



# ANÁLISE DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DA ROSUVASTATINA CONTRA BACTÉRIAS ORAIS

\*Jéssica de Andrade Moreno<sup>1</sup>, Rafaela Durrer Parolina de Carvalho<sup>2</sup>, Karina Cogo-Müller<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup> Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas, Piracicaba -SP

<sup>2</sup> Departamento de Ciências Fisiológicas  
, Universidade Estadual de Campinas, Piracicaba –SP

<sup>3</sup> Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual de Campinas, Campinas -SP

## Resumo

A doença periodontal resulta de uma complexa interação entre o biofilme subgengival e eventos imunoinflamatórios do hospedeiro que se desenvolvem nos tecidos gengivais e periodontais, em resposta ao desafio apresentado pelas bactérias. As estatinas são fármacos utilizados para o tratamento de hiperlipidemia e prevenção de doenças cardiovasculares, que possuem efeitos pleiotrópicos, dentre eles, o efeito antimicrobiano. O objetivo deste estudo foi investigar o efeito antimicrobiano da rosuvastatina nas bactérias patogênicas da microbiota oral: *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Fusobacterium nucleatum*, *Actinomyces odontolyticus*, *Actinomyces naeslundii*, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus sanguinis* e *Streptococcus gordonii*. Para isso, foi realizado o ensaio de Concentração Inibitória Mínima (CIM) e ensaio de associação (checkerboard assay) com metronidazol e amoxicilina para investigar uma possível interação com essas drogas. A concentração inibitória mínima (CIM) foi determinada pelo método de microdiluição em placas de 96 poços como descrito pelo Clinical and Laboratory Standards Institute. Os experimentos foram realizados em triplicata em três momentos distintos. A rosuvastatina apresentou atividade antimicrobiana apenas para *P. gingivalis* W83 e ATCC 33277 e em alta concentração, com valor de CIM na faixa de 400 µg/mL; porém não apresentou atividade antimicrobiana nas demais bactérias testadas. Houve interação sinérgica entre rosuvastatina e metronidazol para *P. gingivalis* ATCC 33277, com CIM de 100 µg/mL para rosuvastatina e entre 0,097 a 0,048 µg/mL para metronidazol, reduzindo os valores de CIM de 3 a 4 vezes. Desse modo, concluiu-se que a rosuvastatina apresenta atividade antimicrobiana contra *P. gingivalis*, com possível interação sinérgica com metronidazol.

**Palavras-chave:** Rosuvastatina, estatinas, antimicrobianos.

## INTRODUÇÃO

As estatinas são fármacos mundialmente empregados para o tratamento de hiperlipidemia. Estudos anteriores demonstraram que as estatinas apresentam benefícios clínicos não relacionados a redução dos níveis de colesterol, são os chamados efeitos pleiotrópicos, que incluem atividade antimicrobiana (Graziano et al., 2015), antiviral

(Haidari et al., 2007), fungicida (Souza, 2011), anti-inflamatória (Koh et al., 2002), pró-osteogênica (Garrett et al., 2001) e progenitora de células endoteliais (Maeda et al., 2003; Bertl et al., 2017).

A doença periodontal é resultante de uma complexa interação entre o biofilme subgengival e eventos imunoinflamatórios progressivos do hospedeiro que se desenvolvem nos tecidos



gingivais e periodontais, em resposta ao desafio apresentado pelas bactérias (Pradeep et al., 2016). O sucesso do tratamento da doença consiste no controle do biofilme, no qual deve ser feito a associação entre o tratamento mecânico convencional de raspagem e alisamento radicular e orientação de higiene bucal (Deas et al., 2016).

