



# Efeito do Beta-Hidroxiácido de sinvastatina na atividade da HMG-CoA Redutase bacteriana

**Palavras-Chaves:** SINVASTATINA, *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*, ESTATINAS.

**Autoras:**

KAROLINE DA SILVA FARIAS, FCF – UNICAMP

KÁTIA DE PÁDUA SILVA (Coorientadora), FCF – UNICAMP

Prof(a). Dr(a). KARINA COGO MÜLLER (Orientadora), FCF – UNICAMP

---

## 1. INTRODUÇÃO

A sinvastatina é um agente hipolipemiante da classe das estatinas, que inibe de forma reversível a enzima 3-Hidroxi-3-MetilGlutaril Coenzima-A Redutase (HMG-CoA-Redutase) presente na via do mevalonato, responsável por catalisar uma das etapas fundamentais da biossíntese do colesterol, a conversão de HMG-CoA em ácido mevalônico (Brunton *et al.*, 2012).

As estatinas podem ser divididas entre as que são administradas através de preparações ácidas biologicamente ativas (pravastatina, rosuvastatina, entre outras) e as que são administradas na forma de pró-fármaco inativo, como é o caso da sinvastatina. (Brunton, *et al.*, 2012) Esta estatina possui um anel lactona que precisa sofrer hidrólise enzimática a fim de que fique na sua forma farmacologicamente ativa (Brunton, *et al.*, 2012). Estudos realizados com as estatinas têm demonstrado que elas possuem efeitos pleiotrópicos, desencadeados possivelmente pela redução de isoprenóides, que diminuem as proteínas de sinalização celular (Ko *et al.*, 2017; Campo & Carvalho, 2007). Podem ser observados efeitos anti-inflamatórios, atividades imunomoduladoras, anticarcinogênicas, antioxidantes, efeitos antimicrobianos em bactérias Gram-positivas (*Staphylococcus aureus*) e Gram-negativas (*Escherichia coli*), potencialização da atividade antitumoral de citocinas e agentes quimioterápicos, como a cisplatina e a doxorrubicina (de Carvalho *et al.*, 2021. Ko *et al.*, 2017; Graziano *et al.*, 2015; Bergman *et al.*, 2011; Campo & Carvalho, 2007), entre outros efeitos.

Entre as estatinas, a sinvastatina tem apresentado atividade antibacteriana contra diferentes tipos de microbiota (oral, intestinal e nasofaríngea), bactérias ambientais e bactérias resistentes a drogas (Ko *et al.*, 2017), tendo capacidade de inibir a síntese de proteínas bacterianas e a produção de toxinas de *S. aureus*. (Thangamani *et al.*, 2015). A bactéria *S. aureus* é um dos principais patógenos implicados em infecções nosocomiais e a sua capacidade de formar biofilmes bacterianos dificulta o seu tratamento (Graziano *et al.*, 2015). No entanto, não há estudos comparando a sinvastatina com a sua molécula hidrolisada, em termos de atividade antimicrobiana. Com isso, o objetivo do presente estudo é avaliar se a sinvastatina em sua forma ativa (tenivastatina) possui atividade antimicrobiana e atua na atividade da enzima HMG-CoA redutase bacteriana de *S. aureus*.

## 2. METODOLOGIA

O presente projeto contempla avaliar a atividade antimicrobiana da tenivastatina, através do ensaio de concentração inibitória mínima (CIM), assim como avaliar a atividade enzimática de HMG-CoA redutase II de *S. aureus*, por meio da expressão heteróloga da enzima em *E.coli* e do ensaio de inibição enzimática usando o “*HMG-CoA Reductase Assay Kit*” (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA).

