

Trabalho de Conclusão de Curso

Kevin Silva Muller

ESTUDO DOS EFEITOS DE ESTATINAS EM RATAS PRENHES NA INTERAÇÃO NEUROMUSCULAR

Orientadora: Profa. Dra. Selma Maria Michelin Matheus

Botucatu, SP

2022

Kevin Silva Muller

**ESTUDO DOS EFEITOS DE ESTATINAS EM RATAS PRENHES
SOBRE A INTERAÇÃO NEUROMUSCULAR**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Instituto de
Biociências, Universidade Estadual
Paulista "Júlio de Mesquita Filho",
Câmpus de Botucatu, para obtenção do
título de Bacharel em Ciências
Biológicas.

Orientadora: Profa. Dra. Selma Maria Michelin Matheus

Co-Orientadora: Profa. Dra. Cintia Yuri Matsumura

Departamento de Biologia Estrutural e Funcional (Setor Anatomia), Instituto de
Biociências de Botucatu – UNESP

Botucatu, SP

2022

M958e Muller, Kevin Silva
ESTUDO DOS EFEITOS DE ESTATINAS EM RATAS
PRENHES NA INTERAÇÃO NEUROMUSCULAR / Kevin Silva
Muller. -- Botucatu, 2022
34 p. : il.

Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado - Ciências
Biológicas) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de
Biociências, Botucatu
Orientadora: Selma Maria Michelin Matheus
Coorientadora: Cintia Yuri Matsumura

1. interação neuromuscular. 2. estatinas. 3. gravidez. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de
Biociências, Botucatu. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha família por toda a preocupação com minha educação, pelo suporte e por sempre confiarem e acreditarem em minhas escolhas tanto quanto eu.

A minha orientadora Professora Dra. Selma M. M. Matheus, por todos os ensinamentos e direcionamentos desde meu primeiro ano, por ser uma orientadora tão presente e disposta, e por me ajudar a trilhar meu caminho no meio científico.

A minha coorientadora Professora Dra. Cintia Yuri Matsumura por toda a ajuda e orientação na realização das quantificações proteicas e pela grande disponibilidade.

Ao meu amigo e parceiro de laboratório Felipe, por toda a ajuda desde minha primeira IC e por todo o apoio e companheirismo, em todos os momentos, no dia a dia do laboratório.

Ao Gelson e a Cristiane pelo apoio diário nas técnicas e suporte administrativo.

Aos meus amigos de sala Zé, Arrombado, Fugi e SBT por todos as experiências e momentos que vivemos durante esses 4 anos.

Aos meus amigos da república Caverna Do Dragão, em especial Derra, Disne e VAB, pelo companheirismo e parceria para tudo.

Aos meus professores da graduação por proporcionarem tanto aprendizado e amadurecimento, além de bons exemplos e inspirações.

A FAPESP pela bolsa de iniciação científica (2021/03528-2).

Obrigado!

Sumário

RESUMO.....	6
INTRODUÇÃO	7
OBJETIVOS.....	12
MATERIAL E MÉTODOS.....	13
RESULTADOS.....	18
DISCUSSÃO E CONCLUSÃO	26
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	30

RESUMO

Os sintomas musculares associados às estatinas (SAMS) são o efeito adverso associado mais comum ao tratamento com estatinas. As estatinas são medicamentos inibidores da enzima 3-hidroxi-3-metil-glutaril-CoA redutase, que levam a efeitos redutores do colesterol sérico. As SAMS ocorrem em cerca de 30% dos pacientes tratados com essas drogas, causando uma ampla variedade de distúrbios neuromusculares, desde câibras e dores musculares até eventos raros de rabdomiólise fatal. Mesmo com a alta incidência na prática clínica, os mecanismos subjacentes à patogênese da SAMS permanecem desconhecidos. Por outro lado, a gravidez é um período crítico para a saúde cardiovascular da mãe e está relacionada ao aumento dos níveis de colesterol. As estatinas podem ser úteis durante esse estado, mas sua segurança ainda não está determinada. Dessa maneira, investigamos os efeitos pós-parto da exposição à rosuvastatina e sinvastatina durante a gravidez em ratos Wistar com foco nas estruturas neuromusculares. Para isso, vinte e uma ratas Wistar prenhes foram distribuídas em: Controle (C), tratadas com veículo (dimetilsulfóxido + dH₂O); Sinvastatina (S), 62,5 mg/kg/dia; e Rosuvastatina (R), 10 mg/kg/dia. Os tratamentos (gavagem) foram realizados diariamente do 8º ao 20º dia gestacional. No desmame, os tecidos maternos pós-parto foram coletados e submetidos à: análise morfológica e morfométrica do músculo sóleo e junções neuromusculares associadas (JNMs) e nervo isquiático; quantificação de proteínas; quantificação sérica do colesterol total e enzima creatina quinase; e análise de colágeno intramuscular. Foi observado aumento de diâmetro e área nas JNMs dos grupos S e R, também com perda de circularidade. O número de miofibras com núcleos centrais foi maior nos mesmos grupos. Os mionúcleos têm papel fundamental no desenvolvimento e manutenção das JNMs e são determinantes no rearranjo do citoesqueleto de agrupamentos de receptores de acetilcolina. Esta exposição pode tê-los remodelado, alterando a morfologia dos JNMs. Nossos resultados podem ser associados ao desenvolvimento e progressão da SAMS observada na prática clínica.

Palavras-chave: sintomas musculares associados às estatinas; interação neuromuscular; mionúcleos; receptor nicotínico de acetilcolina; gravidez;

1. Introdução

A hiperlipidemia e hipercolesterolemia são considerados fatores risco para doenças cardiovasculares e configuram um problema de saúde global sendo diretamente associadas a hábitos alimentares precários e condições de sedentarismo (Organização Mundial da Saúde, 2021). Os fármacos que reduzem a concentração do colesterol sanguíneo revolucionaram o tratamento dessas doenças e a terapia dos pacientes com risco aumentado para doenças cardiovasculares (DCs) (Karlson et al., 2016) através da redução dos níveis de colesterol sanguíneo, de maneira que estão diretamente relacionados com a qualidade de vida e saúde de milhares de pessoas no mundo inteiro (Objetivo de desenvolvimento sustentável número 3).

O colesterol é uma molécula anfipática de natureza lipídica que pode ser encontrada em quase todas as membranas biológicas de células animais, sendo responsável pela manutenção da fluidez, da curvatura, dos canais iônicos e das funções de sinalização e compartimentação celular (Krivoi & Petrov, 2019). A presença dessa molécula na membrana plasmática regula a função de diversas proteínas, incluindo transportadores, receptores e canais iônicos, sendo que cerca de metade das proteínas de membrana são resultantes do processo de cristalização com colesterol (Grouleff et al., 2015).

O colesterol de modo geral, pode ser sintetizado pelo organismo dos mamíferos ou adquirido pela dieta. Sua biossíntese ocorre a partir da utilização de 18 moléculas de Acetilcoenzima A, em uma via metabólica complexa, com a participação da enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA redutase, que atua em uma etapa precoce e limitante no processo de síntese do colesterol, a qual converte 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA em mevalonato (Van der Wulp et al., 2010). As estatinas devido às suas propriedades de inibição da enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA redutase são fármacos amplamente utilizados para redução do colesterol.

Além de seu efeito específico na inibição da biossíntese do colesterol, estes fármacos ainda produzem uma gama de efeitos pleiotrópicos, agindo principalmente no Sistema Cardiovascular, no encéfalo e nos músculos

esqueléticos (Sodero & Barrantes, 2020), em que desencadeiam respostas de proteção endotelial, anti-inflamatórias e antioxidantes (Girardi, 2014). Assim, são fármacos válidos para o tratamento de outras condições patológicas, como artrite reumatoide, tromboembolismo venoso e doenças hepáticas (Ferri & Corsini, 2014). Com a grande prevalência e impacto das DCs, além da adoção alternativa às estatinas em tratamentos não necessariamente ligadas ao perfil lipídico do paciente, o uso desse fármaco é cada vez maior, como observado em relatos do Centro de Controle e Prevenção de Doenças dos Estados Unidos que descrevem o uso em mais de 25% da população estado-unidense acima de 40 anos (Gu et al., 2014).

As estatinas são medicamentos geralmente bem tolerados e eficazes (Crisan & Patil, 2020; Patel & Kothari, 2017), no entanto, com seu amplo uso, vêm sendo associadas a efeitos colaterais musculares, metabólicos e neurológicos (Thompson, 2016), não existindo ainda um consenso sobre as reais causas desses efeitos. Os Sintomas Musculares Associados às Estatinas (SAMS) são os efeitos adversos mais comuns, e representam um problema clínico importante. Bruckert et al. caracterizou os fatores de risco, taxa de ocorrência, início, natureza e impacto de sintomas musculares leves a moderados associados às estatinas na prática clínica em 7924 pacientes não-selecionados com hiperlipidemia e concluiu que os SAMS além de mais comuns que o esperado, também podem exercer um grande impacto na vida cotidiana dos pacientes acometidos.

Na prática clínica, o tratamento com estatinas está associado ao desenvolvimento de problemas musculares em cerca de 30% dos pacientes (Jacobson et al., 2019; Bruckert et al., 2005). Os SAMS observados com maior frequência envolvem dor ou fraqueza muscular, mas podem levar à quadros mais graves, como de miotoxicidades, variando de mialgias e câibras à elevação da enzima creatina quinase (CK), miopatias e até rabdomiólise fatal (Gras-Champel et al., 2019). Estudos indicam que o desenvolvimento dos SAMS, está associado à dose-dependência, nas quais maiores doses e/ou duração do tratamento potencializam as chances de SAMS (Mammen & Amato, 2010; Chan et al., 2005) e o desenvolvimento destas está associado à

interrupção do tratamento e piora no quadro cardiovascular dos pacientes (Taylor & Thompson, 2018).

O diagnóstico dos SAMS é subjetivo tanto para o paciente quanto para o médico, pois não existem testes clínicos ou critérios diagnósticos totalmente confiáveis e validados (Thompson, 2016). Ainda, de um ponto de vista experimental, os SAMS são pouco investigados, tendo sua existência apenas relatadas na literatura, com sua patogênese pouco compreendida.

Já é conhecido que o tratamento com estatinas tem efeitos sobre o sistema nervoso central (Sodero & Barrantes, 2020; Cibičková, 2011) mas pouco é explorado sobre o sistema nervoso periférico. Ainda, estudos sugerem que os efeitos decorrentes dessa terapia também podem ser exercidos em neurônios motores inferiores da medula espinal (Paz & Barrantes, 2021; Sodero & Barrantes, 2020).

