



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E DO
DESENVOLVIMENTO

Tainara Fernandes de Mello

**Toxicidade reprodutiva masculina em camundongos expostos à rosuvastatina da pré-
puberdade a maturidade sexual**

Florianópolis
2023

Tainara Fernandes de Mello

**Toxicidade reprodutiva masculina em camundongos expostos à rosuvastatina da pré-
puberdade a maturidade sexual**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento - PPGBCD da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do título de mestre em Biologia Celular e do Desenvolvimento.

Orientador: Prof. Dr. Gabriel Adan Araújo Leite

Coorientadora: Profa. Dra. Yara Maria Rauh Müller

Florianópolis

2023

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Mello, Tainara Fernandes de
Toxicidade reprodutiva masculina em camundongos
expostos à rosuvastatina da prépuberdade a maturidade
sexual / Tainara Fernandes de Mello ; orientador, Gabriel
Adan Araújo Leite, coorientadora, Yara Maria Rauh Müller,
2023.
72 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós
Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento,
Florianópolis, 2023.

Inclui referências.

1. Biologia Celular e do Desenvolvimento. 2. Estatinas.
3. Reprodução masculina. 4. Toxicologia. I. Leite, Gabriel
Adan Araújo. II. Müller, Yara Maria Rauh. III. Universidade
Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em
Biologia Celular e do Desenvolvimento. IV. Título.

Tainara Fernandes de Mello

**Toxicidade reprodutiva masculina em camundongos expostos à rosuvastatina da
pré-puberdade a maturidade sexual**

O presente trabalho em nível de mestrado foi avaliado e aprovado, em 26 de maio de 2023,
pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Profa. Dra. Marina Trevizan Guerra
Universidade Federal de Mato Grosso do Sul – Campus de Três Lagoas

Profa. Dra. Viviane Glaser
Universidade Federal de Santa Catarina

Certificamos que esta é a versão original e final do trabalho de conclusão que foi julgado adequado
para obtenção do título de mestra em Biologia Celular e do Desenvolvimento.

Insira neste espaço a
assinatura digital

Profa. Dra. Evelise Maria Nazari
Coordenação do Programa de Pós-Graduação

Insira neste espaço a
assinatura digital

Prof. Dr. Gabriel Adan Araújo Leite
Orientador

Florianópolis, 2023.

Este trabalho é dedicado à minha família, em especial, meus pais,
Arlete e Altemar.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todas as pessoas que, de alguma forma, em algum momento, auxiliaram para o caminhar e finalização dessa minha jornada.

Especialmente, gostaria de agradecer a Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC e ao Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento pela recepção, acolhimento, infraestrutura e conhecimento que foi me proporcionado ao longo dessa caminhada.

Em especial, meu orientador, professor Dr. Gabriel Adan Araújo Leite por encarar a aventura de me orientar e pela honra em ter sido sua primeira mestranda. Além do aceite em seu laboratório e desse modo, permitindo que eu auxiliasse no crescimento do nosso Laboratório de Reprodução e Toxicologia - Laretox, que assim como nós, ainda era um novato nesse mundo que é a UFSC. Agradeço todo o conhecimento trocado, as conversas, as risadas durante os experimentos, a compreensão em momentos os quais tive limitações e por ter agregado em meu crescimento acadêmico e profissional. Admiro toda sua jornada.

À minha querida coorientadora professora Dra. Yara Maria Rauh Müller, que partilhou grandes ensinamentos, não apenas para o meio científico, mas para a vida. A qual sempre está com os olhos brilhando ao fazer ciência. Toda a parceria fornecida pelo seu Laboratório de Reprodução e Desenvolvimento Animal – LRDA.

À professora Dra. Evelise Maria Nazari, pela sua disponibilidade e colaboração de seu Laboratório de Reprodução e Desenvolvimento Animal – LRDA.

À professora Dra. Fátima Regina Mena Barreto Silva do Laboratório de Hormônio e Transdução de Sinais, com toda sua colaboração enriquecendo ainda mais minha pesquisa.

Ao Laboratórios Multiusuários de Estudos em Biologia - LAMEB e seus técnicos pela disponibilidade, equipamentos e por todo auxílio fornecido.

Ao apoio financeiro do Programa de Bolsas Universitárias de Santa Catarina – UNIEDU/FUMDES e da Fundação de Amparo à Pesquisa e Extensão Universitária – FAPEU.

À toda equipe do Laretox, por estarmos em constante desenvolvimento com nossas discussões científicas e momentos de descontração. Em especial Alice, Ana, Julia e João, auxiliando em experimentos e fazendo os desafios se tornarem leves.

Agradeço todos os meus amigos pelas conversas, apoios e descontrações. Em especial aos meus roomies, Leonardo e Paqui, que dentro de tantos surtos coletivos, estávamos sempre juntos, nos ajudando, rindo, descontraindo e dando puxões de orelha quando necessário.

Agora o ponto mais importante disso tudo, o meu pilar, as pessoas que estiveram comigo a vida inteira, minha família. Agradeço meus irmãos Camila, Henrique e Vitor por estarem sempre presentes e em sincronia. Pela minha sobrinha Giovanna, que alegra sempre os momentos com suas histórias e vivências, tenho certeza que um dia também será uma grande bióloga! E aos meus pais, Arlete e Altemar, essa dupla é mais que especial, uma dupla que sempre me deu todo o apoio que precisei, que sempre incentivou o aprendizado e o crescimento, sempre esteve ali para todos os momentos, que levantou minha cabeça em inúmeras vezes, que sempre me instigou a correr atrás de meus sonhos e mostrou que com muita dedicação conquistamos nossos objetivos. Amo todos vocês de forma indescritível.

Por fim, gostaria de agradecer a mim, por toda minha força de vontade, por enfrentar novos desafios e de abrir mão de muitas coisas para estar onde estou.

RESUMO

Os seres humanos têm sido moldados pela praticidade da vida contemporânea e essa influência no estilo de vida tem acarretado a efeitos deletérios no metabolismo humano, gerando, principalmente, síndrome metabólica, caracterizada por obesidade, resistência à insulina, diabetes mellitus tipo 2 e doenças cardiovasculares. Esse cenário aumenta a necessidade do uso de medicamentos para o controle de doenças cardiovasculares, como, as estatinas. A rosuvastatina tem demonstrado maior eficácia no controle da dislipidemia e na prevenção de doenças cardiovasculares. Por outro lado, as estatinas podem acarretar em danos no sistema reprodutivo masculino. Neste sentido, o objetivo deste estudo foi avaliar a qualidade espermática e o desempenho reprodutivo de camundongos machos expostos à rosuvastatina desde a pré-puberdade até a maturidade sexual. Trinta camundongos machos foram divididos em três grupos experimentais que receberam veículo (solução salina), 1,5 ou 5,5 mg/kg/dia de rosuvastatina, por via oral (gavagem), do dia pós-natal (DPN) 23 ao 80, quando a idade de instalação da puberdade, os parâmetros espermáticos, o desempenho reprodutivo e os parâmetros fetais (f1), como, análise biométrica e morfológica. Foram utilizados os testes One-way ANOVA ou Kruskal-Wallis seguidos de teste de Tukey ou Dunn, respectivamente, e as diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$. A instalação da puberdade mostrou-se atrasada nos grupos tratados com estatinas em comparação ao grupo de controle. Os pesos dos órgãos foram semelhantes entre os grupos, exceto a glândula seminal vazia, que foi reduzida no grupo exposto à dose mais baixa de rosuvastatina. A taxa de perda pós-implantação aumentou em ambos os grupos expostos à rosuvastatina. Verificou-se um aumento da frequência de anomalias congênitas gerais e de marcos precoces do desenvolvimento, quando avaliados em conjunto, na prole dos machos expostos à dose mais baixa de estatina. Quando analisadas separadamente, a presença de pálpebras abertas foi mais frequente nos indivíduos cujos pais foram expostos à menor dose de estatina. Em relação à biometria fetal, a distância craniocaudal dos fetos masculinos apresentou uma redução nos grupos tratados. Além disso, verificou-se uma redução da qualidade espermática nos machos expostos a ambas as doses de estatina. A vitalidade e a motilidade dos espermatozoides foram reduzidas nos grupos tratados com estatina de forma dose-dependente e houve um aumento na taxa de gotas citoplasmáticas proximais nos espermatozoides de ambos os grupos expostos. O número de espermátides maduras por grama de testículo e também a produção diária relativa de espermatozoides foram reduzidos nos grupos expostos à rosuvastatina. No epidídimo, foi demonstrado um aumento do tempo de trânsito dos espermatozoides na região da cabeça/corpo. Além disso, a compactação da cromatina dos espermatozoides foi diminuída no grupo exposto à dose mais baixa. Em resumo, os resultados indicam redução da qualidade espermática, toxicidade reprodutiva paterna e comprometimento do desenvolvimento da prole após a exposição paterna à rosuvastatina. Esse estudo sugere um possível risco para a saúde reprodutiva de homens que fazem o tratamento com esse medicamento desde a infância e adolescência até à idade adulta, de forma crônica.

Palavras-chave: Camundongos. Estatinas. Espermatozoides. Reprodução masculina. Toxicidade.

ABSTRACT

Humans have been shaped by the convenience of modern life, and this influence on lifestyle has led to deleterious effects on human metabolism, primarily giving rise to metabolic syndrome characterized by obesity, insulin resistance, type 2 diabetes mellitus, and cardiovascular diseases. This scenario increases the necessity of using medications for controlling cardiovascular diseases, such as statins. Rosuvastatin has demonstrated greater efficacy in managing dyslipidemia and preventing cardiovascular diseases. On the other hand, statins can potentially inflict harm on the male reproductive system. In this context, the objective of this study was to evaluate sperm quality and reproductive performance in male mice exposed to rosuvastatin from pre-puberty to sexual maturity. Thirty male mice were divided into three experimental groups receiving either a vehicle (saline solution), 1.5 mg/kg/day, or 5.5 mg/kg/day of rosuvastatin via oral gavage from postnatal day (PDN) 23 to 80. Parameters such as the onset of puberty, sperm parameters, reproductive performance, and fetal parameters (F1) including biometric and morphological analyses were assessed. One-way ANOVA or Kruskal-Wallis tests were employed followed by Tukey's or Dunn's post hoc tests, respectively, with differences considered significant at $p < 0.05$. The onset of puberty was found to be delayed in the statin-treated groups compared to the control group. Organ weights were similar among groups, except for the empty seminal gland weight, which was reduced in the group exposed to the lower dose of rosuvastatin. Post-implantation loss rate increased in both rosuvastatin-exposed groups. An increase in overall congenital anomalies and early developmental markers was observed in the offspring of males exposed to the lower dose of statin. Specifically, open eyelids were more frequent in individuals whose parents were exposed to the lower statin dose. Regarding fetal biometry, the craniocaudal distance of male fetuses showed a reduction in treated groups. Additionally, sperm quality was reduced in males exposed to both statin doses. Sperm vitality and motility were dose-dependently reduced in the statin-treated groups, and the proximal cytoplasmic droplet rate in sperm increased in both exposed groups. The number of mature spermatids per gram of testis and the relative daily sperm production were reduced in groups exposed to rosuvastatin. In the epididymis, an increased sperm transit time in the head/body region was demonstrated. Moreover, sperm chromatin compaction was diminished in the group exposed to the lower dose. In summary, the results indicate diminished sperm quality, paternal reproductive toxicity, and impaired offspring development following paternal exposure to rosuvastatin. This study suggests a potential risk to the reproductive health of men undergoing chronic treatment with this medication from childhood and adolescence into adulthood.

Keywords: Statins. Male reproduction. Mice. Sperm. Toxicity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Principais condições que compõe a síndrome metabólica.	16
Figura 2. Mecanismo de ação das estatinas na via do mevalonato e redução da biossíntese de colesterol.....	19
Figura 3. Vias neuroendócrinas envolvidas na ativação do eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal e na instalação da puberdade.....	23
Figura 4. Representação gráfica do delineamento experimental.	28
Figura 5. Fotomicrografias representativas dos graus de compactação da cromatina.....	33
Figura 6. Idade da instalação da puberdade nos três grupos de estudo.	37
Figura 7. Motilidade espermática nos diferentes grupos experimentais no DPN 80.	40
Figura 8. Vitalidade espermática dos grupos experimentais no DPN 80.	40
Figura 9. Grau de compactação da cromatina espermática dos animais dos grupos experimentais.....	42
Figura 10. Fotomicrografia dos testículos de camundongos dos grupos experimentais no DPN 80.	45
Figura 11. Fotomicrografias das diferentes regiões do epidídimo de camundongos dos grupos experimentais no DPN 80.....	46
Figura 12. Cinética do processo espermatogênico nos animais dos grupos experimentais no DPN 80.	47
Figura 13 . Fotomicrografias representativas das categorias de estágios dos túbulos seminíferos.	48
Figura 14. Parâmetros biométricos fetais da prole masculina e feminina dos animais dos grupos experimentais.....	51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Massa corporal final e massa dos órgãos reprodutores dos grupos experimentais no PND 80.	38
Tabela 2. Massa dos órgãos vitais dos grupos experimentais no DPN 80.	39
Tabela 3. Morfologia espermática dos animais dos grupos experimentais no DPN 80.	41
Tabela 4. Posição da gota citoplasmática no flagelo dos espermatozoides dos animais dos grupos experimentais no DPN 80.	41
Tabela 5. Contagem espermática no testículo e no epidídimo dos animais dos grupos experimentais no DPN 80.	43
Tabela 6. Análise histopatológica testicular nos diferentes grupos experimentais no DPN 80.	44
Tabela 7. Morfometria testicular dos grupos experimentais no PND 80.	48
Tabela 8. Performance reprodutiva dos machos dos diferentes grupos experimentais no DPN 70 após acasalamento natural com fêmeas não-tratadas.	50
Tabela 9. Frequência de anomalias congênitas e marcos do desenvolvimento adiantados na prole dos animais dos grupos experimentais.	52

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Acetil CoA	Acetil Coenzima A
AT	Azul De Toluidina
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
DCV	Doenças Cardiovasculares
DG	Dia Gestacional
DM2	Diabetes Mellitus Tipo 2
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DPN	Dia Pós-Natal
eNOS	Óxido nítrico endotelial
EPA	<i>Environmental Protection Agency</i>
EUA	Estados Unidos da América
FPP	Farnesil Pirofosfato
FSH	Hormônio Folículo Estimulante
GGPP	Geranylgeranyl Pirofosfato
GnRH	Hormônio Liberador de Gonadotrofina
HDL-colesterol	Colesterol de Alta Densidade
HHG	Hipotalâmico-Hipofisário-Gonadal
HMG-CoA redutase	3-Hidroxi-3-Metilglutaril Coenzima A Redutase
IDL-colesterol	Lipoproteínas de Densidade Intermediária
IMC	Índice de Massa Corporal
Insl3	Peptídeo 3 Semelhante à Insulina
KNDy	Kisspeptina- Neurocinina B-Dinorfina
LAMEB	Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia
LDL-colesterol	Lipoproteínas de Baixa Densidade
LH	Hormônio Luteinizante
NaCl	Cloreto de Sódio
OMS	Organização Mundial de Saúde
PDE	Produção Diária de Espermatozoides
PBS	Tampão Fosfato de Sódio
RI	Resistência à Insulina
SM	Síndrome Metabólica
TG	Triglicerídeos

UFSC
VLDL-colesterol

Universidade Federal de Santa Catarina
Lipoproteínas de Densidade Muito Baixa

SUMÁRIO

1	Introdução	15
1.1	Estilo de vida no século XXI	15
1.2	Estatinas: Uso e mecanismos de ação	17
1.3	Desenvolvimento pós-natal masculino	20
1.4	O efeito da rosuvastatina no sistema genital masculino	24
2	Objetivos	26
2.1	Objetivo Geral	26
2.2	Objetivos específicos	26
3	Material e métodos	27
3.1	Animais	27
3.1.1	Obtenção das camundongas prenhes e das ninhadas	27
3.1.2	Delineamento experimental	27
3.2	Instalação da puberdade	29
3.3	Teste de fertilidade por acasalamento natural e análise da performance reprodutiva	29
3.4	Avaliação morfológica fetal externa	30
3.5	Eutanásia, coleta e pesagem de órgãos	30
3.6	Avaliações espermáticas	31
3.6.1	Motilidade espermática	31
3.6.2	Vitalidade espermática	31
3.6.3	Morfologia espermática	32
3.6.4	Compactação da cromatina espermática	32
3.6.5	Cálculo da produção diária de espermatozoides por testículo	33
3.6.6	Contagem do número e cálculo do tempo de trânsito dos espermatozoides no epidídimo	34
3.7	Análises histopatológica e morfométrica	34

3.7.1	Área do túbulo seminífero, área do epitélio seminífero e área luminal, e altura do epitélio germinativo.....	35
3.7.2	Cinética do processo espermatogênico.....	35
3.8	Análise estatística	36
4	Resultados.....	37
4.1	Instalação da puberdade.....	37
4.2	Massa corporal final e massa dos órgãos reprodutores e vitais	38
4.3	Qualidade espermática.....	39
4.4	Avaliações histopatológicas e morfométricas	44
4.5	Performance reprodutiva	49
4.6	Análises dos parâmetros biométricos e morfológicos fetais.....	50
5	Discussão.....	53
6	Conclusão	59
	REFERÊNCIAS	60
	ANEXO A – Certificado de aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Santa Catarina.	66
	ANEXO B – Emenda de aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Santa Catarina.	67

1 INTRODUÇÃO

1.1 ESTILO DE VIDA NO SÉCULO XXI

O estilo de vida é uma temática que vem sendo tratada desde os anos noventa, através de campanhas pelo mundo, evidenciando e incentivando os cuidados com a saúde por meio de atividades físicas. Essas campanhas foram elaboradas para a divulgação de atividades físicas e recomendações sanitárias, tendo em vista o desconhecimento da sua importância pela população, juntamente com o desenvolvimento da modernidade resultando em comportamentos sedentários (ARROCHA RODULFO, 2019).