### ● Atividade Antimicrobiana da tenivastatina

Os ensaios de CIM foram realizados utilizando as cepas de *S. aureus* ATCC 33591 (meticilina-resistente) e ATCC 29213 (suscetível à metilicina), através de diluições seriadas feitas em microplacas de 96 poços, utilizando a sinvastatina ácida (tenivastatina) da Sigma, nas concentrações de 2.000 a 0,12 µg/mL em um volume final de 200 µL, segundo o protocolo da *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI – M07-A9, 2012). Foi utilizado o meio de cultura Mueller Hinton Caldo (MHB), o inóculo bacteriano foi preparado a partir de culturas de *S. aureus* em meio Ágar Triptona de Soja (TSA) com 24h de crescimento. Posteriormente, as colônias isoladas foram coletadas e suspensas no meio MHB, com densidade óptica de 0,1 de em 660 nm. As placas foram incubadas por 24h, após esse período, a CIM foi verificada por leitura em espectrofotômetro com comprimento de onda de 660 nm e por avaliação visual, através da coloração com resazurina (0,01%). As microplacas utilizadas foram divididas nos seguintes grupos experimentais:

- Grupo teste (A, B, C e D): Tenivastatina + DMSO + Inóculo + MHB
- Controle DMSO (E): MHB + Inóculo + DMSO
- Controle Positivo (F): MHB + Inóculo
- Controle do Negativo (G): Apenas MHB
- Controle Branco (H): Tenivastatina + MHB

### ● Expressão heteróloga da proteína em *E.coli*.

A região estrutural do gene *mvaA* que codifica a proteína HMG-CoA redutase de *S. aureus* foi clonada em vetor pET28a(+) nos sítios de restrição BamHI e XhoI, o que permitiu a inserção de Histag em N-terminal possibilitando a purificação por cromatografia de afinidade com resina de níquel. A expressão da HMG-CoA redutase II foi feita em *E. coli* BL21(DE3), que foi cultivado em meio LB líquido durante 24 h a 37°C, com indução por IPTG. O gene *mvaA* codifica uma proteína com 425 aminoácidos e com um peso molecular de 46.180 Da. A análise foi realizada por SDS-PAGE e a concentração foi determinada por absorbância a 280 nm utilizando o coeficiente de extinção molar.

### ● Ação da tenivastatina na atividade da enzima HMG-CoA bacteriana

Os ensaios de inibição enzimática foram conduzidos em triplicata utilizando o “*HMG-CoA Reductase Assay Kit*”, baseando-se na seguinte reação: (S)-HMG-CoA + 2 NADPH + 2 H<sup>+</sup> → (R)-mevalonato + 2 NADP<sup>+</sup> + CoASH. A atividade enzimática foi monitorada através da oxidação de NADPH, por meio da leitura de absorbância a 340 nm no espectrofotômetro a 37°C durante 20 minutos com leituras realizadas a cada 10 segundos.

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### ● Expressão heteróloga da proteína em *E.coli*.

A análise por SDS-PAGE demonstrou que houve expressão da enzima na fração solúvel que foi purificada. A banda apresentada pela seta vermelha (figura 1) deve ser correspondente à enzima

HMG-CoA redutase, visto que, possui massa molecular de aproximadamente 40 kDa. Sendo assim, ela foi posteriormente utilizada nos ensaios cinéticos para avaliação da atividade da HMG-CoA redutase de *S. aureus*.

