

## 13ª JORNADA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

# GENÉTICA

### ANÁLOGOS DA ATORVASTATINA SÃO CAPAZES DE REDUZIR A ATIVAÇÃO E PROLIFERAÇÃO DE MACRÓFAGOS DA LINHAGEM RAW267,2 ATIVADOS COM LPS

<sup>1</sup>Najara Gomes (IC-UNIRIO); <sup>1</sup>Larissa Silva de Almeida Christoni (IC-FAPERJ); <sup>1,2</sup>Carlos Fernando Araujo Lima (Mestrado-FAPERJ Nota 10); <sup>2</sup>Israel Felzenszwalb; <sup>1</sup>Claudia Alessandra Fortes Aiub (Orientadora).

<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, UNIRIO e UERJ.

Palavras-chave: atorvastatina, anti-inflamatórios, resposta proliferativa, quimioterapia experimental.

#### INTRODUÇÃO

A inflamação é um processo essencial para a sobrevivência dos organismos por consistir em uma resposta fundamentalmente protetora, que livra os organismos da causa inicial da injúria e das consequências desta. Sem esse mecanismo, as infecções poderiam não ser percebidas e os ferimentos causados poderiam não cicatrizar, levando até a morte do indivíduo. Este mecanismo de defesa é uma reação complexa que ocorre nos tecidos levando, principalmente, a respostas dos vasos sanguíneos, leucócitos, proteínas plasmáticas e fagócitos teciduais devido à secreção de fatores solúveis por células próprias ou invasores estranhos. No entanto, a inflamação pode se tornar a própria causa das injúrias e de doenças. Por esta razão, há uma grande necessidade do desenvolvimento de fármacos anti-inflamatórios que controlem as sequelas nocivas da inflamação sem interferir em seus efeitos benéficos (KUMAR et al., 2010).

As estatinas, também conhecidas como inibidores da 3-Hidroxi-3-Metilglutaril Coenzima A (HMG-CoA) redutase, são usadas no tratamento da hipercolesterolemia, porém vem sendo estudadas por seus efeitos pleiotrópicos, como, por exemplo, seu potencial como agentes imunossupressores. Estudos recentes mostram que as estatinas, com destaque para Atorvastatina (ATV), são capazes de reprimir a indução do complexo de histocompatibilidade principal de classe II (MHC II) induzida por interferon-gama (IFN- $\gamma$ ), de diminuir a secreção de citocinas pró-inflamatórias, como IFN- $\gamma$ , MCL-I e IL-1 $\beta$  e de reduzir a proliferação e ativação dos linfócitos T. Deste modo, as estatinas podem ser importantes para o manejo clínico, já que como fármacos anti-inflamatórios, seriam uma opção para permitir a modulação da resposta imune no tratamento de doenças inflamatórias e auto-imunes, além de seu uso ser benéfico para pacientes transplantados, já que previne a rejeição dos aloenxertos (NEURAUTER et al., 2002 e MACH, 2013).

#### OBJETIVO

Avaliar o efeito da Atorvastatina e de seus análogos (da série PCSR) sobre a ativação e proliferação de macrófagos da linhagem RAW 264,7.

#### METODOLOGIA

1) Amostras: A atorvastatina cálcica, assim como seus análogos com potencial anti-inflamatório, foram sintetizados pelo laboratório de química medicinal, liderados pela Dra. Núbia Boechat, do Centro de Tecnologia de Fármacos da Fundação Oswaldo Cruz (FarManguinhos – FIOCRUZ).

2) Cultura de células: Os macrófagos da linhagem RAW 264,7 foram gentilmente cedidos pela Dra. Marsen Garcia, do Laboratório de Imunologia Aplicada do Departamento de Bioquímica da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ). Esta linhagem de macrófagos é derivada de tumores induzidos pelo vírus da leucemia murina de Abelson, em camundongos machos BALB/c. As células foram cultivadas em meio DMEM, suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB) e 1% de solução de antibióticos (Estreptomicina e Penicilina), em garrafas de 75cm<sup>2</sup> e mantidas em estufa úmida à temperatura de 37°C e 5% de CO<sub>2</sub> (CELMER, 2010).

