

## EFEITOS DA SINVASTATINA, DA EZETIMIBA E DA ASSOCIAÇÃO EZETIMIBA/SINVASTATINA SOBRE A HISTOLOGIA E O METABOLISMO HEPÁTICO

Luana Eloisa Leal (PIBIC/CNPq//UEM), Mariana Ferreira Sapateiro (PIBIC/CNPq/ UEM), Carmem Patrícia Barbosa (Coorientadora), Lívia Bracht (Orientadora), e-mail: lbracht@uem.br.

Universidade Estadual de Maringá/ Centro de Ciências Biológicas/  
Departamento de Bioquímica, Maringá/PR.

**Ciências biológicas, Bioquímica.**

**Palavras-chave:** fármacos hipolipemiantes, fígado, metabolismo.

### Resumo

O objetivo deste trabalho foi investigar o efeito do tratamento crônico com a sinvastatina, a ezetimiba e a associação ezetimiba/sinvastatina sobre a gliconeogênese hepática e outros parâmetros relacionados ao funcionamento do fígado. Para tanto, foram utilizados ratos machos Wistar, tratados por 28 dias por gavagem oral com: sinvastatina (40 mg/Kg), ezetimiba (10 mg/Kg) e associação ezetimiba/sinvastatina (10/40 mg/Kg). Os animais foram eutanasiados, o sangue coletado para dosagem da atividade das enzimas marcadores de lesão hepática, AST e ALT. O modelo de perfusão de fígado isolado de rato foi utilizado para se avaliar o metabolismo hepático, sendo que o L-lactato foi utilizado como substrato gliconeogênico. Adicionalmente, foi realizada a análise histológica dos fígados de animais tratados e animais controle. Os resultados obtidos mostraram que todos os fármacos (em monoterapia ou associação) provocaram alterações histológicas no fígado. Todavia, o tratamento com sinvastatina e com a associação ezetimiba/sinvastatina parecem ter provocado maiores danos ao fígado, especialmente em relação ao metabolismo. O primeiro aumentou a atividade da enzima ALT no plasma e provocou uma tendência à redução da gliconeogênese. Já o segundo foi mais nocivo, pois provocou aumento expressivo da atividade das enzimas AST e ALT e ainda diminuição da produção de glicose a partir de L-lactato, além do aumento do consumo de oxigênio e da produção de piruvato. Portanto, o tratamento com a associação ezetimiba/sinvastatina foi mais nocivo ao fígado, ao menos em relação ao funcionamento deste órgão.

### Introdução

As estatinas são usadas no controle do colesterol por inibirem, de forma competitiva, a enzima HMG-CoA redutase. Sua utilização pode ocorrer em monoterapia ou em associação com ezetimiba, medicamento que atua no intestino bloqueando a absorção de colesterol (ALTMANN et al.,

2004). Embora sejam relativamente seguros, as estatinas podem causar efeitos adversos raros, mas clinicamente relevantes, que incluem a toxicidade para o fígado e para os músculos. Sabe-se que a disfunção mitocondrial parece estar envolvida no tratamento com estatinas (MIKASHINOVICH et al., 2016). O objetivo deste trabalho foi investigar se o tratamento crônico com sinvastatina, ezetimiba, ou associação ezetimiba/sinvastatina é capaz de alterar a gliconeogênese hepática e outros parâmetros relacionados, utilizando o modelo de perfusão em fígado isolado de ratos. Além disso, foram também realizados experimentos para avaliar a histologia dos fígados dos animais tratados com estes fármacos.