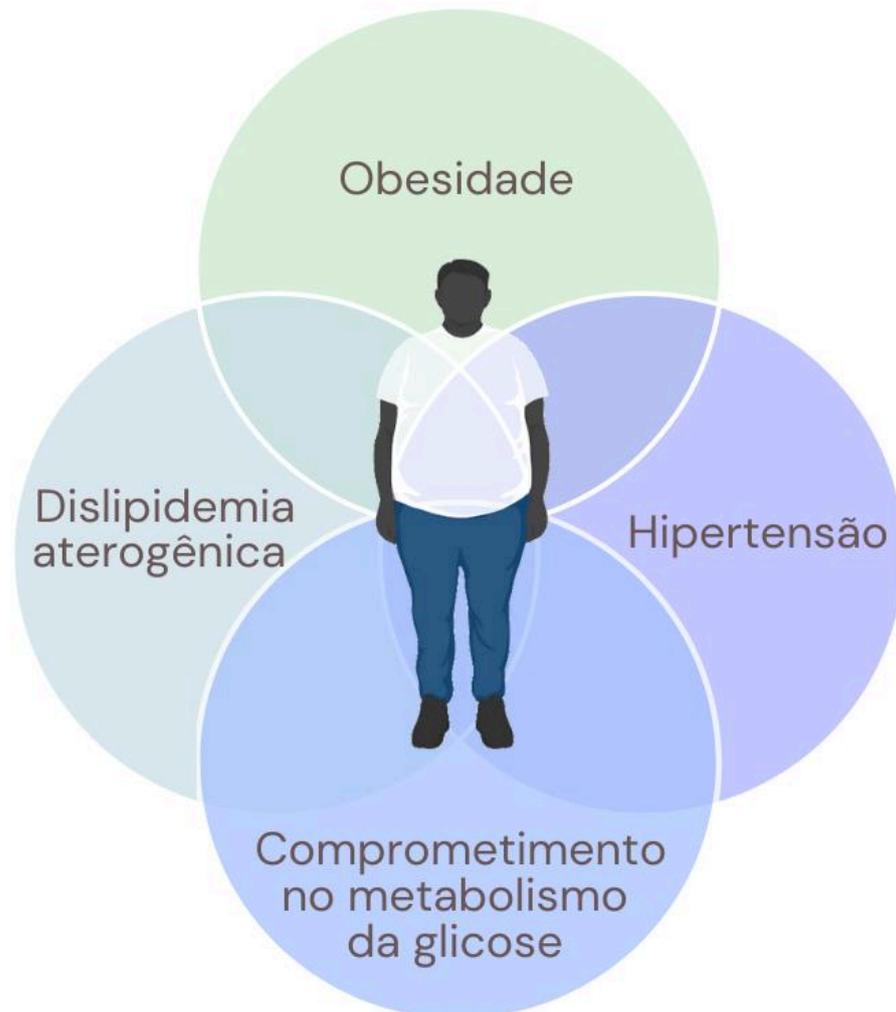
Na sociedade contemporânea, os indivíduos vêm sendo moldados pela praticidade, com lazers passivos (utilização de televisões e vídeo games) e atividades relacionadas ao trabalho (trabalhos remotos e horas excessivas sentados), assim, apresentando um maior tempo sedentário diário, bem como tendo maus hábitos alimentares e apresentando uma falta de exercícios físicos (MORATOYA et al., 2013; RYNDERS et al., 2018). Este estilo de vida acarreta em efeitos deletérios sobre o metabolismo do indivíduo, gerando tendências em desenvolver principalmente síndrome metabólica (SM), como, obesidade, resistência à insulina (RI) e diabetes mellitus tipo 2 (DM2); doenças cardiovasculares (DCV) como a doença arterial coronariana, angina instável e enfarte agudo do miocárdio; alterações pulmonares; e doenças neurológicas (ARROCHA RODULFO, 2019; BOUCHARD; BLAIR; KATZMARZYK, 2015).

Atualmente, com esses fatores de risco estabelecidos pela SM, essa síndrome está entre os principais problemas clínicos e de saúde pública global, apresentando uma tendência constante e crescente de prevalência oscilando de 10% a até 84%. Quando associada com DM2, mostra um aumento de cinco vezes e um aumento de duas vezes quando associado ao desenvolvimento de doença cardiovascular (FAHED et al., 2022; GEMEDA; ABEBE; DUGUMA, 2022).

A SM é caracterizada por um conjunto de fatores bioquímicos e fisiológicos que juntos resultam em distúrbios metabólicos (Figura 1), o que ocasiona a alta possibilidade de desenvolvimento de DM2 e de DCV. Esses distúrbios metabólicos podem ser caracterizados por valores diminuídos de colesterol de alta densidade (HDL-colesterol), hipertensão, hiperglicemia, níveis elevados de triglicerídeos (TG) e a obesidade abdominal. Sua definição ainda é muito debatida, entretanto, o ponto em comum entre essas classificações já estabelecidas baseia-se nos seguintes componentes: obesidade, adiposidade abdominal ou

indicadores de resistência à insulina; metabolismo da glicose comprometido; hipertensão; e dislipidemia aterogênica (CLÁUDIO et al., 2018; FARIAS et al., 2020; SAMSON; GARBER, 2014).

Figura 1. Principais condições que compõe a síndrome metabólica.



Fonte: Elaborado pela autora (2023). Desenvolvido: Canva.

Sendo um dos elos da SM, a obesidade é caracterizada pelo acúmulo excessivo de gordura corporal em grande extensão, o que acarreta prejuízos à saúde dos indivíduos. Esse excesso de massa corporal pode ser definido pelo índice de massa corporal (IMC), índice calculado considerando a massa corporal e a altura do indivíduo. A obesidade se constitui enquanto fator de risco para enfermidades como dislipidemias, DM2, DCV e até mesmo alguns tipos de câncer, incluindo endométrio, mama, ovário, próstata, fígado, vesícula biliar, rim,

cólon, esôfago e estômago (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2008; SOUSA et al., 2022; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2021).

A sua etiologia é multifatorial com interação entre fatores metabólicos, genéticos, ambientais, nutricionais, psicossociais e no estilo de vida, os quais estão relacionadas com o seu surgimento e desenvolvimento (CAMPAGNOLO et al., 2008). Com o aumento da incidência em países desenvolvidos e subdesenvolvidos e a íntima associação com doenças crônicas não-transmissíveis, a obesidade vem afetando cada vez mais a sociedade, além de afetar mais precocemente crianças e adolescentes (WEFFORT et al., 2019). Segundo dados da Organização mundial de Saúde (OMS), comparado com o índice de obesidade mundial realizado em 1975, os números até o momento triplicaram, tendo em média 1,9 bilhões de adultos (com 18 anos ou mais) apresentando um peso acima do ideal e destes, mais de 650 milhões são obesos. Em 2016, estimou-se que 340 milhões de crianças e adolescentes de 5 a 19 anos foram classificadas com excesso de peso e estimativas apontam que, até 2030, 30% dos indivíduos dentro dessa faixa etária serão afetados por estas condições nos EUA. Sendo assim, a obesidade foi reconhecida pela OMS como a maior epidemia de saúde pública mundial até o ano de 2019 (WANG et al., 2008; WEFFORT et al., 2019; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2021).

Com os casos de obesidade leve ou moderada crescendo na população, sendo mais comuns em crianças e adolescentes, tornaram-se mais frequentes os casos de dislipidemia secundária na infância e na adolescência (GONZÁLEZ JIMÉNEZ; ÁLVAREZ FERRE, 2011). Conseqüentemente, o perfil lipídico mais encontrado consiste em aumento de lipoproteínas de densidade muito baixa (VLDL-colesterol) e remanescentes, das partículas pequenas e densas de lipoproteínas de baixa densidade (LDL-colesterol) e de triglicerídeos, além de diminuição da fração de HDL-colesterol, assim, aumentando a busca por prevenções e tratamentos para esse cenário (WEFFORT et al., 2019).

1.2 ESTATINAS: USO E MECANISMOS DE AÇÃO

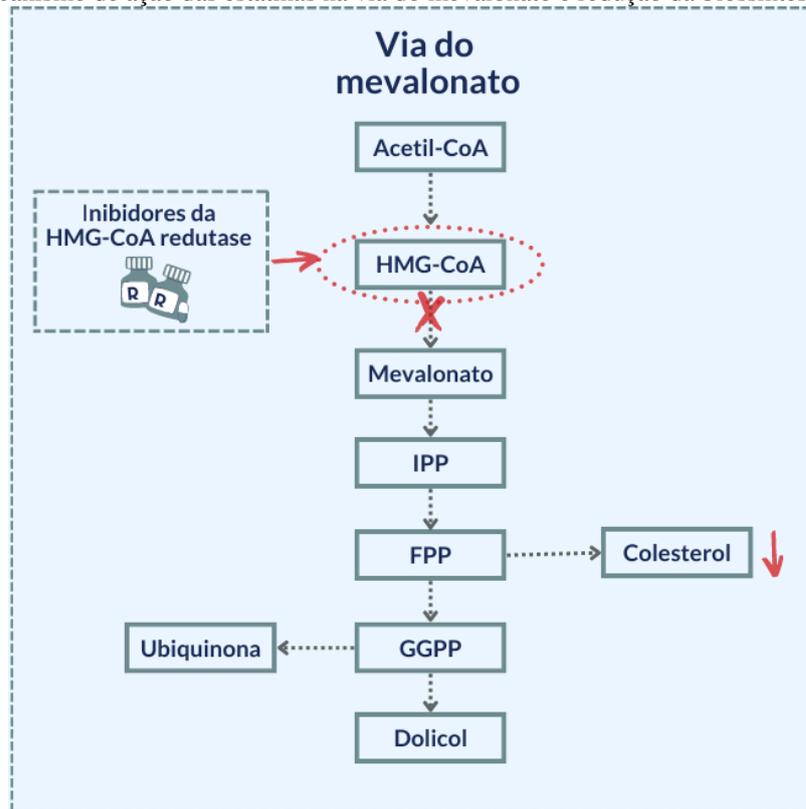
A descoberta das estatinas ocorreu a partir de um estudo com fungos, realizados na década de setenta, onde o foco foi compreender os compostos naturais envolvidos na biossíntese do colesterol, entretanto, durante o estudo, acidentalmente, percebeu-se a atividade dos inibidores da 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A redutase (HMG-CoA redutase) pela

primeira vez, enzima a qual é um elemento chave para a atuação das estatinas (TOTH; BANACH, 2019).

Durante uma pesquisa de agentes antimicrobianos através de um caldo de fermentação de *Penicillium citrinum*, surgiu a primeira hipótese onde o bioquímico japonês Akira Endo supôs que, de forma natural, alguns organismos produziam e utilizavam como mecanismo de defesa os inibidores da HMG-CoA redutase contra organismos que necessitavam colesterol ou outros esteroides para sua sobrevivência (ENDO, 1992; ENDO; KURODA; TSUJITA, 1976; TOTH; BANACH, 2019). Obtiveram-se também resultados promissores a partir do caldo de fermentação de *Aspergillus terreus*, o qual originou o inibidor mevinolin, posteriormente denominado lovastatina. Foram mais de dois anos de pesquisa e mais de seis mil cepas microbianas estudadas em busca de inibidores da HMG-CoA redutase realizados por Akira Endo e colaboradores para fornecerem os pontos chave para inibidores eficazes da biossíntese do colesterol utilizados atualmente (ENDO, 2008).

A biossíntese do colesterol é realizada a partir da acetil coenzima A (acetil CoA), oriundo do metabolismo da glicose, acetato e a glutamina, usado na via do mevalonato (Figura 2), uma via anabólica constituída por trinta etapas. Essa via produz metabólitos isoprenoides essenciais para diversos processos biológicos, além de possibilitar a biossíntese de esteróis, tal como o colesterol (MULLEN et al., 2016; TOTH; BANACH, 2019).

Figura 2. Mecanismo de ação das estatinas na via do mevalonato e redução da biossíntese de colesterol.



Fonte: Adaptado de Mullen et al., 2016. Desenvolvido: Canva e Mind the Graph.

Ação dos inibidores da HMG-CoA redutase, estatinas, agindo na via do mevalonato, acarretando na produção de esteróis e metabólitos isoprenóides essenciais para diversos processos biológicos, sendo um deles a biossíntese do colesterol.

Tendo em vista o funcionamento dos inibidores da HMG-CoA redutase, atualmente, as estatinas são os fármacos mais utilizados para controle das hiperlipidemias e prevenção de doenças cardíacas coronárias, sendo utilizadas diariamente por mais de 30 milhões de pacientes. Esses medicamentos têm como função a diminuição da síntese endógena do colesterol através do mecanismo de inibição competitiva da enzima HMG-CoA redutase, enzima limitante na biossíntese de colesterol (ENDO, 2008; GONZÁLEZ JIMÉNEZ; ÁLVAREZ FERRE, 2011; WEFFORT et al., 2019).

Além disso, as estatinas aumentam a atividade dos receptores de LDL-colesterol no fígado, acarretando em uma maior remoção do LDL-colesterol circulante e dos seus precursores remanescentes, tais como o VLDL-colesterol e lipoproteínas de densidade intermediária (IDL-colesterol) (GONZÁLEZ JIMÉNEZ; ÁLVAREZ FERRE, 2011; WEFFORT et al., 2019). Como as estatinas impedem a conversão de HMG-CoA em mevalonato, de modo consequente, esses fármacos inibem a síntese de compostos importantes, denominados isoprenóides intermediários da via biossintética do colesterol, como o geranylgeranyl pirofosfato (GGPP) e

farnesil pirofosfato (FPP). As estatinas promovem reduções de 25% a 45% nas concentrações séricas LDL-colesterol, de 5 a 10% nos níveis séricos de TG e aumentos de 5 a 10% nas concentrações séricas de HDL-colesterol (ADAM; LAUFS, 2008; ISTVAN, 2003; VRECER et al., 2003; WEFFORT et al., 2019).

Para uma estatina ser ideal em seus resultados, necessitaria uma afinidade elevada para o sítio ativo da enzima, baixa disponibilidade sistêmica de equivalentes inibidores ativos, seletividade acentuada de captação em células hepáticas em comparação com células não-hepáticas e duração de efeito relativamente prolongado (MCTAGGART, 2003). Atualmente, conforme a *U.S. Food And Drug Administration* (2023), são comercializadas para administração terapêutica sete membros da classe de fármacos das estatinas: atorvastatina, fluvastatina, lovastatina, pitavastatina, pravastatina, rosuvastatina e sinvastatina. A rosuvastatina é uma das estatinas mais eficazes no mercado, alcançando um maior efeito na redução do colesterol e a que mais se aproxima dos critérios citados anteriormente, destacando-se as características únicas de ligação com a enzima HMG-CoA redutase e efeitos inibitórios superiores aos de outras estatinas (ADAMS; ALAEILKHCHI; WRIGHT, 2020; LEITE et al., 2014; MCTAGGART, 2003).

1.3 DESENVOLVIMENTO PÓS-NATAL MASCULINO

A puberdade é um período crítico, onde ocorre o processo de transição entre a infância e fase adulta, envolvendo um conjunto de alterações neuroendócrinas, morfológicas, fisiológicas e comportamentais (FARELLO et al., 2019; LIVADAS; CHROUSOS, 2019). A idade da instalação da puberdade apresenta alguma variabilidade na espécie humana e depende de fatores genéticos, étnicos, nutricionais e psicossociais (MARCEAU et al., 2011). Fisiologicamente, pode-se considerar sua instalação em indivíduos do sexo masculino ocorrendo entre os nove e aos quatorze anos de idade (ABREU; KAISER, 2016). Nos camundongos, a instalação da puberdade ocorre em média, entre o dia pós-natal (DPN) 21 e 28 e a separação prepucial tem sido utilizada como um sinal físico externo indicativo da instalação da puberdade masculina (GUÉNET et al., 2015; PARKER, 2012).

A puberdade é um período de mudanças drásticas no desenvolvimento pós-natal, ocorrendo importantes interações neuroendócrinas e alterações morfológicas nos mamíferos, progredindo através de um conjunto sequencial de estágios para atingir a função reprodutiva na maturidade sexual (FISHER; EUGSTER, 2014; STOKER et al., 2000). Nesse período surgem

as características sexuais secundárias, como as transformações nos testículos, com um grande aumento no volume testicular e aumento na produção hormonal (GUO et al., 2020; KOSKENNIEMI; VIRTANEN; TOPPARI, 2017).

Durante este período, também ocorrem outros eventos importantes nos testículos, tais como a proliferação e maturação das células do nicho somático, bem como o início do processo de espermatogênese (GUO et al., 2020; KOSKENNIEMI; VIRTANEN; TOPPARI, 2017). As células somáticas apresentam dois grandes grupos principais, sendo as células de Leydig e de Sertoli. As células de Leydig se localizam no tecido intersticial testicular e possuem várias funções de relevância para o sistema genital masculino, tais como a produção de testosterona e de peptídeo 3 semelhante à insulina (Insl3), hormônios chave para o desenvolvimento de células germinativas e a descida testicular, respectivamente. As células de Sertoli estão alocadas no interior dos cordões e túbulos seminíferos, tendo a função de suporte principal para as células germinativas, aporte nutricional às células germinativas, fagocitose de corpos residuais, produção de fluido testicular e outras (MURTA et al., 2019; THARMALINGAM; JORGENSEN; MITCHELL, 2018).

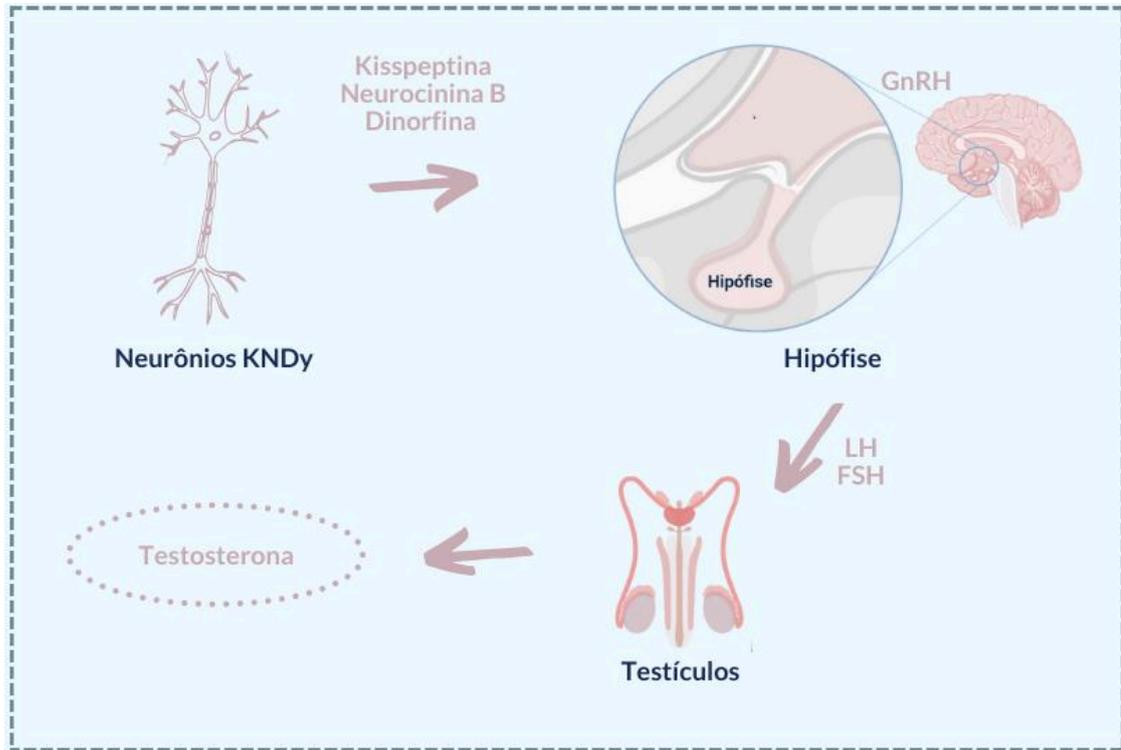
A espermatogênese representa um processo altamente orquestrado e regular de diferenciação celular. Nesse contexto, uma célula-tronco denominada espermatogônia passa por uma série gradual de transformações, culminando na formação de uma célula altamente especializada e haploide, conhecida como espermatozoide, tal processo se desenrola nos túbulos seminíferos dos testículos (FRANÇA; RUSSEL, 1998). No decorrer desse mecanismo de diferenciação, três categorias distintas de células germinativas desempenham papéis fundamentais: espermatogônias, espermatócitos e espermátides (FRANÇA; RUSSEL, 1998; JOHNSON et al., 2000). No estágio adulto, a espermatogênese se manifesta como um processo contínuo que pode ser subdividido em três fases distintas: mitótica, meiótica e espermiogênese. Cada uma dessas fases é marcada por notáveis alterações tanto morfológicas quanto bioquímicas nos elementos constituintes do citoplasma e do núcleo celular. Essa sequência intrincada de eventos não apenas assegura a produção constante de espermatozoides, mas também perpetua a continuidade das espécies através da transmissão da informação genética (HAMANO et al., 2007; JOHNSON et al., 2000).

Apesar de existir algumas diferenças entre humanos e roedores, principalmente com relação ao controle hormonal durante a instalação da puberdade e início da espermatogênese, a maior parte da compreensão nessa temática é proveniente de estudos fisiológicos, genéticos e moleculares realizados com roedores (THARMALINGAM; JORGENSEN; MITCHELL,

2018). A grande similaridade nos mecanismos entre humanos e roedores, como por exemplo, controle da liberação de hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH) por neurotransmissores, componentes celulares envolvidos nos feedbacks positivos e negativos, começo do processo de secreção de gonadotrofinas e o controle do desenvolvimento testicular, possibilitam os estudos nesses animais, tendo resultados que podem ser extrapolados para humanos (OJEDA; SKINNER, 2006).