A ação das estatinas sobre o sistema nervoso periférico ainda é pouco explorada. A junção neuromuscular (JNMs) trata-se de uma conexão morfológicamente distinta entre o nervo terminal e as fibras musculares, sendo considerada uma sinapse "modelo" acessível para estudo no sistema nervoso periférico (Tintignac et al., 2015).

Morfológicamente, as JNMs são formadas por três compartimentos: o compartimento pré-sináptico, onde estão presentes a terminação nervosa com as vesículas contendo o neurotransmissor responsável, a acetilcolina (ACh) e as células de Schwann terminais; a fenda sináptica, preenchida pela lâmina basal, onde reside a enzima acetilcolinesterase (AChE), responsável pela quebra da ACh após a contração muscular; e o compartimento pós-sináptico, que compreende o sarcoplasma que proporciona um suporte estrutural e metabólico para a região pós-sináptica e o sarcolema da fibra muscular (Cruz et al., 2020; Zelada et al., 2020) com as dobras juncionais, onde em seu ápice se encontram os receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChRs).

Os nAChRs são proteínas integrais de membrana compostas por cinco subunidades arranjadas em forma de rosácea ou canais iônicos ($2\alpha 1$, 1β , 1δ e 1ϵ) (Tintignac et al., 2015). As subunidades $\alpha 1$ contém os sítios de ligação com

a acetilcolina que quando estimulados, iniciam a mudança conformacional para a abertura do polo iônico (Changeux & Edelstein, 1998). Durante sua fase embrionária, a subunidade δ é expressa e durante sua maturação pós-natal a subunidade ϵ a substitui, alcançando a fase madura da JNM, com total plasticidade e funcionalidade. Em casos de doenças, lesões e desordens nas JNMs, é comum que estas regridam a sua forma imatura, expressando novamente a subunidade δ (Tintignac et al, 2015).

O colesterol não somente é um componente abundante da membrana pós-sináptica nas JNMs, mas também um participante essencial na manutenção dos nAChRs, podendo interferir na sua distribuição e em várias de suas propriedades (Bermudez et al., 2010; Willmann et al., 2006). Já foi demonstrado uma interação direta entre o colesterol e os nAChRs (Krivoi & Petrov, 2019), considerando que essas moléculas são responsáveis pela estabilização do estado conformacional do receptor e podem alterar as propriedades biofísicas da membrana celular associada (Borroni & Barrantes, 2011).

A depleção do colesterol nas JNMs, possivelmente associada ao tratamento com estatinas, pode afetar vários aspectos da neurotransmissão, podendo resultar na internalização, endocitose e mudanças nas atividades iônicas dos nAChRs, além de problemas na liberação pré-sináptica de ACh e no fator de segurança para transmissão neuromuscular (Paz & Barrantes, 2021; Sodero & Barrantes, 2020; Krivoi & Petrov, 2019).

Nos últimos anos, diversos relatos de casos publicados (Gras-Champel et al., 2019; Crisan & Patil, 2020; Lacomis, 2020; Pasutharnchat & Phanthumchinda, 2011; Scripko et al., 2014; Purvin et al., 2006; Michael et al., 2004; Chong et al., 2004; Parmar et al., 2002; Keoghet et al., 2010; Gale & Danesh-Meyer, 2014; Oh et al., 2008) indicam uma possível associação entre o tratamento com estatinas e o desenvolvimento e/ou progressão de doenças neuromusculares severas, principalmente Miastenia Gravis, doença autoimune que afeta diretamente as JNMs através da destruição dos nAChRs ou pela atuação de anticorpos contra a proteína Musk (*Muscle-specific kinase* – quinase músculo-específica) (Paz & Barrantes, 2021). Gras-Champel et al.

demonstraram em um estudo de análise de caso-não-caso, que são utilizados para avaliar a segurança de medicamentos por meio da análise da desproporcionalidade das notificações de reações adversas a medicamentos em bancos de dados de farmacovigilância, um possível sinal de segurança de associação da Miastenia Gravis e estatinas, principalmente decorrente do tratamento com sinvastatinas e rosuvastatinas.

Também é digno de destaque que com o amplo uso global desta classe de fármacos a exposição da população é cada vez maior (Gu et al., 2014; Newman et al., 2019), de maneira que efeitos relacionados a reprodução humana também vêm sendo avaliados. Aqui, ressaltamos particularmente as mulheres em processo gestacional, em que fatores como o aumento da prevalência de hipercolesterolemia em jovens; a tendência de gestações mais tardias entre os casais; e a frequência elevada de gestações indesejadas, tendem a aumentar o risco da exposição gestacional às estatinas.

A gestação é um fenômeno já reconhecido como um período crítico para a saúde cardiovascular tanto da mulher quanto de sua prole, de maneira que é descrita pela Associação Americana do Coração como um “teste de estresse” fisiológico que revela riscos subjacentes das mães às DCs (Brown et al., 2018). Durante a gravidez, diversas alterações morfológicas e metabólicas acontecem na mãe, entre as quais ocorre um aumento progressivo dos níveis de colesterol materno, tornando-se 40-50% maior do que o valor inicial ao final da gestação (Herrera et al., 2002; Avis et al., 2009; Brizzi et al., 1999). Ainda, as mães podem estar suscetíveis ao desenvolvimento fisiológico de quadros de hipercolesterolemia materna, que podem se prolongar mesmo após o parto. A saúde cardiovascular gestacional também já foi significativamente associada a riscos de resultados adversos na gravidez, e a hipercolesterolemia gestacional é associada ao desenvolvimento de quadros de pré-eclâmpsia (Cantin et al., 2021; Perak et al., 2021). Dessa maneira, as DCs constituem um desafio particular durante a gravidez devido as mudanças fisiológicas e as altas necessidades do feto, e as preocupações com a segurança fetal ainda limitam as opções de tratamento (Cantin et al., 2021).

Embora o uso de estatinas não seja recomendado para mulheres grávidas, sua segurança/efetividade durante a gravidez ainda não foi

determinada (Zarek et al., 2013). O uso de estatina não deve ser prescrito para uma mulher que está grávida ou tentando engravidar, mas metade de todas as gravidezes não são planejadas e a exposição a estatina durante o início a gravidez não é mais um evento raro (Newman et al., 2019).

Com o uso global generalizado de estatinas, a exposição da população tem aumentando (Gu et al., 2014; Newman et al., 2019), e os efeitos relacionados à reprodução humana também precisam ser investigados. Principalmente mulheres no processo gestacional, em que fatores como o aumento da prevalência de hipercolesterolemia em jovens; a tendência de gravidez tardia entre os casais; e a alta frequência de gestações indesejadas tende a aumentar o risco de exposição gestacional às estatinas (Karalis et al., 2016).

Embora o uso de estatinas não seja recomendado para mulheres grávidas, sua segurança/efetividade durante a gravidez ainda não foi determinada (Vahedian-Azimi et al., 2021). Estudos em animais mostraram que as estatinas podem prevenir complicações na gravidez, como abortos espontâneos e pré-eclâmpsia (Girardi, 2014). Essas indicações podem apoiar o uso do medicamento durante a gravidez para complicações obstétricas, portanto, uma investigação mais aprofundada de sua segurança é necessária.

Objetivo Geral: Investigar os efeitos pós-parto nas estruturas (tecidos) de interação neuromuscular de ratas Wistar tratadas com estatinas durante a gestação.

Objetivos Específicos:

- Análise morfológica e morfométrica das JNMs;
- Análise morfológica e morfométrica das fibras musculares (HE);
- Análise morfológica e morfométrica do nervo isquiático;
- Análise e quantificação do colágeno intramuscular (Masson);
- Quantificação proteica da Enzima Creatina-kinase e do colesterol sérico total;

- Quantificação proteica dos nAChRs (alpha1, epsilon, gamma) e proteína MUSK e Rapsyn;

2. Materiais e métodos

Animais e desenho experimental

Ratos Wistar adultos (100 dias de vida) machos e fêmeas foram acasalados durante o período escuro do ciclo, colocando duas fêmeas na gaiola do macho. O primeiro dia gestacional (DG) foi determinado pela presença de espermatozóides em esfregaços vaginais de fêmeas em cio, que posteriormente foram mantidas em gaiolas individuais.

A partir do oitavo DG, 21 fêmeas prenhes foram distribuídas aleatoriamente em três grupos experimentais (n = 7/grupo): Controle (C), tratado com dimetilsulfóxido (DMSO) 20% e água destilada como veículo; Sinvastatina (S), tratada na dose de 62,5 mg/kg/dia, diluída em veículo; e Rosuvastatina (R), tratada com essa droga na dose de 10 mg/kg/dia, diluída no veículo. Os tratamentos foram realizados diariamente do GD 8 ao 20, por via oral (gavagem) (Figura 1). Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Unesp (CEUA/IBB/Unesp, protocolo 1115110620).

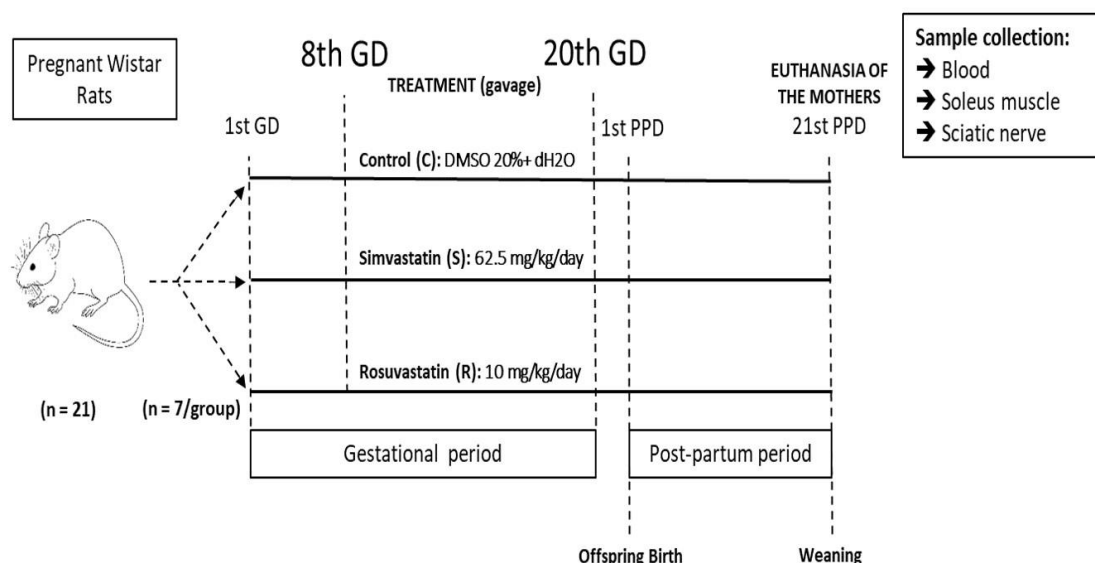


Figura 1: Representação gráfica do desenho experimental utilizado neste estudo. Dia Gestacional (GD) e Dia Pós-Parto (PPD).

