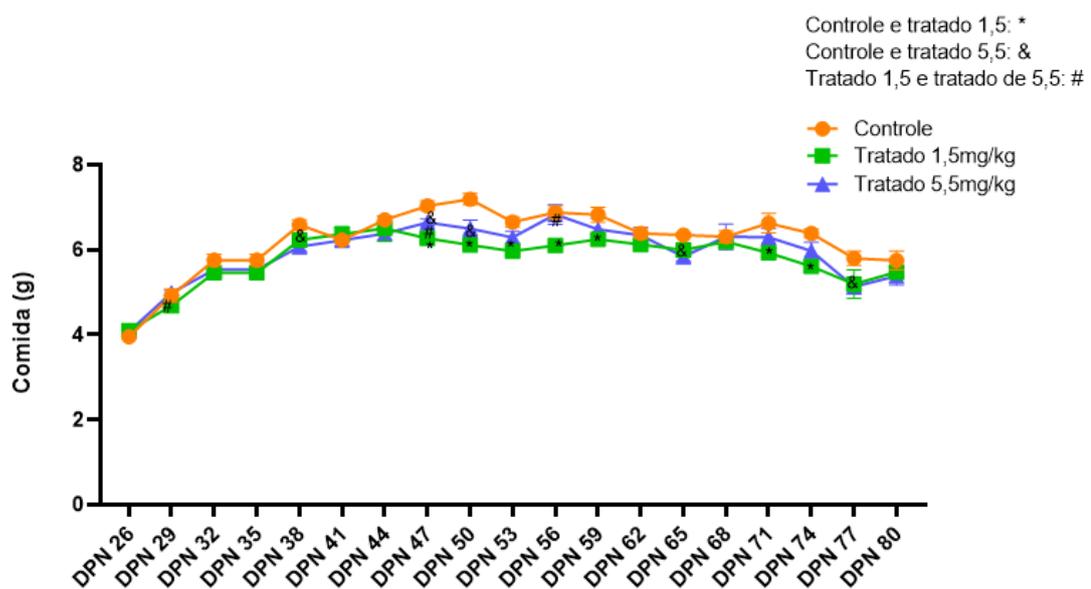
Figura 4 – Consumo de água dos animais dos grupos controle e expostos à rosuvastatina.



Os valores estão expressos como média \pm EPM. *Two-way* ANOVA seguida de teste *post-hoc* de Tukey. $p < 0,05$.

Em relação ao consumo de ração, verificou-se uma redução na ingestão alimentar dos animais dos grupos submetidos ao tratamento com rosuvastatina em diferentes momentos da exposição (Figura 5).

Figura 5 – Consumo de ração dos animais dos grupos controle e tratados com rosuvastatina.



Os valores estão expressos como média \pm EPM. *Two-way* ANOVA seguida de teste *post-hoc* de Tukey. $p < 0,05$.

6.3. MASSA DOS ÓRGÃOS VITAIS

A massa dos órgãos vitais obtidos, tais como o fígado, rim, coração, pulmão, adrenal, encéfalo, hipófise e baço, mostrou-se similar entre os grupos experimentais (Tabela 3).

Tabela 3 – Massa dos órgãos vitais dos animais dos grupos controle e tratados com rosuvastatina.

	Grupos experimentais (n=10/grupo)		
	Controle	1,5 mg/Kg	5,5 mg/Kg
Fígado (g)	2,08 ± 0,08	1,86 ± 0,06	1,96 ± 0,13
Rins (mg)	328,00 ± 10,0	307,50 ± 11,0	295,00 ± 15,80
Coração (mg)	175,00 ± 4,70	166,00 ± 2,90	169,00 ± 3,20
Pulmão (mg)	221,00 ± 5,20	218,50 ± 9,30	215,50 ± 9,50
Adrenal (mg)	3,00 ± 0,54	3,00 ± 0,32	3,00 ± 0,33
Encéfalo (mg)	467,00 ± 7,30	466,50 ± 8,20	455,50 ± 7,80
Hipófise (mg)	3,00 ± 0,59	3,00 ± 0,17	3,00 ± 0,24
Baço (mg)	157,00 ± 11,40	150,00 ± 35,30	135,50 ± 6,20

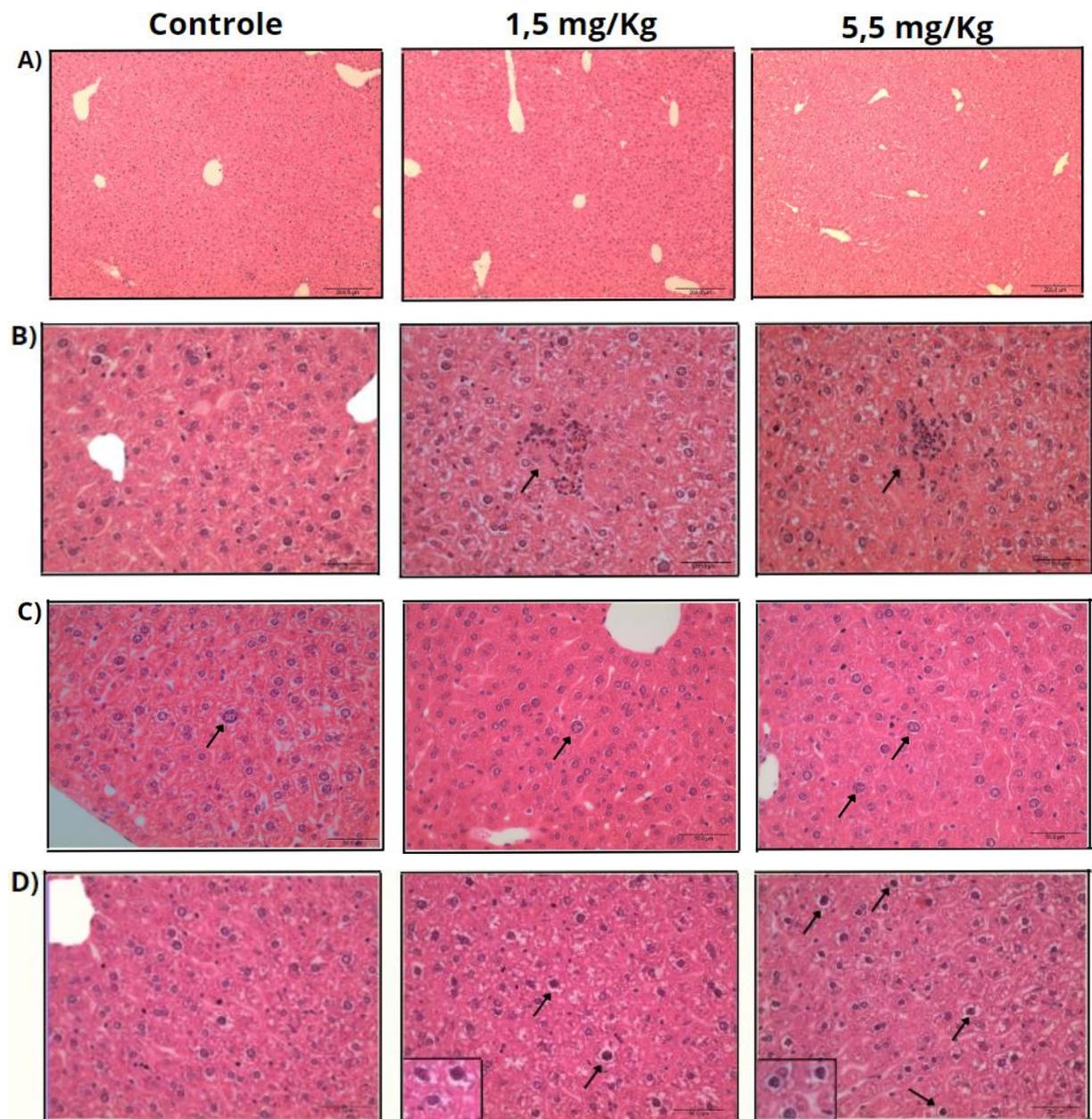
Valores expressos como média ± EPM. *One-way* ANOVA seguida de teste *post-hoc* de Tukey. $p > 0,05$.