Para a instalação da puberdade e início da maturação sexual estão envolvidos alguns componentes chaves nesses eventos, sendo o sistema hipotalâmico Kisspeptina- neurocinina B- dinorfina (KNDy) e o seu gerador de impulsos de GnRH a jusante no núcleo arqueado do hipotálamo, responsáveis pela ativação do eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal (HHG). A partir desses componentes, os neurônios KNDy secretam Kisspeptina, neuroquinina B e dinorfina, iniciando a liberação de GnRH pelo hipotálamo, assim, ativando a hipófise para a produção e liberação de hormônio luteinizante (LH) e hormônio folículo estimulante (FSH), ocorrendo a estimulação das gônadas para a produção de testosterona na hipófise (Figura 3) (ABREU; KAISER, 2016; LIVADAS; CHROUSOS, 2019). O transporte de GnRH inicia quando o mesmo é liberado na eminência média e segue pela corrente sanguínea, que o levará até as células gonadotrópicas através de um sistema vascular porta-hipofisário para o transporte de neuro-hormônios.

Figura 3. Vias neuroendócrinas envolvidas na ativação do eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal e na instalação da puberdade.



Fonte: Adaptado de Nieuwenhuis et al., 2020. Desenvolvido: Canva e Mind the graph.

Processo hormonal de início da instalação da puberdade em machos. Neurônios KNDy secretam Kisspeptina, neuroquinina B e dinorfina, iniciando a liberação de GnRH pelo hipotálamo, assim, ativando a hipófise para a produção e liberação de LH e FSH. Onde ocorre a estimulação das gônadas para a produção de testosterona.

Esta via não ocorre exclusivamente no momento que se inicia o desenvolvimento puberal, pois ela inicia-se na fase fetal sendo responsável pela diferenciação sexual hipotalâmica e persiste até o período neonato do indivíduo, onde nesses primeiros meses de vida, sucede a ativação transitória do eixo HHG. Em indivíduos do sexo masculino, entre 1 e 3 meses de idade, nota-se um pico na concentração de testosterona acompanhada da diminuição da concentração de LH. Seguidamente, essa via é desativada até o início da maturação puberal (KIVIRANTA; KUIRI-HÄNNINEN; SAARI, 2016; KUIRI-HÄNNINEN; SANKILAMPI; DUNKEL, 2014; LIVADAS; CHROUSOS, 2019). Em contraste, em camundongos as concentrações de testosterona são altas após o nascimento e apresentam uma redução a partir do primeiro dia pós-natal, tendo um aumento próximo do período de instalação da puberdade, entretanto, a funcionalidade do eixo HHG desenvolve-se gradualmente ao longo do desenvolvimento juvenil dos animais (BELL, 2018).

Antes de o eixo HHG ser completamente reativado, ocorre um processo no corpo humano denominado adrenaarca. Durante essa fase, as glândulas adrenais, que têm a responsabilidade de produzir diversos hormônios, aumentam a liberação de androstenediona, a

qual é responsável por converter periféricamente em testosterona. Como resultado desse processo, ocorre a gonadarca, em que sob a influência dos hormônios hipofisários, se dá início à produção dos hormônios gonadais e à gametogênese. (NIEUWENHUIS et al., 2020; SOUZA et al., 2014).

Em machos, como citado anteriormente, o processo de maturação inicia-se pela liberação de kisspeptina, ativando o eixo HHG, assim, tendo o aumento dos pulsos de GnRH no hipotálamo, a liberação de LH e hormônio folículo estimulante (FSH) pela hipófise, estimulando a produção de hormônios esteroides sexuais pelos testículos (FISHER; EUGSTER, 2014). O hormônio LH desencadeia a secreção de testosterona pelos testículos, enquanto o FSH assegura a manutenção da espermatogênese. Isso, por sua vez, resulta na redução da liberação da kisspeptina dos neurônios KNDy e, conseqüentemente, da secreção de GnRH pelo hipotálamo. Esse encadeamento de eventos leva ao aumento da velocidade de crescimento gonadal, o que por sua vez promove a capacidade reprodutiva e o desenvolvimento das características sexuais secundárias, culminando na expressão do fenótipo masculino adulto (ALOTAIBI, 2019; FISHER; EUGSTER, 2014).

Durante a puberdade, como a espermatogênese e a esteroidogênese ainda não estão totalmente estabelecidas, esse pode ser um período crítico do desenvolvimento reprodutivo pós-natal e, portanto, mais vulnerável às mudanças ocasionadas por agentes químicos denominados como desreguladores endócrinos (FAVARETO et al., 2011; JOHNSON et al., 2010).

1.4 O EFEITO DA ROSUVASTATINA NO SISTEMA GENITAL MASCULINO

O principal protagonista das possíveis interferências durante o período de desenvolvimento reprodutivo pós-natal são os desreguladores endócrinos, um grupo de compostos químicos que engloba substâncias químicas exógenas (GONSIOROSKI; MOURIKES; FLAWS, 2020). Estes compostos tem o potencial de alterar negativamente as funções do sistema endócrino, tendo em vista sua capacidade de mimetizar hormônios, alterar metabolização e outros, além de interferir na resposta hormonal (ROCHA et al., 2022; ROY; CHAKRABORTY; CHAKRABORTY, 2009). Muitos desses compostos químicos com potencial de diminuição nas funções androgênicas têm demonstrado retardar o desenvolvimento puberal e os efeitos reprodutivos adversos induzidos por esses compostos tóxicos dependem do tempo, via e dose de exposição (BLYSTONE et al., 2007; LEITE et al., 2017b).

Estudos apontam que a exposição às estatinas traz preocupações relacionada ao seu efeito na síntese de hormônios esteroides endógenos, podendo causar alterações na função e produção hormonal do indivíduo, através da inibição da HMG-CoA redutase e diminuição da síntese de colesterol, resultando na diminuição da biossíntese dos hormônios esteroides sexuais (KLINEFELTER; LASKEY; AMANN, 2014; STAMERRA et al., 2023). Ademais, a inibição na enzima HMG-CoA redutase acarretada pelas estatinas, além da redução da síntese de esteroides, tem demonstrado uma queda na síntese de ubiquinona, vitamina D, ácidos biliares e de importantes isoprenoides, como, FFP e GGPP (BROWN; IKONEN; OLKKONEN, 2014).

A rosuvastatina, em específico, mostrou-se como um desregulador endócrino em ratos, interferindo no desenvolvimento reprodutivo masculino no período pós-natal e diminuindo a qualidade dos espermatozoides na maturidade sexual, quando expostos apenas na pré-puberdade (LEITE et al., 2014, 2017a, 2017b). Além disso, foi observado uma redução significativa nas concentrações de testosterona, nos níveis séricos de colesterol total e LDL em humanos e roedores (HSIEH; HUANG, 2016; LEITE et al., 2014). A rosuvastatina demonstrou capacidade de impactar no comportamento sexual e afetar a morfologia epididimária, sem necessariamente causar mudanças nos níveis de testosterona (SILVA et al., 2020).

Além de todos os efeitos citados anteriormente, a rosuvastatina está associada com alterações transgeracionais a partir da exposição em ratos durante a pré-puberdade. Esse potencial se dá através das características constatadas na prole masculina, tendo alterações estruturais no epidídimo e testículos, aumento na fragmentação de DNA e déficits na qualidade espermática (LEITE et al., 2018a).

De modo geral, a exposição a agentes químicos durante o período peripuberal, considerado um período crítico, gera alterações reprodutivas, as quais são relevantes para a toxicologia reprodutiva, visto que as mudanças nessa fase podem afetar a capacidade reprodutiva na vida adulta (MANTOVANI; FUCIC, 2014; PEROBELLI et al., 2012; STOKER et al., 2000).

Tendo em vista o uso elevado de agentes hipolipemiantes na população para os tratamentos desde a infância até a vida adulta, devido à desregulação no perfil lipídico e como prevenção primária de doença cardiovascular, além da considerável escassez de informações sobre os eventuais efeitos das estatinas no desenvolvimento reprodutivo pós-natal e na maturação sexual, existe a necessidade de entender a possível toxicidade promovida pela rosuvastatina no sistema genital e fertilidade masculina, de maneira a permitir uma melhor abordagem referente aos riscos para a saúde reprodutiva humana.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Investigar a fertilidade e os parâmetros fetais de camundongos machos expostos ao agente hipolipemiante rosuvastatina desde a pré-puberdade até a maturidade sexual.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar o estado de saúde geral dos animais através da massa corporal e dos órgãos, e do perfil lipídico sérico dos camundongos expostos à rosuvastatina.
- Caracterizar os efeitos da exposição à rosuvastatina no desenvolvimento reprodutivo pós-natal dos camundongos.
- Avaliar a qualidade espermática e a fertilidade de camundongos expostos à rosuvastatina desde a pré-puberdade.
- Analisar os parâmetros fetais na prole dos animais expostos à rosuvastatina.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS

3.1.1 Obtenção das camundongas prenhes e das ninhadas

Foram utilizados 15 camundongos machos adultos (85 dias de idade, pesando aproximadamente 40 g) e 30 fêmeas adultas (85 dias de idade, pesando aproximadamente 30 g), da linhagem *Swiss*, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC – Campus Florianópolis/SC. Os animais foram mantidos em gaiolas de polietileno medindo 30x20x13 cm, com substrato de maravalha autoclavada, em condições controladas de luminosidade (12 horas de luz/ 12 horas de escuro) e temperatura (média de 23°C) no Biotério Experimental de Mamíferos Roedores da UFSC/CCB (Sala 110C). Os animais receberam água e ração para roedores *ad libitum*.

Os acasalamentos foram realizados durante o período escuro do ciclo, colocando duas fêmeas em fase de proestro na caixa do macho e o dia zero de prenhez (DG 0) foi determinado pela presença de plug vaginal ou ainda, no caso de ausência de plug vaginal, através de lavado vaginal, a confirmação da presença de espermatozoides nas fêmeas. As camundongas prenhes ou lactantes foram mantidas em gaiolas individuais.

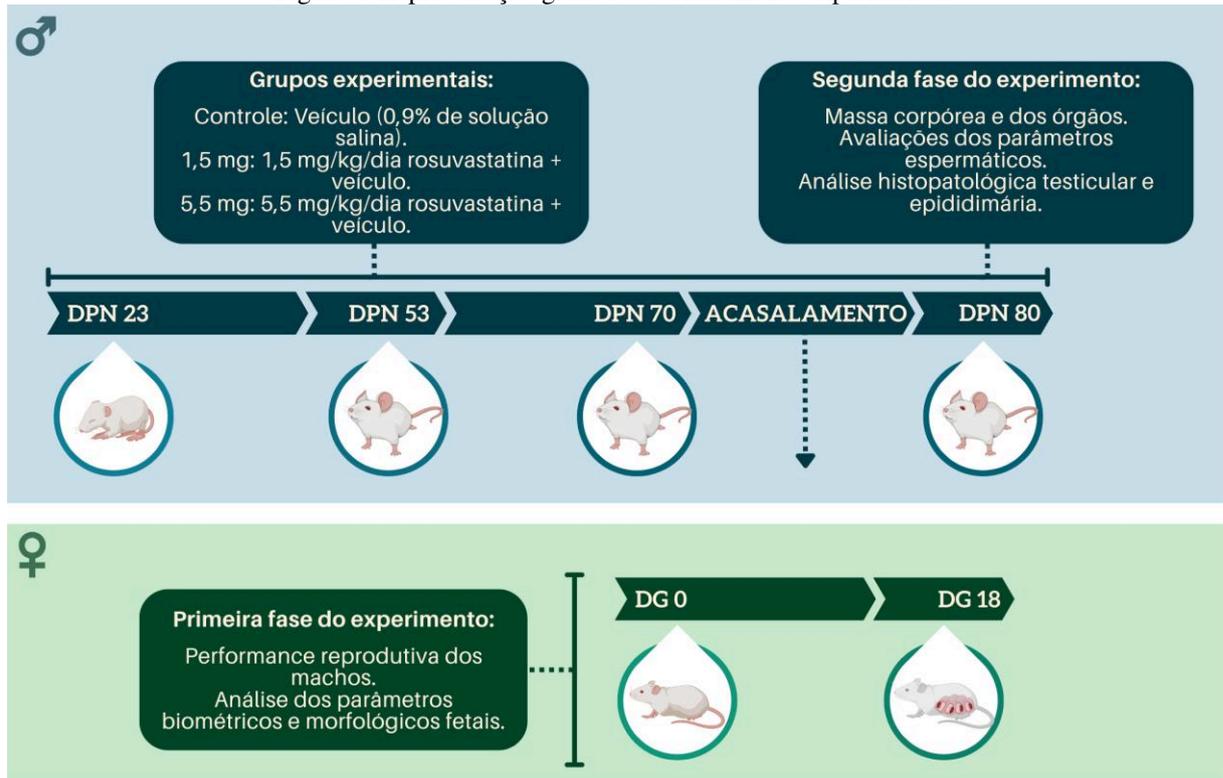
Após o nascimento, no DPN 0, o número de filhotes por ninhada foi reduzido para oito, sendo 4 do sexo feminino e 4 do masculino, onde os filhotes do sexo feminino foram utilizados para um estudo paralelo. As ninhadas com menos de 8 filhotes foram eutanasiadas. Foi mantido apenas o número de animais necessário para a realização desse estudo, sendo que os animais excedentes foram eutanasiados enquanto neonatos, por decapitação.

3.1.2 Delineamento experimental

Após o desmame, o qual foi realizado no dia pós-natal (DPN) 21, os filhotes machos foram distribuídos em três grupos experimentais (n = 10 por grupo, com um ou dois filhotes por ninhada para cada grupo), sendo eles: grupo controle, cujos animais receberam apenas veículo (solução salina a 0,9%) e grupos tratados com rosuvastatina nas doses de 1,5 ou 5,5 mg/Kg/dia de rosuvastatina diluída em solução salina a 0,9%. Os animais dos diferentes grupos experimentais foram administrados por via oral (gavagem) do DPN 23 até a maturidade sexual

(DPN 80) (Figura 4). Para que tais doses fossem estabelecidas, consideraram-se a conversão de doses entre humanos e camundongos baseado na área de superfície corporal das espécies em questão e as dosagens de rosuvastatina disponíveis no mercado, sendo de 10 mg a 40 mg (ADAN; LEITE, 2014; REAGAN-SHAW; NIHAL; AHMAD, 2008).

Figura 4. Representação gráfica do delineamento experimental.



Fonte: Elaborado pelo autor (2023). Desenvolvido: Canva e Mind the graph.

Os camundongos foram expostos a Rosuvastatina do DPN 23 até o DPN 80. O intervalo entre o DPN 70 e o DPN 80 corresponde aos acasalamentos com fêmeas não tratadas, possibilitando as análises citadas. O DPN 80 encerrou-se o tratamento dos animais, subsequentemente, analisando os parâmetros estabelecidos.

O tempo de duração da espermatogênese no camundongo é de aproximadamente trinta e nove dias e o tempo de trânsito espermático epididimário leva em torno de seis dias, totalizando uma média de quarenta e cinco dias (FRANÇA; AVELAR; ALMEIDA, 2005). Sendo assim, o tratamento até o DPN 70 já seria suficiente para a realização da avaliação da performance reprodutiva dos machos, pois contempla o tempo necessário para a espermatogênese e maturação espermática no epidídimo (DUTTA; SENGUPTA, 2016). A fim de utilizar um menor número de animais e assumindo que o tratamento é contínuo durante toda a maturidade sexual nos seres humanos, os animais foram tratados até o DPN 80, quando foram eutanasiados para avaliação dos demais parâmetros reprodutivos.

Para a primeira etapa do experimento no DPN 70, os animais dos grupos experimentais (n=10) foram utilizados para acasalamento com animais não-tratados e a avaliação de sua fertilidade e da performance reprodutiva, bem como das análises dos parâmetros biométricos fetais e da morfologia fetal externa. Para tal, foi necessário a obtenção de 30 camundongas adultas receptivas, em fase de proestro/estro natural, adquiridas do Biotério Central da UFSC para a realização do acasalamento com machos tratados e avaliação da fertilidade e capacidade reprodutiva. No DPN 80, os mesmos animais foram utilizados para obtenção do massa corpórea e massa dos órgãos, análise histopatológica de testículos e epidídimos e avaliações espermáticas (contagens, compactação da cromatina, motilidade, vitalidade e morfologia espermáticas). Todas as análises foram aplicadas ensaios às cegas.

Os procedimentos experimentais estão de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e tiveram a aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Santa Catarina com o número de protocolo 1688170919 (ANEXO A E ANEXO B).

3.2 INSTALAÇÃO DA PUBERDADE

A separação prepucial é o principal parâmetro físico indicativo da instalação da puberdade masculina e foi investigada a partir do DPN 23, com base na retração manual do prepúcio, o qual foi dada como completa quando houve o descolamento do prepúcio em relação à glândula peniana (HOFFMANN, 2018; PARKER, 2012). Os filhotes machos foram pesados no dia em que se constatou a instalação da puberdade de cada indivíduo.

3.3 TESTE DE FERTILIDADE POR ACASALAMENTO NATURAL E ANÁLISE DA PERFORMANCE REPRODUTIVA

O teste de fertilidade e performance reprodutiva foi realizado no DPN 70, com cada um dos camundongos tendo sido colocados inicialmente em caixas 30x20x13 cm. Após o período de reconhecimento do novo ambiente, uma fêmea receptiva não-tratada, em fase de proestro, foi introduzida junto a caixa para que o acasalamento ocorresse durante a fase escura do ciclo claro-escuro. A constatação de prenhez das camundongas foi confirmada na manhã seguinte através da presença de plug vaginal ou pela realização de lavados vaginais, seguida da

verificação da presença de espermatozoides no lavado vaginal, a qual indica o dia gestacional (DG) 0.

As fêmeas prenhes foram pesadas semanalmente para o monitoramento do ganho de peso corpóreo e mantidas em gaiolas individuais. No DG 18 as fêmeas foram eutanasiadas por deslocamento cervical para a coleta dos ovários e do útero gravídico, registro do número de corpos lúteos e sítios de implantação para posterior determinação das seguintes taxas: potencial de fertilidade: implantes / corpos lúteos x 100; taxa de prenhez: n.º de fêmeas prenhes / n.º de fêmeas inseminadas x 100; taxa de perdas pré-implantação: n.º de corpos lúteos – n.º de implantes / n.º de corpos lúteos x 100; taxa de perdas pós-implantação: n.º de implantes – n.º de fetos vivos / n.º de implantes x 100; razão sexual: n.º de fetos do sexo masculino / n.º de fetos do sexo feminino x 100. Ademais, foram obtidos o peso da fêmea prenhe e do útero gravídico, peso dos fetos masculinos e femininos, e peso das placentas.

3.4 AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA FETAL EXTERNA

A análise morfológica fetal externa foi realizada após a obtenção dos fetos no DG 18, com o auxílio de um estereomicroscópio Zeiss, para a verificação de possíveis anomalias congênitas externas nos fetos masculinos e femininos. Os fetos foram avaliados quanto ao aspecto da circunferência da cabeça, protrusão do encéfalo ou meninges, posição e aparência das orelhas e olhos, aspecto geral da face, presença de fenda labial ou palatina, edema generalizado, características e aparência dos membros, dedos e cauda, presença de gastrosquise e de anomalias de medula espinal mais evidentes na região dorsal, como a espinha bífida (DAMASCENO et al., 2008; MCQUEEN, 2006). Com auxílio de paquímetro digital foram aferidas a distância craniocaudal e anogenital nos fetos masculinos e femininos, em razão de sua importância para a constatação de possíveis interferências no desenvolvimento fetal e no desenvolvimento da genitália externa, respectivamente, em decorrência da exposição a um desregulador endócrino (PARKER, 2012; TYL; MARR, 2012).