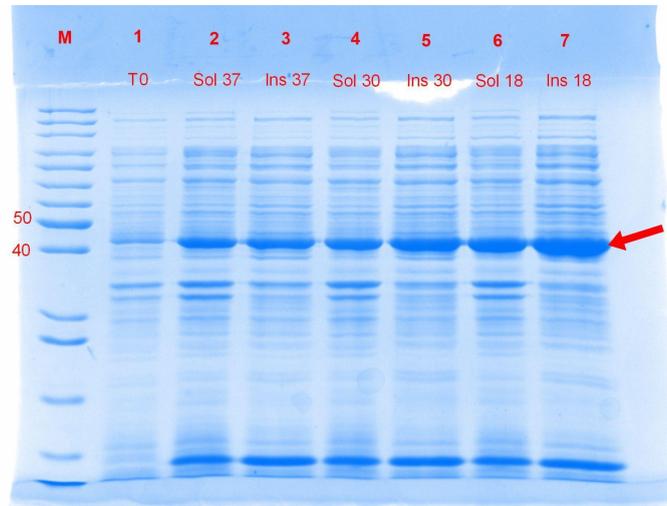


Figura 1 - Análise do processo de expressão das proteínas produzidas pelo clone recombinante *E.coli* BL21(DE3) por SDS-PAGE. M- marcador de peso molecular em kDa. 1- fração antes da indução, 2- fração solúvel do lisado celular da indução a 37°C, 3- fração insolúvel do lisado celular da indução 37°C, 4- fração solúvel do lisado celular da indução 30°C, 5- fração insolúvel do lisado celular da indução 30°C, 6- fração solúvel do lisado celular da indução 18°C e 7- fração insolúvel do lisado celular da indução 18°C. A seta vermelha indica a região correspondente à proteína de interesse.

#### ● Atividade Antimicrobiana da tenivastatina

O valor de CIM obtido para a tenivastatina foi de 1.000 µg/mL em ambas as cepas de *S. aureus* (figuras 2 e 3) e nenhum efeito do DMSO (2,5%) foi observado na morte bacteriana. Nosso grupo de pesquisa encontrou o valor de CIM para a sinvastatina em sua forma pró-fármaco de 31,25 µg/ml para a cepa ATCC 33591 e 15,65 µg/ml para a cepa ATCC 29213 (Graziano *et al.*, 2015), apresentando assim, um CIM inferior ao encontrado para a tenivastatina.

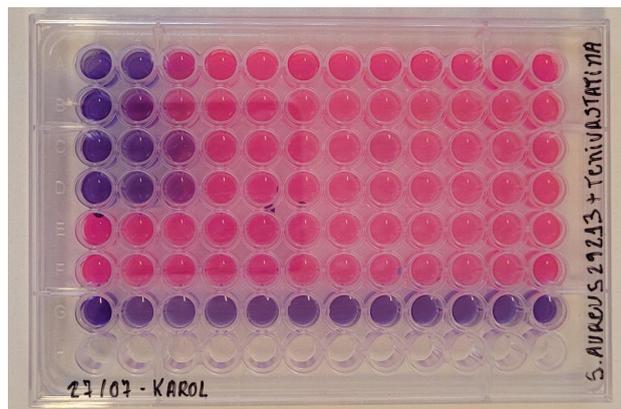


Figura 2 - Avaliação visual com solução de 0,01% de resazurina para a CIM da tenivastatina com DMSO (2,5%) para *S. Aureus* ATCC 29213. O valor de CIM foi de 1.000 ug/mL, representado pelo primeiro poço das linhas A, B, C e D. Não houve morte da cultura bacteriana nas amostras dos poços da linha E e F, o que demonstra que DMSO e o MHB não influenciaram na atividade antimicrobiana. O mesmo confirma-se pela leitura por espectrofotometria (660 nm)

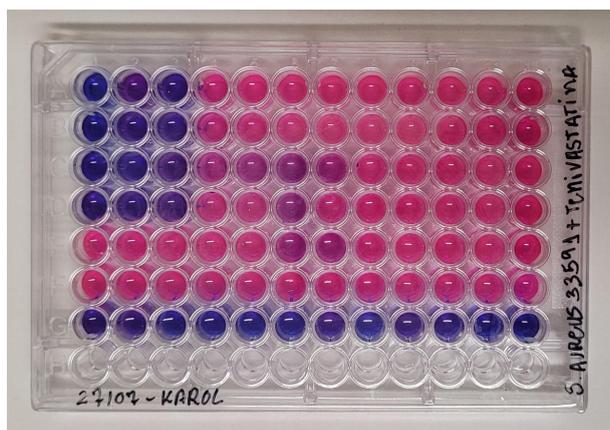


Figura 3 - Avaliação visual com solução de 0,01% de resazurina para a CIM da tenivastatina com DMSO (2,5%) para *S. Aureus* ATCC 33591. O valor de CIM foi de 1.000 ug/mL, representado pelo primeiro poço das linhas A, B, C e D. Não houve morte da cultura bacteriana nas amostras dos poços da linha E e F, o que demonstra que DMSO e o MHB não influenciaram na atividade antimicrobiana. O mesmo confirma-se pela leitura por espectrofotometria (660 nm).