Estudos clínicos notaram que o tratamento periodontal não cirúrgico possuía um benefício adicional associado ao uso local de estatinas quando comparado ao tratamento não cirúrgico apenas (Kumari et al., 2016; Ambrósio et al., 2017). Ainda, outra pesquisa *in vitro* constatou que as bactérias periodontopatogênicas *A. actinomycetemcomitans* e *P. gingivalis* são sensíveis a sinvastatina (Emani et al., 2014). Além dessas, há comprovação também do efeito bacteriostático *in vitro* da sinvastatina sobre *S. mutans*, *S. anginosus*, *S. sanguis* e *S. salivarius* (Whitaker e Alshammari, 2017). Nosso grupo de pesquisa vem realizando já estudos com as estatinas, mostrando que a sinvastatina e atorvastatina tem atividade antimicrobiana contra bactérias orais, tanto na forma planctônica quanto na forma de biofilme (Graziano et al., 2015; Carvalho, 2019).

A rosuvastatina é uma estatina totalmente sintética altamente eficaz que proporciona reduções médias dos níveis de LDL de até 65%, além de reduções clinicamente significativas de triglicérides (Hassman et al., 2001). Garg e Pradeep realizaram ensaio clínico controlado envolvendo lesões de furca grau II em pacientes com periodontite crônica demonstrou que o efeito da rosuvastatina 1,2 % gel foi superior ao da atorvastatina 1,2% gel, uma vez que a mesma obteve resultados mais satisfatórios quanto ao nível de inserção clínica e profundidade de sondagem na região interradicular (Garg e Pradeep, 2016). Verificou-se em outra investigação clínica que a associação de rosuvastatina 1,2% gel com plaquetas ricas em fibrinas obteve resultado regenerativo superior quando comparada ao

desbridamento de retalho aberto ou tratamento com plaquetas apenas (Pradeep et al., 2016).

Assim, o presente estudo teve como objetivo analisar a atividade da rosuvastatina sobre bactérias periodontopatogênicas *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Fusobacterium nucleatum*, *Actinomyces odontolyticus*, *Actinomyces naeslundii*, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus sanguinis* e *Streptococcus gordonii*, visto que pouco se sabe sobre o efeito dessa estatina sobre bactérias orais.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### Ensaio de Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A determinação da concentração inibitória mínima foi realizada pelo método de microdiluição em placas de poliestireno de 96 poços como descrito pelo Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2007). Foi testado o efeito antimicrobiano da rosuvastatina (doação da EMS Indústria Farmacêutica, Hortolândia, São Paulo, Lote MOY1359), que foi dissolvida inicialmente em 50% de dimetil sulfoxido (DMSO) (Synth – Diadema, São Paulo, Brasil, 208663), ficando o DMSO com concentração final de 2,5% nos experimentos. O metronidazol (Sigma Aldrich. - St. Louis, Missouri, EUA, M3761) e a amoxicilina (Sigma Aldrich. - St. Louis, Missouri, EUA, A-8523) foram usados como padrões antimicrobianos.

O teste foi realizado contendo 100 µL de meio em cada poço, sendo o meio TSB-BHI-HM para *P. gingivalis*, *F. nucleatum* e *P. intermedia*, TSB-BHI para *A. odontolyticus* e *A. naeslundii* e MHB para estreptococos. A concentração de rosuvastatina variou de 400 a 0 195 µg/mL, e a diluição foi realizada com DMSO 50% que ficou com uma concentração final de 2,5% nos poços A amoxicilina variou na concentração de 1,25 a 0,0006 µg/ mL para estreptococos. Para os



anaeróbios a concentração de metronidazol variou de 25 a 0,012  $\mu\text{g/mL}$  e a de amoxicilina 20 a 0,0098  $\mu\text{g/mL}$ .

As placas com estreptococos foram incubadas por 24 horas em estufa de  $\text{CO}_2$ , após esse período foram feitas leituras de densidade óptica em espectrofotômetro (550 nm) e posteriormente coloração com resazurina em cada poço a 0,01% em solução aquosa para melhor visualização do crescimento bacteriano. Para os anaeróbios a incubação foi de 48 horas em câmara de anaerobiose, seguida de leitura de densidade óptica em espectrofotômetro (660 nm) e coloração resazurina para verificação da concentração inibitória mínima.