3) Ensaio de sobrevivência: A população de células viáveis é ajustada para que se tenha 105 células/mL. Após adesão celular, o meio foi substituído e as células lavadas com PBS 1x para, em seguida, ser realizado o tratamento com ATV, PCSR02, PCSR08, PCSR09 e PCSR10 (Cf = 10, 100 e 1000  $\mu$ M), controle positivo – Mitomicina-C (Cf = 1, 5, 10 e 50  $\mu$ M) – e controle negativo - DMSO 1%. Depois disso, as placas foram armazenadas por 24h, 48h e 72h em estufa a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Após os períodos pré-determinados, o meio com os produtos teste foram retirados, houve a lavagem com PBS 1x, foram adicionados 90  $\mu$ L de DMEM e 10  $\mu$ L de reagente WST-1 e a placa foi incubada novamente por 3h na estufa. Os resultados foram lidos em um espectrofotômetro com um comprimento de onda de 440 nm, onde foram considerados os valores de absorbância como indicador da viabilidade celular (N = 3, triplicata) (Roche, 2006).

4) Avaliação da proliferação: Para a avaliação da capacidade de inibição da ativação e proliferação celular induzida por um agente inflamatório, foram realizados o ensaio modificado de WST-1 e a contagem por exclusão do Azul de Trypan. Foram incubadas 105 células em 1000  $\mu$ L de DMEM até garantir a adesão das células ao substrato. Após esse período, as células foram lavadas com PBS 1x e 990  $\mu$ L de DMEM foram adicionados para, em seguida, ser realizado o tratamento com o agente flogístico (LPS de E. coli 10  $\mu$ g/mL), ATV, PCSR02, PCSR08, PCSR09 e PCSR10 (Cf = 10, 100 e 1000  $\mu$ M), Dexametasona (Controle positivo - DEXA, Cf = 100 nM) e DMSO 1% (controle negativo). Houve ainda o tratamento apenas com DMSO, sem a adição do LPS. Depois disso,

### 13ª JORNADA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

as placas foram incubadas por 48h em estufa a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub> e após o período pré-determinado, os sobrenadantes das culturas foram coletados em criotubos e armazenados em freezer à -70°C para posterior dosagem de citocinas. Foram adicionados 900 µL de DMEM e 100 µL de reagente WST-1 e a placa foi incubada novamente por 3h na estufa (N=3, triplicata). Os produtos da reação foram transferidos para placas de 96 poços para que a leitura da placa pudesse ser realizada no leitor de microplacas no comprimento de onda de 440 nm. Para a contagem de células pelo método de exclusão do Azul de Trypan foi realizado o mesmo protocolo de incubação descrito anteriormente, porém, após o tratamento de 48h com as amostras-teste, o sobrenadante das culturas foi recolhido, as células foram soltas do substrato e foi realizada a contagem total de células viáveis (para estimar a proliferação) e inviáveis (para a estimativa da sobrevivência após a ativação), após a coloração com o corante Azul de Trypan, na câmara de Neubauer, no microscópio óptico (N=2, duplicata).

5) Análise de dados: Os dados obtidos a partir dos experimentos foram analisados utilizando os programas Microsoft Office Excel 2010 para Windows e GraphPad Prism, utilizando one-way ANOVA com pós-teste de Tukey,  $p < 0,01$ .

#### RESULTADOS

O ensaio de sobrevivência utilizou o limite de 80% de sobrevivência para considerar a toxicidade da substância analisada por não ter sido possível o cálculo da DL50 das substâncias testes. O ensaio de sobrevivência por WST-1 mostrou que, no tempo de 48h, a Atorvastatina e o análogo PCSR09 não são tóxicos em nenhuma das concentrações testadas; já os análogos PCSR02, PCSR08 e PCSR10 mostraram toxicidade quando na maior concentração (1000 µM). Já o ensaio de sobrevivência realizado através do método com Azul de Trypan, mostrou que nenhuma das substâncias-teste são tóxicas aos macrófagos utilizados, quando estas células apresentam-se ativadas.