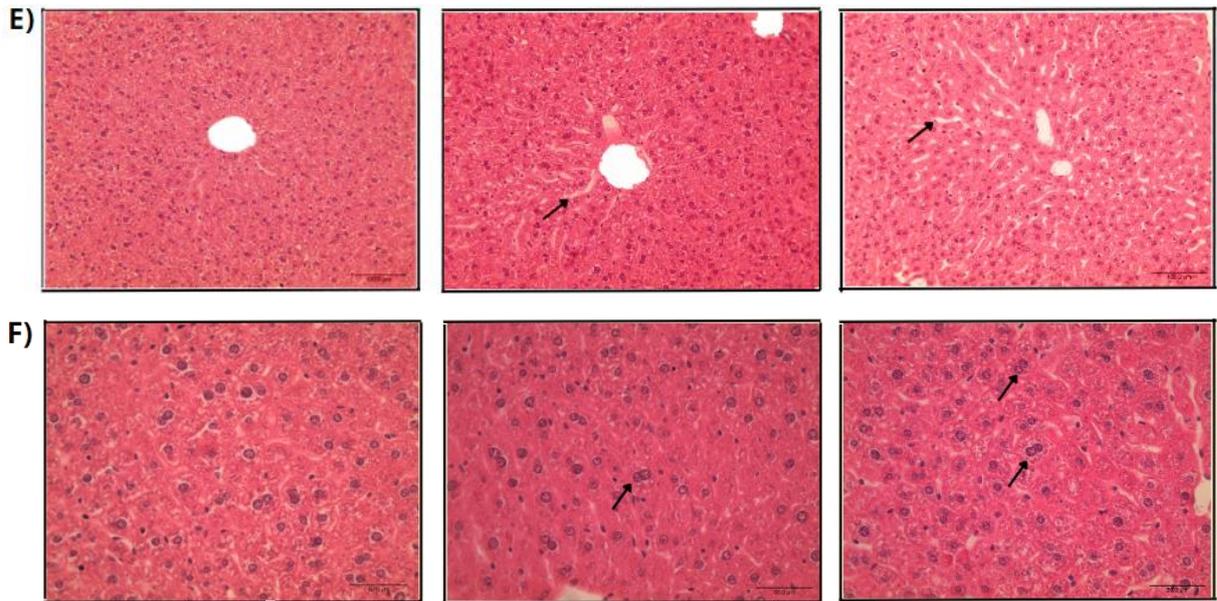
6.4. ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA

Abaixo, na Figura 6, estão apresentadas as fotomicrografias do fígado dos animais dos diferentes grupos experimentais, após coloração usual com hematoxilina e eosina. Nos grupos expostos à estatina, em ambas as doses, houve aumento na frequência de infiltrados inflamatórios, em comparação com o grupo controle (Figura 6B). Destaca-se que todos os grupos experimentais apresentaram hipertrofia de alguns hepatócitos, que foi encontrado em baixa frequência, inclusive nos controles (Figura 6C). Ainda, foi encontrado um maior número de hepatócitos com indicativos de morte celular, tais como retração nuclear e intensa acidofilia citoplasmática, nos grupos expostos à rosuvastatina, em comparação ao grupo controle (Figura 6D).

Além disso, os animais expostos a ambas as doses da estatina demonstraram dilatação dos capilares sinusoides hepáticos, cujo efeito não foi encontrado nos animais controle (Figura 6E). Em relação a presença de hepatócitos binucleados, também houve aumento da frequência desta alteração nos dois grupos tratados (Figura 6F).

Figura 6 - Fotomicrografias do fígado dos animais dos grupos experimentais corados com hematoxilina e eosina.

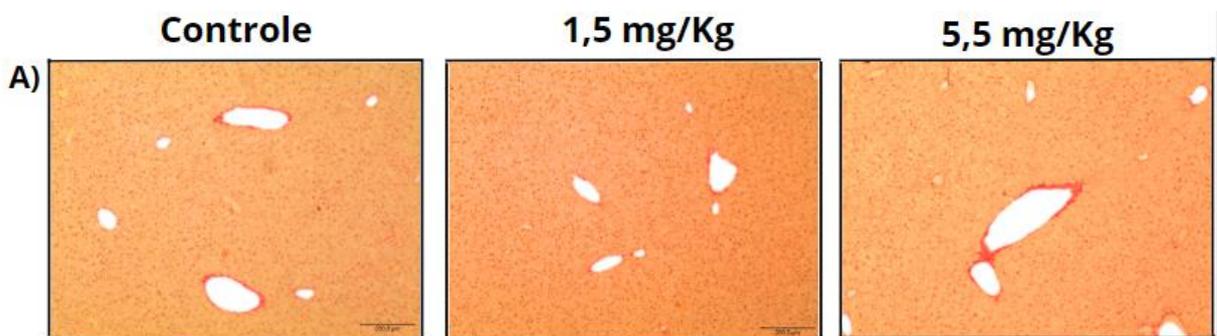


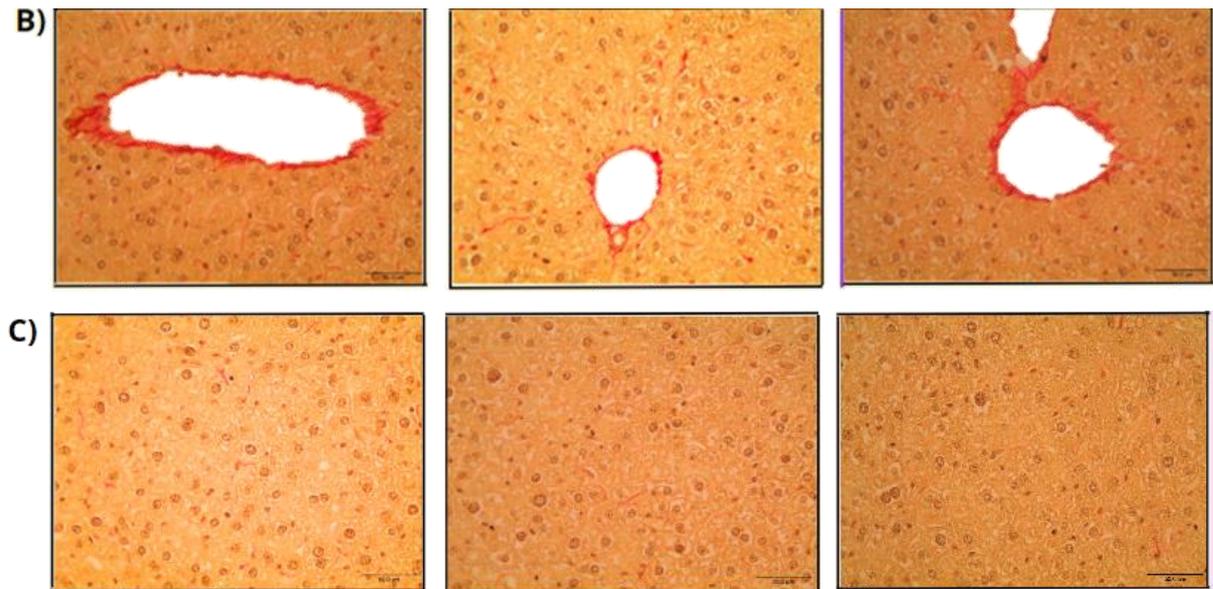


Fotomicrografias hepáticas dos animais dos grupos controle e tratados com rosuvastatina. (A) Visão geral do tecido hepático; (B) Presença de infiltrados inflamatórios nos grupos expostos à estatina (setas); (C) Presença de hipertrofia dos hepatócitos nos grupos controle e tratados (setas); (D) Presença de hepatócitos com indicativos de morte celular (setas); (E) Dilatação sinusoidal (setas); (F) Presença de hepatócitos binucleados (setas). Escala = 200 μ m em A, 100 μ m em E e 50 μ m em B, C, D e F. Hematoxilina e eosina.