Tais resultados corroboram com a revisão de Climent e colaboradores (2021), na qual foi demonstrado que a sinvastatina é um pró-fármaco predominantemente lipofílico e por isso, entra de forma mais fácil nas células e interage com as membranas através de seu precursor hidrofílico ácido e hidrossolúvel (Climent, Benaiges & Pedro-Botet, 2021). Desta forma, a sinvastatina possui um efeito mais eficaz contra a *S. aureus* do que as estatinas já presentes em sua forma ácida (Graziano *et al.*, 2015).

Portanto, a tenivastatina pode ter apresentado menor efeito antimicrobiano contra as cepas de *S. aureus* em comparação com a sinvastatina, por não conseguir atravessar de forma eficiente a barreira hidrofóbica da bactéria por se tratar de uma molécula ionizada que possui mais afinidade pela parte hidrofílica da parede celular bacteriana.

#### ● Ação da tenivastatina na atividade da enzima HMG-CoA bacteriana

Por meio da curva da atividade da HMGR de *S. aureus*, medida pelo decaimento da absorbância por 340 nm (figura 4), foi possível observar uma diferença estatística significativa entre a atividade e os grupos com tenivastatina após 5 minutos de reação ( $p < 0,05$ , Two-Way ANOVA, pós-teste Tukey), através da medição da oxidação do NADPH a  $\text{NADP}^+$ . Entretanto, não foi possível observar diferença estatística significativa entre as amostras com diferentes concentrações de tenivastatina ( $p > 0,05$ , Two-Way ANOVA, pós-teste Tukey).

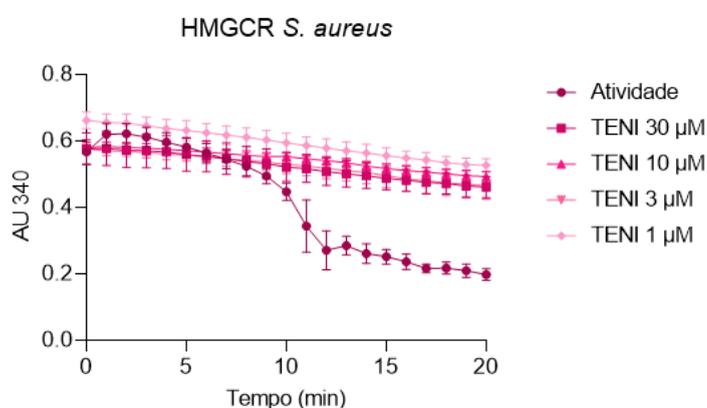


Figura 4 - Curva da atividade da HMGR de *S. aureus*, medida pelo decaimento no valor de absorbância a 340 nm e sua inibição quando adicionado tenivastatina. Todas as amostras foram realizadas em triplicatas e descontado o valor do branco (sem enzima), sendo o controle das amostras sem enzima: branco e branco com tenivastatina (30, 10, 3 e 1 µM). Após 5 minutos da corrida cinética, o teste estatístico não demonstrou diferença estatística significativa entre os grupos com tenivastatina, mas houve diferença entre eles e a atividade. ( $p < 0,05$ , Two-Way ANOVA, pós-teste Tukey).

O NADPH apresenta absorvância a 340 nm, enquanto sua forma oxidada (NAD<sup>+</sup>) não apresenta absorvância significativa nesse mesmo comprimento de onda (Nelson & Cox, 2019). Desta forma, é possível verificar a atividade da HMG-CoA redutase medindo a oxidação de NADPH a NADP<sup>+</sup>, visto que, a redução de HMG-CoA em mevalonato consome duas moléculas de NADPH, que ao doar dois elétrons é convertido em duas moléculas de NADP<sup>+</sup>, sendo portanto, o principal ponto de regulação da via do colesterol (Nelson & Cox, 2019). Nesse caso, é esperado uma queda na curva de absorvância pelo tempo a 340 nm para a atividade enzimática sem o inibidor (figura 4).