O tipo de estatina e as doses de sinvastatina e rosuvastatina propostas neste estudo foram escolhidos com base na literatura e em estudos clínicos observacionais, nos quais foi observada alta incidência de SAMS (Bruckert et al., 2005; Waters et al., 2005; Newman et al., 2019). O período de exposição às estatinas proposto refere-se a um curto período (1-3 semanas) em que o desenvolvimento de SAMS foi observado clinicamente com alta incidência (Bruckert et al., 2005).

Processamento de material biológico

Após o desmame (21º dia pós-natal), as ratas puérperas foram eutanasiadas por indução à inconsciência com CO₂ seguida de decapitação, para coleta de sangue, músculo sóleo e nervo ciático (Figura 1). O sangue foi centrifugado e o soro mantido congelado em biofreezer (-80°C). Os músculos sóleo direito foram congelados em nitrogênio líquido, enquanto os músculos sóleo esquerdo foram reduzidos ao terço médio e suas extremidades fixadas em formalina tamponada (10%), enquanto as partes centrais e os nervos ciáticos foram fixados em fixador de Karnovsky (2,5% glutaraldeído e 4%

paraformaldeído, em solução salina tamponada com fosfato – PBS, 0,2M, pH 7,3). As análises foram realizadas conforme descrito abaixo.

Análise morfológica e morfométrica de junções neuromusculares e fibras musculares

Os músculos foram divididos em região média (contendo o ponto motor) e extremidades proximal e distal. A região do meio foi cortada longitudinalmente em três ou quatro pedaços. As fatias foram preparadas para estudo de JNMs usando reações de esterase não específicas (Lehrer & Ornstein, 1959). As imagens de 50 JNMs foram medidas através do software ImageJ (v1.53) (Schneider et al., 2012) e os seguintes parâmetros foram analisados: área, diâmetro mínimo e máximo, diâmetro de Feret, Feret mínimo, angulação e ângulo de Feret.

As extremidades do músculo sóleo foram fixadas em formol tamponado a 10% por 24h, lavadas em água por 48h, incluídas em Paraplast® (Sigma-Aldrich, San Luis, Missouri, EUA) seccionadas em micrótomo (4 µm) e duas lâminas foram preparados para cada animal em cada grupo experimental.

Um deles foi submetido à coloração de Hematoxilina e Eosina (HE) e aproximadamente 400 fibras musculares foram selecionadas e medidas a partir de 5 campos aleatórios para análise quantitativa. Com o ImageJ, foram analisados área, diâmetro mínimo e máximo, diâmetro de Feret, Feret mínimo, angulação e ângulo de Feret das fibras musculares e contado o número total de núcleos centrais.

A segunda lâmina foi submetida à coloração do Tricrômico de Masson, onde o tecido conjuntivo foi corado em verde e as fibras musculares em vermelho. A quantificação do tecido conjuntivo foi realizada em todo o corte por meio da área e percentual obtidos pelo ImageJ, no qual as áreas em verde foram detectadas automaticamente, por meio da ferramenta Threshold do software.

Análise da expressão de proteínas das junções neuromusculares

Amostras do músculo sóleo direito após o congelamento foram homogeneizadas em RIPA e inibidores de protease (30mg de tecido/ 100µl de tampão de extração). Extratos de tecido foram obtidos por centrifugação por 20 min a 14.000 rpm a 4°C. O teor de proteína foi determinado pelo método de Bradford e o equivalente a 30 microgramas de proteína foi aplicado ao gel de poliacrilamida. Após a eletroforese, as proteínas foram transferidas para membranas de nitrocelulose, que posteriormente foram incubadas com os anticorpos primários: dos nAChRs alpha1 (1:2000, Santa Cruz, sc136130), gama (1:1000, Santa Cruz, sc13998) e epsilon (1:2000, Santa Cruz, sc376747); e das proteínas associadas à formação de clusters de nAChRs: MuSK (1:1000, Bioss, bs6473R) e Rapsyn (1:1000, Santa Cruz, sc58585). Após a lavagem, as membranas foram incubadas por 1h em anticorpo secundário HRP e reveladas com substrato quimioluminescente para Western blotting (Amesham ECL, Sigma-Aldrich, San Luis, Missouri, EUA). A análise de densitometria de banda semiquantitativa foi realizada usando o software ImageJ. Os dados foram normalizados usando os valores GAPDH (1:10000, Cell Signaling, 14C10).

Ensaio da enzima creatina quinase e do colesterol sérico

O ensaio da enzima creatina quinase (CK) foi realizado com um kit comercialmente disponível (CK Kinetic, Bioclin, Quibasa, Minas Gerais, Brasil) e um espectrofotômetro Thermo Electron Corporation Genesys 20 (Krackler Scientific, Albany, Nova York, EUA) de acordo com as instruções do fabricante. A quantificação foi realizada em triplicata com 4 µL de soro para cada animal. Os valores são exibidos como unidades internacionais U/L. Para a análise do colesterol total foram utilizados 4 µL de soro de cada animal para a realização do Método Colorimétrico Enzimático.

Análise morfológica e morfométrica do nervo isquiático

Os nervos foram processados em historesina, seccionados transversalmente em ultramicrotomo (2 μ m, Leica RM2265) e corados com azul de toluidina. As lâminas foram fotografadas (400x, microscópio Olympus Bx41) e as imagens foram obtidas em 5 campos aleatórios. A análise morfométrica consistiu na contagem do número de fibras nervosas íntegras e na mensuração da área e perímetro total do maior fascículo nervoso. Todas as medidas foram realizadas usando o software ImageJ.

Análise estatística

Os dados relativos aos MNJs, ensaio de CK, nervo e fibra muscular foram analisados pelo teste One-Way ANOVA, seguido de um pós-teste de comparações múltiplas de Tukey, com exceção da quantificação do tecido conjuntivo, do número de núcleos centrais e de axônios, o cálculo do peso relativo, que foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis seguido de pós-teste de comparações múltiplas de Dunn. Os valores obtidos pelo teste ANOVAM foram expressos como média $\pm$ SEM e os valores obtidos pelo teste Kruskal-Wallis foram expressos como mediana (mínimo; intervalos máximos). Todos os resultados foram considerados usando o nível de significância de 5% ($p \leq 0,05$).

3. Resultados

As estatinas aumentaram o tamanho das junções neuromusculares

Com relação à morfologia das JNMs, observou-se que, no grupo C (Fig. 2-A), a distribuição das junções estava restrita ao terço médio das fibras musculares, e estas apresentavam uma estrutura compacta, enquanto nos grupos S e R (Fig. 2- B e C) a distribuição foi ampla com as JNMs dispersas além do terço médio. As JNMs do grupo C apresentaram formato regular, circular e pretzel, enquanto os JNMs dos grupos S e R apresentaram maior tamanho e perda da circularidade clássica (Fig. 2- A, B e C: Detalhe).

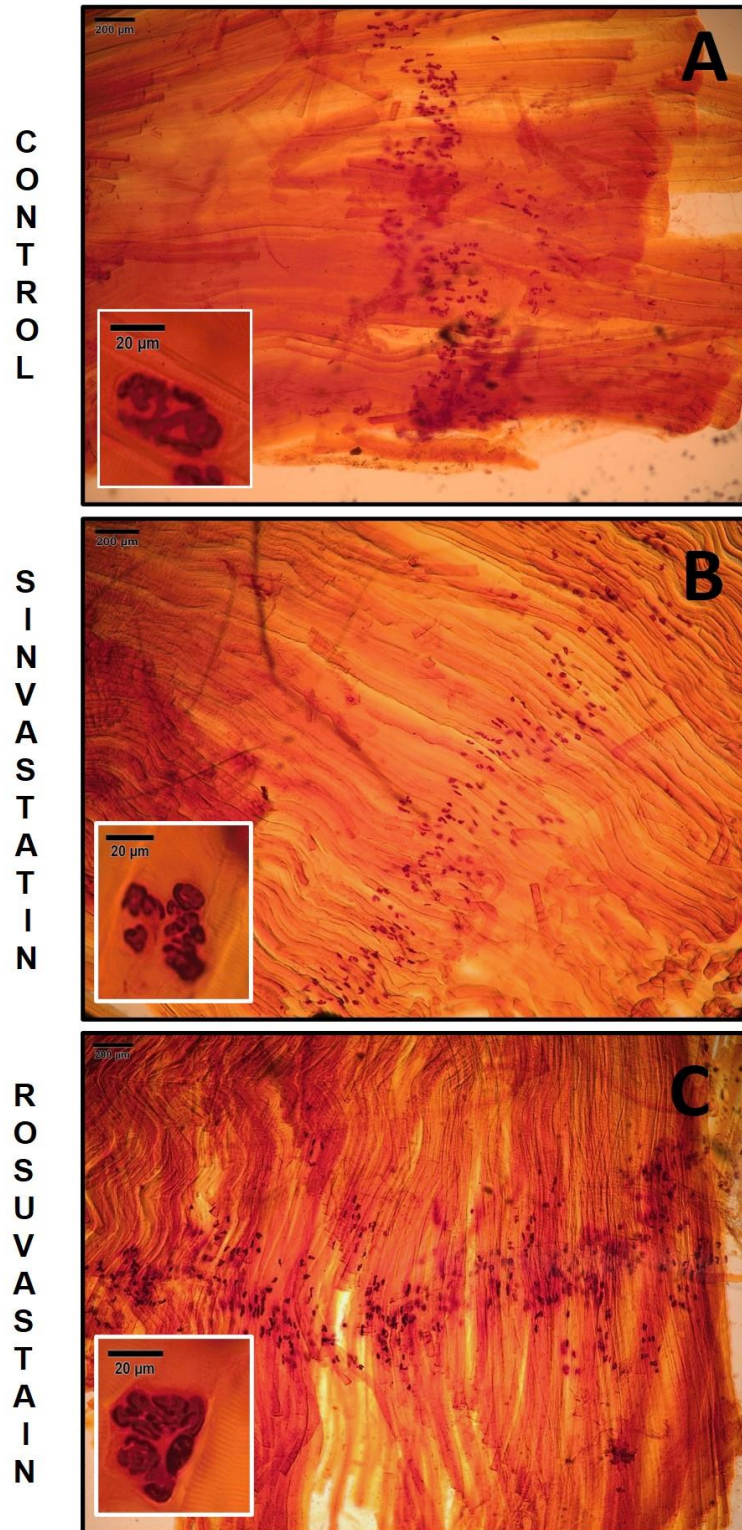


Figura 2: Fotomicrografias das junções neuromusculares do músculo sóleo (terço médio) dos grupos Controle (A), Sinvastatina (B) e Rosuvastatina (C) sob microscopia de luz convencional com aumento de 100x (barra de escala 200 µm) ou em detalhe, sob Ampliação de 400x (barra de escala 20 µm).