A Figura 7 apresenta as fotomicrografias do fígado dos animais dos grupos experimentais após coloração com Picosirius e hematoxilina. A distribuição das fibras de colágeno mostrou-se similar entre os diferentes grupos experimentais (Figura 7).

Figura 7 - Fotomicrografias do fígado dos animais dos grupos experimentais corados com Picosirius e hematoxilina.

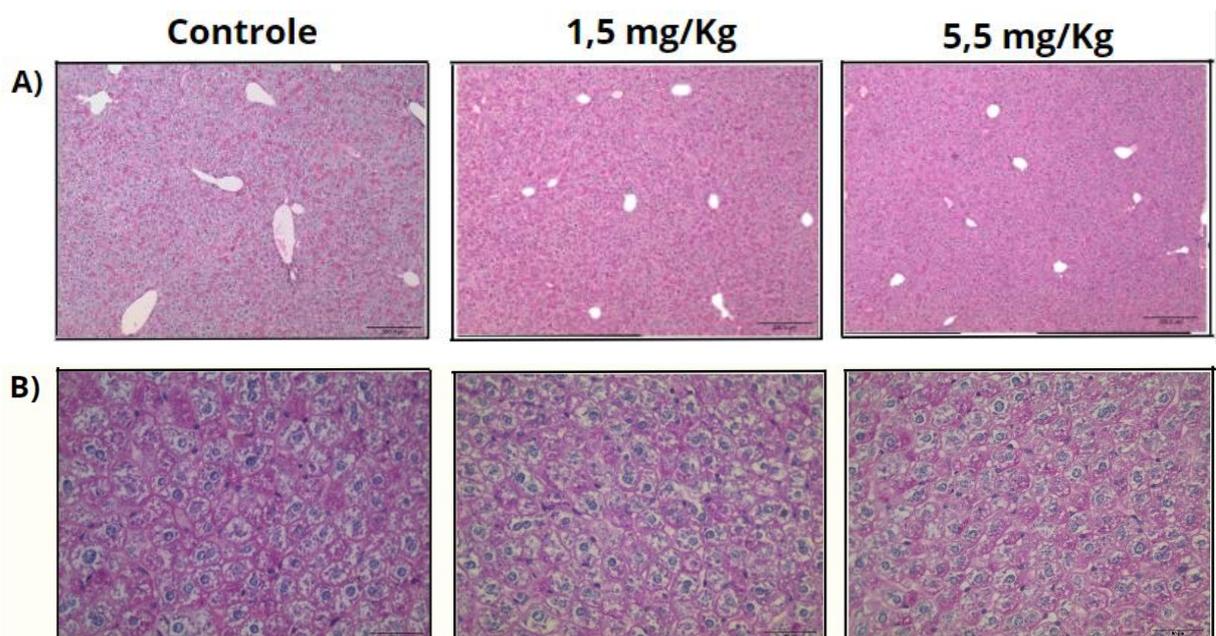




Fotomicrografias hepáticas dos animais dos grupos controle e tratados com rosuvastatina. (A) Visão geral do tecido hepático; (B) Detalhamento de área central de lóbulo hepático; (C) Detalhamento de área periférica de lóbulo hepático. Escala = 200 μ m na primeira linha e 50 μ m na segunda e terceira linhas. Pricrosirius e hematoxilina.

Na Figura 8 estão apresentadas as fotomicrografias do fígado dos animais dos grupos controle e tratados após coloração com Ácido periódico-Schiff. Não houve diferença na distribuição de glicogênio no citoplasma dos hepatócitos entre os grupos experimentais (Figura 8).

Figura 8 - Fotomicrografias do fígado dos animais dos grupos experimentais corados com Ácido periódico-Schiff.



Fotomicrografias hepáticas dos animais dos grupos controle e tratados com rosuvastatina. (A) Visão geral do tecido hepático; (B) Detalhamento de área periférica de lóbulo hepático. Escala = 200 µm na primeira linha e 50 µm na segunda linha.

6.5. MORFOMETRIA HEPÁTICA

Os resultados relacionados à estereologia do fígado estão representados nas Tabelas 4 e 5. Houve aumento na taxa de capilares sinusóides no tecido hepático nas áreas centrais (Tabela 4) e periféricas (Tabela 5) dos lóbulos hepáticos, o que indica dilatação sinusoidal. Os demais parâmetros avaliados não apresentaram diferenças entre os grupos experimentais.

Tabela 4 – Estereologia do tecido hepático realizada em área periférica dos lóbulos hepáticos nos animais dos grupos controle e tratados com rosuvastatina após coloração com Picrosirius e hematoxilina.

	Grupos experimentais (n=6/grupo)		
	Controle	1,5 mg/Kg	5,5 mg/Kg
Núcleo dos hepatócitos (%)	6,52 (6,01 – 6,94)	5,91 (5,55 – 6,53)	5,86 (5,57 – 6,21)
Citoplasma dos hepatócitos (%)	74,12 (73,34 – 74,84)	72,63 (71,35 – 73,94)	72,48 (70,67 – 75,08)
Fibras de colágeno (%)	12,75 (11,60 – 13,57)	10,65 (9,79 – 11,41)	8,94 (7,92 – 13,51)
Capilares sinusóides (%)	4,80 (3,77 – 5,97) ^a	9,87 (8,28 – 10,62) ^b	9,10 (6,66 – 10,67) ^b
Células de Kupffer (%)	1,23 (0,81 – 1,46)	1,28 (1,12 – 1,61)	1,45 (1,20 – 1,56)
Demais componentes teciduais (%)	0,25 (0,10 – 0,63)	0,30 (0,17 – 0,41)	0,30 (0,20 – 0,56)

Valores expressos em mediana e desvio intervalo interquartilico. Kruskal-Wallis seguido pelo teste *post-hoc* de Dunn. Letras diferentes indicam diferença estatística entre os grupos. $p < 0.05$.

Tabela 5 - Estereologia do tecido hepático realizada em área central dos lóbulos hepáticos nos animais dos grupos controle e tratados com rosuvastatina após coloração com Picrosirius e hematoxilina.