## Materiais e métodos

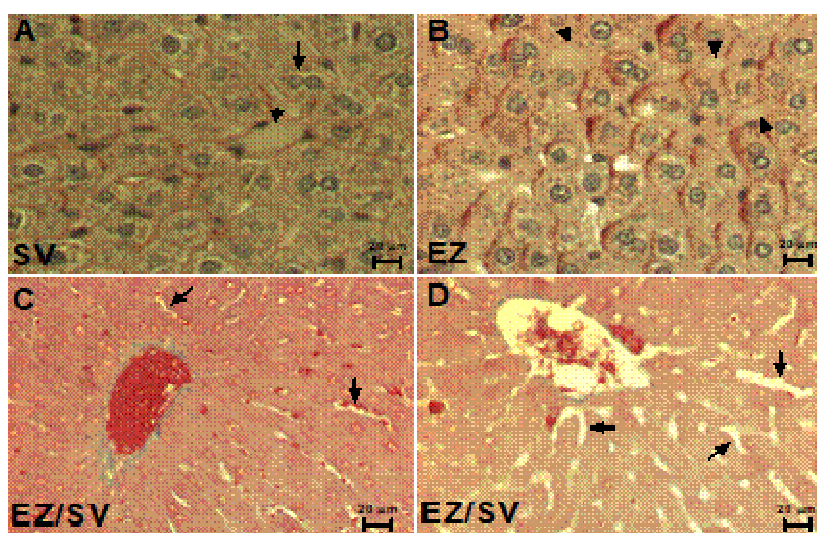
Foram utilizados ratos da linhagem Wistar, machos, adquiridos do Biotério Central da UEM. Todos os experimentos foram previamente aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Estadual de Maringá (parecer CEUA nº 1634270916). Os animais foram tratados por 28 dias com: sinvastatina 40 mg/Kg (SV), ezetimiba 10 mg/Kg (EZ) ou associação ezetimiba/sinvastatina 10/40 mg/Kg (EZ /SV) por gavagem oral. Para os procedimentos de coleta de sangue e remoção do fígado, os ratos foram anestesiados com uma injeção intraperitoneal de tiopental/lidocaína (50/10 mg/kg). O plasma foi utilizado para quantificação da atividade das enzimas aspartato e alanina aminotransferase (AST e ALT). A perfusão de fígado isolado seguiu a metodologia de Schölz e Bucher (1965). O substrato utilizado foi o L-lactato (2mM). Amostras do perfusado efluente foram coletadas a cada 2 ou 4 minutos para quantificação de glicose e piruvato e o consumo de oxigênio foi monitorado por um eletrodo de platina.

Para análise histológica amostras do lobo hepático direito foram fixadas em *Bouin*, desidratadas em concentrações crescentes de álcool, diafanizadas em xilol e incluídas em parafina. Os cortes foram semiseriados de 6 µm de espessura. As secções do órgão foram coradas com Hematoxilina/Eosina (H.E.), Tricômico de Heidenhain's AZAN (AZAN - Tricômico de Azan-Mallory) e Ácido Periódico de Schiff (P.A.S.) (BEHMER et al., 1976). Após, foram capturadas imagens em microscópio óptico Olympus BX41®, utilizando objetiva de 20x e uma câmera Olympus Q-Color® acoplada a um computador com programa computacional Q-Capture®. A análise das colorações foi morfológica e quantitativa que teve como auxílio o programa *Image Pró-Plus® 4.5 (Media Cybernetics)*. Os resultados foram apresentados como média ± erro padrão de média ou desvio padrão.

## Resultados e Discussão

Todos os tratamentos utilizados provocaram alterações histológicas no fígado, em diversos parâmetros. A morfometria foi maior no grupo SV (189,6716 ± 24,1972) e no grupo associação EZ/SV (186,7844 ± 21,7310), em relação ao grupo controle (175,7791 ± 26,6086). Não foi observada

diferença entre os grupos quanto ao conteúdo de glicogênio (coloração P.A.S). Todavia, esta coloração permitiu identificar também o teor de lipofuscina, um pigmento acumulado quando as células sofrem estresse oxidativo. Este pigmento estava aumentado em todos os grupos em relação ao controle, mas o maior teor foi encontrado no grupo SV ( $SV=3,38429 \pm 0,4741 > EZ=2,7413 \pm 0,5667 > EZ/SV=2,1031 \pm 0,2458 > CT=1,2782 \pm 0,2856$ ). O teor de colágeno total estava aumentado em todos os grupos, o que pode ser indicativo de um processo fibrinogênico. Adicionalmente, a análise histopatológica revelou lesões características de processo autofágico, além de edema, congestão, bem como eritrócitos entre os sinusoides (Figura 1). Estas alterações histopatológicas foram observadas em todos os grupos de animais tratados.