Com relação à análise morfométrica das JNMs, observou-se aumento na área (Fig. 3- B), nos diâmetros máximo e mínimo (Fig. 3- D e E), diâmetro Feret (Fig. 3- H) e no Feret mínimo (Fig. 3- I) nos grupos S e R, quando comparados ao grupo C, não havendo diferença entre os grupos tratados com estatinas. Com relação ao perímetro da JNM, ângulo e ângulo de Feret, não houve diferença entre os grupos (Fig. 3- C, F e G).

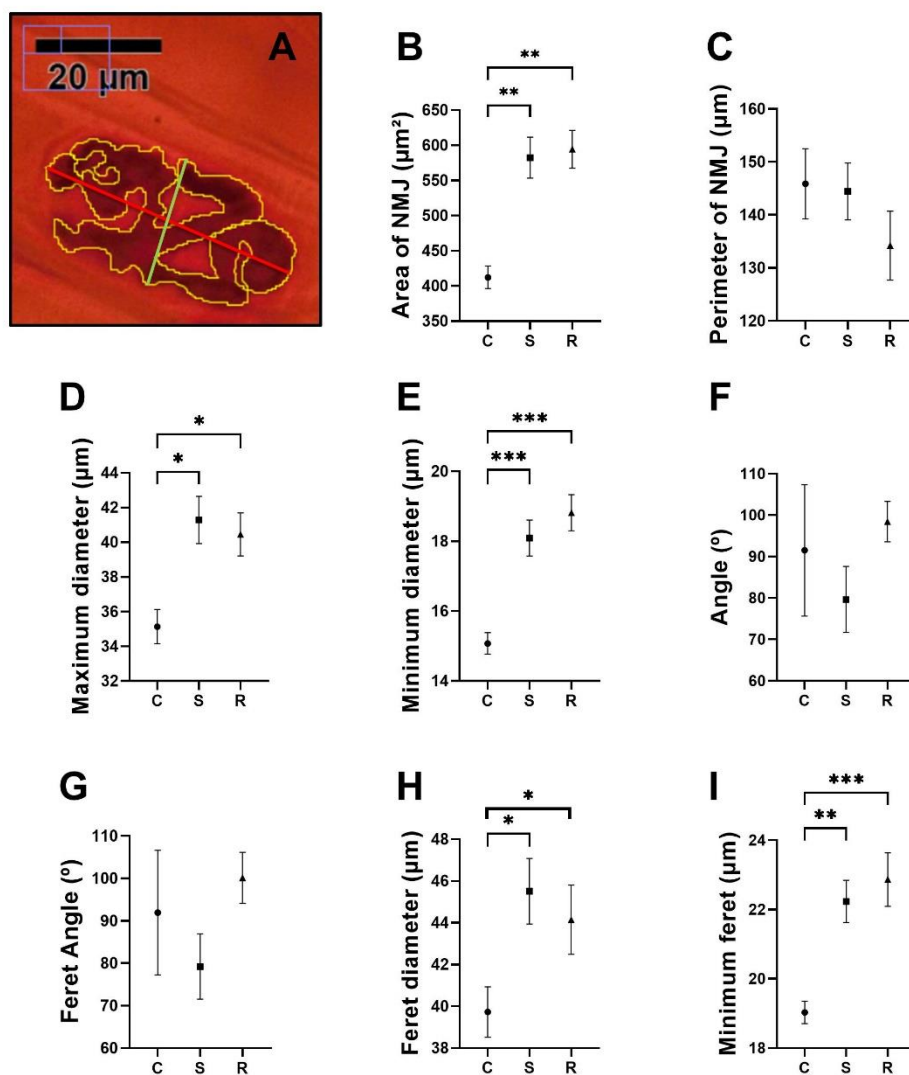


Figura 3: Representação da medida das junções neuromusculares (JNM) (A) e gráficos de análise de área (B), perímetro (C), diâmetro máximo e mínimo (D e E), ângulo (F), ângulo de Feret (G), diâmetro Feret (H) e Feret mínimo (I) de JNMs de todos os grupos experimentais. Os valores são expressos como média e erro padrão da média (SEM), e foram avaliados pelo teste de análise de variância (ANOVA) seguido do teste de Tukey: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. Barra vermelha: medição do diâmetro máximo. Barra verde: medição do diâmetro mínimo.

As estatinas não promoveram alterações na expressão de proteínas

Não houve diferença entre os grupos experimentais quanto à quantificação de proteínas: dos nAChRs epsilon (Fig. 4- A), alpha1 (Fig. 4- B) e gamma (Fig. 4- C) ou das proteínas associadas à formação de clusters de AChRs: Musk (Fig. 4- D) e Rapsyn (Fig. 4- E). Todos os dados foram normalizados pelos valores de GAPDH expressos nas mesmas membranas da proteína analisada (Fig. 4-F).

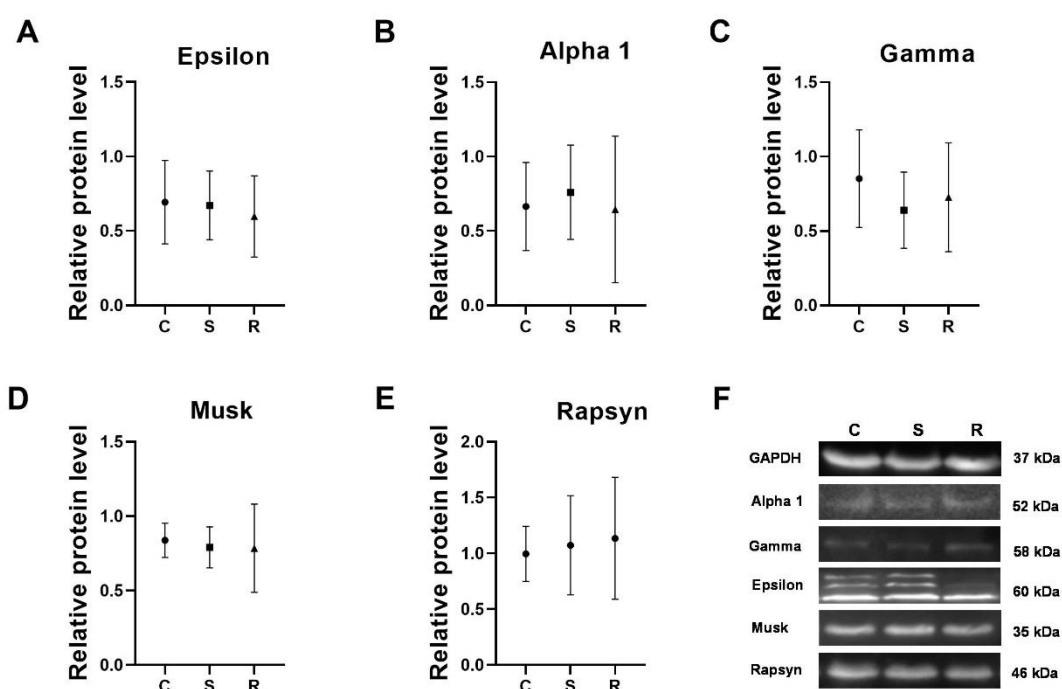


Figura 4: Gráficos de análise de quantificação de proteínas de alpha1 (A), epsilon (B), gamma (C), nAChRs, Musk (D), Rapsyn (E) e marcação de proteínas em membranas (F). Os valores são expressos como média e erro padrão da média (SEM), e foram avaliados pelo teste de análise de variância (ANOVA) seguido do teste de Tukey. C: Grupo controle. S: Grupo Sinvastatina. R: Grupo Rosuvastatina.

As estatinas aumentaram o número de núcleos centrais nas miofibras

A análise morfológica realizada após H.E. A coloração de Masson e o uso da microscopia óptica mostraram, em todos os grupos, fibras musculares

com características compatíveis com a normalidade, com formato poligonal e preservação do endomísio e perimísio (Fig. 5-A-C').