	Grupo experimental (n=6/grupo)		
	Controle	1,5 mg/Kg	5,5 mg/Kg
Núcleo dos hepatócitos (%)	4,72 (4,14 – 5,36)	4,36 (3,85 – 4,69)	6,01 (5,08 – 6,78)
Citoplasma dos hepatócitos (%)	70,01 (67,92 – 72,97)	66,10 (63,12 – 68,72)	68,67 (65,49 – 69,72)
Fibras de colágeno (%)	14,91 (13,78 – 18,51)	16,51 (15,61 – 17,75)	14,41 (12,88 – 16,30)
Capilares sinusóides (%)	5,12 (4,46 – 5,79) ^a	8,53 (7,55 – 10,72) ^b	7,58 (7,29 – 8,36) ^b
Células de Kupffer (%)	1,07 (0,69 – 1,38)	0,56 (0,17 – 0,92)	0,81 (0,56 – 1,72)
Demais componentes teciduais (%)	0,25 (0,10 – 0,63)	0,30 (0,17 – 0,41)	0,30 (0,20 – 0,56)
Veia Centrolobular (%)	2,16 (1,72 – 3,42)	2,74 (1,83 – 3,13)	3,03 (2,28 – 3,86)

Valores expressos em mediana e desvio intervalo interquartilico. Kruskal-Wallis seguido pelo teste *post-hoc* de Dunn. Letras diferentes indicam diferença estatística entre os grupos. $p < 0.05$.

A estereologia realizada após coloração com Ácido periódico-Schiff demonstrou aumento na taxa de capilares sinusóides nos grupos tratados com a estatina, embora não tenha sido demonstrado diferença na porcentagem do conteúdo de glicogênio no citoplasma dos hepatócitos, bem como nos demais parâmetros avaliados (Tabela 6).

Tabela 6 - Estereologia do tecido hepático realizada em área periférica dos lóbulos hepáticos nos animais dos grupos controle e tratados com rosuvastatina após coloração com Ácido periódico-Schiff.

	Grupo experimental (n=6/grupo)		
	Controle	1,5 mg/Kg	5,5 mg/Kg
Núcleo dos hepatócitos (%)	7,91 (7,51 – 8,77)	6,61 (5,82 – 7,38)	7,49 (6,96 – 7,91)
Citoplasma com glicogênio (%)	67,59 (61,71 – 70,60)	63,10 (59,60 – 67,85)	63,19 (59,26 – 64,58)
Citoplasma sem glicogênio (%)	17,36 (15,14 – 20,53)	17,36 (13,14 – 21,62)	16,67 (14,55 – 20,48)
Capilares Sinusóides (%)	3,51 (3,04 – 5,45) ^a	7,86 (6,36 – 10,90) ^b	8,74 (8,09 – 9,81) ^b
Células de Kupffer (%)	2,08 (1,94 – 2,44)	2,03 (1,59 – 3,67)	2,68 (2,24 – 2,96)
Demais Componentes (%)	0,09 (0,00 – 0,39)	0,59 (0,22 – 0,89)	1,01 (0,41 – 1,27)

Valores expressos em mediana e desvio interquartilico. Kruskal-Wallis seguido pelo teste *post-hoc* de Dunn. Letras diferentes indicam diferença estatística entre os grupos. $p < 0.05$.

Em relação às morfometrias realizadas nos hepatócitos, houve aumento da área nuclear destas células nos grupos expostos à estatina, entretanto, a área citoplasmática e a área total dos hepatócitos mostraram-se semelhantes entre os grupos experimentais (Tabela 7).

Tabela 7 – Morfometria dos hepatócitos dos grupos controle e tratados com rosuvastatina.

	Grupo experimental (n=6/grupo)		
	Controle	1,5 mg/Kg	5,5 mg/Kg
Área nuclear (μm^2)	61,64 (57,14 – 65,17) ^a	64,38 (61,17 – 70,54) ^{ab}	68,72 (66,73 – 71,89) ^b
Área citoplasmática (μm^2)	399,10 (393,70 – 412,90)	407,60 (402,70 – 415,50)	400,90 (399,80 – 404,30)
Área total (μm^2)	459,50 (454,10 – 473,30)	470,20 (467,40 – 476,40)	470,90 (467,20 – 473,40)

Valores expressos como média \pm EPM. *One-way* ANOVA seguida de teste *post-hoc* de Tukey. Letras diferentes indicam diferença estatística entre os grupos. $p < 0.05$.

7. DISCUSSÃO

Amplamente utilizadas para o tratamento de pacientes com hipercolesterolemia, as estatinas pertencem a classe terapêutica mais eficaz no controle dos níveis de LDL-colesterol. São bastante utilizadas na proteção contra doenças ateroscleróticas, cardiovasculares e na prevenção da formação de trombos (ALBA, 2011; STANCU; SIMA, 2001). Utilizadas por mais de 200 milhões de pessoas pelo mundo, a discussão sobre sua hepatotoxicidade ainda não está completamente elucidada (VARGAS et al., 2017). Muitas pesquisas buscam demonstrar os benefícios e a segurança do uso contínuo das estatinas, entretanto, através das análises desse estudo, podemos destacar que apesar da sua importância, as estatinas apresentam riscos a estrutura hepática, o que poderia, inclusive, impactar na função do órgão.

Para monitorar o estado de saúde e bem-estar dos animais, o acompanhamento do consumo de água e ração, juntamente com a avaliação da massa corporal dos animais durante o período de exposição, torna-se crucial, já que fornece *insights* valiosos sobre efeitos que podem estar relacionados à toxicidade, enquanto que alterações na massa dos órgãos são considerados indicativos de uma possível toxicidade sistêmica (*ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY- EPA, 1998*).

Neste estudo, houve redução temporária no ganho de massa dos grupos expostos à estatina, sendo que na menor dose, a redução do ganho de massa corporal ocorreu do DPN 41 ao DPN 57, e na maior dose, do DPN 37 ao DPN 53, indicando que, em doses maiores da estatina, a redução no ganho de massa corporal ocorre antes, sendo este um efeito dose-dependente crescente. Nesta pesquisa, houve também uma menor ingestão de água e ração durante parte do período de tratamento, que coincide com a redução do ganho de massa corporal, o que sugere que a redução na ingestão hídrica e alimentar impacta o ganho de massa corporal dos animais. Todavia, na etapa final do tratamento, os animais conseguiram reverter o reduzido ganho de massa que tiveram durante a peripuberdade.

Um estudo realizado por Caparrós-Martín e colaboradores, evidenciou que durante o tratamento de camundongos com atorvastatina e pravastatina, duas outras estatinas amplamente utilizadas, houve uma remodelação na microbiota intestinal dos animais, ocasionando um perfil de fermentação alterado e disfuncional (CAPARRÓS-MARTÍN et al., 2017). Essas alterações foram capazes de promover uma menor ingestão de ração nos grupos expostos às estatinas em comparação ao grupo controle (CAPARRÓS-MARTÍN et al., 2017). Assim, essas modificações na microbiota poderiam explicar a redução na ingestão alimentar observada neste

estudo em parte do período de tratamento, nos grupos expostos à rosuvastatina, em diferentes doses.

Neste estudo, o peso hepático não se mostrou afetado pelos tratamentos, mas a histoarquitetura do órgão apresentou diversas alterações, que sugerem toxicidade hepática, como a dilatação dos capilares sinusóides. Os sinusóides hepáticos representam uma matriz vascular bem organizada que fornece o ambiente estrutural e bioquímico no qual as células hepáticas não-parenquimatosas estão entremeadas e se comunicam, conectando a tríade portal à veia central (MARRONE; SHAH; GRACIA-SANCHO, 2016; VARGAS et al., 2017).