3.5 EUTANÁSIA, COLETA E PESAGEM DE ÓRGÃOS

No DPN 80, foram realizadas as eutanásias dos camundongos machos, sendo que os animais foram pesados e anestesiados via inalação de isoflurano, seguida de deslocamento cervical para a eutanásia dos indivíduos. Subsequentemente, o sangue dos animais foi coletado

através da veia cava inferior e, posteriormente, este foi processado para a realização da separação do soro para futuras dosagens bioquímicas. A coleta dos órgãos reprodutores foi iniciada pela remoção do testículo e epidídimo, os quais foram pesados e destinados às análises histológicas e morfométricas. A glândula seminal (cheia e vazia, sem a glândula coaguladora), o ducto deferente esquerdo, a próstata ventral e a glândula prepucial foram pesadas e, em seguida, descartadas. Os órgãos vitais dos camundongos, tais como rins, fígado, adrenal e encéfalo também foram pesados e posteriormente descartados.

3.6 AVALIAÇÕES ESPERMÁTICAS

3.6.1 Motilidade espermática

Para a análise da motilidade espermática seguiu-se o método previamente descrito, com adaptações, onde após a eutanásia, foram coletados os ductos deferentes direitos dos animais para obtenção dos espermatozoides. A amostra de espermatozoides obtida foi diluída em 500 uL de meio G-IVF™ PLUS (Vitrolife) pré-aquecido a 34°C. Após isso, foram retirados 10 uL da amostra final para análise imediata de motilidade espermática em câmara de Neubauer dupla melhorada espelhada, sob microscopia de luz. Foram analisados 100 espermatozoides, que receberam a classificação A (móveis com movimento progressivo); B (móvel com movimento não progressivo) ou C (imóvel) .(LEITE et al., 2017a; PEROBELLI et al., 2012).

3.6.2 Vitalidade espermática

A coloração com eosina-nigrosina foi realizada para avaliar a viabilidade espermática. Com adaptações, conforme o método previamente descrito, um total de 250 µL de meio G-IVF™ PLUS contendo espermatozoides foi colocado em microtubos de centrifugação (tipo eppendorf) de 1,5 ml e 50 µL de solução de eosina a 1% foram então adicionados e homogeneizado a 34°C. Foi retirado 10 uL da amostra final para análise imediata em lâmina coberta com lamínula. Sendo assim, as porcentagens de espermatozoides vivos e mortos, não corados e corados pela eosina, respectivamente, foram avaliadas em microscópio de luz, com aumento de 400x (OMID BANAFSHI et al., 2021).

3.6.3 Morfologia espermática

Para avaliação da morfologia espermática, uma alíquota de 100 µL do meio de cultura G-IVF™ PLUS foi armazenada em microtubos de centrifugação (tipo eppendorf) de 1,5 ml com 1,0 mL de solução de formol-salina 10%. As amostras foram mantidas em geladeira a 4°C até o momento da análise. Para a avaliação foi adicionado uma gota da amostra de cada animal sobre uma lâmina histológica que, em seguida, foi coberta com lamínula histológica, para a avaliação de 200 espermatozoides por animal em microscópio de luz, no aumento de 400X (SEED et al., 1996).

As anormalidades morfológicas foram classificadas em duas categorias: anormalidades de cabeça (sem curvatura característica e cabeça isolada) e anormalidades de cauda (isolada, enrolada, dobrada ou quebrada) (FILLER, 1993). Os espermatozoides também foram classificados quanto à presença ou ausência e a posição (proximal, medial e distal) da gota citoplasmática (Figura 5).

3.6.4 Compactação da cromatina espermática

Para a análise da compactação da cromatina foi utilizada a técnica modificada de coloração com azul de toluidina (AT). Essa coloração baseia-se na ligação dos grupos fosfato livres do ácido desoxirribonucleico (DNA) espermático aos corantes básicos, nesse caso o AT, quando não estão ligados a protaminas. Para isso, é importante o nivelamento do pH para a função específica que se deseja, nesse caso, o pH utilizado foi o pH 3,5 onde ocorre a reação do corante com os grupamentos de sulfatos e fosfatos (MELLO, 1982). Portanto, quando a coloração apresentar tons de azul escuro ou violeta, é um indicativo de baixo grau de compactação da cromatina, pois quanto mais grupos fosfatos estiverem livres, mais corado se tornará o núcleo dos espermatozoides (Figura 5) (ALVES et al., 2015). O núcleo que apresenta alto grau de compactação da cromatina se cora em azul-claro e, quando há moderado grau de compactação da cromatina, o núcleo espermático se cora em tonalidades intermediárias de azul (ALVES et al., 2015). Dessa maneira, foram utilizados 100 µL do meio de cultura G-IVF™ PLUS contendo espermatozoides obtidos da cauda epididimária de cada animal e, em seguida, foram realizados esfregaços com a amostra de espermatozoides e as lâminas foram deixadas secar em estufa a 50°C. Após isso, as lâminas foram submersas por dois minutos em etanol 70% e deixadas por um minuto na água para hidratar. Por fim, as lâminas foram coradas com AT por

trinta segundos e, posteriormente, foram lavadas em água e deixadas secar em estufa. Após secas, as lâminas foram imersas em xilol para o clareamento e, em seguida, foram montadas com meio de montagem Entellan e lamínulas. As lâminas foram avaliadas em microscopia de luz, quando foram avaliados 100 espermatozoides, que foram classificados em três categorias: baixo grau de compactação, moderado grau de compactação e alto grau de compactação da cromatina espermática.

Figura 5. Fotomicrografias representativas dos graus de compactação da cromatina.



Fotomicrografias de espermatozoides do grupo 1,5mg/Kg de rosuvastatina. Asterisco: Alto grau de compactação; Triângulo: moderado grau de compactação; Seta traço: gota citoplasmática. Seta preenchida: baixo grau de compactação. Azul de toluidina (AT). Barra de escala = 20µm.

3.6.5 Cálculo da produção diária de espermatozoides por testículo

No DNP 80, o parênquima testicular direito dos camundongos foi descongelado no momento da homogeneização para a realização da contagem espermática. Segundo o método previamente descrito, as espermátides testiculares resistentes à homogeneização (estágio 16 da espermiogênese do camundongo) foram contadas (ROBB; AMANN; KILLIAN, 1978).

O parênquima testicular descongelado foi homogeneizado em uma mistura de Triton X100 (0,5ml) em cloreto de sódio (NaCl) 0,9%, em volume fixo de 5 mL. A amostra foi transferida para câmara de Neubauer dupla melhorada espelhada (4 campos por animal),

procedendo-se a contagem das espermatídes maduras em microscopia de luz. Para o cálculo da produção diária de espermatozoides (PDE) o número de espermatozoides por testículo foi dividido por 4,84, que é o número de dias em que essas espermatídes estão presentes no epitélio seminífero. Posteriormente, a PDE por grama de testículo foi calculada, a fim de se determinar a eficiência do processo reprodutivo (ASHBY et al., 2003).

3.6.6 Contagem do número e cálculo do tempo de trânsito dos espermatozoides no epidídimo

Após a coleta das porções cabeça/corpo e cauda dos epidídimos direitos dos camundongos (DPN 80), essas porções foram congeladas até a homogeneização e passaram pelo mesmo procedimento descrito anteriormente para o testículo. Após a homogeneização do epidídimo, foi realizado uma segunda diluição, procedeu-se a contagem dos espermatozoides em câmara de Neubauer dupla melhorada espelhada (4 campos por animal). A média aritmética dos campos contados resulta no número de espermatozoides expresso em milhões por mL e que multiplicado pelas diluições utilizadas, resulta no número de espermatozoides/órgão que, dividido pela PDE, indica o tempo de trânsito dos espermatozoides em dias (número de dias requeridos para que eles atravessem as diferentes porções epididimárias) (ASHBY et al., 2003).

3.7 ANÁLISES HISTOPATOLÓGICA E MORFOMÉTRICA

Após a coleta, no DPN 80, os testículos e os epidídimos esquerdos foram fixados na solução de Davidson modificada (30% de 37-40% solução de formaldeído, 15% de etanol 100%, 5% de ácido acético glacial, e 50% de H₂O destilada) por 24 horas (LATENDRESSE et al., 2002). Posteriormente, os órgãos foram processados para inclusão em parafina e seccionados em 4µm (seções transversais dos testículos e seções longitudinais do epidídimo) com espaçamento de 30 µm, totalizando 3 cortes por animal em um micrótomo rotativo Leica RM2255 no Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia (LAMEB). As secções foram desparafinizadas em xilol, reidratadas em série etanólica decrescente (100% - 70%) e lavadas em água corrente. Os cortes de testículo foram corados em hematoxilina e eosina (HE), coloração usual de rotina e para a realização do estadiamento do epitélio seminífero. Após essa etapa, as secções foram lavadas em água corrente, desidratados em série etanólica crescente (70 - 100%) e foram clareados em xilol. As lâminas foram confeccionadas utilizando o meio de

montagem Entellan® e lamínula histológica. Ao final dessa etapa, as lâminas foram usadas para a avaliação da morfologia testicular e epididimária sob microscopia óptica.

As avaliações histopatológicas e morfométricas foram realizadas em ensaio cego. Nos túbulos seminíferos, os cortes transversais foram escolhidos de forma aleatória em três cortes testiculares não seriados por animal, os mesmos foram classificados em duas categorias, sendo: normais (caracterizados pela presença de camadas de células germinativas concêntricas e normalmente organizadas no epitélio seminífero) ou anormais (com a presença de células germinativas e debris celulares no lúmen, poucas camadas de células germinativas, formação multinucleada, epitélio seminífero com células acidófilas, vacuolização ou degeneração no epitélio seminífero). As células peritubulares e mióides foram avaliadas qualitativamente, e no interstício foi avaliado o aspecto das células de Leydig e aparência dos vasos sanguíneos. A análise histopatológica do epidídimo, como na anterior, também foi realizada de forma qualitativa para avaliar cada região do órgão de acordo com a morfologia do epitélio, lúmen e tecido intersticial (LEITE et al., 2018b).

As seguintes análises morfométricas foram realizadas nos testículos: área do túbulo seminífero, área luminal e área do epitélio seminífero, altura do epitélio germinativo e a cinética do processo espermatogênico.

3.7.1 Área do túbulo seminífero, área do epitélio seminífero e área luminal, e altura do epitélio germinativo

Para avaliação das áreas e alturas nos túbulos seminíferos, foram obtidas imagens dos túbulos seminíferos em microscópio óptico Olympus BX 41 com câmera digital acoplada de 3.3 megapixel no LAMEB, e as mensurações foram realizadas em computador pessoal, utilizando-se de software ImageJ. Para tanto, 15 secções de túbulos seminíferos por animal, na maturidade sexual, no estágio IX da espermatogênese foram analisados com uma ampliação de 200X.

3.7.2 Cinética do processo espermatogênico

Para essa análise, os túbulos seminíferos foram classificados em 4 categorias: estágios I-VI (presença de duas gerações de espermátides: espermátides redondas e alongadas), estágios VII-VIII (presença de espermátides 16 na luz tubular), estágios IX-XI (presença de uma única

geração de espermatídes, ou seja, espermatídes alongadas) e estágio XII (presença de espermatócitos secundários em metáfase e/ou anáfase) (HESS; DE FRANCA, 2008).

3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

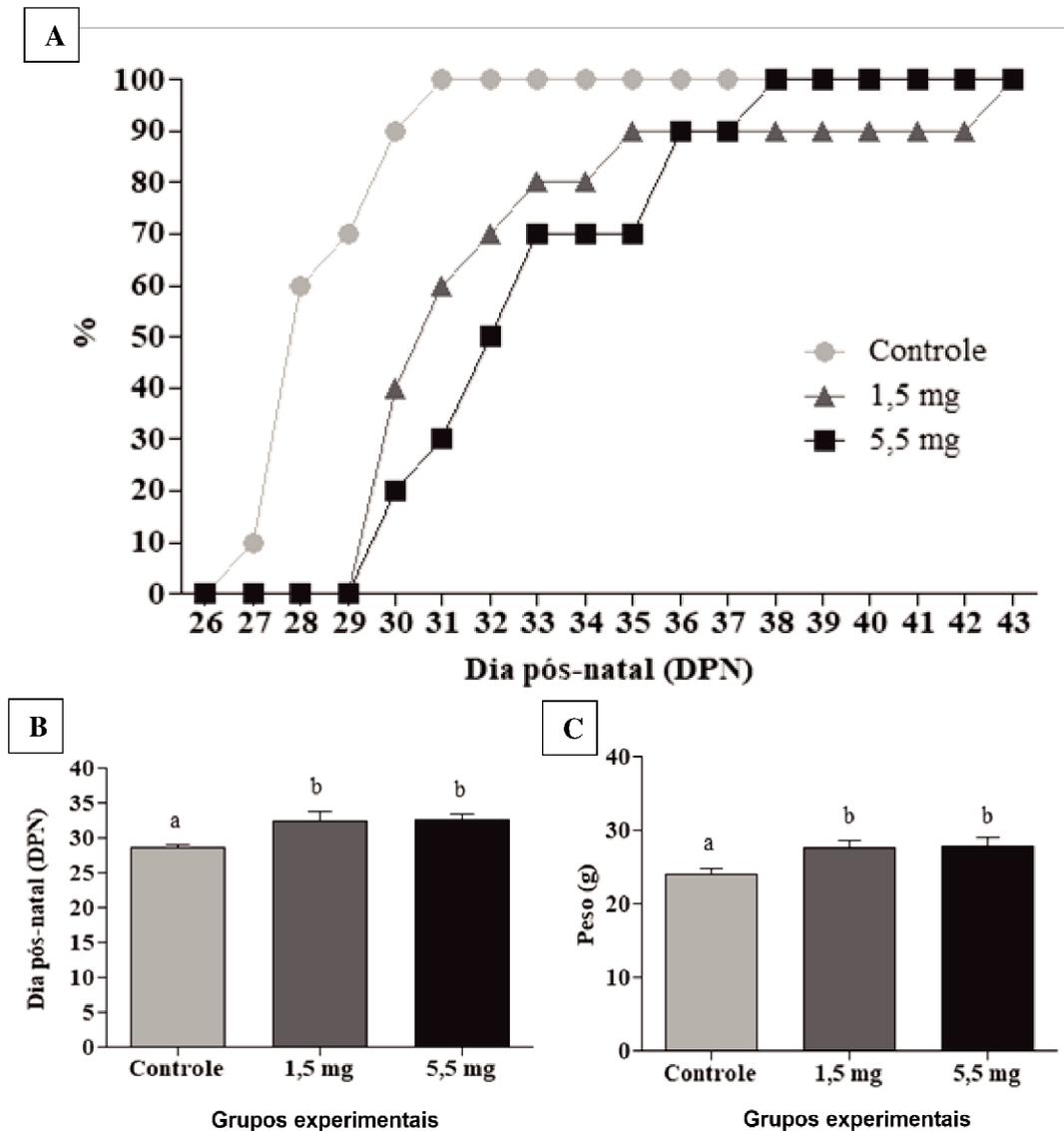
Para a comparação dos resultados entre os grupos experimentais, foram utilizados os testes One-way ANOVA ou Kruskal-Wallis, dependendo da natureza da distribuição dos dados, seguidos pelos testes de Tukey ou Dunn, respectivamente. Para a verificação da normalidade dos dados foi utilizado o teste de Shapiro-Wilk. Os testes estatísticos foram realizados no programa estatístico GraphPad Prism® versão 7. As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 INSTALAÇÃO DA PUBERDADE

O tratamento com rosuvastatina promoveu atraso na idade da separação prepucial dos animais dos grupos tratados, quando comparado com o grupo controle ($p < 0,05$), assim, inferindo um atraso no início da instalação da puberdade nos grupos tratados, em ambas as doses (Figura 6).

Figura 6. Idade da instalação da puberdade nos três grupos de estudo.



(A) Evolução do processo da instalação da puberdade de cada grupo ao longo do tempo (%). (B) Idade da separação prepucial dos animais dos diferentes grupos experimentais. (C) Peso dos animais dos grupos experimentais no dia da separação prepucial. Valores expressos como média \pm erro padrão da média (EPM). One-

way ANOVA seguido de teste de Tukey. Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos. $p < 0,05$.

4.2 MASSA CORPORAL FINAL E MASSA DOS ÓRGÃOS REPRODUTORES E VITAIS

A massa da glândula seminal vazia mostrou-se reduzido no grupo exposto a menor dose da estatina, mas os demais órgãos reprodutores e a massa corpórea final apresentaram-se semelhantes entre os grupos experimentais ($p > 0,05$) (Tabela 1).

Tabela 1. Massa corporal final e massa dos órgãos reprodutores dos grupos experimentais no PND 80.

	Grupos Experimentais (n=10)		
	Controle	1,5 mg	5,5 mg
Massa corporal final (g)	44,30 ± 0,76	44,60 ± 0,85	44,30 ± 0,58
Testículo (mg)	105,20 ± 4,21	105,40 ± 4,18	118,10 ± 6,53
Testículo (mg/g MC)	2,38 ± 0,10	2,36 ± 0,08	2,68 ± 0,16
Epidídimo (mg)	42,60 ± 2,10	42,00 ± 1,46	46,70 ± 1,84
Epidídimo (mg/g MC)	0,96 ± 0,05	0,94 ± 0,03	1,05 ± 0,04
Ducto deferente (mg)	18,40 ± 0,60	17,50 ± 0,62	16,80 ± 1,09
Ducto deferente (mg/g MC)	0,42 ± 0,02	0,39 ± 0,01	0,38 ± 0,02
Próstata (mg)	11,20 ± 0,68	11,70 ± 1,13	12,40 ± 1,02
Próstata (mg/g MC)	0,25 ± 0,01	0,26 ± 0,02	0,28 ± 0,02
Glândula seminal cheia (mg)	272,60 ± 11,04	256,50 ± 8,21	258,70 ± 11,94
Glândula seminal cheia (mg/g MC)	6,17 ± 0,28	5,76 ± 0,18	5,84 ± 0,28
Glândula seminal vazia (mg)	106,30 ± 5,74 ^a	86,60 ± 3,97 ^b	97,30 ± 6,05 ^{ab}
Glândula seminal vazia (mg/g MC)	2,41 ± 0,14 ^a	1,94 ± 0,09 ^b	2,20 ± 1,14 ^{ab}
Glândula prepucial (mg)	124,30 ± 8,47	132,20 ± 11,97	153,50 ± 9,92
Glândula prepucial (mg/g MC)	2,81 ± 0,20	2,97 ± 0,26	3,47 ± 0,24

Valores expressos como média ± EPM. ANOVA seguido de teste de Tukey. Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos experimentais. $p < 0,05$. MC = massa corporal.

A massa dos órgãos vitais dos animais dos grupos experimentais mostrou-se semelhantes entre si ($p > 0,05$) (Tabela 2).

Tabela 2. Massa dos órgãos vitais dos grupos experimentais no DPN 80.