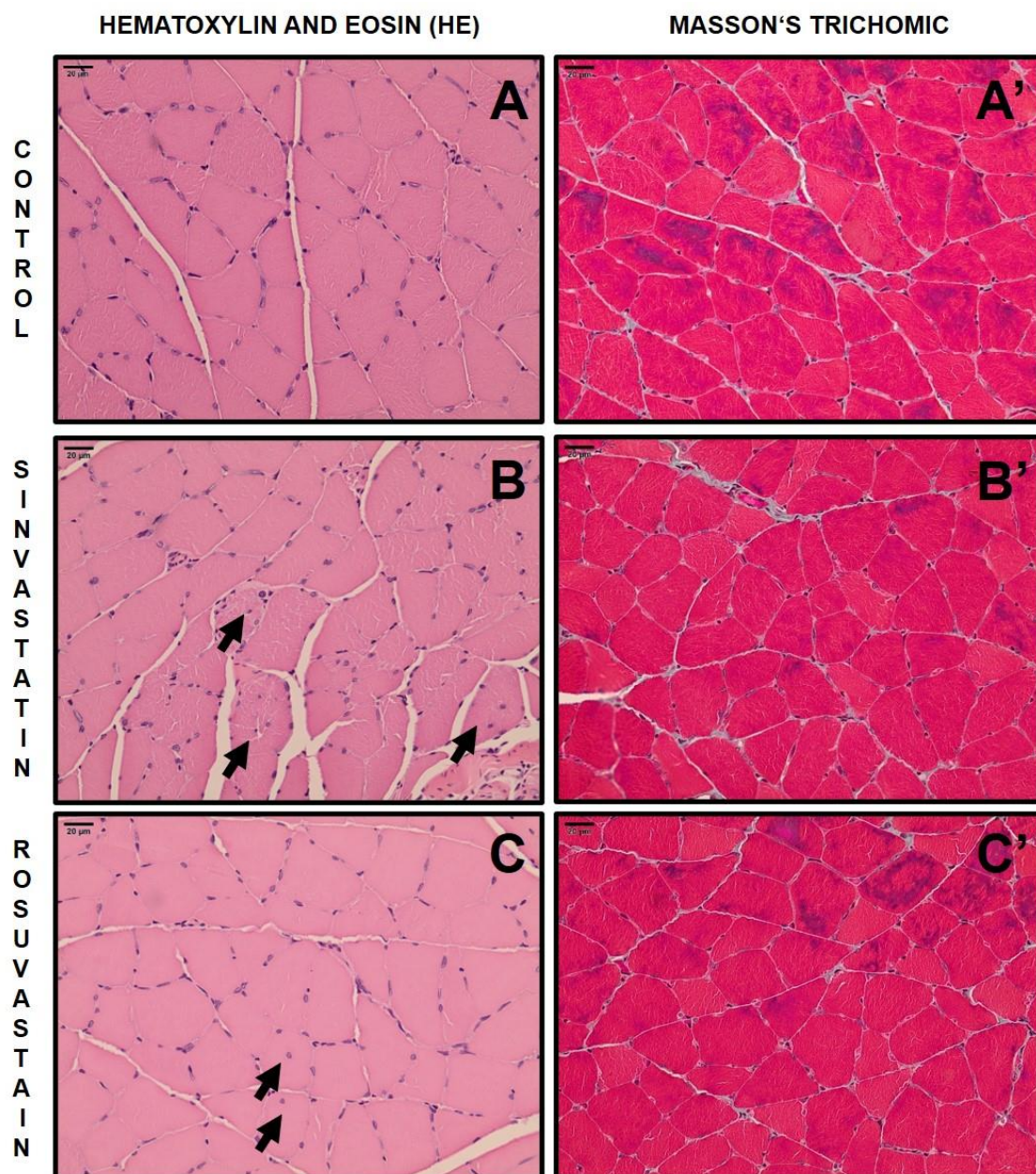


Figura 5: Fotomicrografias de cortes transversais do músculo sóleo corados com hematoxilina e eosina (A-C) e Tricrômico de Masson (A'-C') de cada grupo sob microscopia de luz convencional em aumento de 400x (barra de escala 20 µm). As setas pretas apontam para núcleos centrais.

Com relação à análise morfométrica das fibras musculares, observou-se aumento na contagem de fibras com núcleos centrais, em que os grupos S e R foram estatisticamente diferentes do grupo C (Fig. 6-I), e iguais entre si. Quanto à área (Fig. 6- B), diâmetro máximo e mínimo (Fig. 6- C e D), diâmetro Feret e

Feret mínimo (Fig. 6- E e F), angulação e angulação Feret (Fig. 6- G e H), não foram observadas diferenças entre os grupos experimentais.

A análise quantitativa do colágeno realizada pela coloração de Masson não mostrou diferença estatística entre todos os grupos experimentais para a área relativa (porcentagem) de colágeno intramuscular (Fig. 6-K).

Em relação ao peso relativo do músculo sóleo, que é o peso do músculo sóleo/peso corporal *100, não houve diferenças entre os grupos experimentais (Fig. 6-L).

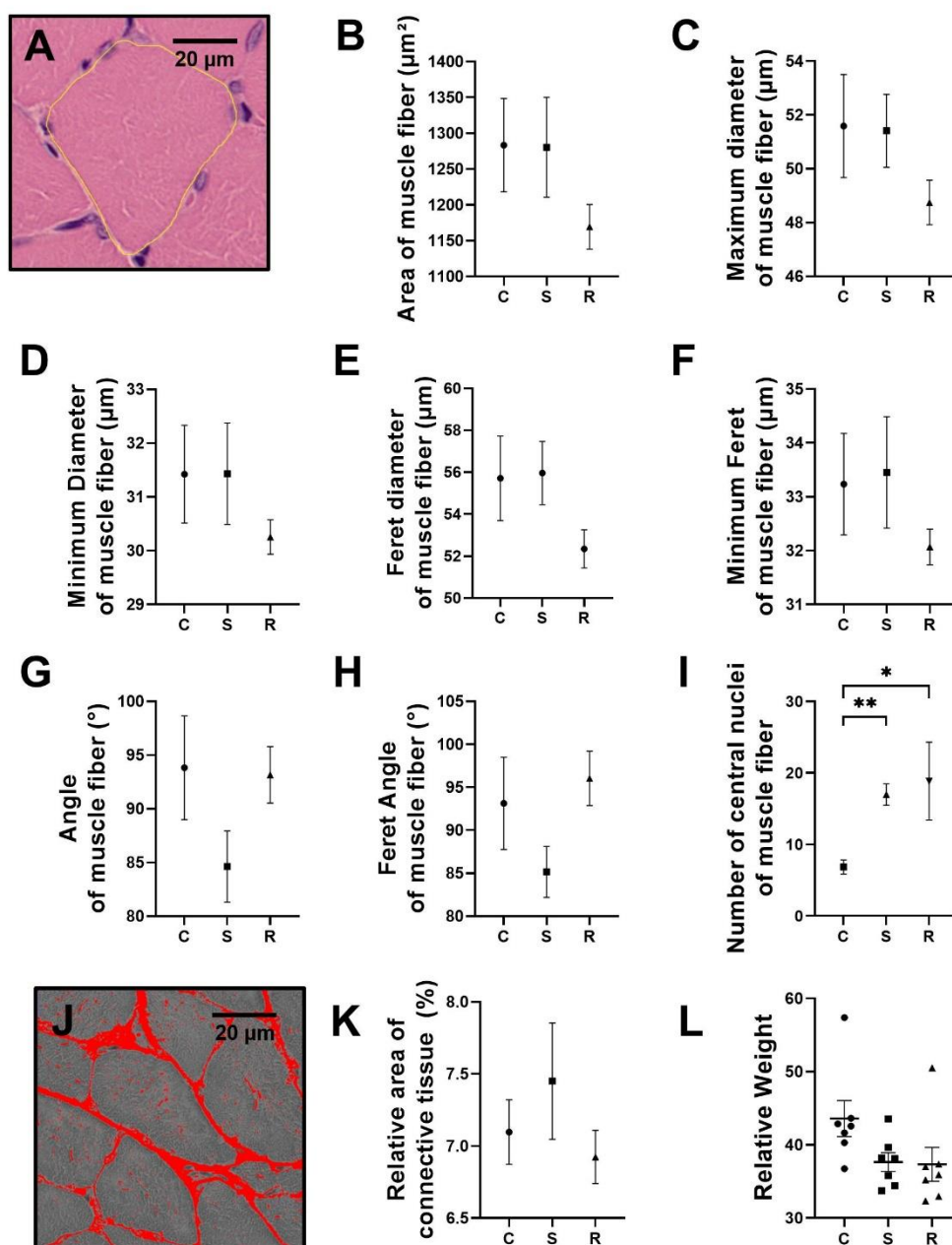


Figura 6: Representação da medição de H.E. fibra muscular corada (A) e gráficos de análise de área (B), diâmetro máximo e mínimo (C e D), diâmetro de Feret e Feret mínimo (E e F), ângulo e ângulo de Feret (G e H), número de núcleos (I) das fibras musculares. Representação da detecção automatizada de colágeno intramuscular (vermelho) (J), área relativa de tecido conjuntivo (K) e peso relativo (L). B-H: Os valores são expressos como média e erro padrão da média (SEM), e foram avaliados pelo teste de análise de variância (ANOVA) seguido do teste de Tukey. I, K e L: Valores expressos em mediana (mínimo; amplitude máxima), e foram avaliados pelo teste de Kruskal-Wallis seguido de pós-teste de comparações múltiplas de Dunn. Os asteriscos indicam variação estatisticamente significativa (* $p < 0,05$; ** $p < 0,001$). C: Grupo controle. S: Grupo Sinvastatina. R: Grupo Rosuvastatina.

As estatinas não alteraram a quantificação sérica de CK ou colesterol

Não houve diferença entre os grupos experimentais quanto à quantificação sérica da enzima CK (Fig. 7-A). Para a análise do colesterol total, todos os grupos experimentais foram semelhantes entre si (Fig. 7-B).

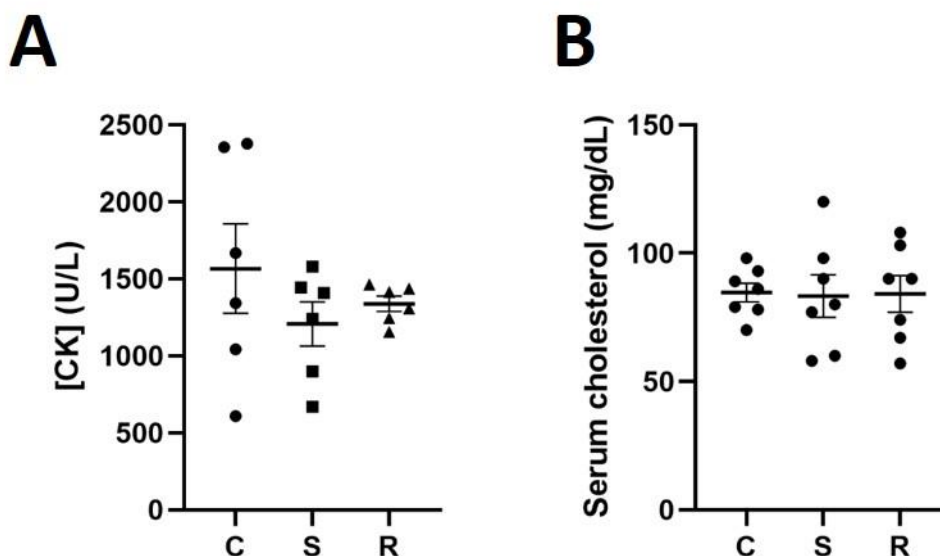


Figura 7: Gráficos de análise do ensaio da enzima creatina quinase sérica (A) e colesterol total sérico (B) de cada grupo. Os valores são expressos como média e erro padrão médio (SEM) e foram avaliados pelo teste de análise de variância (ANOVA) seguido do teste de Tukey. C: Grupo controle. S: Grupo Sinvastatina. R: Grupo Rosuvastatina.