Os sinusóides são responsáveis pela liberação de citocinas e fatores de crescimento necessários para os hepatócitos, que, por sua vez, modulam o crescimento desses vasos sanguíneos juntamente com as demais células não-parenquimatosas (MARRONE; SHAH; GRACIA-SANCHO, 2016). Além disso, por estes serem vasos sanguíneos fenestrados com endotélio e lâmina basal descontínuos, de pequeno calibre, eles estão relacionados à maioria das funções hepáticas importantes, tais como as trocas gasosas, transferência de nutrientes e a desintoxicação (WAKE; SATO, 2015).

A dilatação dos capilares sinusóides pode estar relacionada a obstrução do fluxo venoso, onde a cronicidade do comportamento do fluxo e a congestão, ocasionam a dilatação do capilar, dano endotelial, atrofia dos hepatócitos e deposição de fibrose (BRANCATELLI et al., 2018). O bom funcionamento entre esses componentes e suas relações intercelulares é fundamental para a substituição dos hepatócitos perdidos, após um evento de lesão isquêmica ou tóxica, a fim de promover a regeneração hepática (MARRONE; SHAH; GRACIA-SANCHO, 2016).

Neste estudo, uma das alterações histopatológicas encontradas foi a dilatação sinusoidal nos grupos expostos à rosuvastatina, sendo o efeito mais danoso encontrado no grupo de maior dose. Além disso, este resultado foi confirmado através da estereologia do tecido hepático, que demonstrou aumento na taxa ocupada por sinusoides no tecido hepático. Assim, constata-se uma relação dose-dependente crescente em relação a dilatação vascular promovida pela rosuvastatina. Em estudos prévios, as estatinas já mostraram ser capazes de promover vasodilatação em outros órgãos, tais como nas artérias coronárias e artérias periféricas do coração e no endotélio dos vasos linfáticos (KOH, 2000)

Os capilares sinusoides são importantes detectores de lesões, principalmente no início de danos à estrutura hepática, portanto, é comum perceber uma disfunção na distribuição e apresentação desses sinusóides quando há danos na estrutura do fígado, quando comparados com o tecido hepático saudável (POISSON et al., 2017). O aparecimento da dilatação dos capilares sinusóides já foi descrito para doenças que causam danos nas células hepáticas, como

leucemia e anemia falciforme. As alterações sinusoidais podem contribuir para o desenvolvimento de hiperplasia nodular regenerativa (tumor benigno hepático não vascular), hipertensão portal e aumento da probabilidade de desenvolvimento de trombos microvasculares no fígado (BRUNT et al., 2014)

Quando o tecido hepático é acometido por uma lesão, este passa pelo processo de inflamação, onde se encontram aglomerados de leucócitos denominados de infiltrados inflamatórios. Essa inflamação é regulada pelas células endoteliais sinusoidais do fígado, que são responsáveis por separar o sangue do resto do órgão como uma barreira, restringindo ou permitindo a entrada de leucócitos circulantes (POISSON et al., 2017). Neste estudo, os danos ao tecido hepático, especialmente a dilatação sinusoidal, poderiam estar possibilitando maior passagem de leucócitos do lúmen vascular para o parênquima hepático, devido ao maior calibre e aumento da permeabilidade vascular, o que proporcionaria aumento de infiltrados inflamatórios.

Sabe-se que o estado hiperinflamatório persistente e sistêmico é um dos principais causadores de lesão generalizada em tecidos, e que são principalmente ocasionados pela liberação maciça de mediadores inflamatórios, como as citocinas, quimiocinas, fatores de crescimento e mediadores lipídicos bioativos, sendo o fígado e o rim os órgãos principalmente afetados, seguidos pelo cérebro, sistema circulatório e sistema respiratório (CASULLERAS; ZHANG; CRISTINA, 2020).

Por possuírem uma estrutura bastante permeável, a dilatação dos capilares sinusoides, torna-se um facilitador da migração dos leucócitos do sangue para o tecido hepático. O tamanho médio de um capilar sinusóide é de 5 a 10 μm em humanos, mas podem expandir-se até 30 μm quando o tecido apresenta-se lesionado (CULLEN; STALKER, 2016). Os capilares sinusóides expressam ICAM-1 e proteína de adesão vascular-1 (VAP-1), permitindo a adesão de leucócitos ao endotélio. Durante uma inflamação, a expressão de ICAM-1, VAP-1 e CD31 estão aumentadas, induzindo a migração transendotelial dos leucócitos (POISSON et al., 2017), possibilitando, assim, a formação de infiltrados inflamatórios.

Além disso, os infiltrados inflamatórios podem estar relacionados a diversas patologias, como hepatite, doenças autoimunes, esteatose-hepática, doenças metabólicas ou genéticas, lesões ocasionadas por medicamentos em doses não terapêuticas e por substâncias tóxicas (GASMI; KLEINER, 2020). Desta forma, neste estudo, o tecido hepático apresentou-se como um alvo de toxicidade promovida pela rosuvastatina, quando a exposição ocorreu de forma crônica, por longo período.

As lesões hepáticas são capazes de modificar significativamente os programas transcricionais dos hepatócitos, promovendo sua proliferação ou morte (MARRONE; SHAH; GRACIA-SANCHO, 2016). A apoptose é caracterizada por alterações morfológicas na célula, especificamente no núcleo, que apresenta retração celular, formação de protuberâncias na membrana e cromatina bem condensada (KANZLER; GALLE, 2000).

Um estudo realizado por Kubota e colaboradores na *Kyushu University Hospital* no Japão, com cultura de diferentes tipos celulares, incluindo células do tecido hepático humano, investigou a toxicidade de diferentes estatinas (sinvastatina, lovastatina, cerivastatina, fluvastatina e atorvastatina), constatando que as estatinas lipofílicas causaram apoptose e diminuíram a viabilidade em diferentes tipos celulares, como os miócitos cardíacos, células musculares estriadas esqueléticas, células musculares lisas vasculares, células endoteliais e hepatócitos (KUBOTA et al., 2004, DIRKS; JONES, 2006). A apoptose em tecidos que sofreram danos é necessária para prevenir e retardar patologias (DIRKS; JONES, 2006)

Outra alteração histopatológica encontrada neste estudo foi a presença de hepatócitos binucleados ou hipertrofiados. A poliploidia é uma estratégia do crescimento celular que permite o aumento da produção metabólica, na massa e no tamanho celular (GUIDOTTI et al., 2003). O aparecimento de núcleos fusionados no fígado é reconhecido, mas os mecanismos que acarretam essa transformação ainda são pouco conhecidos, podendo estar relacionado a um desenvolvimento comum, à regeneração hepática ou a respostas a estímulos inflamatórios e lesões (GRIZZI; CHIRIVA-INTERNATI, 2007; MIYAOKA et al., 2012).

Grizzi e Chiriva-Internati demonstraram num estudo com ratos, que os animais que apresentavam hepatite crônica ou estavam em fase terminal de cirrose, apresentavam mais hepatócitos com núcleos fusionados do que os ratos que tinham carcinoma hepatocelular, indicando que a alteração no número e a fusão dos núcleos hepáticos está relacionada à gravidade da lesão (GRIZZI; CHIRIVA-INTERNATI, 2007). Podemos observar nesse estudo, através das análises histopatológicas, que ao aumentar a dose da rosuvastatina nos grupos tratados, a incidência de animais que apresentavam hepatócitos com núcleos fusionados era maior, evidenciando um efeito dose-dependente crescente.

Outro estudo demonstrou que após o fígado sofrer lesões por hemocromatose, infecção viral crônica de hepatite B, C e D e por doença hepática gordurosa não-alcoólica, houve mudanças na estrutura dos hepatócitos e na quantidade de seus núcleos, sugerindo um aumento na quantidade de células com núcleos fusionados para compensar a sobrecarga metabólica hepática causada pelas lesões (DONNE et al., 2020).

