

EFEITOS DA SINVASTATINA, DA EZETIMIBA E DA ASSOCIAÇÃO EZETIMIBA/SINVASTATINA SOBRE O ESTADO OXIDATIVO DO FÍGADO DE RATO

Luana Eloísa Leal (PIBIC/CNPq), Mellina da Silva Simões, Anacharis Babeto de Sá Nakanishi, Jurandir Fernando Comar, Livia Bracht (orientadora), e-mail: lbracht@uem.br.

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

Área e subárea do conhecimento: Ciências biológicas, Bioquímica.

Palavras-chave: hipolipemiantes, estresse oxidativo, fígado.

Resumo:

As estatinas e a ezetimiba são fármacos usados no tratamento da hipercolesterolemia. 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. O objetivo do presente trabalho foi investigar os efeitos do tratamento crônico (28 dias, via oral) com a sinvastatina_{40mg/Kg} (SV), com a ezetimiba_{10mg/Kg} (EZ) e com a combinação ezetimiba/sinvastatina_{10/40mg/Kg} (EZ/SV) sobre o estado oxidativo do fígado. Os resultados obtidos demonstraram que todos os tratamentos foram capazes de modificar diversos parâmetros relacionados ao estado oxidativo do fígado. Especificamente, o tratamento com SV, EZ e EZ/SV provocaram um aumento no conteúdo de espécies reativas de oxigênio (ROS) totais no fígado de 151%, 96% e 85%, respectivamente. Todos os tratamentos também aumentaram a geração de ROS diretamente pelas mitocôndrias, na presença de rotenona. Tanto a SV quanto a combinação EZ/SV aumentaram a peroxidação lipídica em 29% e 59%, respectivamente. Houve aumento da quantidade de glutathiona oxidada (GSSG) apenas nos fígados de animais tratados com a associação EZ/SV (+114%). Todavia, a razão glutathiona reduzida/glutathiona oxidada (GSH/GSSG) estava significativamente diminuída nos fígados de animais tratados tanto com EZ (-31%) quanto com EZ/SV (-42%). Nenhum dos tratamentos alterou a atividade das enzimas antioxidantes catalase ou superóxido dismutase. Nossos resultados demonstram que o tratamento crônico com estes agentes hipolipemiantes não é silenciosamente tolerado pelo fígado. Adicionalmente, o estresse oxidativo é, muito provavelmente, um dos mecanismos envolvidos com a hepatotoxicidade destes fármacos.

Introdução

As estatinas atuam como inibidores competitivos da enzima 3-hidróxi-3-metilglutaril coenzima A redutase (HMG-CoA redutase), que catalisa uma etapa limitante da via de síntese do colesterol no fígado e outros tecidos. As estatinas têm perfil relativamente seguro. Entretanto, efeitos adversos raros, mas clinicamente relevantes, podem incluir a toxicidade para o fígado e para os músculos. Alguns estudos confirmam a existência de hepatotoxicidade induzida pelo uso de estatinas, embora este seja um efeito colateral menos frequente (BJÖRNSSON; JACOBSEN; KALAITZAKIS, 2012), mas que pode desencadear sintomas severos, quando presente.

Muitas vezes, o uso de terapias combinadas de estatinas e outros agentes hipolipemiantes podem aumentar a incidência dos efeitos adversos. A ezetimiba (inibidora da proteína de transporte de colesterol Niemann-Pick do tipo C1) promove efeitos benéficos adicionais quando associada às estatinas, em relação aos níveis séricos de lipídeos. Embora não existam muitos relatos de efeitos adversos graves associados à combinação da ezetimiba com as estatinas, Tuteja et al. (2008) descreveram o caso de um paciente que desenvolveu falência hepática fulminante após tratamento com esta combinação (TUTEJA et al., 2008).

Levando-se em consideração que o número de pacientes que utilizam estatinas deve aumentar nos próximos anos, uma melhor compreensão dos mecanismos envolvidos com a toxicidade destes fármacos é determinante para a prevenção de efeitos adversos. Portanto, o objetivo central do presente trabalho foi investigar os efeitos do tratamento crônico com a sinvastatina, com a ezetimiba e com a combinação ezetimiba/sinvastatina sobre o estado oxidativo hepático.