As estatinas não alteraram a histologia do nervo

Através da análise histológica dos nervos ciáticos, fibras nervosas foram observadas em forma e aspectos regulares em todos os grupos experimentais com axônios e bainhas de mielina íntegros (Fig. 8- A-C). Na análise quantitativa, não foram observadas diferenças entre os grupos experimentais quanto ao número total de axônios (Fig. 8- D), área (Fig. 8- E) e perímetro (Fig. 8- F) do fascículo nervoso e à densidade axonal – o número de axônios dividido pela área do nervo – (Fig. 8-G).

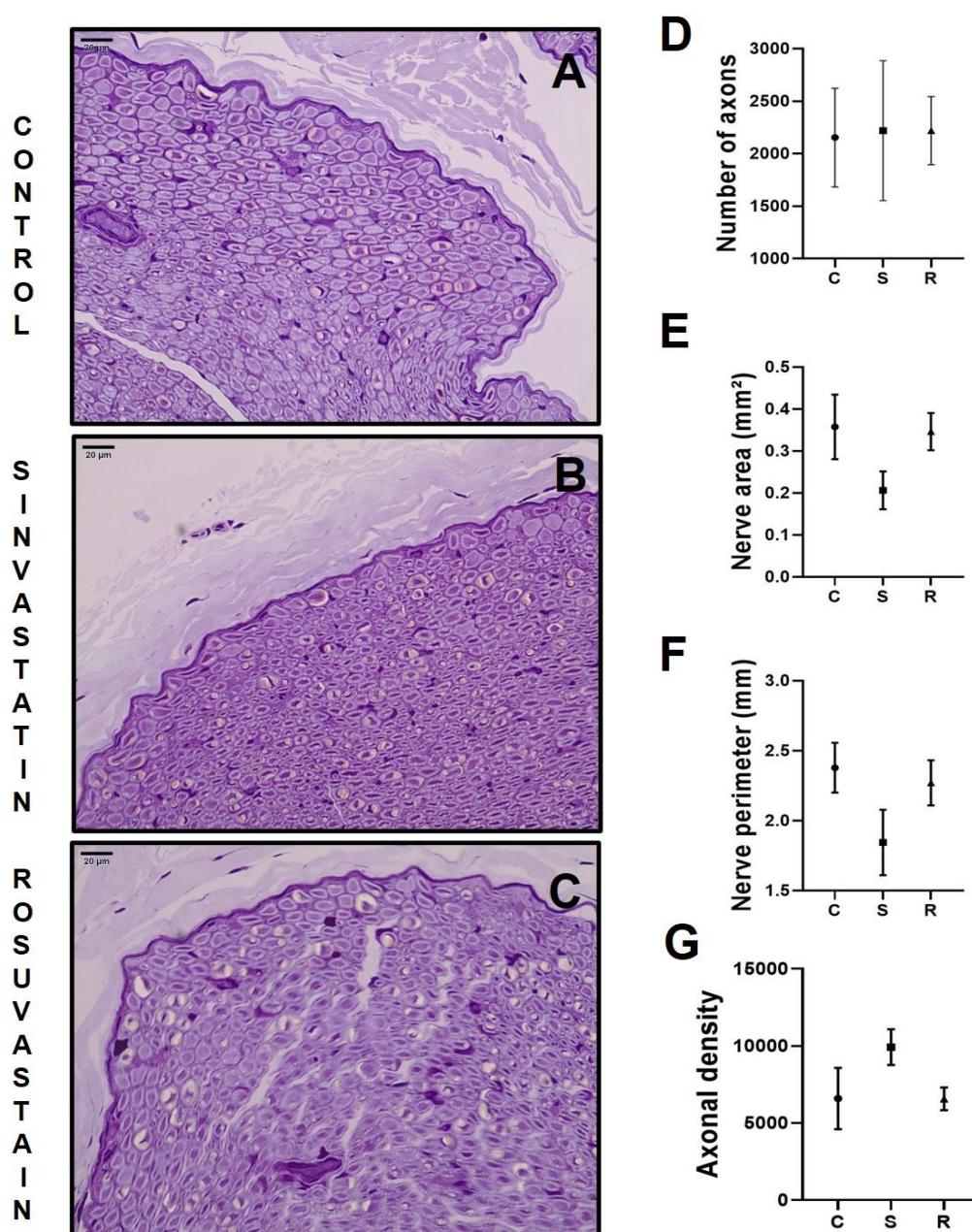


Figura 8: Fotomicrografias de cortes transversais do nervo ciático corados com Azul de Toluidina dos grupos Controle (A), Sinvastatina (B) e Rosuvastatina (C), sob microscopia de luz

convencional com aumento de 400x (barra de escala 20µm). Gráficos de análise da área do nervo (D), perímetro do nervo (E), número de axônios (F) e densidade axonal de todos os grupos experimentais. D: Os valores são expressos como mediana (mínimo; intervalos máximos), e foram avaliados pelo teste de Kruskal-Wallis seguido de pós-teste de comparações múltiplas de Dunn. E-G: Os valores são expressos como média e erro padrão da média (SEM), e foram avaliados pelo teste de análise de variância (ANOVA) seguido do teste de Tukey.

4. Discussão e Conclusão

O colesterol é um dos componentes da membrana plasmática e desempenha um papel importante na manutenção da integridade estrutural da membrana plasmática e na transmissão do sinal transmembrana. A bainha de mielina rica em colesterol funciona como isolante para aumentar a velocidade de condução nervosa (Vance, 2012).

Durante a gravidez, há um aumento progressivo dos níveis de colesterol materno, um lipídio essencial para o crescimento e desenvolvimento fetal. O estudo dos níveis de colesterol materno tornou-se recentemente importante, pois pode contribuir para o processo aterogênico e DCs (Cantin et al, 2020).

As estatinas são terapia de primeira linha para reduzir o colesterol, mas seu uso na gestação é contraindicado devido aos potenciais efeitos adversos. As diretrizes atuais recomendam que todas as mulheres em idade fértil em terapia hipolipemiante recebam aconselhamento pré-gravidez, bem como aconselhamento sobre contracepção (Pang et al, 2020).

Neste trabalho, investigamos as alterações nos tecidos neuromusculares desenvolvidas pelo tratamento gestacional com estatinas e seus desfechos em ratas Wistar pós-parto. Embora não tenhamos encontrado diferenças na expressão de proteínas, chama a atenção o alargamento e perda de circularidade na morfologia dos JNMs dos grupos tratados com estatinas, além do aumento de fibras com núcleos centrais encontrados nos mesmos grupos.

Existem poucas técnicas não invasivas para diagnosticar com precisão SAMS (Taylor et al., 2018; Attardo et al., 2022). O biomarcador mais utilizado é

a enzima CK, comumente empregada como marcador de dano muscular (Goldstein, 2017). Nossos resultados mostraram que não houve diferenças entre os grupos quanto aos valores de CK. Embora possa aparecer a qualquer momento durante o tratamento com estatinas, há uma tendência de elevação da CK entre os primeiros a 6 meses após o início do tratamento (Cham et al., 2010). No entanto, devido à dificuldade de avaliação do SAMS, existe um consenso clínico de que o SAMS pode ocorrer mesmo na ausência de elevação dessa proteína (Gras-Champel et al., 2019).

Exames de ressonância magnética de membros inferiores de pacientes acometidos por miopatia, incluindo anticorpos anti-HMG-CoA, cuja presença sugere SAMS, revelaram edema muscular generalizado da musculatura acometida, infiltração gordurosa por inflamação e necrose das fibras (Crisan et al., 2020; Pinal-Fernandez et al., 2017). Em modelos experimentais, a diminuição do peso muscular e da área das fibras musculares podem atuar como possíveis indicadores de degeneração muscular (Muller et al., 2007), enquanto a infiltração e proliferação de tecido conjuntivo intramuscular pode levar à diminuição da capacidade de contração muscular sendo indicadores de fraqueza muscular (Savolainen et al., 1988).

Em nossa análise do tecido muscular, não foram encontradas diferenças entre os grupos experimentais em relação ao peso muscular, peso relativo, morfologia das fibras musculares e morfometria incluindo área relativa de tecido conjuntivo. Alterações desses parâmetros são esperadas em lesões mais graves, como casos de desnervação (Leite et al., 2019), e menos comuns em tratamentos medicamentosos, principalmente em períodos mais curtos de uso.

No entanto, encontramos diferenças estatísticas na contagem de núcleos centrais, onde houve aumento do número, nos grupos S e R quando comparados ao grupo C. Regularmente, os mionúcleos ocupam a periferia das miofibrilas, enquanto em condições patológicas a presença de núcleos mais centrais é observada (Folker & Baylies, 2013). Núcleos centrais geralmente aparecem nas fibras musculares esqueléticas após danos induzidos por uma variedade de lesões, incluindo exposição a drogas miotóxicas (Pissulin et al.,

2017). Assim, o posicionamento nuclear também é comumente usado como um marcador morfológico de alteração (Folker & Baylies, 2013). O aumento do número de mionúcleos centrais nos grupos S e R pode estar relacionado ao desenvolvimento, em estágio inicial, de uma miopatia, ou mesmo aos sintomas leves observados na SAMS, como câibras e dores musculares (Folker & Baylies, 2013).

Os mionúcleos desempenham um papel fundamental no desenvolvimento e manutenção dos JNMs, estando no rearranjo do citoesqueleto e na formação de aglomerados de nAChRs (Englander & Rubin, 1987). Os genes que codificam várias proteínas sinápticas, incluindo nAChRs, AChE e Musk, são expressos por mionúcleos específicos, que se agregam próximo ao local sináptico (Jevsek & Burden, 2006). Essas proteínas são encontradas no sarcolema das fibras musculares e são produzidas no núcleo sináptico dos JNMs (Rodriguez et al., 2020), com papel essencial na formação dos agrupamentos de nAChRs e no desenvolvimento da zona ativa presente na membrana pré-sináptica (Paz & Barrantes, 2021).

As junções saudáveis apresentam uma forma comum de “pretzel” (Sanes & Lichtman, 2001), desvios dessa circularidade, como observado nos grupos S e R, são sugestivos de remodelação, que pode não estar diretamente associada à centralização dos mionúcleos, mas sim a alterações na manutenção de nAChRs ou outras proteínas estruturais. É importante ressaltar que a técnica utilizada neste trabalho para evidenciar os JNMs foi a “esterase inespecífica” (Lehrer & Ornstein, 1959). Essa técnica baseia-se na marcação de sítios de esterase positivos, que contém ACh, levando à evidenciação de regiões pré e pós-sinápticas e também da fenda sináptica, permitindo a visualização de toda a morfologia da JNM.