Ademais, a hipertrofia dos núcleos dos hepatócitos também sugere que o órgão sofreu lesão e passou por regeneração celular (MIYAOKA et al., 2012). Neste estudo, apesar das análises morfológicas não evidenciarem diferenças no conteúdo de colágeno tecidual e nas reservas de glicogênio citoplasmáticas dos hepatócitos entre os grupos, houve, ainda, o aumento do núcleo dos hepatócitos no grupo exposto a maior dose de rosuvastatina. Um estudo com camundongos que passaram por ressecção cirúrgica – hepatectomia parcial - demonstrou que após 14 dias, houve diferença significativa no tamanho dos hepatócitos e dos seus núcleos, aumentando o conteúdo de DNA e sugerindo que a hipertrofia teve papel fundamental na regeneração tecidual (MIYAOKA et al., 2012).

Diferentes estudos já demonstraram que as estatinas em geral são responsáveis pelo aumento do núcleo de diferentes tipos celulares (MIETTINEN; BJÖRKLUND, 2015). Não somente nos hepatócitos, mas em células do osteossarcoma e em células endoteliais primárias da veia umbilical humana puderam ser observadas essas alterações morfológicas devido ao uso de altas doses de estatinas (MIETTINEN; BJÖRKLUND, 2015).

A hipertrofia do núcleo dos hepatócitos é uma resposta adaptativa a estímulos e condições específicas. As causas potenciais desse acontecimento estão relacionadas a regeneração por danos ou lesões hepáticas, condições crônicas como a hepatite e cirrose, mudanças metabólicas e hormonais e alterações na expressão gênica relacionada aos fatores de crescimento e citocinas que influenciam o tamanho e atividade celular (HAFNER et al., 2011).

A rosuvastatina é um medicamento capaz de modular a atividade de diversos fatores de transcrição, além de possuir efeitos negativos em algumas vias de sinalização, tais como as vias do fator de crescimento semelhante a insulina e do fator de crescimento derivado de plaquetas (CULLEN; STALKER, 2016). A regeneração dos hepatócitos após lesão hepática, é ocasionada pela estimulação dos fatores de crescimento e fatores de crescimento semelhantes a insulina, bem como uma variedade de hormônios, como o glucagon e de citocinas, como interleucina-6 (CULLEN; STALKER, 2016). Se a cascata de sinalização da via da insulina (IGF) ou as vias de fator de crescimento, forem alteradas, haverá mudanças no comportamento e na resposta celular, na expressão gênica, e na resposta inflamatória efetiva, ocasionando diferentes patologias hepáticas, desde mudanças morfológicas até danos no funcionamento celular (CULLEN; STALKER, 2016).

A estereologia do fígado, diferenciando as regiões centrais e periféricas dos lóbulos hepáticos, revelou-se crucial para uma análise mais precisa, considerando a influência da área de veia centrolobular na contabilização dos componentes celulares e teciduais. A separação dessas regiões permitiu uma abordagem mais refinada na avaliação da distribuição dos

componentes hepáticos, possibilitando compreender melhor as respostas celulares hepáticas frente a exposição à rosuvastatina. Neste caso, a dilatação sinusoidal, por exemplo, mostrou-se como uma alteração histopatológica comum em ambas as regiões dos lóbulos hepáticos.

É importante destacar que as alterações encontradas indicam toxicidade hepática, com prejuízo para a estrutura do tecido hepático em exposições de longo prazo com a rosuvastatina. Entretanto, como limitação do estudo, são necessárias novas avaliações, tais como a atividade de enzimas que confirmam o dano ao tecido hepático, como alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST), bem como análises de estresse oxidativo e de enzimas antioxidantes.

8. CONCLUSÃO

Em resumo, a exposição de camundongos machos à rosuvastatina, em diferentes doses, desde a pré-puberdade até a maturidade sexual promoveu redução temporária do ganho de massa corporal e do consumo hídrico e alimentar, além de ter gerado toxicidade hepática, evidenciada pelas diversas alterações histológicas e morfométricas do tecido hepático. Considerando que as doses da estatina utilizadas neste estudo são equivalentes às doses usadas por seres humanos, indica-se que a exposição crônica à rosuvastatina desde a pré-puberdade pode representar um risco ao tecido hepático humana.

9. REFERÊNCIAS

ALBA, R. D. Uso Prévio de Estatina no Infarto Agudo do Miocárdio Experimental em Ratos: Análise de Estresse Oxidativo 48h Pós-Insulto Associado a Parâmetros Ecocardiográficos. p. 1–71, 2011.

BETHESDA. **LiverTox: Informações clínicas e de pesquisa sobre lesão hepática induzida por drogas:** Rosuvastatina. 2012. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK548620/#:~:text=Hepatotoxicity,than%20plac%20%5B0.5%25%5D%20recipients>.

BLASCO, M.; ASCASO, J. F. Control del perfil lipídico global. **Clínica e Investigación en Arteriosclerosis**, v. 31, p. 34–41, 3 dez. 2019.

BRASIL, Agência. **Obesidade entre jovens de 18 a 24 anos subiu 90% em um ano.** 2023. Disponível em: <https://agenciabrasil.ebc.com.br/saude/noticia/2023-06/obesidade-entre-jovens-de-18-24-anos-subiu-90-em-um-ano>

BRASIL, Agência. **Mais da metade dos brasileiros estava com sobrepeso em 2021.** 2022. Disponível em: <https://agenciabrasil.ebc.com.br/saude/noticia/2022-04/mais-da-metade-dos-brasileiros-estava-com-sobrepeso-em-2021#:~:text=Ainda%20conforme%20o%20estudo%2C%20o,estava%20em%20%2C27%25>

BRAUN, Julian. **Obesidade Infantil:** as razões por trás do aumento de peso entre as crianças brasileiras. 2022.

BRUNT, E. M. et al. Pathology of the liver sinusoids. **Histopathology**, v. 64, n. 7, p. 907–920, 2014.

CALIGIONI, C.S. (2009). **Assessing reproductive status/stages in mice. Current protocols in neuroscience**, 48, A.4I.1-A.4I.8. doi:10.1002/0471142301.nsa04is48

CAPARRÓS-MARTÍN, J. A. et al. Statin therapy causes gut dysbiosis in mice through a PXR-dependent mechanism. **Microbiome**, v. 5, n. 1, p. 95, 2017.

CAO, L. et al. Mechanism of hepatocyte apoptosis. **Journal of Cell Death**, v. 9, p. 19–29, 2016.

CASULLERAS, M.; ZHANG, I. W.; CRISTINA, L. Immunopathology in Acute-on-Chronic Liver Failure. p. 1–18, 2020

CULLEN, Russell C. Cattle And John M. Liver and Gall Bladder. In: WALLIG, Matthew *et al.* **Fundamentals of Toxicology Pathology**. 3. ed. Elsevier, 2018. Cap. 8. p. 125-151

CULLEN, J. M.; STALKER, M. J. Liver and Biliary System. **Jubb, Kennedy and Palmer's Pathology of Domestic Animals: Sixth Edition**, v. 2, p. 258- 352.e1, 2016.

CORSINI, A. et al. New insights into the pharmacodynamic and pharmacokinetic properties of statins **Pharmacology and Therapeutics**, **1999**.

CORTESE, F. et al. **Rosuvastatin: Beyond the cholesterol-lowering effect** **Pharmacological Research**. Academic Press, , 1 maio 2016.