Os experimentos foram realizados em triplicata, em três momentos distintos.

### Ensaio de associação (checkerboard microdilution assay)

Para avaliar uma possível interação entre a rosuvastatina e antibióticos foi realizado o ensaio de associação com microdiluição em placas de 96 poços para *P. gingivalis*, associando concentrações de rosuvastatina de 400  $\mu\text{g/mL}$  à 6,25  $\mu\text{g/mL}$  e metronidazol de 0,78  $\mu\text{g/mL}$  à 0,0121  $\mu\text{g/mL}$ . A placa foi incubada por 48 horas em câmara de anaerobiose. Após esse período, foram avaliadas as CIM dos fármacos associados por meio de leituras de densidade óptica em espectrofotômetro (660 nm) e coloração com 30  $\mu\text{L}$  de resazurina em cada poço a 0,01% em solução aquosa.

Os experimentos foram realizados em triplicata, em três momentos distintos.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A rosuvastatina apresentou atividade antimicrobiana apenas para *P. gingivalis* W83 e

ATCC 33277 e em alta concentração, com CIM na faixa de 400  $\mu\text{g/mL}$ ; porém não apresentou atividade antimicrobiana nas demais bactérias testadas com rosuvastatina na concentração de 400 a 0,195  $\mu\text{g/mL}$ .

Todos os microrganismos testados mostraram-se sensíveis aos antimicrobianos padrões.

**Tabela 1.** CIM ( $\mu\text{g/mL}$ ) da rosuvastatina contra cepas de *P. gingivalis*.

Cepas	CIM Rosuvastatina ( $\mu\text{g/mL}$ )
<i>P. gingivalis</i> W83	400
<i>P. gingivalis</i> ATCC 33277	400

**Tabela 2.** CIM ( $\mu\text{g/mL}$ ) da amoxicilina contra bactérias anaeróbias e estreptococos orais.

Cepas	CIM Amoxicilina ( $\mu\text{g/mL}$ )
<i>A. odontoliticus</i> NCTC 9935	0,078
<i>A. naeshlundii</i>	0,0195 a 0,039
<i>F. nucleatum</i> ATCC 51190	0,39
<i>P. intermedia</i> ATCC 49046	0,195 a 0,39
<i>S. sanguinis</i> 3K36	0,078 a 0,156
<i>S. mitis</i> NCTC 12261	0,0195
<i>S. oralis</i> ATCC 10557	0,0195 a 0,039
<i>S. salivarius</i> ATCC 7073	0,039
<i>S. gordonii</i> Chali	0,078 a 0,039

**Tabela 3.** CIM ( $\mu\text{g/mL}$ ) do metronidazol contra *P. gingivalis*.

Cepas	CIM Metronidazol ( $\mu\text{g/mL}$ )
<i>P. gingivalis</i> W83	0,195
<i>P. gingivalis</i> ATCC 33277	0,195 a 0,390

Com o objetivo de avaliar uma possível interação entre a rosuvastatina e os antibióticos foi realizado o ensaio de associação. Como apenas *P. gingivalis* se mostrou sensível a rosuvastatina, os



testes foram feitos apenas com essa espécie, associando a estatina com metronidazol.

Houve interação sinérgica entre rosuvastatina e metronidazol para a cepa *P. gingivalis* ATCC 33277, com CIM de 100 µg/mL para rosuvastatina e entre 0,097 a 0,048 µg/mL para metronidazol, reduzindo os valores de CIM de

3 a 4 vezes. Os testes também foram realizados para *P. gingivalis* W83, mas os resultados se mostraram inconclusivos. Para essa cepa foram encontrados valores de FICI de 0,37 e 0,75, sendo necessários mais ensaios para comprovar o tipo de associação.