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. Ao final do período de tratamento, os animais foram submetidos a jejum de 18 horas e anestesiados com tiopental sódico (50 mg/Kg) para retirada do fígado. O fígado foi clampeado em nitrogênio líquido e homogeneizado em tampão fosfato 0,1 M (pH 7,4) na proporção de 10% p/v para obtenção do homogenato, que foi utilizado para avaliar especificamente: 1) os níveis de espécies reativas de oxigênio (ROS) totais; 2) os níveis de TBARS; 3) os níveis de glutatona oxidada (GSSG) e glutatona reduzida (GSH) e 4) as atividades de enzimas antioxidantes catalase e superóxido dismutase (SOD) (COMAR et al., 2013). Alternativamente, os fígados dos animais tratados por 28 dias e dos animais controle também foram utilizados para o isolamento de mitocôndrias pela técnica de centrifugação diferencial. Estas organelas foram utilizadas para determinação da geração de ROS mitocondrial (ZACCAGNINO et al., 2009). Os resultados foram apresentados como média $\pm$ erro padrão de média e foram analisados estatisticamente através de análise de variância.

Resultados e Discussão

A Tabela 1 mostra os resultados da avaliação do estado oxidativo dos fígados de animais tratados com os hipolipemiantes EZ, SV, EZ/SV e de animais controle. É possível observar que todos os tratamentos modificaram diversos parâmetros. Especificamente, os tratamentos com EZ, SV e EZ/SV provocaram um aumento no conteúdo de espécies reativas de oxigênio (ROS) totais no fígado de 151%, 96% e 85% em relação ao controle, respectivamente. Nesta tabela podem ser observados também os resultados do teor de peroxidação lipídica nos fígados dos animais, que pode ser inferido pelo teor de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). Tanto a SV quanto a combinação EZ/SV aumentaram a peroxidação lipídica em 29% e 59% em relação ao controle, respectivamente. Houve aumento da quantidade de glutatona oxidada (GSSG) apenas nos fígados de animais tratados com a associação EZ/SV (+114%), embora não tenha havido diferença estatisticamente significativa em relação aos teores de GSH. Todavia, a razão glutatona reduzida/glutatona oxidada (GSH/GSSG) estava significativamente diminuída nos fígados de animais tratados com EZ (-31%) e EZ/SV (-42%). Nenhum dos tratamentos alterou a atividade das enzimas catalase ou SOD.

Tabela 1: Resultados da avaliação dos parâmetros de estresse oxidativo no fígado de ratos Wistar tratados diariamente por 28 dias com sinvastatina 40 mg/Kg (SV), ezetimiba 10 mg/Kg (EZ), associação ezetimiba 10 mg/Kg + sinvastatina 40 mg/Kg (EZ/SV) e animais controle.

	Controle	EZ	SV	EZ + SV
GSH (nmol/mg prot)	13,46 ± 1,35 ^{ab}	10,05 ± 1,18 ^{ab}	21,30 ± 1,71 ^a	17,23 ± 2,56 ^a
GSSG (nmol/mg prot)	0,14 ± 0,01 ^a	0,16 ± 0,02 ^a	0,18 ± 0,02 ^a	0,30 ± 0,03 ^b
GSH/GSSG	102,20 ± 13,83 ^a	70,78 ± 17,11 ^a	118,6 ± 6,48 ^a	59,27 ± 9,42 ^b
GSH + GSSG (nmol/mg prot)	13,59 ± 1,34 ^a	10,21 ± 1,18 ^a	18,07 ± 3,61 ^a	17,53 ± 2,57 ^a
TBARS (nmol/mg prot)	1,38 ± 0,16 ^a	1,59 ± 0,25 ^a	1,79 ± 0,30 ^b	2,20 ± 0,32 ^b
ROS total (nmol/mg prot)	0,27 ± 0,03 ^a	0,68 ± 0,03 ^b	0,53 ± 0,04 ^c	0,50 ± 0,03 ^c
Catalase (μmol/(min.mg prot))	468,9 ± 83,7 ^a	519,8 ± 74,9 ^a	491,6 ± 18,3 ^a	447,6 ± 72,3 ^a
SOD (U/mg prot)	1,93 ± 0,14 ^a	2,64 ± 0,16 ^a	2,97 ± 0,23 ^a	2,75 ± 0,37 ^a

Letras minúsculas diferentes sobre os números indicam diferença significativa entre os grupos (p<0,05).