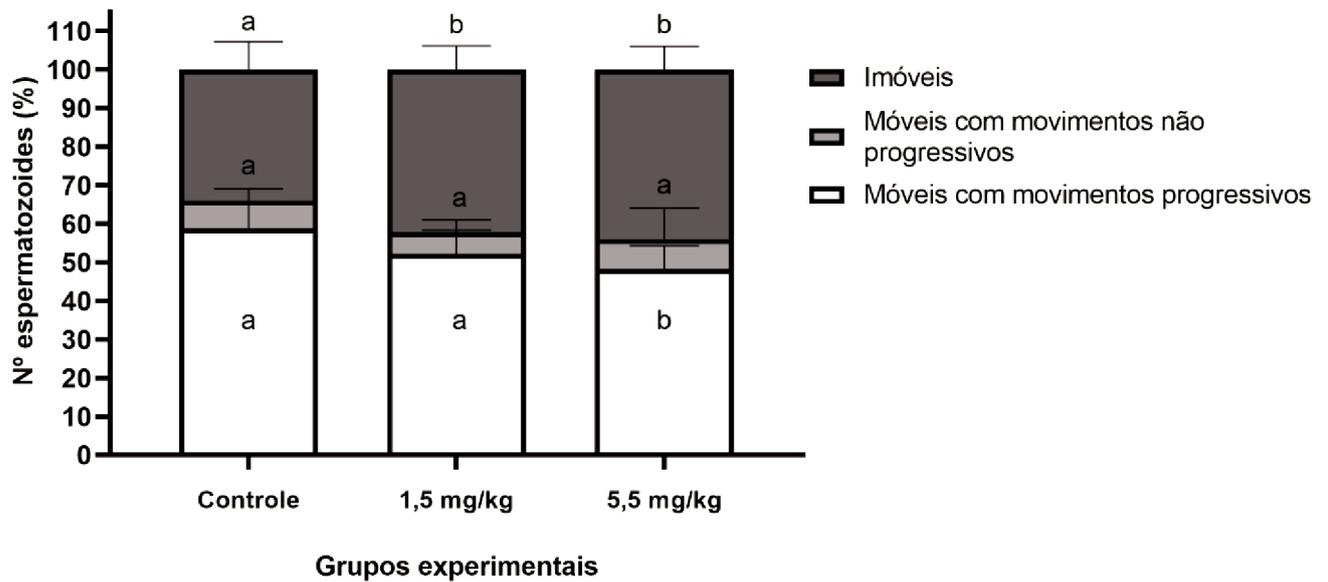
	Grupos Experimentais (n=10)		
	Controle	1,5 mg	5,5 mg
Hipófise	2,90 ± 0,10	3,30 ± 0,21	2,90 ± 0,23
Hipófise (mg/g MC)	0,07 ± 0,01	0,08 ± 0,01	0,07 ± 0,01
Tireoide (mg)	3,90 ± 0,31	3,70 ± 0,26	4,30 ± 0,40
Tireoide (mg/g MC)	0,09 ± 0,01	0,08 ± 0,01	0,10 ± 0,01
Fígado (g)	2,06 ± 0,05	1,97 ± 0,07	2,00 ± 0,05
Fígado (mg/g MC)	46,56 ± 1,00	44,10 ± 1,10	45,10 ± 0,73
Adrenal (mg)	3,50 ± 0,31	3,10 ± 0,23	3,20 ± 0,25
Adrenal (mg/g MC)	0,08 ± 0,01	0,07 ± 0,01	0,07 ± 0,01
Rim (mg)	302,30 ± 16,46	309,30 ± 11,11	307,60 ± 9,40
Rim (mg/g MC)	6,80 ± 0,26	6,94 ± 0,23	6,93 ± 0,14
Encéfalo (mg)	475,30 ± 3,76	492,00 ± 8,48	480,80 ± 6,04
Encéfalo (mg/g MC)	10,75 ± 0,16	11,06 ± 0,25	10,86 ± 0,11
Coração (mg)	161,70 ± 4,66	165,90 ± 2,54	158,40 ± 5,66
Coração (mg/g MC)	3,66 ± 0,11	3,73 ± 0,07	3,57 ± 0,11

Valores expressos como média ± EPM. ANOVA seguido de teste de Tukey. $p > 0,05$. MC = massa corporal.

4.3 QUALIDADE ESPERMÁTICA

Com relação aos resultados da motilidade espermática, houve um aumento na porcentagem de espermatozoides imóveis nos dois grupos experimentais quando comparados ao grupo controle ($p < 0,05$) (Figura 7). A taxa de espermatozoides móveis não-progressivos mostrou-se similar entre os grupos experimentais ($p > 0,05$) (Figura 7). Ademais, observa-se uma queda na frequência de espermatozoides móveis progressivos no grupo exposto a maior dose da estatina, quando comparados aos grupos controle e grupo tratado com a menor dose da estatina ($p < 0,05$) (Figura 7).

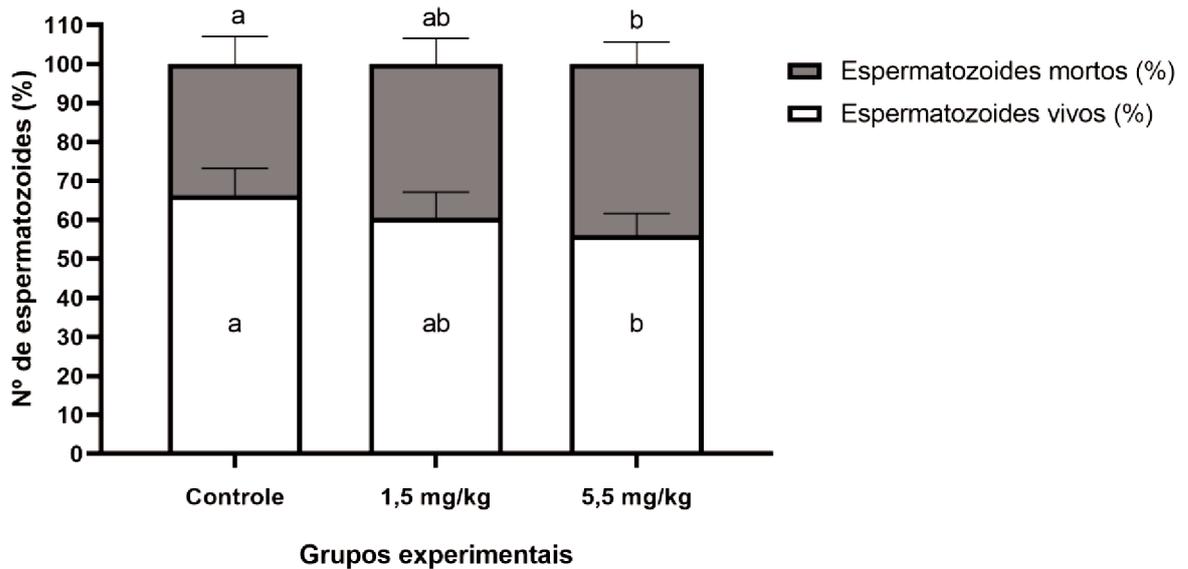
Figura 7. Motilidade espermática nos diferentes grupos experimentais no DPN 80.



Valores expressos como desvio interquartilício \pm EPM. Kruskal-Wallis seguido de teste de Dunn. Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos. $p < 0,05$.

Houve uma redução na taxa de espermatozoides vivos e um aumento na frequência de espermatozoides mortos nos grupos tratados com a estatina ($p < 0,05$) (Figura 8).

Figura 8. Vitalidade espermática dos grupos experimentais no DPN 80.



Valores expressos como desvio interquartilício \pm EPM. Kruskal-Wallis seguido de teste de Dunn. Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos. $p < 0,05$.

Referente à morfologia espermática, a frequência de espermatozoides normais e com anomalias (cabeça e cauda) mostraram-se semelhantes entre os grupos tratados e o grupo controle ($p>0,05$) (Tabela 3). A porcentagem de presença de gota citoplasmática não demonstrou diferença significativa entre os três grupos experimentais ($p>0,05$) (Tabela 3).

Tabela 3. Morfologia espermática dos animais dos grupos experimentais no DPN 80.

	Grupos Experimentais		
	Controle	1,5 mg	5,5 mg
Espermatozoides normais (%)	84,00 (82,00 - 86,50)	86,00 (83,50 - 88,125)	85,50 (82,75 - 89,00)
Anormalidades de cabeça (%)	5,00 (3,37 - 6,62)	4,00 (3,37 - 4,25)	3,50 (2,25 - 6,00)
Anormalidades de cauda (%)	11,50 (8,75 - 12,50)	10,00 (7,37 - 12,62)	10,00 (8,25 - 12,75)
Presença da gota citoplasmática (%)	26,50 (20,00 - 37,12)	23,25 (17,62 - 27,50)	26,50 (12,50 - 29,50)

Valores expressos como desvio interquartilico \pm EPM. ANOVA seguido de teste de Tukey. $p>0,05$.

A análise de posicionamento da gota citoplasmática no flagelo espermático demonstrou um aumento de gotas com posição proximal, em ambos os grupos expostos, com uma diminuição na frequência das gotas citoplasmáticas de posição medial e distal ($p<0,05$) (Tabela 4).

Tabela 4. Posição da gota citoplasmática no flagelo dos espermatozoides dos animais dos grupos experimentais no DPN 80.

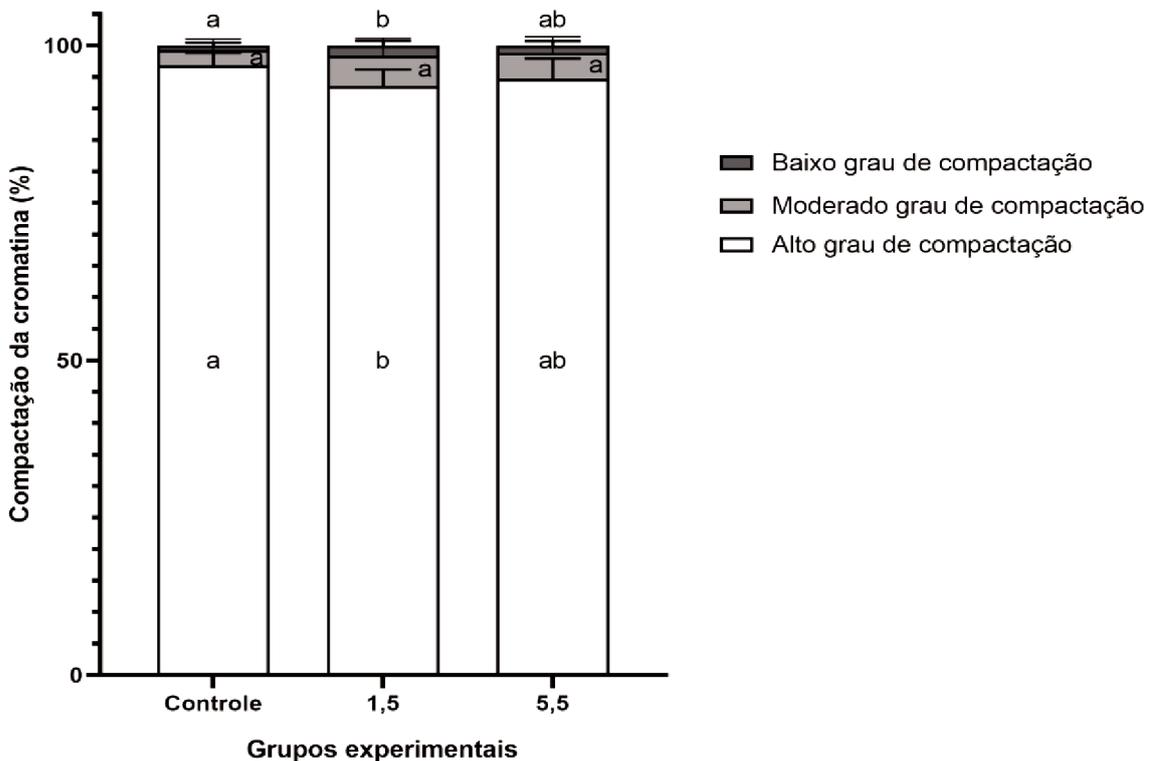
	Grupos Experimentais		
	Controle	1,5 mg	5,5 mg
Gota citoplasmática proximal (%)	11,50 (6,50 - 16,62) ^a	22,75 (15,37 - 25,75) ^b	25,00 (11,75 - 27,25) ^b
Gota citoplasmática medial (%)	12,50 (2,87 - 30,75) ^a	1,00 (0,87 - 2,00) ^b	1,00 (0,75 - 2,50) ^b

Gota citoplasmática distal (%)	0,50 (0,00 - 1,50) ^a	0,00 (0,00 - 0,00) ^b	0,00 (0,00 - 0,50) ^b
--------------------------------	---------------------------------	---------------------------------	---------------------------------

Valores expressos como desvio interquartilico \pm EPM. ANOVA seguido de teste de Tukey. Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos. $p < 0,05$.

A compactação da cromatina espermática foi diminuída na dose de 1,5 mg/Kg de rosuvastatina, quando comparado aos demais grupos experimentais ($p < 0,05$) (Figura 9). De forma complementar, houve diminuição na frequência de espermatozoides com alto grau de compactação da cromatina no grupo exposto a menor dose, em comparação aos demais grupos experimentais ($p < 0,05$) (Figura 9).

Figura 9. Grau de compactação da cromatina espermática dos animais dos grupos experimentais.



Valores expressos como desvio interquartilico \pm EPM. Kruskal-Wallis seguido de teste de Dunn. Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos experimentais. $p < 0,05$.

As contagens espermáticas foram realizadas tanto nos testículos, quanto nos epidídimos. Nos testículos, os grupos expostos a rosuvastatina nas doses de 1,5 mg/Kg e 5,5 mg/Kg, demonstraram uma redução no número de espermátides maduras por grama de órgão e também na PDE relativa ($p < 0,05$) (Tabela 5). Os demais parâmetros da análise, sendo, número de espermátides maduras por órgão e a PDE, não apresentaram diferenças significativas quando

comparados aos controles (Tabela 5). No epidídimo evidenciou-se um acréscimo no tempo de trânsito espermático na região de cabeça/corpo do epidídimo dos animais dos grupos expostos à estatina ($p < 0,05$) (Tabela 5). Os fatores restantes da análise mostraram valores similares entre si (Tabela 5).

Tabela 5. Contagem espermática no testículo e no epidídimo dos animais dos grupos experimentais no DPN 80.

	Grupos Experimentais		
	Controle	1,5 mg	5,5 mg
<u>Contagem espermática no testículo</u>			
Número de espermátides maduras (10^6 /testículo)	23,32 ± 1,23	21,01 ± 1,53	20,16 ± 0,42
Número de espermátides maduras (10^6 /g testículo)	281,00 ± 3,10 ^a	229,13 ± 17,51 ^b	236,00 ± 11,00 ^b
PDE (10^6 /testículo/dia)	4,90 ± 0,25	4,34 ± 0,32	4,20 ± 0,09
PDE relativa (10^6 /g testículo/dia)	58,00 ± 0,64 ^a	47,34 ± 3,62 ^b	49,00 ± 2,22 ^b
<u>Contagem espermática no epidídimo</u>			
Número de espermatozoides na cabeça/corpo ($\times 10^6$ /órgão)	13,41 ± 1,53	15,00 ± 1,42	14,43 ± 0,70
Número relativo de espermatozoides na cabeça/corpo ($\times 10^6$ /g/órgão)	532,00 ± 46,00	550,00 ± 46,00	574,00 ± 24,03
Número espermatozoides na cauda ($\times 10^6$ /órgão)	19,34 ± 2,70	21,00 ± 2,80	20,00 ± 2,00
Número relativo de espermatozoides na cauda ($\times 10^6$ /órgão)	1190,00 ± 128,41	1294,00 ± 123,08	1342,00 ± 68,47
Tempo de trânsito espermático na cabeça/corpo (dias)	2,75 ± 0,21 ^a	3,52 ± 0,30 ^b	3,33 ± 0,09 ^b

Tempo de trânsito espermático na cauda (dias)	4,10 ± 0,63	5,00 ± 0,78	4,58 ± 0,38
---	-------------	-------------	-------------

Valores expressos como média ± EPM. One-way ANOVA complementado com teste de Tukey. Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos experimentais. $p < 0,05$.

4.4 AVALIAÇÕES HISTOPATOLÓGICAS E MORFOMÉTRICAS

As análises histopatológicas nos testículos exibiram resultados semelhantes entre o grupo controle, 1,5 mg/Kg e 5,5 mg/Kg de rosuvastatina ($p > 0,05$) (Tabela 6).

Tabela 6. Análise histopatológica testicular nos diferentes grupos experimentais no DPN 80.

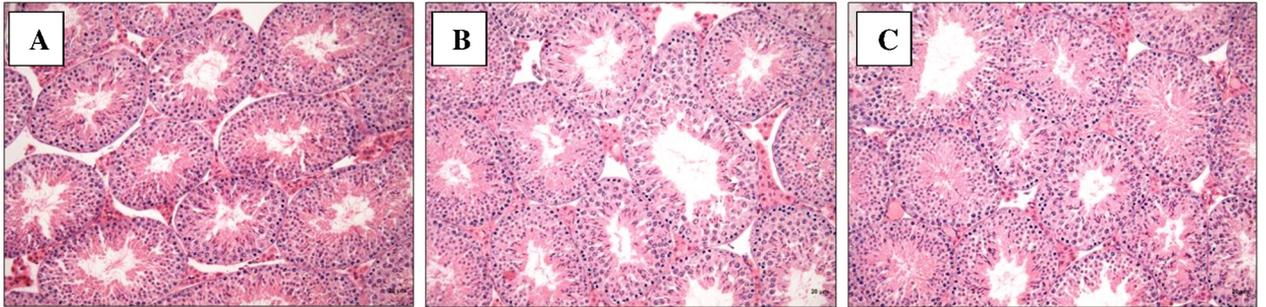
	Grupos Experimentais		
	Controle	1,5 mg	5,5 mg
Túbulos seminíferos normais (%)	86,50 (81,50 – 90,00)	80,50 (73,50 – 85,25)	82,00 (77,75 – 85,25)
Esfoliação de células germinativas no lúmen (%)	1,00 (0,75 – 2,25)	2,00 (0,00 – 3,75)	1,00 (0,00 – 2,50)
Células multinucleadas (%)	0,00 (0,00 – 0,00)	0,00 (0,00 – 0,00)	1,00 (0,00 – 1,00)
Presença de células acidófilas (%)	8,00 (7,00 – 11,50)	12,00 (6,50 – 17,25)	11,00 (8,50 – 13,25)
Degeneração no epitélio e/ou redução de camadas de células germinativas (%)	2,00 (0,75 – 2,25)	3,50 (1,00 – 4,00)	3,00 (3,00 – 3,00)
Vacuolização (%)	3,00 (1,00 – 3,25)	3,00 (1,00 – 4,00)	1,50 (1,00 – 4,75)
Atrofia (%)	0,00 (0,00 – 0,00)	0,00 (0,00 – 0,25)	0,00 (0,00 – 0,00)
Espermátides retidas (%)	0,00 (0,00 – 0,00)	0,00 (0,00 – 0,00)	0,00 (0,00 – 0,00)

Valores expressos como desvio interquartilístico ± EPM. Kruskal-Wallis seguido de teste de Dunn. $p > 0,05$.

Na avaliação qualitativa, as células peritubulares apresentaram um padrão similar entre os grupos experimentais, com suas características de apresentarem pouco citoplasma e núcleo central achatado, e sendo localizadas como componentes principais das paredes dos túbulos seminíferos (DYM, 1994). Ademais, as células de Leydig apresentaram morfológicamente semelhantes entre os grupos experimentais, com núcleo esférico ou ovoide, e localizadas entre

os túbulos seminíferos e próximas aos vasos sanguíneos (RUSSELL et al., 1993). As fotomicrografias testiculares representativas dos diferentes grupos experimentais estão representadas na Figura 10, demonstrando aspecto estrutural similar entre os grupos.