Portanto, técnicas “específicas” de marcação de nAChRs, como a α -bungarotoxina (Nirthanan, 2020), teriam possibilitado uma melhor visualização e compreensão do possível remodelamento desses receptores. Além disso, o aumento dos JNMs pode estar relacionado a outras proteínas do composto celular, além dos nAChRs (Rodriguez et al., 2020; Zelada et al., 2021).

Outro ponto a considerar é que nossas ratas prenhes foram tratadas do 8º ao 20º dia de gestação. A coleta do material biológico ocorreu no 21º dia após a gestação, coincidindo com o desmame. Já se sabe que o JNMs é uma estrutura altamente plástica (Zelada et al., 2021; Tintignac et al., 2015) e que se remodela rapidamente diante de diferentes estímulos. É possível que tenha ocorrido um retorno molecular das proteínas envolvidas com os JNMs, sem tempo suficiente para o retorno morfológico dos JNMs. Outro estudo publicado por nosso grupo de pesquisa observou ocorrência semelhante diante da denervação (Pinto et al., 2021).

Nossa análise de colesterol total mostrou resultados semelhantes entre os grupos, o que destaca que nossos resultados de JNMs estão relacionados ao tratamento com estatinas e não a uma diminuição do colesterol sérico, de forma tóxica.

As alterações na associação dos complexos proteicos nAChRs e JNMs têm uma associação direta com a lâmina basal e os componentes do citoesqueleto do músculo estriado esquelético alvo (Sanes & Lichtman, 2001). Proteínas extracelulares, como lamininas, que podem estimular o agrupamento de nAChRs (Montanaro et al., 1998) e Nidogen-2, que conecta redes de laminina e colágeno ao citoesqueleto (Fox et al., 2008) também são essenciais para a modelagem clássica do JNMs (Rodriguez et al., 2020). Essas proteínas já foram comprovadamente alteradas pela terapia com estatinas (Baker, 2005; Gauthaman et al., 2009; Wei et al., 2022) em estudos moleculares e in vitro, e levantamos a hipótese de que isso também poderia influenciar a morfologia do JNMs.

Os nAChRs estando no topo das dobras juncionais do sarcolema são fundamentais para a excitação da membrana. Jangadas lipídicas e colesterol também desempenham um papel fundamental para sua aglomeração e estabilização (Paz & Barrantes, 2021). Os componentes extracelulares do aparelho pós-sináptico e as proteínas periféricas da membrana, como Rapsyn, Musk e os nAChRs, são enriquecidos em microdomínios lipídicos preparados a partir de miotubos selvagens nos quais o colesterol é fundamental para a funcionalidade do JNMs (Willman et al., 2006; Tintignac et al., 2015).

Como efeito pleiotrópico das estatinas, os intermediários isoprenóides também são diretamente afetados pelo uso das estatinas, pois inibem a síntese do ácido L-mevalônico (Liao, 2002). Eles servem como anexos lipídicos para uma variedade de moléculas de sinalização intracelular e já estão associados à miotoxicidade induzida por estatinas (Baker, 2005; Sakamoto & Kimura, 2013).

Como a prática clínica adota diferentes dosagens e períodos de tratamento com estatinas, outros períodos experimentais também precisam ser explorados, dada a grande variação desses aspectos nos diagnósticos de SAMS. Outros estudos já demonstraram efeitos adversos das estatinas no músculo liso, onde as exposições a essa droga foram relacionadas a alterações nos padrões uterinos basais e de contração induzida em ratas grávidas e não grávidas (de Barros et al., 2022). A resposta do tratamento em outros músculos estriados, com fibras glicolíticas e/ou intermediárias, em oposição ao músculo sóleo (fibras oxidativas), deve ser investigada, pois o SAMS afeta uma ampla gama de músculos esqueléticos, desde os membros posteriores até os membros superiores (Taylor et al., 2018).

Além disso, diante dos nossos resultados, chama-se a atenção também para as pacientes regulares, não grávidas, que fazem tratamento com estatinas. A patogênese da SAMS em um aparelho neuromuscular não gravídico ainda não é profundamente investigada e mais estudos são necessários para esclarecer o desenvolvimento e as consequências da SAMS.

Outro ponto relevante é a análise da HMG-CoA redutase (HMGCR), que é o alvo das estatinas e do LDL-colesterol, consideradas limitações deste estudo. Essas análises devem ser exploradas em estudos futuros, além de períodos prolongados de tratamento, testes funcionais e outras expressões de proteínas relevantes, para contribuir para o melhor entendimento da fisiopatologia da SAMS.

Neste estudo, demonstramos que a exposição gestacional às estatinas induziu alterações na morfologia dos JNMs pós-parto no músculo sóleo, independentemente do nível de colesterol sérico. Essas alterações podem indicar uma possível relação com o desenvolvimento e progressão da SAMS observada na prática clínica.

5. Referências Bibliográficas

Attardo S, Musumeci O, Velardo D, Toscano A. Statins Neuromuscular Adverse Effects. *Int J Mol Sci.* 2022; 23(15).

Avis, B.A. Hutten, M.T. Twickler, J.J. Kastelein, J.A. van der Post, A. F. Stalenhoef, et al., Pregnancy in women suffering from familial hypercholesterolemia: a harmful period for both mother and newborn? *Curr. Opin. Lipidol.* 2009; 484–490.

Baker SK. Molecular clues into the pathogenesis of statin-mediated muscle toxicity. *Muscle Nerve.* 2005;31(5):572-80.

Bermudez, V., S. S. Antollini, G. A. Fernandez Nievas, M. I. Avelldano, and F. J. Barrantes. Partition profile of the nicotinic acetylcholine receptor in lipid domains upon reconstitution. *J Lipid Res.* 2010; 51 (9):2629-2641.

Borroni, V., and F. J. Barrantes. Cholesterol modulates the rate and mechanism of acetylcholine receptor internalization. *J Biol Chem.* 2011; 286 (19):17122-17132.

Brizzi, G. Tonolo, F. Esposito, L. Puddu, S. Dessole, M. Maioli, et al., Lipoprotein metabolism during normal pregnancy. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 1999; 430–434

Brown HL, Warner JJ, Gianos E, Gulati M, Hill AJ, Hollier LM, Rosen SE, Rosser ML, Wenger NK; American Heart Association, the American College of Obstetricians and Gynecologists . Promoting risk identification and reduction of cardiovascular disease in women through collaboration with obstetricians and gynecologists: a presidential advisory from the American Heart Association and the American College of Obstetricians and Gynecologists. *Circulation.* 2018; 137:e843–e852.

Bruckert E, Hayem G, Dejager S, Yau C, Bégaud B. Mild to moderate muscular symptoms with high-dosage statin therapy in hyperlipidemic patients--the PRIMO study. *Cardiovasc Drugs Ther.* 2005;19(6):403-14.

Cantin C, Fuenzalida B, Leiva A. Maternal hypercholesterolemia during pregnancy: Potential modulation of cholesterol transport through the human placenta and lipoprotein profile in maternal and neonatal circulation. *Placenta.* 2020 May; 94:26-33

Cham S, Evans MA, Denenberg JO, Golomb BA. Statin-associated muscle-related adverse effects: a case series of 354 patients. *Pharmacotherapy.* 2010;30(6):541-53.

Chan J, Hui RL, Levin E. Differential association between statin exposure and elevated levels of creatine kinase. *Ann Pharmacother.* 2005;39(10):1611-6.

Chan J, Hui RL, Levin E. Differential association between statin exposure and elevated levels of creatine kinase. *Ann Pharmacother.* 2005;39(10):1611–6.

Changeux JP, Edelstein SJ. Allosteric receptors after 30 years. *Neuron.* 1998; 21(5):959-80. doi: 10.1016/s0896-6273(00)80616-9. PMID: 9856454.

Chong PH, Boskovich A, Stevkovic N, Bartt RE. Statin-associated peripheral neuropathy: review of the literature. *Pharmacotherapy.* 2004;24(9):1194-203.

Cibičková, L. Statins and their influence on brain cholesterol. *J Clin Lipidol.* 2011; 5 (5):373- 379

Crisan E, Patil VK. Neuromuscular Complications of Statin Therapy. *Curr Neurol Neurosci Rep*. 2020;20(10):47.

Crisan, E., & Patil, V. K. Neuromuscular Complications of Statin Therapy. *Current Neurology and Neuroscience Reports*. 2020; 20(10), 1–7.

de Barros JWF, Villela E Silva P, da Silva GV, da Silva KP, Borges CDS, Mueller A, et al. Rosuvastatin exposure in female Wistar rats alters uterine contractility and do not show evident (anti)estrogenic effects. *Drug Chem Toxicol*. 2022;45(5):2233-45.

E. Herrera, Lipid metabolism in pregnancy and its consequences in the fetus and newborn. *Endocrine*. 2002; 43–55.

Englander LL, Rubin LL. Acetylcholine receptor clustering and nuclear movement in muscle fibers in culture. *J Cell Biol*. 1987;104(1):87-95.

FERRI, N.; CORSINI, A. Clinical evidence of statin therapy in non-dyslipidemic disorders. *Pharmacological Research*. 2014; v. 88, p. 20–30.

Folker ES, Baylies MK. Nuclear positioning in muscle development and disease. *Front Physiol*. 2013;4:363.

Fox MA, Ho MS, Smyth N, Sanes JR. A synaptic nidogen: developmental regulation and role of nidogen-2 at the neuromuscular junction. *Neural Dev*. 2008;3:24.

Gale J, Danesh-Meyer HV. Statins can induce myasthenia gravis. *J Clin Neurosci*. 2014;21(2):195-7.

Gauthaman K, Manasi N, Bongso A. Statins inhibit the growth of variant human embryonic stem cells and cancer cells in vitro but not normal human embryonic stem cells. *Br J Pharmacol*. 2009;157(6):962-73.

Girardi G. Can statins prevent pregnancy complications? *J Reprod Immunol*. 2014;101-102:161-7.

GIRARDI, G. Can statins prevent pregnancy complications? *Journal of Reproductive Immunology*. 2014; v. 101–102, p. 161–167

Goldstein RA. Skeletal Muscle Injury Biomarkers: Assay Qualification Efforts and Translation to the Clinic. *Toxicol Pathol*. 2017;45(7):943-51.

Gras-Champel V, Batteux B, Masmoudi K, Liabeuf S. Statin-induced myasthenia: A disproportionality analysis of the WHO's VigiBase pharmacovigilance database. *Muscle Nerve*. 2019;60(4):382-6.