**Tabela 4.** Comparação da CIM (µg/ml) das substâncias isoladas e em associação, valores de FICI e efeito farmacológico da associação dos fármacos para *P. gingivalis* ATCC 33277

Cepas	CIM isolada Rosuvastatina	CIM isolada Metronidazol	CIM da Associação ROS / Metronidazol	ΣFICI	Efeito
<i>P.gingivalis</i> ATCC 33277	400	0,195 a 0,390	100   0,097 - 0,048	0,37	Sinergismo

A composição microbiana do biofilme oral é expressivamente diferente em locais saudáveis e em sítios com doença periodontal (Roberts e Darveau, 2015). Devido esta grande diversidade e as interações complexas formadas entre os membros da microbiota, *P. gingivalis* demonstra associação única com a doença, provavelmente devido ao alto potencial patogênico e a relação com a progressão da doença periodontal (Mombelli, 2018). Lipopolissacarídeos, proteases, fimbrias e alguns outros fatores de virulência estão entre as estratégias exploradas por *P. gingivalis* para promover a colonização bacteriana, promover a coagregação de *P. gingivalis* com outras bactérias e facilitar o crescimento da comunidade microbiana no biofilme periodontal. Esses fatores de virulência também modulam uma variedade de componentes do sistema imune do hospedeiro e subvertem a resposta imune para evitar a eliminação bacteriana ou induzir um ambiente inflamatório. (Xu et al., 2020).

Assim sendo, como a rosuvastatina apresentou atividade antimicrobiana contra essa espécie que é um importante patógeno na progressão da doença periodontal, as estatinas podem contribuir para a desorganização ou inibição do biofilme periodontal. Da mesma forma,

o uso tópico de rosuvastatina como adjuvante no tratamento periodontal não cirúrgico pode ser um importante aliado tanto para melhora dos parâmetros clínicos quanto no controle do biofilme periodontal.

## CONCLUSÃO

O estudo concluiu que a rosuvastatina apresenta atividade antimicrobiana *in vitro* contra *P. gingivalis*, um importante patógeno ligado a organização do biofilme e progressão da doença periodontal. Observou-se também uma possível interação sinérgica da rosuvastatina com metronidazol contra *P. gingivalis*. No entanto, são necessários estudos clínicos para avaliar a atividade da rosuvastatina em biofilmes periodontais para comprovar o efeito antimicrobiano dela.

## AGRADECIMENTOS

Apoio PIBIC/SAE (01.P.175/2019; 01.P.96/2020).

## BIBLIOGRAFIA

Ambrósio LMB, Rovai ES, Sendyk DI, Holzhausen M, Pannuti CM. Does the adjunctive use of statins provide additional benefits to nonsurgical periodontal treatment? A



systematic review and meta-analysis. *J Periodontol Res.* 2018;53(1):12–21.

Bertl K, Parllaku A, Pandis N, Buhlin K, Klinge B, Stavropoulos A. The effect of local and systemic statin use as an adjunct to non-surgical and surgical periodontal therapy—A systematic review and meta-analysis. *J Dent.* 2017; 67:18–28.

Carvalho, Rafaela Parolina Durrer. Atividade antimicrobiana das estatinas contra bactérias da microbiota oral. Dissertação de mestrado. Universidade Estadual de Campinas, 2019.

CLSI. Clinical and Laboratory Standard Institute - Performance Standards for antimicrobial susceptibility testing; Approved standard - Seventh Edition. CLSI document M100-S16. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute. Wayne, PA; 2006.

CLSI. Clinical and Laboratory Standard Institute - Methods for Antimicrobial Susceptibility Testing of Anaerobic Bacteria; Approved Standard – Seventh Edition. CLSI document M11-A7. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2007.

Deas DE, Moritz AJ, Sagun RS, Gruwell SF, Powell CA. Scaling and root planing vs. conservative surgery in the treatment of chronic periodontitis. *Periodontol 2000.* 2016; 71:128–139.