DIRKS, A. J.; JONES, K. M. Statin-induced apoptosis and skeletal myopathy. **American Journal of Physiology - Cell Physiology**, v. 291, n. 6, 2006.

DONNE, R. et al. Polyploidy in liver development, homeostasis and disease. **Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology**, v. 17, n. 7, p. 391–405, 2020.

DUNCAN, S. A. Mechanisms controlling early development of the liver. **Mechanisms of Development**, v. 120, n. 1, p. 19–33, 2003.

ELIAS, B. Y. H. Liver Morphology. **Biological Review**, v.30, p.263-310, 1995.

ERIKSSON, M.; ANGELIN, B.; SJÖBERG, S. Risk for fatal statin-induced rhabdomyolysis as a consequence of misinterpretation of “evidence-based medicine” [2]. **Journal of Internal Medicine**, v. 257, n. 3, p. 313–314, 2005.

FU, D. A.; CAMPBELL-THOMPSON, M. Periodic Acid-Schiff Staining with Diastase. In: **Methods in Molecular Biology**. [s.l: s.n.]. v. 1639p. 145–149.

GASMI, B.; KLEINER, D. E. Liver Histology: Diagnostic and Prognostic Features. **Clinics in Liver Disease**, v. 24, n. 1, p. 61–74, 2020.

GONZÁLEZ JIMÉNEZ, E.; ÁLVAREZ FERRE, J. Estatinas: Características y Efectos sobre el Control Lipídico en el Niño y Adolescente Obeso. **Revista Clínica de Medicina de Familia**, v. 4, n. 1, p. 69–75, fev. 2011.

GRIZZI, F.; CHIRIVA-INTERNATI, M. Human binucleate hepatocytes: Are they a defence during chronic liver diseases? **Medical Hypotheses**, v. 69, n. 2, p. 258–261, 2007.

GRUNDY, S. M. Early detection of high cholesterol levels in young adults. **Jama**, v. 284, n. 3, p. 365–367, 2000.

GUIDOTTI, J. E. et al. Liver cell polyploidization: A pivotal role for binuclear hepatocytes. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 21, p. 19095–19101, 2003.

HAFNER, M. et al. The human primary hepatocyte transcriptome reveals novel insights into atorvastatin and rosuvastatin action. **Pharmacogenetics and Genomics**, v. 21, n. 11, p. 741–750, 2011.

HAO, S. **Liver Function**. Third Edit ed. [s.l.] ACADEMIC PRESS, INC., 2020.

HELFENSTEIN FONSECA, F. A. et al. Pharmacokinetics of statins. **Revista Brasileira de Medicina**, v. 62, n. 11, 2005.

ISTVAN, E. S. **Structural mechanism for statin inhibition of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase**. American Heart Journal. Anais. Mosby Inc., 1 dez. 2002.

KANZLER, S.; GALLE, P. R. Apoptosis and the liver. **Seminars in Cancer Biology**, v. 10, n. 3, p. 173–184, 2000.

KHAN, R. A. et al. Effects of rosuvastatin (added to hypocaloric diet) on serum periostin, adiponectin, proinflammatory cytokines levels and hepatic steatosis in non-alcoholic fatty liver disease patients with dyslipidemia. **Clinical Epidemiology and Global Health**, v. 7, n. 1, p. 53–59, 2019.

KOH, K. K. Effects of statins on vascular wall: Vasomotor function, inflammation, and plaque stability. **Cardiovascular Research**, v. 47, n. 4, p. 648–657, 2000.

KOSTAPANOS, M. S.; MILIONIS, H. J.; ELISAF, M. S. Rosuvastatin-associated adverse effects and drug-drug interactions in the clinical setting of dyslipidemia. **American Journal of Cardiovascular Drugs**, v. 10, n. 1, p. 11–28, 2010.

KUBOTA, T. et al. Apoptotic injury in cultured human hepatocytes induced by HMG-CoA reductase inhibitors. **Biochemical Pharmacology**, v. 67, n. 12, p. 2175–2186, 2004.

LATENDRESSE, J. R. et al. Fixation of Testes and Eyes Using a Modified Davidson's Fluid: Comparison with Bouin's Fluid and Conventional Davidson's Fluid. **Toxicologic Pathology**, v. 30, n. 4, p. 524–533, 2 jun. 2002.

LATTOUF, R. et al. Picrosirius Red Staining. **Journal of Histochemistry & Cytochemistry**, v. 62, n. 10, p. 751–758, 14 out. 2014.

LEITE, G. A. A. et al. Ascorbic acid co-administered with rosuvastatin reduces reproductive impairment in the male offspring from male rats exposed to the statin at pre-puberty. **Food and Chemical Toxicology**, v. 118, p. 416–429, ago. 2018.

LONG, S. B. et al. Clinical utility of rosuvastatin and other statins for cardiovascular risk reduction among the elderly. **Clinical Interventions in Aging**, 2011.

LOURES-VALE, Andréia Assis; MARTINEZ, Tânia Leme da Rocha. **Hipocolesterolemizantes: bases para seu uso, evidências recentes**. 2020. Disponível em: <http://educacao.cardiol.br/pec/aterosclerose/fasciculos/2002a1f2m1/art01.htm>. Acesso em: 13 nov. 2023.

MARON, D. J.; FAZIO, S.; LINTON, M. F. Current perspectives on statins. **Circulation**, v. 101, n. 2, p. 207–213, 18 jan. 2000.

MARRONE, G.; SHAH, V. H.; GRACIA-SANCHO, J. Sinusoidal communication in liver fibrosis and regeneration. **Journal of Hepatology**, v. 65, n. 3, p. 608–617, 2016

MATÍA MARTÍN, P.; LECUMBERRI PASCUAL, E.; CALLE PASCUAL, A. L. Nutrición y síndrome metabólico. **Revista Española de Salud Pública**, v. 81, n. 5, p. 489–505, 2007.

MENDES, Ricardo Evandro; PILATI, Célio. Estudo morfológico de fígado de bovinos abatidos em frigoríficos industriais sob inspeção estadual no Oeste e no Planalto de Santa Catarina, Brasil. **Ciência Rural**, [S.L.], v. 37, n. 6, p. 1728-1734, dez. 2007. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0103-84782007000600035>.

MIETTINEN, T. P.; BJÖRKLUND, M. Mevalonate Pathway Regulates Cell Size Homeostasis and Proteostasis through Autophagy. **Cell Reports**, v. 13, n. 11, p. 2610–2620, 2015.

MIYAOKA, Y. et al. Hypertrophy and unconventional cell division of hepatocytes underlie liver regeneration. **Current biology : CB**, v. 22, n. 13, p. 1166–1175, 2012.

NAKAGAKI, B. N. et al. Immune and metabolic shifts during neonatal development reprogram liver identity and function. **Journal of Hepatology**, v. 69, n. 6, p. 1294–1307, 2018.

NISSEN, S. E. et al. Effect of very high-intensity statin therapy on regression of coronary atherosclerosis: The ASTEROID trial. **Journal of the American Medical Association**, v. 295, n. 13, p. 1556–1565, 2006.

ORAL, U. S. O. rosuvastatina cálcica. 1999.

OZGULER, Ibrahim M; BURMA, Oktay; UYSAL, Ayhan; AKBULUT, Handan. Rosuvastatin Lowers Systemic Inflammatory Response in Coronary Artery Bypass Graft Accompanied by Cardiopulmonary Bypass Surgery: a randomized controlled study. **Clinical & Investigative Medicine**, [S.L.], v. 38, n. 4, p. 154, 9 ago. 2015. University of Toronto Libraries - UOTL. <http://dx.doi.org/10.25011/cim.v38i4.24260>.