Grouleff, J.; Irudayam, S.J.; Skeby, K.K.; Schiøtt, B. The influence of cholesterol on membrane protein structure, function, and dynamics studied by molecular dynamics simulations. *Biochim. Biophys. Acta*. 2015; pg. 1783–1795.

Gu Q, Paulose-Ram R, Burt VL, Kit BK. Prescription cholesterol-lowering medication use in adults aged 40 and over: United States, 2003-2012. *NCHS Data Brief*. 2014;(177):1-8.

Gu Q, Paulose-Ram R, Burt VL, Kit BK. Prescription Cholesterol-lowering medication use in adults aged 40 and over: United States, 2003-2012. *NCHS Data Brief*. 2014;(177):1-8

Jacobson TA, Cheeley MK, Jones PH, La Forge R, Maki KC, López JAG, et al. The Statin Adverse Treatment Experience Survey: Experience of patients reporting side effects of statin therapy. *J Clin Lipidol*. 2019;13(3):415-24.

Jacobson TA, Cheeley MK, Jones PH, La Forge R, Maki KC, López JAG, et al. The Statin adverse treatment experience survey: experience of patients reporting side effects of statin therapy. *J Clin Lipidol*. 2019;13(3):415–24.

Jevsek M, Burden SJ. Microarray screen for synaptic genes in the neuromuscular junction. *J Mol Neurosci*. 2006;30(1-2):29-30.

Karalis DG, Hill AN, Clifton S, Wild RA. The risks of statin use in pregnancy: A systematic review. *J Clin Lipidol*. 2016;10(5):1081-90.

KARLSON, B. W. et al. Doses of rosuvastatin, atorvastatin and simvastatin that induce equal reductions in LDL-C and non-HDL-C: Results from the VOYAGER meta-analysis. *European Journal of Preventive Cardiology*. 2016; v. 23, n. 7, p. 744–747.

Keogh MJ, Findlay JM, Leach S, Bowen J. Statin-associated weakness in myasthenia gravis: a case report. *J Med Case Rep*. 2010;4:61.

Krivoi, I. I., & Petrov, A. M. Cholesterol and the safety factor for neuromuscular transmission. *International Journal of Molecular Sciences*. 2019; 20(5).

Lacomis D. What's in the Neuromuscular Junction Literature? *J Clin Neuromuscul Dis*. 2020;21(4):195-204.

LEHRER GM, ORNSTEIN L. A diazo coupling method for the electron microscopic localization of cholinesterase. *J Biophys Biochem Cytol*. 1959;6:399-406.

Leite APS, Pinto CG, Tibúrcio FC, Sartori AA, de Castro Rodrigues A, Barraviera B, et al. Heterologous fibrin sealant potentiates axonal regeneration after peripheral nerve injury with reduction in the number of suture points. *Injury*. 2019;50(4):834-47.

Liao JK. Isoprenoids as mediators of the biological effects of statins. *J Clin Invest*. 2002;110(3):285-8.

Mammen AL, Amato AA. Statin myopathy: a review of recent progress. *Curr Opin Rheumatol*. 2010;22(6):644-50.

Mammen AL, Amato AA. Statin myopathy: a review of recent progress. *Current Opinion in Rheumatology*. 2010; 22:644–50.

Montanaro F, Gee SH, Jacobson C, Lindenbaum MH, Froehner SC, Carbonetto S. Laminin and alpha-dystroglycan mediate acetylcholine receptor aggregation via a MuSK-independent pathway. *J Neurosci*. 1998;18(4):1250-60.

Muller FL, Song W, Jang YC, Liu Y, Sabia M, Richardson A, et al. Denervation-induced skeletal muscle atrophy is associated with increased mitochondrial ROS production. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2007;293(3):R1159-68.

Newman CB, Preiss D, Tobert JA, Jacobson TA, Page RL, Goldstein LB, et al. Statin Safety and Associated Adverse Events: A Scientific Statement From the American Heart Association. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2019;39(2):e38-e81.

Nirthanan S. Snake three-finger α -neurotoxins and nicotinic acetylcholine receptors: molecules, mechanisms and medicine. *Biochem Pharmacol.* 2020;181:114168.

Oh SJ, Dhall R, Young A, Morgan MB, Lu L, Claussen GC. Statins may aggravate myasthenia gravis. *Muscle Nerve.* 2008;38(3):1101-7.

Organização Mundial da Saúde | Cardiovascular Diseases (CVDs). [https://www.who.int/newsroom/factsheets/detail/cardiovascular-diseases-\(cvds\)](https://www.who.int/newsroom/factsheets/detail/cardiovascular-diseases-(cvds)). Acessado em 17/02/2021.

Pang J, Chan DC, Watts GF. The Knowns and Unknowns of Contemporary Statin Therapy for Familial Hypercholesterolemia. *Curr Atheroscler Rep.* 2020;22(11):64.

Parmar B, Francis PJ, Ragge NK. Statins, fibrates, and ocular myasthenia. *Lancet.* 2002;360(9334):717.

Pasutharnchat N, Phanthumchinda K. Statin-associated myasthenic weakness. *J Med Assoc Thai.* 2011;94(2):256-8.

PATEL, M.; KOTHARI, C. Critical review of statins: A bio-analytical perspective for therapeutic drug monitoring. *TrAC Trends in Analytical Chemistry.* 2017; v. 86, p. 206–221.

Paz ML, Barrantes FJ. Cholesterol in myasthenia gravis. *Arch Biochem Biophys.* 2021;701:108788.

Perak AM, Lancki N, Kuang A, Labarthe DR, Allen NB, Shah SH, Lowe LP, Grobman WA, Lawrence JM, Lloyd-Jones DM, Lowe WL Jr, Scholtens DM; HAPO Follow-Up Study Cooperative Research Group. Associations of Maternal Cardiovascular Health in Pregnancy With Offspring Cardiovascular Health in Early Adolescence. *JAMA.* 2021 16;325(7):658-668. doi: 10.1001/jama.2021.0247

Pinal-Fernandez I, Casal-Dominguez M, Carrino JA, Lahouti AH, Basharat P, Albayda J, et al. Thigh muscle MRI in immune-mediated necrotising myopathy: extensive oedema, early muscle damage and role of anti-SRP autoantibodies as a marker of severity. *Ann Rheum Dis.* 2017;76(4):681-7.

Pinto CG, Leite APS, Sartori AA, Tibúrcio FC, Barraviera B, Junior RSF, et al. Heterologous fibrin biopolymer associated to a single suture stitch enables the return of neuromuscular junction to its mature pattern after peripheral nerve injury. *Injury.* 2021;52(4):731-7.

Pissulin CN, de Souza Castro PA, Codina F, Pinto CG, Vechetti-Junior IJ, Matheus SM. GaAs laser therapy reestablishes the morphology of the NMJ and nAChRs after injury due to bupivacaine. *J Photochem Photobiol B.* 2017;167:256-63.

Purvin V, Kawasaki A, Smith KH, Kesler A. Statin-associated myasthenia gravis: report of 4 cases and review of the literature. *Medicine (Baltimore).* 2006;85(2):82-5.

Rodríguez Cruz PM, Cossins J, Beeson D, Vincent A. The Neuromuscular Junction in Health and Disease: Molecular Mechanisms Governing Synaptic Formation and Homeostasis. *Front Mol Neurosci.* 2020;13:610964.

ROSS, J. L. Statins in the Management of Pediatric Dyslipidemia. *Journal of Pediatric Nursing.* 2016; v.31, n. 6, p. 723–735

Sakamoto K, Kimura J. Mechanism of statin-induced rhabdomyolysis. *J Pharmacol Sci.* 2013;123(4):289-94.

Sanes JR, Lichtman JW. Induction, assembly, maturation and maintenance of a postsynaptic apparatus. *Nat Rev Neurosci*. 2001;2(11):791-805.

Savolainen J, Myllylä V, Myllylä R, Vihko V, Väänänen K, Takala TE. Effects of denervation and immobilization on collagen synthesis in rat skeletal muscle and tendon. *Am J Physiol*. 1988;254(6 Pt 2):R897-902.

Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods*. 2012;9(7):671-5.

Scripko PD, Amato AA, Puig A. Mystery case: a 63-year-old man with progressive proximal pain and weakness. *Neurology*. 2014;82(4):e26-9.

Sodero, A. O., and F. J. Barrantes. Pleiotropic effects of statins on brain cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes*. 2020; 1862 (9):183340.

Taylor BA, Thompson PD. Statin-Associated Muscle Disease: Advances in Diagnosis and Management. *Neurotherapeutics*. 2018;15(4):1006-17.

Thompson PD, Panza G, Zaleski A, Taylor B. Statin-Associated Side Effects. *J Am Coll Cardiol*. 2016;67(20):2395-410.

Tintignac LA, Brenner HR, Rüegg MA. Mechanisms Regulating Neuromuscular Junction Development and Function and Causes of Muscle Wasting. *Physiol Rev*. 2015;95(3):809-52.

Vahedian-Azimi A, Makvandi S, Banach M, Reiner Ž, Sahebkar A. Fetal toxicity associated with statins: A systematic review and meta-analysis. *Atherosclerosis*. 2021;327:59-67.

VAN DER WULP, M. Y. M.; VERKADE, H. J.; GROEN, A. K. Regulation of cholesterol homeostasis. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 2010; v. 368, n. 1, p. 1–16, 10.

Waters DD. Safety of high-dose atorvastatin therapy. *Am J Cardiol*. 2005;96(5A):69F-75F.

Wei J, Huan Y, Heng Z, Zhao C, Jia L, Yu Y, et al. Dynamic urine proteome changes in a rat model of simvastatin-induced skeletal muscle injury. *J Proteomics*. 2022;254:104477.

Willmann R, Pun S, Stallmach L, Sadasivam G, Santos AF, Caroni P, et al. Cholesterol and lipid microdomains stabilize the postsynapse at the neuromuscular junction. *EMBO J*. 2006;25(17):4050-60.

Zarek, J., Delano, K. E., Nickel, C., Laskin, C. A., & Koren, G. Are statins teratogenic in humans? Addressing the safety of statins in light of potential benefits during pregnancy. *Expert Review of Obstetrics & Gynecology*. 2013, 8(6), 513–524. doi:10.1586/17474108.2013.842684

Zelada D, Bermedo-García F, Collao N, Henríquez JP. Motor function recovery: deciphering a regenerative niche at the neuromuscular synapse. *Biol Rev Camb Philos Soc*. 2021;96(2):752-66.