Emani S, Gunjiganur G, Mehta D. Determination of the antibacterial activity of simvastatin against periodontal pathogens, *Porphyromonas gingivalis* and *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*: An in vitro study. *Contemp Clin Dent.* 2014;5(3):377.

Garg S, Pradeep AR. 1.2% Rosuvastatin and 1.2% Atorvastatin Gel Local Drug Delivery and Redelivery in the Treatment of Class II Furcation Defects: A Randomized Controlled Clinical Trial. *J Periodontol.* 2016;88(3):259–65.

Garrett IR, Gutierrez G, Mundy GR. Statins and bone formation. *Curr Pharm Des.* 2001 May;7(8):715-36.

Graziano TS, Cuzzullin MC, Franco GC, Schwartz-Filho HO, De Andrade ED, Groppo FC, et al. Statins and antimicrobial effects: Simvastatin as a potential drug against *Staphylococcus aureus* biofilm. *PLoS One.* 2015;10(5).

Haidari M, Muzammil A, Casscells SW, Madjid M. Statins block influenza infection by down-regulating Rho/Rho kinase pathway. *Circulation.* 2007; 116:116–117.

Hassman HA, Brown WV, Zedler BK, Bays HE. Eficácia e segurança de rosuvastatina: resultados de estudo comparativo de 52 semanas versus pravastatina e

sinvastatina. XXIII Congresso da Sociedade Européia de Cardiologia. Estocolmo, Suécia. Setembro de 2001.

Koh KK, Son JW, Ahn JY, Jin DK, Kim HS, Choi YM, Kim DS, Jeong EM, Park GS, Choi IS, Shin EK. Comparative effects of diet and statin on NO bioactivity and matrix metalloproteinases in hypercholesterolemic patients with coronary artery disease, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 22, 2002, e19–e23.

Kumari M, Martande SS, Pradeep AR, Naik SB. Efficacy of subgingivally delivered 1.2% atorvastatin in the treatment of chronic periodontitis in patients with type 2 diabetes mellitus: a randomized controlled clinical trial. *J Periodontol.* 2016; 87:1278-1285.

Maeda T, Kawane T, Horiuchi N. Statins augment vascular endothelial growth factor expression in osteoblastic cells via inhibition of protein prenylation. *Endocrinology.* 2003; 144:681-692.

Mombelli A. Microbial colonization of the periodontal pocket and its significance for periodontal therapy. *Periodontol 2000.* 2018;76(1):85–96.

Pradeep AR, Garg V, Kanoriya D, Singhal S. 1.2% Rosuvastatin Versus 1.2% Atorvastatin Gel Local Drug Delivery and Redelivery in Treatment of Intrabony Defects in Chronic Periodontitis: A Randomized Placebo-Controlled Clinical Trial. *J Periodontol.* 2016;87(7):756–62.

Pradeep AR, Garg V, Kanoriya D, Singhal S. Platelet-Rich Fibrin With 1.2% Rosuvastatin for Treatment of Intrabony Defects in Chronic Periodontitis: A Randomized Controlled Clinical Trial. *J Periodontol.* 2016;87(12):1468–73.

Roberts FA, Darveau RP. Microbial protection and virulence in periodontal tissue as a function of polymicrobial communities: symbiosis and dysbiosis. *Periodontol 2000.* 2015;69(1):18-27.

Souza, ERY. Atividade antifúngica in vitro de estatinas sobre espécies de *Candida* e *Cryptococcus*. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Ceará, 2011. Orientadora Prof<sup>a</sup> Dra. Raimunda Sâmia Nogueira Brilhante.

Whitaker EJ, Alshammari A. Bacteriostatic Effect of Simvastatin on Selected Oral Streptococci in Vitro. *Contemporary Clinical Dentistry.* 2017;8(1): 59–63.

Xu W, Zhou W, Wang H, Liang S. Roles of *Porphyromonas gingivalis* and its virulence factors in periodontitis. Vol. 120, *Advances in Protein Chemistry and Structural Biology.* Elsevier Ltd; 2020. 45–