PANDEY, A.; CHAWLA, S.; GUCHHAIT, P. Type-2 diabetes: Current understanding and future perspectives. **IUBMB Life**, v. 67, n. 7, p. 506–513, 2015.

PERLMAN, R. L. Mouse Models of Human Disease: An Evolutionary Perspective. **Evolution, Medicine, and Public Health**, 2016.

POIRIER, P.; DESPRÉS, J. P. Impact of obesity in contemporary cardiology. **Medecine/Sciences**, v. 19, n. 10, p. 943–949, 2003.

POISSON, J. et al. Liver sinusoidal endothelial cells: Physiology and role in liver diseases. **Journal of Hepatology**, v. 66, n. 1, p. 212–227, 2017.

PURCINO, L. S.; LÚCIA, A.; MORAES, C. DE. Pluralidade e Complexidade da Questão Alimentar e Nutricional na Transição do Século XX para o XXI. p. 73–83, 2016.

REAGAN-SHAW, S.; NIHAL, M.; AHMAD, N. Dose translation from animal to human studies revisited. **The FASEB Journal**, v. 22, n. 3, p. 659–661, 2008.

RESNICOW, K. et al. The Case Against ‘the Case Against Childhood Cholesterol Screening’. **JAMA: The Journal of the American Medical Association**, v. 265, n. 22, p. 3003–3005, 1991.

RUBBA, P.; MAROTTA, G.; GENTILE, M. Efficacy and safety of rosuvastatin in the management of dyslipidemia. **Vascular Health and Risk Management**, v. 5, p. 343–352, 2009.

SILVA, P. V. et al. Effects of isolated or combined exposure to sibutramine and rosuvastatin on reproductive parameters of adult male rats. **Journal of Applied Toxicology**, v. 40, n. 7, p. 947–964, 18 jul. 2020.

SPRENGER, F. S.; SEPPI, K.; POEWE, W. Drug safety evaluation of rotigotine. **Expert Opinion on Drug Safety**, v. 11, n. 3, p. 503–512, 2012.

SSEWANYANA, D. et al. Perspectives on Underlying Factors for Unhealthy Diet and Sedentary Lifestyle of Adolescents at a Kenyan Coastal Setting. **Frontiers in Public Health**, v. 6, n. February, 2018.

STANCU, C.; SIMA, A. Statins: Mechanism of action and effects. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 5, n. 4, p. 378–387, 2001.

TEKIN, A. et al. Short-term effects of fluvastatin therapy on plasma interleukin-10 levels in patients with chronic heart failure. **Coronary Artery Disease**, v. 19, n. 7, p. 513–519, 2008.

TREFTS, E.; GANNON, M.; WASSERMAN, D. H. The liver. **Current Biology**, v. 27, n. 21, p. R1147–R1151, 2017.

VARGAS, J. I. et al. Use of Statins in Patients with Chronic Liver Disease and Cirrhosis: Current Views and Prospects. **Current Gastroenterology Reports**, v. 19, n. 9, 2017.

VIJAYAKANTHI, N. et al. Rhabdomyolysis due to rosuvastatin in a patient with ROHHAD syndrome. **Journal of Clinical Lipidology**, v. 15, n. 6, p. 789–792, 2021.

WAKE, K.; SATO, T. “The Sinusoid” in the Liver: Lessons Learned from the Original Definition by Charles Sedgwick Minot (1900). **Anatomical Record**, v. 298, n. 12, p. 2071–2080, 2015.

WALLIG, MATTHEW, WANDA HASCHEK, BRAD BOLON, B. M. (ED.). **Fundamentals of Toxicologic Pathology**. Third Edit ed. [s.l.] Elsevier, 2018.

WARD, N. C.; WATTS, G. F.; ECKEL, R. H. Statin Toxicity: Mechanistic Insights and Clinical Implications. **Circulation Research**, v. 124, n. 2, p. 328–350, 2019.

WHITE, C. M. A review of the pharmacologic and pharmacokinetic aspects of rosuvastatin *Journal of Clinical Pharmacology*, **2002**.

ZHAO, R.; DUNCAN, S. A. Embryonic development of the liver. **Hepatology**, v. 41, n. 5, p. 956–967, 2005.

ANEXO A – Certificado de aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Santa Catarina



Universidade Federal de Santa Catarina

*Comissão de Ética no
Uso de Animais*

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "EXPOSIÇÃO DE CAMUNDONGOS SWISS À ROSUVASTATINA DA PRÉ-PUBERDADE ATÉ A MATURIDADE SEXUAL: EFEITOS IMEDIATOS SOBRE O SISTEMA GENITAL E A FERTILIDADE", protocolada sob o CEUA nº 1688170919 (ID 001484), sob a responsabilidade de **Gabriel Adan Araujo Leite** e equipe; **Márcia Eduarda Geraldo; Julia Schubert Sengl de Souza; Ana Beatriz Goedert** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADA** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Catarina (CEUA/UFSC) na reunião de 16/12/2019.

We certify that the proposal "SWISS MALE MICE EXPOSED TO ROSUVASTATIN FROM PRE-PUBERTY TO SEXUAL MATURITY: IMMEDIATE EFFECTS ON GENITAL SYSTEM AND FERTILITY", utilizing 225 Heterogenics mice (males or females), protocol number CEUA 1688170919 (ID 001484), under the responsibility of **Gabriel Adan Araujo Leite and team; Márcia Eduarda Geraldo; Julia Schubert Sengl de Souza; Ana Beatriz Goedert** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **APPROVED** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of Santa Catarina (CEUA/UFSC) in the meeting of 12/16/2019.

Finalidade da Proposta: Pesquisa

Vigência da Proposta: de 01/2020 a 01/2023 Área: Beg (Biologia Celular, Embriologia E Genética)

Origem: Biotério Central

Espécie: Camundongos heterogênicos

Linhagem: Swiss

sexo: Machos ou Fêmeas

idade: 1 a 90 dias

Quantidade: 225

Peso: 1 a 45 g

Florianópolis, 25 de abril de 2023

Luciana Aparecida Honorato
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de Santa Catarina

Vanessa Rafaella Foletto da Silva
Vice-Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de Santa Catarina



**ANEXO B – Emenda de aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)
da Universidade Federal de Santa Catarina**



Universidade Federal de Santa Catarina

*Comissão de Ética no
Uso de Animais*

CERTIFICADO : EMENDA v21/03/2022

Certificamos que a EMENDA (versão de 21/03/2022) da proposta intitulada "EXPOSIÇÃO DE CAMUNDONGOS SWISS À ROSUVASTATINA DA PRÉ-PUBERDADE ATÉ A MATURIDADE SEXUAL: EFEITOS IMEDIATOS SOBRE O SISTEMA GENITAL E A FERTILIDADE", CEUA nº 1688170919 (ID 020761), sob a responsabilidade de **Gabriel Adan Araujo Leite** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos vigentes para sua apresentação, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), sendo assim **APROVADO** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Catarina (CEUA/UFSC) em 12/04/2022.

Término previsto: 01/2023

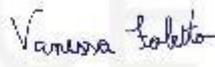
ANIMAIS UTILIZADOS

Camundongos heterogênicos	Machos ou Fêmeas	Total Aprovado	Quantidade Utilizada
		225	0

Florianópolis, 25 de abril de 2023



Luciana Aparecida Honorato
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de Santa Catarina



Vanessa Rafaela Foletto da Silva
Vice-Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de Santa Catarina

