

## 13ª JORNADA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

# GENÉTICA

### EFEITOS ANTIMUTAGÊNICOS E QUIMIOPREVENTIVOS DA ATORVASTATINA CONTRA AGENTES ALQUILANTES

1Larissa Silva de Almeida Christoni (IC-FAPERJ); 1Najara Gomes dos Santos (IC-UNIRIO); 1,2Carlos Fernando Araujo Lima de Oliveira (Mestrado-FAPERJ Nota 10); 2Israel Felzenszwalb; 1Claudia Alessandra Fortes Aiub (orientador).

<sup>1</sup>Laboratório de Genotoxicidade, Departamento de Genética e Biologia Molecular; Instituto Biomédico; Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro.

<sup>2</sup>Laboratório de Mutagênese Ambiental, Departamento de Biofísica e Biometria; Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes; Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Apoio Financeiro: FAPERJ, CNPq

Palavras-chave: atorvastatina; antimutagenicidade; quimioprevenção; agentes alquilantes

#### INTRODUÇÃO

A Atorvastatina é um fármaco da família das estatinas que são as drogas mais usadas para o tratamento das hiperlipidemias com o propósito de diminuir os níveis de lipoproteínas plasmáticas ricas em colesterol. (SOJA, 2006) Este efeito ocorre pela inibição da enzima HMG-CoA redutase que participa dos primeiros passos da biossíntese do colesterol. (CAMPO; CARVALHO, 2007)

Também conhecida como Lipitor, a atorvastatina foi introduzida no mercado em 1996, sendo considerada o fármaco mais vendido no mundo no ano de 2002. (BARROS, 2010) Independente da diminuição do colesterol sérico, alguns outros efeitos podem ser exercidos pelas estatinas, sendo estes denominados efeitos pleiotrópicos. Dentre os efeitos pleiotrópicos estão incluídos a ação reguladora na função endotelial, diminuição do estresse oxidativo e inflamação e o aumento da estabilidade de placas ateroscleróticas. (MACHADO, 2011)

Há um interesse na utilização da Atorvastatina como agente antineoplásico que se baseia na evidência pré-clínica de atividades anti-proliferativas e pró-apoptóticas em variados tipos de células tumorais. Em modelos animais já foram observados efeitos antitumorais contra o melanoma, linfoma, carcinoma mamário e adenocarcinoma pancreático, resultado do retardamento do crescimento tumoral e inibição de processos metastáticos. Em relação aos efeitos metastáticos, as estatinas são capazes de determinar etapas que são essenciais para o processo, como a ligação, motilidade e invasão. (BARROS, 2010)

Estudos provaram que o efeito antineoplásico das estatinas ocorre pela supressão da biossíntese do mevalonato, um precursor de intermediários isoprenóides importantes que são adicionados durante a modificação pós-traducional de uma variedade de proteínas, como as subunidades Ras e Rho da proteína G. Estas proteínas estão envolvidas na progressão do ciclo celular, sinalização celular e integridade da membrana. A inibição da ativação Rho reverteu o fenótipo metastático de células de melanoma humano. (MEKHAIL et al., 2012) A atorvastatina é capaz de inibir o crescimento do tumor através da indução da apoptose induzida pela ativação da proteína quinase AMP, que leva à expressão de p21, resultando em estresse do retículo endoplasmático e morte celular. (YANG et al., 2010)

Quando da associação com quimioterápicos, as estatinas demonstram a capacidade de potencializar a atividade antitumoral através do aumento da apoptose. As estatinas detêm uma variedade de células na fase G1 do ciclo celular e estas se mostram mais sensíveis à atividade dos quimioterápicos. (CAMPO; CARVALHO, 2007)

Em um ensaio com mutação induzida por NaN<sub>3</sub> em cepas TA100 e TA98 de *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium, a Atorvastatina inibiu significativamente as mutações, o que ficou evidente pela diminuição do número de colônias revertentes nas placas tratadas. Este efeito antimutagênico das estatinas pode ser explicado por uma provável proteção do genoma bacteriano contra os agentes mutagênicos. (SOJA; AJITH, 2006)

#### OBJETIVO

Avaliar o efeito antimutagênico da Atorvastatina frente a agentes alquilantes.

#### METODOLOGIA

Foi realizado o ensaio de *Salmonella*/Microsoma e Sobrevivência para quatro cepas de *Salmonella enterica* Typhimurium (TA1535, TA100, TA102 e TA104), com diferentes características genéticas que permitem avaliar a participação de diversos mecanismos de reparo na quimioprevenção dos danos induzidos pelos agentes alquilantes, e três concentrações de Atorvastatina (50, 100 e 500 µg/placa).