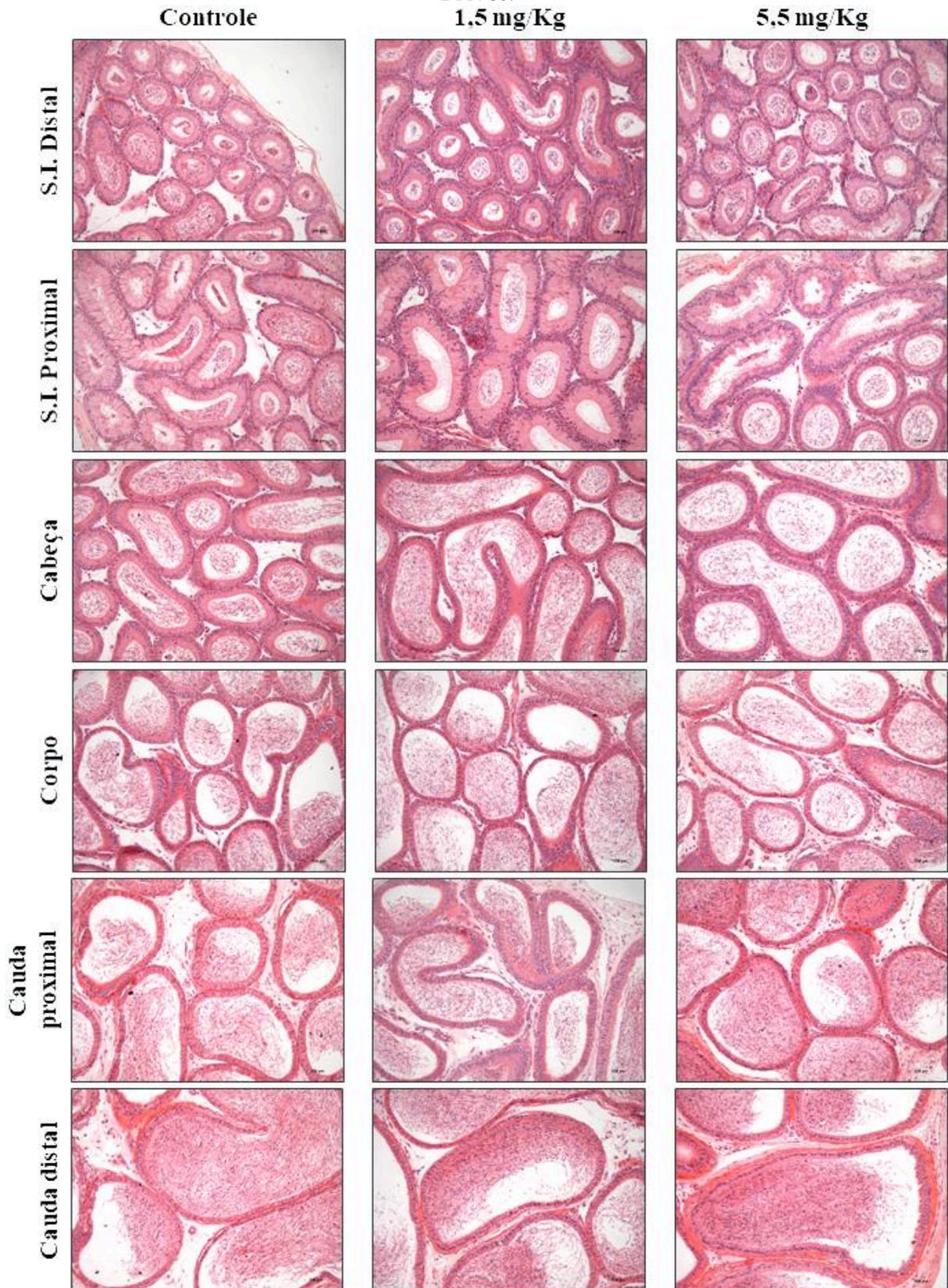
Figura 10. Fotomicrografia dos testículos de camundongos dos grupos experimentais no DPN 80.



Fotomicrografia de secções testiculares do grupo controle (A), 1,5 mg/Kg (B) e 5,5mg/Kg de rosuvastatina (C). Hematoxilina e Eosina (HE). Barra de escala = 20 μ m.

No epidídimo, não houve diferenças histológicas entre os grupos em relação a morfologia do epitélio, lúmen e tecido intersticial. As fotomicrografias das diferentes porções epididimárias dos animais dos grupos experimentais estão representadas na Figura 11.

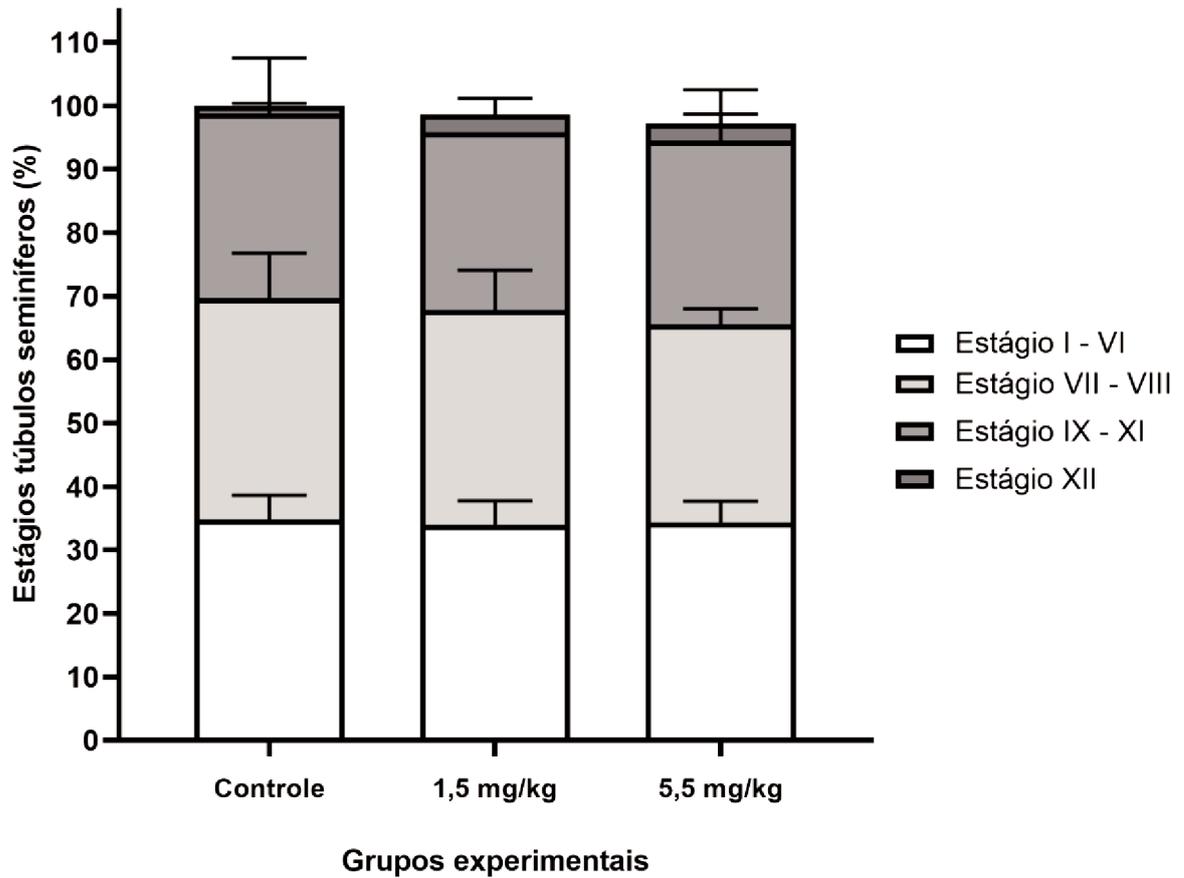
Figura 11. Fotomicrografias das diferentes regiões do epidídimo de camundongos dos grupos experimentais no DPN 80.



Fotomicrografias de secções do epidídimo dos grupos controle, 1,5 mg/Kg e 5,5mg/Kg de rosuvastatina. Hematoxilina e Eosina (HE). S.I: Segmento Inicial. Barra de escala = 100µm.

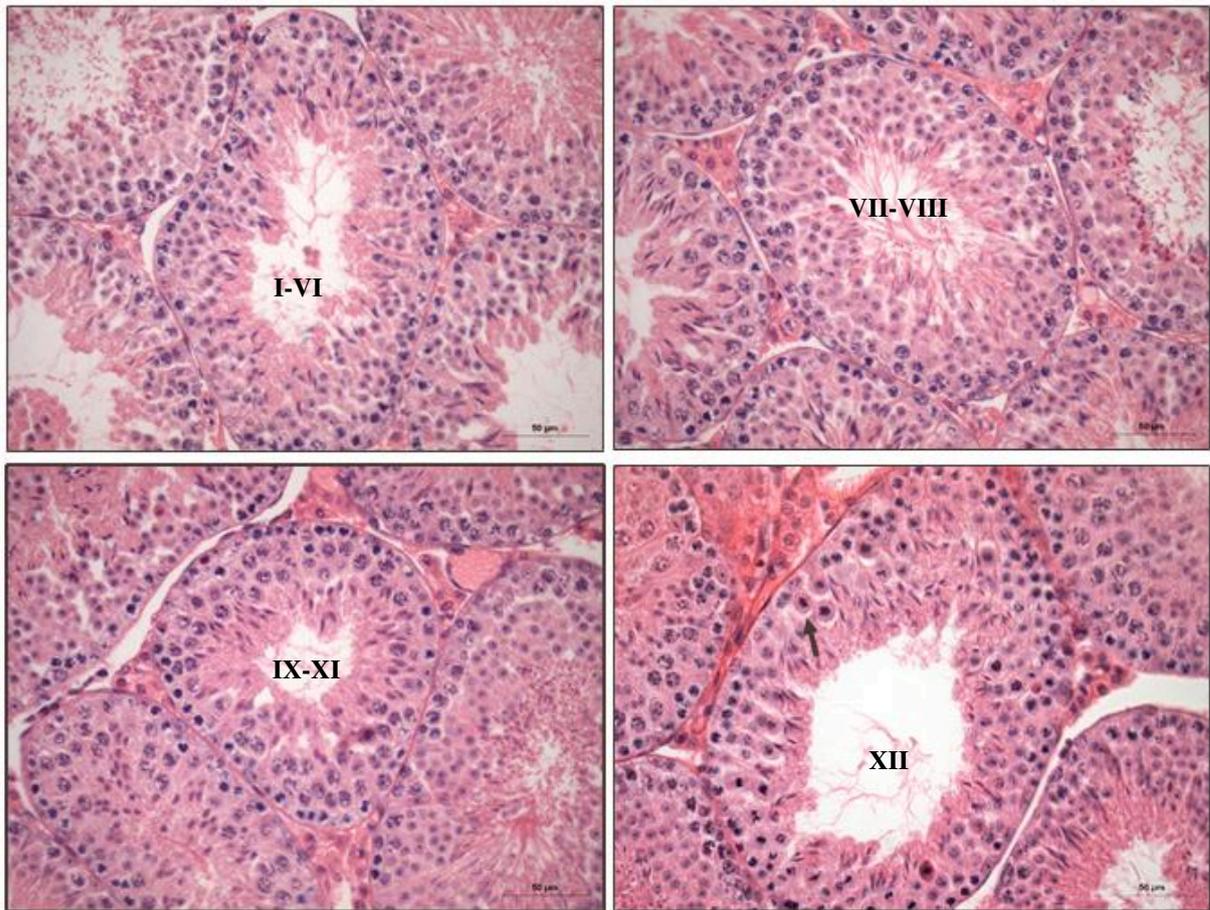
Referente a avaliação da cinética do processo espermatogênico, a frequência das categorias de estágios I-VI, VII-VIII, IX-XI e XII (Figura 13) não demonstraram diferença significativa entre os grupos experimentais ($p > 0,05$) (Figura 12).

Figura 12. Cinética do processo espermatogênico nos animais dos grupos experimentais no DPN 80.



Valores expressos como desvio interquartil \pm EPM. One-way ANOVA complementado com teste de Tukey. Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos experimentais. $p > 0,05$.

Figura 13 . Fotomicrografias representativas das categorias de estágios dos túbulos seminíferos.



Fotomicrografias de secções testiculares do grupo controle. Estágios I-VI; VII-VIII; IX-XI; XII. Hematoxilina e Eosina (HE). Barra de escala = 100μm.

As análises morfométricas da altura do epitélio seminífero (μm) e área do túbulo seminífero, do lúmen do túbulo seminífero e do epitélio seminífero (μm^2), demonstraram resultados semelhantes entre o grupo controle e os grupos expostos as doses de 1,5 mg/Kg e 5,5 mg/Kg de rosuvastatina ($p > 0,05$) (Tabela 7).

Tabela 7. Morfometria testicular dos grupos experimentais no PND 80.

	Grupos Experimentais (n=10)		
	Controle	1,5 mg	5,5 mg
Altura do epitélio seminífero (μm)	59,46 \pm 3,22	62,69 \pm 3,55	61,56 \pm 1,59
Área do túbulo seminífero (μm^2)	31700,00 \pm 3248,22	32232,00 \pm 1653,90	33159,00 \pm 4236,20
Área luminal do túbulo seminífero (μm^2)	4009,80 \pm 531,03	5404,9 \pm 655,78	4924,5 \pm 1511,2
Área do epitélio seminífero (μm^2)	27690,00 \pm 2846,60	26827,00 \pm 1623,93	28235,00 \pm 2783,10

Valores expressos como média \pm EPM. ANOVA seguido de teste de Tukey. $p > 0,05$.

4.5 PERFORMANCE REPRODUTIVA

As taxas de prenhez e de perdas pré-implantação, potencial de fertilidade, massa corporal materna e massa do útero gravídico foram semelhantes entre as fêmeas acasaladas com machos dos diferentes grupos experimentais ($p>0,05$), entretanto a taxa de perdas pós-implantação aumentou nas fêmeas cujos machos foram expostos à rosuvastatina ($p<0,05$) (Tabela 8).

Tabela 8. Performance reprodutiva dos machos dos diferentes grupos experimentais no DPN 70 após acasalamento natural com fêmeas não-tratadas.

	Grupos Experimentais (n=10)		
	Controle	1,5 mg	5,5 mg
Taxa de prenhez (%)	90%	80%	90%
¹ Massa corporal (DG 0) (g)	40,78 ± 0,91	39,78 ± 0,72	41,70 ± 1,19
¹ Massa corporal (DG18) (g)	68,67 ± 2,36	65,44 ± 2,74	70,20 ± 3,46
¹ Ganho de massa na gestação	27,89 ± 1,65	25,67 ± 2,44	28,50 ± 2,84
¹ Útero gravídico (g)	21,62 ± 1,72	19,02 ± 2,09	21,27 ± 3,00
² Potencial de fertilidade (%)	88,24 (59,71 - 100,00)	86,61 (69,65 - 93,42)	89,47 (69,70 - 97,37)
² Taxa de perdas pós-implantação (%)	6,06 (0,00 - 10,61) ^a	18,18 (6,70 - 33,33) ^b	17,16 (5,80 - 51,56) ^b
² Taxa de perdas pré-implantação (%)	11,76 (0,00 - 40,30)	13,4 (6,57 - 30,36)	10,53 (2,63 - 30,30)
² Razão sexual (M:F)	1,28 (0,94 - 2,34)	1,07 (0,70 - 1,39)	1,48 (0,85 - 1,85)
¹ Massa dos fetos machos (g)	1,36 ± 0,03	1,34 ± 0,05	1,40 ± 0,05
¹ Massa dos fetos fêmeas (g)	1,32 ± 0,04	1,26 ± 0,07	1,19 ± 0,14
¹ Massa da placenta dos fetos machos (g)	0,12 ± 0,01	0,12 ± 0,01	0,13 ± 0,01
¹ Massa da placenta dos fetos fêmeas (g)	0,11 ± 0,01	0,11 ± 0,01	0,10 ± 0,01

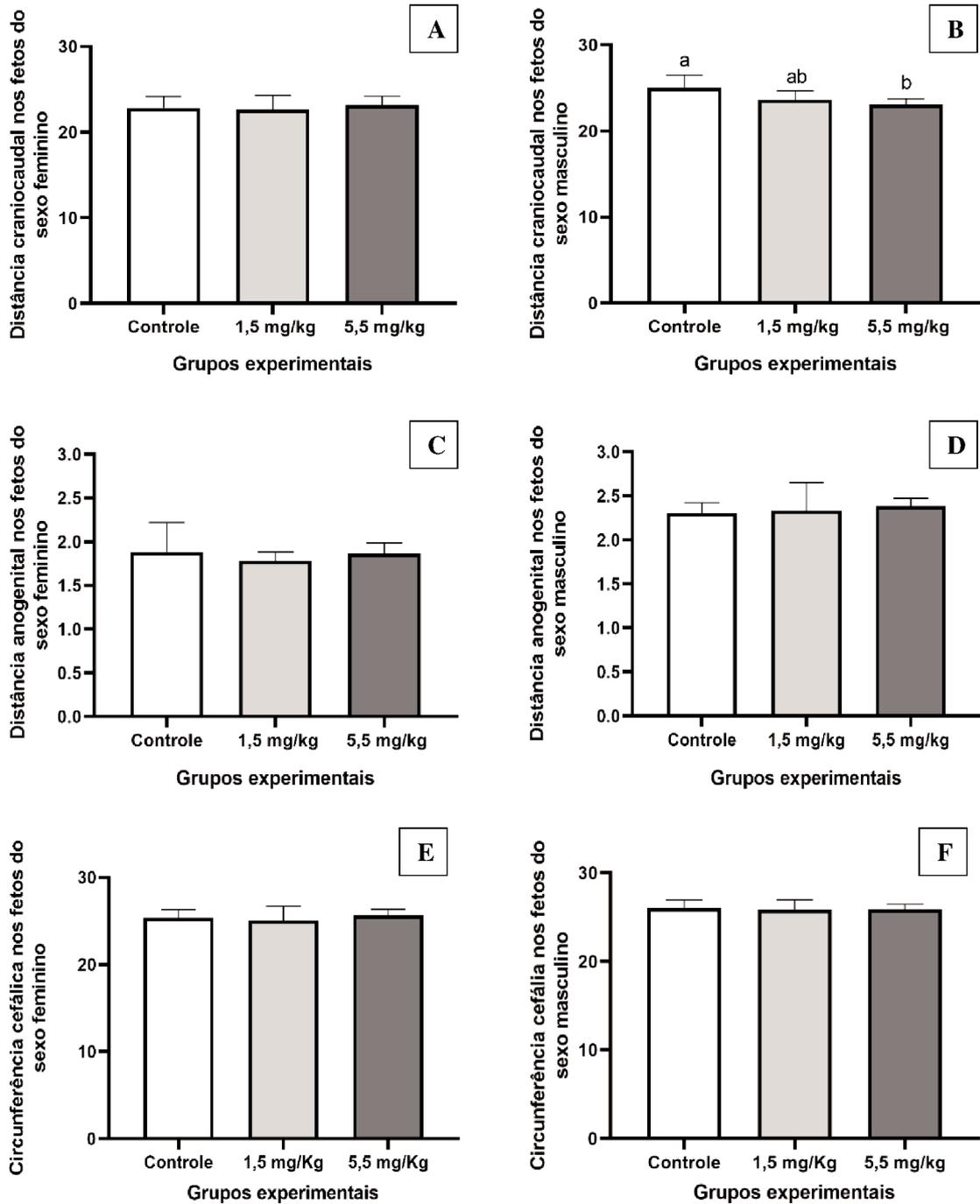
Valores expressos como média ± EP¹ ou mediana e desvios interquartílicos². One-way ANOVA seguido de teste de Tukey ou Kruskal-Wallis seguido de teste de Dunn. Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos experimentais. p ≤ 0,05. DG = dia gestacional.

4.6 ANÁLISES DOS PARÂMETROS BIOMÉTRICOS E MORFOLÓGICOS FETAIS

A distância anogenital e a circunferência cefálica apresentaram medidas similares entre a prole masculina e feminina dos grupos experimentais (p>0,05) (Figura 14). A distância

craniocaudal dos fetos femininos não apresentou diferenças significativas ($p > 0,05$), entretanto, para os fetos masculinos, a prole oriunda de pais expostos à rosuvastatina demonstrou uma redução neste parâmetro, de forma dose-dependente ($p < 0,05$) (Figura 14).