Neste trabalho a geração de ROS também foi avaliada em mitocôndrias isoladas do fígado dos ratos submetidos aos diferentes tratamentos, utilizando-se succinato como substrato oxidável. A figura 1 ilustra estes resultados onde é possível observar que houve aumento significativo na produção mitocondrial de ROS nos grupos tratados com EZ, SV e EZ/SV, na via direta de geração de ROS (com rotenona), ou seja, quando os

elétrons fluem no sentido do complexo II para complexo IV da cadeia respiratória mitocondrial.

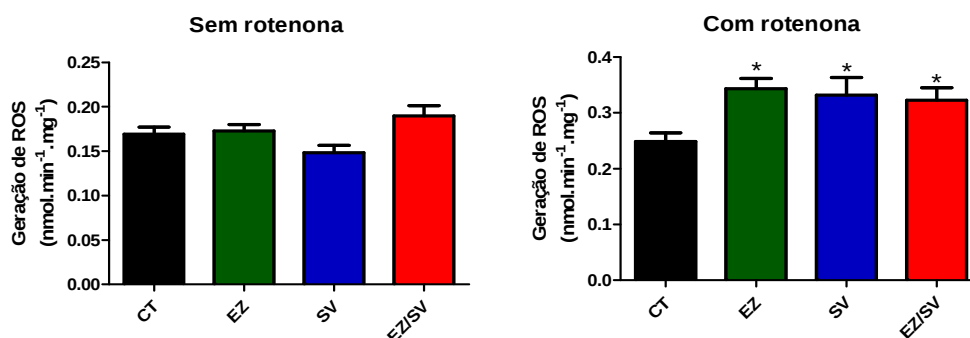


Figura 1: Geração de espécies reativas de oxigênio em mitocôndrias isoladas de fígados de ratos controle (CT) e ratos tratados diariamente por 28 dias com sinvastatina 40 mg/Kg (SV), ezetimiba 10 mg/Kg (EZ) e associação ezetimiba 10 mg/Kg + sinvastatina 40 mg/Kg (EZ/SV).

Conclusões

Os resultados obtidos no presente trabalho demonstram que os tratamentos com EZ, SV e com a associação EZ/SV causam estresse oxidativo no fígado, sendo a contribuição da geração de ROS mitocondrial determinante para o desenvolvimento deste processo. Muito provavelmente, este é um dos mecanismos envolvidos com a hepatotoxicidade destes fármacos.

Agradecimentos

Ao CNPq pela concessão da bolsa.

Referências

BJÖRNSSON, E.; JACOBSEN, E. I.; KALAITZAKIS, E. Hepatotoxicity associated with statins: Reports of idiosyncratic liver injury post-marketing. **Journal of Hepatology**, v. 56, n. 2, p. 374–380, 2012.

TUTEJA, S. et al. Simvastatin-ezetimibe-induced hepatic failure necessitating liver transplantation. **Pharmacotherapy**, v. 28, n. 9, p. 1188–93, set. 2008.

COMAR, J. F. et al. Oxidative state of the liver of rats with adjuvant-induced arthritis. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 58, p. 144–153, 1 maio 2013.

ZACCAGNINO, P., SALTARELLA, M., D'ORIA S., A. CORCELLI, M.S. SAPONETTI, M. L. N-Arachidonylglycine causes ROS production and cytochrome c release in liver mitochondria. **Free Radical Biology in Medicine**, v. 47, n., p. 585-592, 2009.