Neste ensaio houve a incubação por 60 minutos de 100 µL da cepa de *S. enterica* Typhimurium, 500 µL de Tampão fosfato de sódio 0,2 M/pH 7,4, 100 µL de Atorvastatina + 100 µL do agente alquilante ou 100 µL de DMSO. Foram usados o N-óxido de 4-nitroquinolina (4NQO; CAS:56-57-5) e Metilmetano Sulfonato (MMS; CAS:66-27-3) como agentes alquilantes, indutores de lesões no DNA. Após o período de incubação, 10 µL da suspensão bacteriana tratada foi diluída em solução salina (NaCl 0.9%). Então, 100 µL da solução diluída foi colocada em uma placa de petri com ágar nutriente e incubada a 37°C por 24h. Após esse período, o número de UFC sobreviventes foi contado. A diluição total foi de 10<sup>-7</sup>.

Ao mesmo tempo, 2mL de Top Agar (7 g/L agar; 5 g/L NaCl; 0,0105 g/L L-histidina; 0,0122 g/L biotina; pH 7.4, 45 °C) foi adicionada ao tubo de ensaio, e a mistura final foi vertida em uma placa de petri com Ágar Vogel-Bonner E. Esta mistura final foi incubada a 37°C por 72h e as colônias revertentes foram contadas. Os experimentos foram realizados em triplicata e repetidos duas vezes. Os resultados foram analisados estatisticamente utilizando o software

## 13ª JORNADA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

GraphPad Prism, através do método one-way ANOVA, com pós-teste de Bonferroni. (AMES; MARON, 1983)

As linhagens utilizadas possuem mutação no gene *rfa*, o que leva à perda parcial da barreira de polissacarídeos que reveste a superfície bacteriana, aumentando a permeabilidade e facilitando a entrada de moléculas grandes na célula. Com exceção da TA102, as demais linhagens possuem a deleção do gene *uvrB*, o qual promove o sistema de reparo por excisão de nucleotídeos (NER) do DNA. Desta forma, apenas a TA102 é proeficiente no reparo NER, sendo hábil a detectar agentes indutores de pontes entre as cadeias do DNA. (AMES; MARON, 1983)

Cada linhagem possui uma mutação diferente no operon da histidina, o que confere maior especificidade na detecção de um determinado tipo de mutágeno. As cepas TA100 e TA1535 possuem mutação no gene *hisG46*, que codifica a primeira enzima da biossíntese de histidina; A TA102 e a TA104 possuem um sítio mutante da *hisG428*. Na TA102 foram inseridos pares de bases AT no sítio mutante pelo plasmídeo pAQ1, a fim de aumentar o número de sítios alvos. (AMES; MARON, 1983)

As cepas TA100, TA102 e TA104 contêm o plasmídeo pKM101 que participa da via recombinacional de reparo por excisão de bases. A atuação do plasmídeo pKM101 possibilita o aumento do reparo do DNA. (ONUKI, 2000)

### RESULTADOS

A sobrevivência foi maior que 80% para todas as concentrações testadas em relação ao DMSO, exceto para a linhagem TA1535. Nas linhagens TA100, TA102, TA104 e TA1535 foi possível observar uma resposta antimutagênica. Nas cepas TA100, TA104 e TA1535 houve um efeito antimutagênico dose-dependente observado pelo aumento da sobrevivência das culturas tratadas com o aumento da concentração da Atorvastatina.

Osmutágenos 4-NQO e MMS utilizados induzem, por alquilação, mutações por substituições de pares de bases. Todas as cepas de *S. enterica* Typhimurium detectam esse tipo de mutação. TA102 e TA104 detectam substituições A:T por C:G. TA100 e TA1535 detectam substituições C:G por A:T, sendo os pares de bases C:G os principais alvos do Metilmetano Sulfonato. A atuação do plasmídeo pKM101 nas cepas TA100, TA102 e TA104, possibilitando o aumento do reparo do DNA pela via recombinacional, teve como consequência o aumento do número de colônias revertentes e da taxa de sobrevivência bacteriana.