Figura 14. Parâmetros biométricos fetais da prole masculina e feminina dos animais dos grupos experimentais.



Os parâmetros biométricos da prole feminina estão representados à esquerda e os parâmetros da prole masculina estão à direita. Valores expressos como desvio interquartil \pm EPM. One-way ANOVA seguida de teste de Tukey. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos. $p < 0,05$.

A frequência de anomalias congênitas e de marcos do desenvolvimento adiantados, quando avaliados em conjunto, mostraram uma taxa aumentada na prole de pais expostos a menor dosagem de rosuvastatina ($p < 0,05$) (Tabela 9). Quando analisados separadamente, a presença de pálpebras abertas foi considerada um marco do desenvolvimento adiantado em relação ao esperado para a idade gestacional, tendo maior frequência em indivíduos cujos pais foram expostos a menor dose da estatina (Tabela 9). Contudo, as taxas das seguintes anomalias congênitas não apresentaram diferença significativa entre os grupos experimentais ($p > 0,05$) (Tabela 9).

Tabela 9. Frequência de anomalias congênitas e marcos do desenvolvimento adiantados na prole dos animais dos grupos experimentais.

	Grupos Experimentais (n=10)		
	Controle	1,5 mg	5,5 mg
Anomalias e marcos do desenvolvimento adiantados	5,05 ^a	14,14 ^b	6,25 ^{ab}
Pálpebras abertas	2,08 ^a	4,49 ^b	1,87 ^a
Encurtamento de membros	1,05	0	0
Fetos de tamanho reduzido	0	2,3	0
Polidactilia	0	2,3	1,87
Cauda enrolada	0	1,16	0
Cifose	1,05	1,16	0
Gastrosquise	0	1,16	0
Múltiplas anomalias congênitas	0	2,3	0

Valores expressos em porcentagem (%). Qui-quadrado de Pearson. Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos experimentais. $p < 0,05$.

5 DISCUSSÃO

As estatinas vem sendo amplamente prescritas e utilizadas por crianças, adolescentes e adultos, seja para fins de regulação do perfil lipídico, como em casos de dislipidemias, quanto para a prevenção de doenças cardiovasculares (GONZÁLEZ JIMÉNEZ; ÁLVAREZ FERRE, 2011; WEFFORT et al., 2019). Entretanto, estudos salientam que a exposição a estatinas pode comprometer os parâmetros reprodutivos e a fertilidade masculina (KLINFELTER; LASKEY; AMANN, 2014; LEITE et al., 2014, 2018a). Neste cenário, o presente estudo visou investigar e compreender sobre os parâmetros reprodutivos e a fertilidade de camundongos machos expostos ao agente hipolipemiante rosuvastatina desde a pré-puberdade até a maturidade sexual, com a finalidade de se sugerir os possíveis efeitos para a saúde reprodutiva no ser humano.

Em camundongos, uma das características físicas indicativas da idade de instalação da puberdade é separação prepucial, que demanda um aumento na concentração de testosterona para que ocorra a queratinização do epitélio bálano-prepucial, assim, gerando a separação do prepúcio da glândula peniana (HOFFMANN, 2018; PARKER, 2012; WISNER; STALVEY; WARREN, 1983). No presente trabalho, observou-se um atraso na idade da separação prepucial nos dois grupos expostos a rosuvastatina, assim, inferindo o atraso no início da puberdade desses indivíduos. Este atraso na instalação da puberdade pode ocorrer como consequência da ação antiandrogênica de medicamentos, sendo que estudos prévios realizados com roedores expostos à rosuvastatina mostraram uma instalação da puberdade tardia nesses animais (LEITE et al., 2017b; MONOSSON et al., 2015).

Com o atraso na instalação da puberdade, conseqüentemente, obteve-se um aumento na massa corporal, no dia da separação prepucial, nos indivíduos com instalação da puberdade tardia. O acompanhamento da massa corporal e sua mensuração final nos indivíduos são parâmetros de grande importância dentro da toxicologia, pois possibilitam compreender o estado geral de saúde dos animais, tendo em vista que uma redução ou um aumento no ganho de massa pode refletir em uma variedade de respostas, como, por exemplo, a toxicidade sistêmica (EPA, 1996). Porém, apenas com a massa corporal, muitas variáveis podem ser mascaradas, por esse motivo, é de grande importância o conhecimento da massa dos órgãos vitais e reprodutivos, tanto a massa absoluta, quanto a massa relativa para se ter informações sobre a condição sistêmica e reprodutiva dos animais expostos (EPA, 1996). Com base nas análises realizadas pode-se inferir que não houve efeitos sistêmicos. Da mesma maneira, a

ausência de efeitos persistiu na maioria dos parâmetros de massa dos órgãos reprodutores, com exceção da massa da glândula seminal vazia que evidenciou uma redução, sugerindo um possível impacto na estrutura tecidual, sem interferência em sua produção de secreção. Assim, a rosuvastatina demonstrou ser um fármaco o qual não acarreta em uma toxicidade sistêmica nos camundongos.

Com relação a histopatologia testicular dos camundongos no DPN 80, em ambos os grupos experimentais, os resultados foram similares, indicando ausência de alterações estruturais na organização testicular. Devido à redução dos níveis de isoprenoides intermediários ou depleção androgênica induzidos pela estatina, estudos tem relatado aumento na taxa de morte de células germinativas no testículo (ARAKI; MAEDA; MOTOJIMA, 2012; LEITE et al., 2014, 2017a, 2018b), embora o mesmo não tenha sido observado nesse estudo. Ademais, as células somáticas presentes no epitélio seminífero, as células de Sertoli, são essenciais para a efetividade da espermatogênese, tendo um papel na nutrição do epitélio seminífero, manutenção da integridade do epitélio e na barreira hematotesticular, assim, as lesões destas células podem ter um forte impacto na saúde reprodutiva masculina (MEDEIROS et al., 2019; RUSSELL et al., 1993). Nesse trabalho não foram observadas alterações estruturais testiculares que sugerissem possíveis danos diretos ou indiretos às células de Sertoli, o que indica que a redução da produção espermática estaria mais relacionada com a depleção androgênica promovida pela estatina.

A diminuição dos níveis de andrógenos, por exemplo, a testosterona, por intermédio da redução das concentrações de colesterol sérico pelas estatinas tem demonstrado possíveis efeitos tóxicos na reprodução masculina, como na qualidade espermática e alterações na performance reprodutiva, ademais, devido a esse mesmo mecanismo, as estatinas mostram-se capazes de reduzir a contagem espermática (HSIEH; HUANG, 2016; LEITE et al., 2014, 2017a). Tendo em vista que esses hormônios tem um papel relevante na espermatogênese e que alterações nas células de Sertoli influenciam o número de espermatozoides por testículo, nessas condições experimentais, houve redução da PDE relativa, o que sugere impacto desse medicamento na produção espermática testicular (FRANÇA; AVELAR; ALMEIDA, 2005). Além da redução da contagem espermática testicular nesse trabalho, a rosuvastatina proporcionou um aumento no tempo de trânsito espermático na região de cabeça/corpo do epidídimo. Sabe-se que a passagem do espermatozoide ao longo do ducto epididimário é fundamental para o processo de maturação, aquisição da motilidade e capacidade de fertilização do espermatozoide (DANTAS, 2022; ELFGEN et al., 2016). A maturação completa do

espermatozoide através do trânsito no epidídimo acontece sob influência de secreções epididimárias ao longo ducto, ocorrendo várias alterações bioquímicas sequenciais relacionadas à liberação e absorção de fluidos, exossomos, antioxidantes e íons (COOPER, 2011; REILLY et al., 2016). Além disso, quando há alterações na espermiogênese, o espermatozoide pode ser incapaz de responder adequadamente a esse ambiente epididimário (COOPER, 2011; REILLY et al., 2016).

Tendo em vista a importância do epidídimo para a maturação espermática e os resultados obtidos na pesquisa, estudos indicam que o aumento no tempo de trânsito espermático não impacta na capacidade fértil dos espermatozoides, porém, quando ocorre uma aceleração nesse tempo de trânsito, acarreta em um prejuízo para a qualidade espermática (GARCIA et al., 2012; KEMPINAS et al., 1998).

A taxa de alterações morfológicas nos espermatozoides foi similar entre os grupos no atual estudo, não obstante, houve uma redução na frequência das gotas citoplasmáticas em posição medial e distal, de modo consequente houve um aumento na frequência das gotas citoplasmáticas proximais, em ambos os grupos expostos. A gota citoplasmática é um pequeno resíduo citoplasmático que permanece aplicado à espermátide 16 após a liberação do epitélio germinativo, e durante o trânsito epididimário ocorre a alteração morfológica correlacionada a migração da gota citoplasmática (HERMO et al., 2019). A retenção da gota citoplasmática ao flagelo do espermatozoide pode acarretar em uma angulação flagelar, impactando diretamente na motilidade desses espermatozoides (COOPER et al., 2004; COOPER; BARFIELD, 2006).

Estudos prévios sugerem que a exposição a desreguladores endócrinos, os quais implicam na redução de testosterona, impactem na produção de ATP e, por conseguinte, na alteração da capacidade mitocondrial, prejudicando a motilidade espermática (BEN SLIMA et al., 2017; RAHMAN et al., 2017; SHARMA et al., 2020). Um dos motivos para ocorrer essa alteração na função mitocondrial é a possível deficiência da coenzima Q10 (CoQ10), conhecida também como ubiquinona, ocasionada pelo uso crônico de estatinas, onde a enzima HMG-CoA redutase é, também, responsável pela síntese da CoQ10, assim, sendo afetada com esse tratamento medicamentoso (BANACH et al., 2015; DA SILVA et al., 2021; PRAJAPATI; GARABADU; KRISHNAMURTHY, 2017). Trabalhos desenvolvidos pelo grupo de pesquisa também demonstraram uma queda nos níveis de testosterona nos grupos experimentais de ratos após a exposição à rosuvastatina (LEITE et al., 2014, 2017a, 2018b). Logo, os resultados desse trabalho mostraram uma diminuição na porcentagem de espermatozoides móveis progressivos na maior dose de rosuvastatina, demonstrando a possível toxicidade direta da rosuvastatina no

epidídimo ou efeitos indiretos desse medicamento através da redução nos níveis de testosterona e de danos à integridade do material genético.

Trabalhos realizados com exposição à atorvastatina indicaram que a limitação do hormônio essencial para a espermatogênese, a testosterona, acarretada pela estatina, está associada com a redução da vitalidade espermática (AKDENIZ et al., 2020; PONS-REJRAJI et al., 2014). Além disso, estudos demonstram que as estatinas apresentam um possível potencial de morte celular em diversas linhagens celulares, podendo assim estar associado com danos na funcionalidade da membrana espermática, principalmente, nesse caso, alterações da permeabilidade da membrana (LEE; KIM, 2013; SANTOS; SILVA, 2010). Nesse estudo, uma possível explicação para a redução da vitalidade espermática nos grupos expostos à estatina seria a redução androgênica e a morte celular, como consequência do efeito primário das estatinas, a redução dos níveis de colesterol.

Alguns trabalhos encontraram alterações na integridade do DNA espermático quando expostos a diferentes estatinas, como em estudos realizados com rosuvastatina, sinvastatina, atorvastatina e pravastatina (COETSEE et al., 2008; LEITE et al., 2017a). O processo de condensação do núcleo da célula espermática ocorre durante a espermiogênese, quando as histonas, que são proteínas nucleares básicas, são substituídas parcialmente ou completamente por proteínas específicas de caráter básico dos espermatozoides, as protaminas (KANIPPAYOOR; ALPERN; MOEHRING, 2013). A integridade do DNA do espermatozoide mostra-se extremamente relevante, já que alterações em sua cromatina ou danos na sua estrutura podem levar a diminuição da fertilidade na maturidade sexual e prejudicar o desenvolvimento embrionário (LEITE et al., 2017a). Nesse estudo houve menor compactação da cromatina no grupo de menor dose e uma tendência no grupo de maior dose expostos à rosuvastatina, a qual demonstrou ser capaz de interferir na qualidade espermática. Ademais, observou-se a formação de anomalias congênitas e a antecipação de marcos do desenvolvimento, além de aumento das taxas de perdas pós-implantação, sugerindo uma possível toxicidade relacionada à integridade do genoma paterno, após exposição à rosuvastatina.

O efeito antiandrogênico indicado pelo atraso da instalação da puberdade traz impactos negativos para a maturação e função reprodutiva, como demonstrado nesse estudo em que houve prejuízo à performance reprodutiva dos animais expostos à estatina, efeito constatado a partir do aumento das perdas pós-implantação, já que esta pode ser uma implicação adversa na qualidade dos espermatozoides e na integridade do genoma masculino, como também

verificado nos resultados com a menor compactação da cromatina (CABRAL et al., 2018; KRISTENSEN et al., 2011).

É sabido que o espermatozoide desempenha um papel fundamental na embriogênese, contribuindo por meio do seu genoma haploide. Além disso, ele participa de diversos outros eventos no desenvolvimento, incluindo a singamia, regulação epigenética e a clivagem (BASHIRI et al., 2020). Em um estudo conduzido por Marchetti e sua equipe (2004), foi observado que aproximadamente 98% das alterações genéticas transmitidas pelo progenitor eram do tipo cromossômico. Esses achados sugerem que a formação dessas alterações ocorreu durante o período entre a exposição da linhagem germinativa do macho e o início da primeira fase S após a fertilização. Em decorrência a exposição paterna a compostos tóxicos variados, pode-se acarretar em uma prole com indivíduos apresentando anomalias congênitas, isso se deve em virtude do desenvolvimento anormal seguir para a implantação, viabilizando o pré-embrião, entretanto, tendo a possibilidade de ocorrer interferência negativa com o desenvolvimento embriofetal subsequentemente (MARCHETTI et al., 2004). Portanto, as estatinas apontam um potencial de modificações no genoma espermático, resultando em alterações nas taxas de anomalias congênitas e antecipação nos marcos do desenvolvimento encontradas nesse estudo.

A distância anogenital é um marcador de diferenciação sexual, sendo um marco utilizado para a avaliação do desenvolvimento sexual precoce (THANKAMONY et al., 2016). Também se enquadram como biomarcadores de relevância para o desenvolvimento fetal os parâmetros biométricos de circunferência cefálica e distância craniocaudal (PARKER, 2012; TYL; MARR, 2012). Nos grupos expostos a estatina, constata-se uma tendência de redução da distância craniocaudal em fetos do sexo masculino, alvitando uma toxicidade fetal mediada por fator paterno.

Em síntese, à medida que as estatinas, notadamente a rosuvastatina, continuam a ser amplamente prescritas para regular os perfis lipídicos e mitigar doenças cardiovasculares em diversas faixas etárias, surge um cenário de crescente consciência acerca dos potenciais efeitos adversos destes medicamentos na esfera da saúde reprodutiva masculina (GONZÁLEZ JIMÉNEZ; ÁLVAREZ FERRE, 2011; WEFFORT et al., 2019). É de suma importância, contudo, reconhecer as limitações intrínsecas deste estudo. Foram empregados animais normolipidêmicos, tornando essencial adotar cautela ao extrapolar diretamente os resultados para a população humana. Além disso, é relevante ressaltar que a crescente utilização da rosuvastatina reforça a importância de compreender suas implicações abrangentes, incluindo

sua influência na saúde reprodutiva. Estes resultados vão além do imediato e estimulam reflexões mais amplas sobre a farmacodinâmica das estatinas e seu potencial impacto na saúde reprodutiva e no desenvolvimento pós-natal a longo prazo. Dessa forma, a convergência entre as áreas de pesquisa ganha uma importância substancial, construindo uma abordagem mais holística para preservar a saúde reprodutiva de indivíduos que façam o uso desse fármaco.

6 CONCLUSÃO

Em suma, a exposição de camundongos machos à rosuvastatina desde a pré-puberdade até a maturidade sexual promoveu toxicidade reprodutiva através de redução da qualidade espermática e diminuição da performance reprodutiva dos machos por meio do aumento das taxas de perda pós-implantação. Ademais, houve toxicidade no desenvolvimento da prole mediada por fator paterno, provavelmente devido a alterações espermáticas genéticas e/ou epigenéticas, que aumentaram a frequência de anomalias congênitas e anteciparam a abertura das pálpebras nos fetos, especialmente na menor dose de rosuvastatina. Este estudo sugere um possível risco à saúde reprodutiva de homens que fazem uso da estatina desde a pré-adolescência e que realizam um tratamento crônico com esse medicamento por toda a vida.

REFERÊNCIAS

- ABREU, A. P.; KAISER, U. B. Pubertal development and regulation. **The lancet Diabetes & Endocrinology**, v. 4, n. 3, p. 254–264, 2016.
- ADAM, O.; LAUFS, U. Antioxidative effects of statins. **Archives of Toxicology**, v. 82, n. 12, p. 885–892, 2008.
- ADAMS, S. P.; ALAEILKHCHI, N.; WRIGHT, J. M. Pitavastatin for lowering lipids (Review). **Cochrane Database Syst.**, p. 1–155, 2020.
- ADAN, G.; LEITE, A. **Desenvolvimento reprodutivo de ratos machos expostos ao agente hipolipemiante rosuvastatina**. [s.l.] Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu, 2014.
- AKDENIZ, E. et al. Effect of atorvastatin on spermatogenesis in rats: A stereological study. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 19, n. 12, p. 2609–2614, 2020.
- ALOTAIBI, M. F. Physiology of puberty in boys and girls and pathological disorders affecting its onset. **Journal of Adolescence**, v. 71, n. November 2018, p. 63–71, 2019.
- ALVES, M. B. R. et al. Investigando a compactação e a fragmentação não induzida do DNA espermático: refinamento da avaliação espermática parte 1. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 39, n. 2, p. 263–269, 2015.
- ARAKI, M.; MAEDA, M.; MOTOJIMA, K. Hydrophobic statins induce autophagy and cell death in human rhabdomyosarcoma cells by depleting geranylgeranyl diphosphate. **European Journal of Pharmacology**, v. 674, n. 2–3, p. 95–103, 2012.
- AROCHA RODULFO, J. I. Sedentarism, a disease from xxi century. **Clínica e Investigación en Arteriosclerosis (English Edition)**, v. 31, n. 5, p. 233–240, 2019.
- ASHBY, J. et al. The effect on sperm production in adult Sprague-Dawley rats exposed by gavage to bisphenol A between postnatal days 91-97. **Toxicological Sciences**, v. 74, n. 1, p. 129–138, 2003.
- BANACH, M. et al. Effects of coenzyme Q10 on statin-induced myopathy: A meta-analysis of randomized controlled trials. **Mayo Clinic Proceedings**, v. 90, n. 1, p. 24–34, 2015.
- BELL, M. R. Comparing postnatal development of gonadal hormones and associated social behaviors in rats, mice, and humans. **Endocrinology**, v. 159, n. 7, p. 2596–2613, 2018.
- BEN SLIMA, A. et al. Endocrine disrupting potential and reproductive dysfunction in male mice exposed to deltamethrin. **Human and Experimental Toxicology**, v. 36, n. 3, p. 218–226, 2017.
- BLYSTONE, C. R. et al. Iprodione delays male rat pubertal development, reduces serum testosterone levels, and decreases ex vivo testicular testosterone production. **Toxicology Letters**, v. 174, n. 1–3, p. 74–81, 2007.
- BOUCHARD, C.; BLAIR, S. N.; KATZMARZYK, P. T. Less Sitting , More Physical Activity , or Higher. **Mayo Clinic Proceedings**, v. 90, n. 11, p. 1533–1540, 2015.
- BROWN, A. J.; IKONEN, E.; OLKKONEN, V. M. Cholesterol precursors : more than mere markers of biosynthesis. **Curr. Opin. Lipidol.**, v. 25, n. 2, p. 133–139, 2014.
- CABRAL, R. E. L. et al. Carnitine partially improves oxidative stress , acrosome integrity , and reproductive competence in doxorubicin-treated rats. **Andrology**, v. 6, n. 1, p. 236–246, 2018.
- CAMPAGNOLO, P. D. B. et al. Prevalence of overweight and associated factors in southern Brazilian adolescents. **Public Health**, v. 122, n. 5, p. 509–515, 2008.
- CLÁUDIO, J. et al. Prevalência da síndrome metabólica e de seus componentes em pessoas com diabetes mellitus tipo 2. **Texto & Contexto-Enfermagem**, v. 27, n. 3, p. 1–8, 2018.