**Figura 1** – Fotomicrografias de hepatócitos de ratos tratados com Simvastatina 40 mg/Kg (SV; **A**), Ezetimiba 10 mg/Kg (EZ; **B**) e com a associação Ezetimiba/Simvastatina 10/40 mg/Kg (EZ/SV; **C** e **D**). Notar em **A** binucleação (seta preta) e congestão de vaso sanguíneo (cabeça de seta). Notar em **B** edema (cabeça de seta). Notar em **C** sinusoides dilatados com presença de eritrócitos (setas pretas). Notar em **D** dilatação dos sinusoides porém sem a presença de eritrócitos (setas pretas). **A** e **B** corados com P.A.S. (40X); **C** e **D** corados com AZAN (20X) (n=5)

Em relação à atividade das enzimas marcadoras de lesão hepática no plasma, não foram observadas alterações na atividade da AST de animais tratados com SV ou EZ, em relação aos animais controle. Nos animais tratados com a associação, todavia, a atividade desta enzima foi 192% maior do que o controle ( $p < 0,05$ ). Já a atividade da ALT foi maior nos animais tratados tanto com SV (+86%) quanto com a associação EZ/SV (+148%). Os experimentos de perfusão de fígado isolado permitiram a caracterização de diversas alterações no funcionamento do órgão, especialmente no grupo tratado com EZ/SV. O tratamento dos animais com a associação reduziu a produção hepática de glicose em 55% ao final do período de perfusão ( $p < 0,05$ ), quando comparado ao controle. Houve uma tendência a redução da produção hepática de glicose nos animais tratados com simvastatina, embora não tenha havido diferença estatisticamente significativa. Além

disso, os animais tratados com a associação apresentaram produção de piruvato significativamente maior (+ 92%) do que os demais grupos. De maneira semelhante, o consumo de oxigênio dos animais tratados com esta associação foi superior (+24%) ao dos animais controle. Vale ressaltar ainda que a gliconeogênese nos animais tratados com EZ/SV aumentou menos do que poderia se esperar pelo aumento do consumo de oxigênio, como pode ser evidenciado pelos valores da razão entre o aumento líquido da produção de glicose pelo aumento do consumo de oxigênio a partir da infusão de L-lactato ( $\Delta$ glicose/ $\Delta$ oxigênio). Para os animais controles esta razão foi igual a 5,2, enquanto que, para os animais tratados, a razão foi igual a 2,3.

## Conclusões

Nossos resultados demonstram que todos os fármacos hipolipemiantes utilizados cronicamente neste trabalho (SV, EZ e EZ/SV) provocam alterações histológicas no fígado, incluindo alterações indicativas de lesão ao órgão. Todavia, estas alterações histológicas não mostraram uma correlação direta com o funcionamento do órgão. Em relação a este aspecto, o tratamento com a associação EZ/SV se mostrou mais nocivo, comprometendo marcadamente a produção hepática de glicose. Além disso, esta associação aumentou o consumo de oxigênio do fígado e a produção de piruvato a partir de L-lactato. Estes resultados, em conjunto, fornecem indícios de que os fígados de animais tratados com a associação EZ/SV possuem uma ineficiência na transdução de energia mitocondrial.

## Agradecimentos

Agradecemos ao CNPq pelo apoio financeiro.

## Referências

ALTMANN, S.W. et al. Niemann-Pick C1 Like 1 protein is critical for intestinal cholesterol absorption. **Science**, Washington, v. 303, n. 5661, p. 1201-1204, 2004.

BEHMER, O.A.; TOLOSA, E.M.C.; FREITAS NETO, A.G. **Manual de técnicas para histologia normal e patológica**. São Paulo: Edart, 1976.

MIKASHINOVICH, Z.I.; BELOUSOVA, E.S.; SARKISYAN, O.G. Impairment of Energy Dependent Processes in the Muscle Tissue as a Pathogenetic Mechanism of Statin-Induced Myopathy. **Bulletin of Experimental Biology and Medicine**, Estados Unidos, v. 162, n. 10, p. 426-429, 2016.

SCHOLZ, R. et al. **Control of Energy Metabolism**. New York: Academic Press, 1965.