As quebras de fita simples do DNA provocadas pela ação do MMS (por inserção de um grupo metila nas bases nitrogenadas) e do 4-NQO (pela formação de adutos instáveis) podem ser reparadas por excisão, onde o nucleotídeo danificado não é corrigido e sim removido do DNA. Dessa forma, a fita não danificada serve como molde para a reincorporação do nucleotídeo correto pela DNA-polimerase. Para que ocorra o reparo por excisão de nucleotídeos, é necessária a atuação da enzima *uvrB*. As linhagens utilizadas (com exceção da TA102) possuem mutação no gene que codifica essa enzima, o que proporciona a fixação da mutação provocada pelos mutágenos. (WATSON et al., 2006)

Nas quebras de fita dupla, também promovidas pela ação dos mutágenos utilizados, não há fita molde para que ocorra o reparo. Nessa situação, ocorre o reparo por recombinação, onde a informação da sequência é extraída de uma segunda cópia não danificada do cromossomo. Quando há um dano extremo no DNA, os mecanismos celulares não conseguem corrigir a molécula de forma precisa, então a mesma utiliza um último recurso denominado Sistema de reparo sujeito a erro. Nesse caso, qualquer base nitrogenada é inserida no local da lesão para garantir que a replicação continue mesmo sem uma informação precisa da sequência correta, que seria proporcionada pelo molde. Esse mecanismo de reparo possui grande chance de causar mutação pela inserção de uma base incorreta, e é ativado pelo plasmídeo pKM101, aumentando a taxa de mutação espontânea. (WATSON et al., 2006)

### CONCLUSÃO

Concluímos que a Atorvastatina foi capaz de prevenir danos ao DNA induzidos por agentes alquilantes previamente conhecidos.

### REFERÊNCIAS

- BENN, C. L. et al. Huntingtin modulates transcription, occupies gene promoters in vivo, and binds directly to DNA in a polyglutamine-dependent manner. *The Journal* 1- AMES, Dorothy M. Maron And Bruce N.. Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. *Mutation Research*, Berkeley, v. 4, n. 3, p.173-215, maio 1983.
- 2- AQIL, Farrukh; ZAHIN, Maryam; AHMAD, Iqbal. Antimutagenic activity of methanolic extracts of four ayurvedic medicinal plants. *Indian Journal Of Experimental Biology*, Aligarh, v. 46, p.668-672, set. 2008.
- 3- BARROS, André Luiz de Souza. Avaliação da inibição do crescimento tumoral pelo tratamento com ácido valpróico, atorvastatina e pioglitazona isoladamente e em associação. 95 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Inovação Terapêutica, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2010.
- 4- CAMPO, Vanessa Leiria; CARVALHO, Ivone. Estatinas hipolipêmicas e novas tendências terapêuticas. *Química Nova*, Ribeirão Preto, v. 30, n. 2, p.425-430, abr. 2007.
- 5- MACHADO, Willian Moreira; MUNHOZ, Antonio Carlos Mattar; FERNANDES, Daniel. Estatinas: Efeitos Pleiotrópicos. *Ci. Biol. Saúde*, Ponta Grossa, v. 17, n. 2, p.141-150, nov. 2011.
- 6- MEKHAIL, George M. et al. Anticancer effect of atorvastatin nanostructured polymeric micelles based on stearyl-grafted chitosan. *International Journal Of Biological Macromolecules*. Cairo, p. 351-363. maio 2012.
- 7- MINICUCCI, Eliana Maria. O papel da proteína p53 e do gene TP53 na carcinogênese bucal quimicamente induzida pela 4NQO em ratos. 61 f. Tese (Doutorado) - Curso de Medicina, Unesp, Botucatu, 2008.
- 8- ONUKI, Janice. Lesões em DNA promovidas por ácido 5-aminolevulínico: uma proposta de bases moleculares para os hepatomas associados às porfirinopatias. 244 f. Tese (Doutorado) - Curso de Química, USP, São Paulo, 2000.
- 9- SOJA, T.a. Ajith And M.. A comparative study on the antimutagenicity of atorvastatin and lovastatin against directly acting mutagens. *Cell Biology And Toxicology*, Thrissur, n. 22, p.269-274, mar. 2006.



### **13ª JORNADA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA**

10- WATSON, James D. et al. Biologia molecular do gene. 5 ed. Porto Alegre: Artmed, 2006.

11- YANG, Pei-ming et al. Inhibition of Autophagy Enhances Anticancer Effects of Atorvastatin in Digestive Malignancies. Cancer Research, Taiwan, v. 19, n. 70, p.7699-7709, out. 2010.