COETSEE, T. N. et al. Investigating the potential neuroprotective effects of statins on DNA damage in mouse striatum. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n. 9, p. 3186–3192, 2008.

COOPER, T. G. et al. Mouse models of infertility due to swollen spermatozoa. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 216, n. 1–2, p. 55–63, 2004.

COOPER, T. G. The epididymis, cytoplasmic droplets and male fertility. **Asian Journal of Andrology**, v. 13, n. 1, p. 130–138, 2011.

COOPER, T. G.; BARFIELD, J. P. Utility of infertile male models for contraception and conservation. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 250, n. 1–2, p. 206–211, 2006.

DA SILVA, T. A. et al. Suplementação de coenzima Q10 e redução dos efeitos colaterais da terapêutica com estatinas: uma revisão sistemática / Coenzyme Q10 supplementation and reduction of side effects of statin therapy: a systematic review. **Brazilian Journal of Development**, v. 7, n. 8, p. 84648–84672, 2021.

DAMASCENO, D. C. et al. **Anomalias Congênitas - Estudos Experimentais**. Belo Horizonte: [s.n.].

DANTAS, M. R. T. Editorial: The harmfulness of excessive heat on sperm maturation in mammals. **Multidisciplinary Science Journal**, v. 4, n. 1, p. 1–3, 2022.

DUTTA, S.; SENGUPTA, P. Men and mice: Relating their ages. **Life Sciences**, v. 152, p. 244–248, 2016.

DYM, M. Basement membrane regulation of Sertoli cells. **Endocrine Reviews**, v. 15, n. 1, p. 102–115, 1994.

ELFGEN, V. et al. Contractility of the epididymal duct: function, regulation and potential drug effects. **Reproduction and Fertility**, v. 156, n. 4, p. 1470–1626, 2016.

ENDO, A. The discovery and development of HMG-CoA reductase inhibitors. **Journal of Lipid Research**, v. 33, n. 11, p. 1569–1582, 1992.

ENDO, A. A gift from nature: The birth of the statins. **Nature Medicine**, v. 14, n. 10, p. 1050–1052, 2008.

ENDO, A.; KURODA, M.; TSUJITA, Y. ML-236A, ML-236B, and ML-236C, new inhibitors of cholesterol synthesis produced by penicillium citrinum. **Journal of Antibiotics**, v. 29, n. 12, p. 1346–1348, 1976.

EPA. Guidelines for Reproductive Toxicity Risk Assessment. **Federal Register**, v. 61, n. October, p. 56274–56322, 1996.

FAHED, G. et al. Metabolic Syndrome: Updates on Pathophysiology and Management in 2021. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 2, p. 1–38, 2022.

FARELLO, G. et al. Review of the literature on current changes in the timing of pubertal development and the incomplete forms of early puberty. **Frontiers in Pediatrics**, v. 7, n. MAR, p. 1–7, 2019.

FARIAS, F. et al. Diabetes & Metabolic Syndrome : Clinical Research & Reviews Metabolic syndrome and COVID-19 : An update on the associated comorbidities and proposed therapies rio a , Ana Cl a Wermerson Assunç a. **Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews**, v. 14, n. 3, p. 809–814, 2020.

FAVARETO, A. P. A. et al. Persistent Impairment of Testicular Histology and Sperm Motility in Adult Rats Treated with Cisplatin at Peri-Puberty. **Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology**, v. 109, n. 2, p. 85–96, 2011.

FILLER, R. Methods for Evaluation of Rat Epididymal Sperm Morphology. In: **Male Reproductive Toxicology**. [s.l.] ACADEMIC PRESS, INC., 1993. v. 3p. 334–343.

FISHER, M. M.; EUGSTER, E. A. What is in our environment that effects puberty? **Reproductive Toxicology**, v. 44, p. 7–14, 2014.

FRANÇA, L. R.; AVELAR, G. F.; ALMEIDA, F. F. L. Spermatogenesis and sperm

transit through the epididymis in mammals with emphasis on pigs. **Theriogenology**, v. 63, p. 300–318, 2005.

GARCIA, P. V. et al. Morphometric-stereological and functional epididymal alterations and a decrease in fertility in rats treated with finasteride and after a 30-day post-treatment recovery period. **Fertility and Sterility**, v. 97, n. 6, p. 1444–1451, 2012.

GEMEDA, D.; ABEBE, E.; DUGUMA, A. Metabolic Syndrome and Its Associated Factors among Type 2 Diabetic Patients in Southwest Ethiopia, 2021/2022. **Journal of Diabetes Research**, v. 2022, p. 1–7, 2022.

GONSIOROSKI, A.; MOURIKES, V. E.; FLAWS, J. A. Endocrine disruptors in water and their effects on the reproductive system. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 6, p. 1–66, 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, 2011.

GUÉNET, J. L. et al. **Genetics of the Mouse**. [s.l.] Springer Berlin, Heidelberg, 2015.

GUO, J. et al. The Dynamic Transcriptional Cell Atlas of Testis Development during Human Puberty. **Cell Stem Cell**, v. 26, n. 2, p. 262–276.e4, 2020.

HAMANO, K. I. et al. Spermatogenesis in immature mammals. **Reproductive Medicine and Biology**, v. 6, n. 3, p. 139–149, 2007.

HERMO, L. et al. Dark side of the epididymis: tails of sperm maturation. **Andrology**, v. 7, n. 5, p. 566–580, 2019.

HESS, R. A.; DE FRANCA, L. R. Spermatogenesis and cycle of the seminiferous epithelium. In: CHENG, C. Y. (Ed.). **Molecular Mechanisms in Spermatogenesis**. [s.l.] Springer-Verlag New York Inc, 2008. v. 636p. 1–15.

HOFFMANN, H. M. Determination of Reproductive Competence by Confirming Pubertal Onset and Performing a Fertility Assay in Mice and Rats. **Journal of visualized experiments : JoVE**, n. 140, p. 1–10, 2018.

HSIEH, C. J.; HUANG, B. Rosuvastatin decreases testosterone levels but not sexual function in men with type 2 diabetes. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v. 120, p. 81–88, 2016.

ISTVAN, E. Statin inhibition of HMG-CoA reductase: A 3-dimensional view. **Atherosclerosis Supplements**, v. 4, n. 1, p. 3–8, 2003.

JOHNSON, L. et al. Efficiency of spermatogenesis: A comparative approach. **Animal Reproduction Science**, v. 60–61, p. 471–480, 2000.

JOHNSON, L. et al. Anatomy and Physiology of the Male Reproductive System and Potential Targets of Toxicants. **Comprehensive Toxicology, Second Edition**, v. 11, p. 5–59, 2010.

KANIPPAYOOR, R. L.; ALPERN, J. H. M.; MOEHRING, A. J. Protamines and spermatogenesis in *Drosophila* and *Homo sapiens*. **Spermatogenesis**, v. 3, n. 2, p. e24376, 2013.

KEMPINAS, W. D. G. et al. Rat Epididymal Sperm Quantity, Quality, and Transit Time after Guanethidine-. **Biology of Reproduction**, v. 59, n. 4, p. 890–896, 1998.

KIVIRANTA, P.; KUIRI-HÄNNINEN, T.; SAARI, A. Transient Postnatal Gonadal Activation and Growth Velocity in Infancy. **Pediatrics**, v. 138, n. 1, p. 1–10, 2016.

KLINEFELTER, G. R.; LASKEY, J. W.; AMANN, R. P. Statin drugs markedly inhibit testosterone production by rat Leydig cells in vitro: Implications for men. **Reproductive Toxicology**, v. 45, p. 52–58, 2014.

KOSKENNIEMI, J. J.; VIRTANEN, H. E.; TOPPARI, J. Testicular growth and development in puberty. **Current Opinion in Endocrinology & Diabetes and Obesity**, v. 24,

n. 3, p. 215–224, 2017.

KRISTENSEN, D. M. et al. Many Putative Endocrine Disruptors Inhibit Prostaglandin Synthesis. **Environmental Health Perspectives**, v. 119, n. 4, p. 534–542, 2011.

KUIRI-HÄNNINEN, T.; SANKILAMPI, U.; DUNKEL, L. Activation of the Hypothalamic- Pituitary-Gonadal Axis in Infancy: Minipuberty. **Hormone research in pediatrics**, v. 82, n. 2, p. 73–80, 2014.

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, 2002.

LEE, S. K.; KIM, Y. S. Phosphorylation of eIF2 α attenuates statin-induced apoptosis by inhibiting the stabilization and translocation of p53 to the mitochondria. **International Journal of Oncology**, v. 42, n. 3, p. 810–816, 2013.

LEITE, G. A. A. et al. Delayed reproductive development in pubertal male rats exposed to the hypolipemiant agent rosuvastatin since prepuberty. **Reproductive Toxicology**, v. 44, p. 1–11, 2014.

LEITE, G. A. A. et al. Vitamin C partially prevents reproductive damage in adult male rats exposed to rosuvastatin during prepuberty. **Food and Chemical Toxicology**, v. 109, p. 272–283, 2017a.

LEITE, G. A. A. et al. Ascorbic acid supplementation partially prevents the delayed reproductive development in juvenile male rats exposed to rosuvastatin since prepuberty. **Reproductive Toxicology**, v. 73, n. 7, p. 328–338, out. 2017b.

LEITE, G. A. A. et al. Lower sperm quality and testicular and epididymal structural impairment in adult rats exposed to rosuvastatin during prepuberty. **Journal of Applied Toxicology**, v. 38, n. 6, p. 914–929, 2018a.

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 prepuberty. **Food and Chemical Toxicology**, v. 118, n. 5, p. 416–429, 2018b.

LIVADAS, S.; CHROUSOS, G. P. Molecular and Environmental Mechanisms Regulating Puberty Initiation: An Integrated Approach. **Frontiers in Endocrinology**, v. 10, n. December, 2019.

MANTOVANI, A.; FUCIC, A. Puberty dysregulation and increased risk of disease in adult life: Possible modes of action. **Reproductive Toxicology**, v. 44, p. 15–22, 2014.

MARCEAU, K. et al. Individual Differences in Boys' and Girls' Timing and Tempo of Puberty: Modeling Development With Nonlinear Growth Models. **Developmental Psychology**, v. 47, n. 5, p. 1389–1409, 2011.

MARCHETTI, F. et al. Paternally Transmitted Chromosomal Aberrations in Mouse Zygotes Determine Their Embryonic Fate 1. **Biology of Reproduction**, v. 70, n. 3, p. 616–624, 2004.

MCQUEEN, C. A. **COMPREHENSIVE TOXICOLOGY**. [s.l: s.n.]. v. 3

MCTAGGART, F. Comparative pharmacology of rosuvastatin. **Atherosclerosis Supplements**, v. 4, n. 1, p. 9–14, 2003.

MEDEIROS, P. DA C. DE et al. Prepubertal exposure to low doses of sodium arsenite impairs spermatogenesis and epididymal histophysiology in rats. **Environmental Toxicology**, v. 34, n. 1, p. 83–91, 2019.

MELLO, M. L. S. Induced metachromasia in bull spermatozoa. **Histochemistry**, v. 74, n. 3, p. 387–392, 1982.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Ações de Enfermagem para o Controle do Câncer: Uma proposta de integração ensino-serviço**. [s.l: s.n.]. v. 3

MONOSSON, E. et al. Peripubertal exposure to the antiandrogenic fungicide ,

vinclozolin , delays puberty , inhibits the development of androgen-dependent tissues , and alters androgen receptor function in the male rat †. **Toxicology and Industrial Health**, v. 15, n. 1–2, p. 65–79, 2015.

MORATOYA, E. E. et al. Mudanças no padrão de consumo alimentar no Brasil. **Revista de política agrícola**, v. 22, n. 1, p. 72–84, 2013.

MULLEN, P. J. et al. The interplay between cell signalling and the mevalonate pathway in cancer. **Nature Reviews Cancer**, v. 16, n. 11, p. 718–731, 2016.

MURTA, D. V. F. et al. A organização dos testículos. **Pubvet**, v. 13, n. 7, p. 1–6, jul. 2019.

NIEUWENHUIS, D. et al. Adipokines: A gear shift in puberty. **Obesity Reviews**, v. 21, n. 6, p. 1–10, 2020.

OJEDA, S. R.; SKINNER, M. K. Puberty in the Rat. In: **Knobil and Neill's Physiology of Reproduction**. [s.l.: s.n.]. p. 2061–2126.

OMID BANAFSHI et al. Sperm Preparation by Washing and Swim-up Method Improves In Vitro Fertilization and Birth Rate in Mice. **Russian Journal of Developmental Biology**, v. 52, n. 6, p. 449–456, 19 nov. 2021.

PARKER, R. M. Reproductive toxicity testing—Methodology. In: HOOD, R. D. (Ed.). **Developmental and Reproductive Toxicology: A Practical Approach**. [s.l.] Informa Healthcare, 2012. p. 184–228.

PEROBELLI, J. E. et al. Impairment on sperm quality and fertility of adult rats after antiandrogen exposure during prepuberty. **Reproductive Toxicology**, v. 33, n. 3, p. 308–315, 2012.

PONS-REJRAJI, H. et al. Evaluation of atorvastatin efficacy and toxicity on spermatozoa, accessory glands and gonadal hormones of healthy men: A pilot prospective clinical trial. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 12, n. 1, p. 1–12, 2014.

PRAJAPATI, S. K.; GARABADU, D.; KRISHNAMURTHY, S. Coenzyme Q10 Prevents Mitochondrial Dysfunction and Facilitates Pharmacological Activity of Atorvastatin in 6-OHDA Induced Dopaminergic Toxicity in Rats. **Neurotoxicity Research**, v. 31, n. 4, p. 478–492, 2017.

RAHMAN, M. S. et al. Gestational exposure to bisphenol A affects the function and proteome profile of F1 spermatozoa in adult mice. **Environmental Health Perspectives**, v. 125, n. 2, p. 238–245, 2017.

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.

REILLY, J. N. et al. Characterisation of mouse epididymosomes reveals a complex profile of microRNAs and a potential mechanism for modification of the sperm epigenome. **Scientific Reports**, v. 6, n. August, p. 1–15, 2016.

ROBB, G. W.; AMANN, R. P.; KILLIAN, G. J. Daily sperm production and epididymal sperm reserves of pubertal and adult rats. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 54, n. 1, p. 103–107, 1978.

ROCHA, R. C. L. DA et al. Disruptores endócrinos – interações com o meio ambiente e puberdade. **Femina**, v. 50, n. 4, p. 4, 2022.

ROY, J. R.; CHAKRABORTY, S.; CHAKRABORTY, T. R. Estrogen-like endocrine disrupting chemicals affecting puberty in humans - A review. **Medical Science Monitor**, v. 15, n. 6, p. 137–45, 2009.

RUSSELL, L. D. et al. Histological and Histopathological Evaluation of the Testis. **International Journal of Andrology**, v. 16, n. 1, p. 83–83, fev. 1993.

RYNDERS, C. A. et al. Sedentary behavior is a key determinant of metabolic inflexibility. **The Journal of Physiology**, v. 596, n. 8, p. 1319–1330, 2018.

SAMSON, S. L.; GARBER, A. J. Metabolic Syndrome. **Endocrinology and Metabolism Clinics of NA**, v. 43, n. 1, p. 1–23, 2014.

SANTOS, L. N.; SILVA, F. V. DA. Reações adversas às estatinas: mecanismo de ação e evidências clínicas. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, v. 9, n. 1, p. 79, 2010.

SEED, J. et al. Methods for assessing sperm motility, morphology, and counts in the rat, rabbit, and dog: A consensus report. **Reproductive Toxicology**, v. 10, n. 3, p. 237–244, 1996.

SHARMA, A. et al. Endocrine-disrupting chemicals and male reproductive health. **Reproductive Medicine and Biology**, v. 19, n. 3, p. 243–253, 2020.

SILVA, P. V. E et al. Effects of isolated or combined exposure to sibutramine and rosuvastatin on reproductive parameters of adult male rats. **Applied Toxicology**, n. January, p. 1–18, 2020.

SOUSA, A. C. A. et al. Editorial: Obesogens in the XXI century: Emerging health challenges. **Frontiers in Endocrinology**, v. 13, n. 8, p. 1–10, 2022.

SOUZA, A. C. et al. Avaliação ultrassonográfica e mensurações das glândulas adrenais em primatas não humanos neotropicais: mico-de-cheiro (*Saimiri sciureus*), macaco-da-noite (*Aotus azarae infulatus*) e bugio-ruivo (*Alouatta guariba clamitans*). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 34, n. 9, p. 903–910, set. 2014.

STAMERRA, C. A. et al. Statin therapy and sex hormones. **European Journal of Pharmacology**, v. 890, n. January 2021, p. 1–7, 2023.

STOKER, T. E. et al. The effect of atrazine on puberty in male Wistar rats: An evaluation in the protocol for the assessment of pubertal development and thyroid function. **Toxicological Sciences**, v. 58, n. 1, p. 50–59, 2000.

THANKAMONY, A. et al. Anogenital distance as a marker of androgen exposure in humans. **Andrology**, v. 4, p. 616–625, 2016.

THARMALINGAM, M. D.; JORGENSEN, A.; MITCHELL, R. T. Molecular and Cellular Endocrinology Experimental models of testicular development and function using human tissue and cells. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 468, n. 1, p. 95–110, 2018.

TOTH, P. P.; BANACH, M. Statins: Then and Now. **Methodist DeBakey cardiovascular journal**, v. 15, n. 1, p. 23–31, 2019.

TYL, R. W.; MARR, M. C. Developmental toxicity testing—Methodology Rochelle W. Tyl and Melissa C. Marr. In: HOOD, R. D. (Ed.). **Developmental and Reproductive Toxicology: A Practical Approach**. [s.l.] Informa Healthcare, 2012. v. 3p. 139–183.

U.S. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Statins**. Disponível em: <<https://www.fda.gov/drugs/information-drug-class/statins>>. Acesso em: 17 mar. 2023.

VRECER, M. et al. Use of statins in primary and secondary prevention of coronary heart disease and ischemic stroke. Meta-analysis of randomized trials. **International Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics**, v. 41, n. 12, p. 567–577, 2003.

WANG, Y. et al. Will All Americans Become Overweight or Obese? Estimating the Progression and Cost of the US Obesity Epidemic. **Obesity**, v. 16, n. 10, p. 2323–2330, 2008.

WEFFORT, V. R. S. et al. **Obesidade na infância e adolescência: Manual de Orientação**. [s.l.: s.n.].

WISNER, J. R.; STALVEY, J. R. D.; WARREN, D. W. Delay in the age of balanopreputial skinfold cleavage and alterations in serum profiles of testosterone, 5 α -androstane-3 α , 17 β -diol, and gonadotropins in adult rats treated during puberty with luteinizing hormone releasing hormone. **Steroids**, v. 41, n. 4, p. 443–454, abr. 1983.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Obesity and overweight**. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>>.

**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

		Total Aprovado	Quantidade Utilizada
Camundongos heterogênicos	Machos ou	225	0
	Fêmeas		

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