Por outro lado, é esperado que a atividade da enzima bacteriana diminua quando adicionado o inibidor da enzima, que nesse caso, pela nossa hipótese seria a tenivastatina, já que as estatinas, são inibidores competitivos da atividade da HMG-CoA redutase humana. Como resultado, foi observada atividade da enzima, porém pouca variação entre as curvas medidas para as diferentes concentrações de tenivastatina, apesar disso, ainda assim a curva da atividade quando comparada a inibição apresentou diferença significativa. Essa pouca variação da absorvância a 340 nm no teste realizado, pode indicar pouca oxidação de NADPH em NADP<sup>+</sup>, podendo estar associado ao fato de não estar havendo a conversão de HMG-CoA em mevalonato, o que seria um indicativo de inibição.

#### 4. CONCLUSÃO

A tenivastatina possui efeito antimicrobiano contra *S. aureus*, porém inferior à sinvastatina, devido a lipofilicidade da molécula. A enzima HMG-CoA redutase foi devidamente purificada para utilização nos ensaios cinéticos, em que houve diferença significativa na absorvância em 340 nm entre a atividade e a tenivastatina indicando assim que pode ter ocorrido inibição na via do mevalonato pela tenivastatina.

#### 5. BIBLIOGRAFIA

1. CAMPO, Vanessa L. & CARVALHO, Ivone. Estatinas hipolipêmicas e novas tendências terapêuticas. **Química Nova**. v. 30(2), p. 425–430, 2007.
2. CLIMENT, Elisenda; BENAIGES, David; PEDRO-BOTET, Juan. Hydrophilic or Lipophilic Statins?. **Front Cardiovasc Med**. v. 8, p. 687585, 2021.
3. CLSI. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard - Ninth Edition. CLSI document M07-A9. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2012.
4. DE CARVALHO, Rafaela D. P.; CASARIN, Renato C. V.; DE LIMA, Patrícia O., COGO-MÜLLER, Karina. Statins with potential to control periodontitis: From biological mechanisms to clinical studies. **J Oral Biosci**. v. 63(3), p. 232-244, 2021.
5. BERGMAN, Peter; LINDE, Charlotte; PÜTSEP, Katrin; POHANKA, Anton; NORMARK, S., Henriques-Normark, B., ANDERSSON, Jan & BJÖRKHEM-BERGMAN, Linda. Studies on the antibacterial effects of statins-in vitro and in vivo. **PLoS one**. v. 6(8), e24394, 2011.
6. Brunton, Laurence L.; Chabner, Bruce A.; Knollmann, Bjorn C.. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica de Goodman & Gilman**. 12. ed. Porto Alegre: Amgh Editora Ltda, 2012.
7. GRAZIANO, Talita S.; CUZZULLIN, Maria C.; FRANCO, Gilson C.; SCHWARTZ-FILHO, Humberto O.; DE ANDRADE, Eduardo D.; GROppo, Francisco C.; COGO-MÜLLER, Karina. Statins and Antimicrobial Effects: Simvastatin as a Potential Drug against *Staphylococcus aureus* Biofilm. **PLoS One**. v. 10(5), e0128098, 2015.
8. KO, Humphrey H., LAREU, Ricky R., DIX, Brett R., & HUGHES, Jeffery D. Statins: antimicrobial resistance breakers or makers?. **PeerJ**. v. 5, e3952, 2017.
9. NELSON, David L.; COX, Michael M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 7ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2019.
10. THANGAMANI, Shankar; MOHAMMAD, Haroon; ABUSHAHBA, Mostafa F.N.; HAMED, Maha I.; SOBREIRA, Tiago. J.P.; HEDRICK, Victoria E.; PAUL, Lago N.; SELEEM, Mohamed N. Exploring simvastatin, an antihyperlipidemic drug, as a potential topical antibacterial agent. **Scientific reports**. v. 5, 16407, 2015.