O índice de estimulação (SI) foi analisado tanto pelo ensaio WST-1 quanto pelo método com Azul de Trypan. Após tratamento das células com LPS, o SI tende a se tornar maior ou igual a 3, e por isso podemos considerar que as células estão ativadas. No ensaio WST-1, quando tratadas também com Atorvastatina, ocorre uma redução no SI em todas as concentrações, porém, apenas com ATV de 100 e 500 µM mostra uma redução no SI estatisticamente significativa. Deste modo, pode-se dizer que houve redução na ativação das células testadas apenas nestas concentrações; o tratamento com PCSR02 se mostrou eficiente em todas as concentrações, já que houve redução estatisticamente significativa em todas as concentrações testadas, e sendo assim, esse agente teste pode ser capaz de reduzir a ativação dos macrófagos; quando tratadas com PCSR08 e PCSR09. Os resultados mostraram redução estatisticamente significativa apenas nas concentrações de 100 e 1000 µM, e assim como a ATV, apenas nessas concentrações demonstraram a redução na ativação das células utilizadas no experimento. Por fim, quando as células foram tratadas com PCSR10, houve redução estatisticamente significativa em todas as concentrações testadas, além disso, na concentração de 100 µM, a redução foi bastante elevada, mostrando SI de, aproximadamente, três vezes menor quando comparado ao do LPS, logo, é possível que este análogo seja o mais promissor como medicamento anti-inflamatório.

Quando analisado pelo método Azul de Trypan, todas as substâncias testadas, em todas as concentrações, mostraram uma redução estatisticamente significativa. Logo, todas as substâncias testadas reduzem a ativação das células inflamadas. Além disso, corroborando com o dado anterior, a substância possivelmente mais promissora como medicamento anti-inflamatório é o análogo PCSR10, pois é o que mostra a maior redução do SI.

Além disso, foi possível observar que todas as substâncias utilizadas mostraram uma resposta dose-dependente em ambos os ensaios.

#### CONCLUSÃO

Através dos resultados até então obtidos, pode-se considerar que a Atorvastatina e seus análogos são drogas potencialmente anti-inflamatórias, necessitando ainda de ensaios in vitro e in vivo para confirmar estes efeitos.

#### REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS: CELMER, A. J. PADRONIZAÇÃO DA TÉCNICA DE RT-PCR PARA TRIAGEM IN VITRO DE COMPOSTOS COM POTENCIAL ATIVIDADE IMUNOMODULATÓRIA EM MACRÓFAGOS. Disponível em: <<https://repositorio.ufsc.br/bitstream/handle/123456789/94378/286647.pdf?sequence=1>>. Acessado em: 10 de janeiro de 2014.

FERNÁNDEZ, M.R.; CARVALHO, R.V.; OGLIARI, F.A.; BEIRA, F.A.; A. ETGES, A.; BUENO, M. Cytotoxicity and genotoxicity of sodium percarbonate: a comparison with bleaching agents commonly used in discoloured pulpless teeth, *International Endodontic Journal*, v.43, p.102-108, 2010.

KUMAR V., et al. "Robbins and Cotran – Pathologic Basis of Disease". 2010, 8ª ed. Ed. Elsevier;

MACH, F. Statins as Immunomodulatory Agents. Disponível em: <[http://circ.ahajournals.org/content/109/21\\_suppl\\_1/II-15](http://circ.ahajournals.org/content/109/21_suppl_1/II-15)>. Acessado em: 10 de janeiro de 2014.

NEURAUER G., WIRLEITNER B., LAICH A., SCHENNACH H., WEISS G. & FUCHS D. Atorvastatin suppresses interferon-induced neopterin formation and tryptophan degradation in human peripheral blood mononuclear cells and in monocytic cell lines. *Clin. Exp. Immunol.* 2003; 131, p. 264–267.

ROCHE. Cell proliferation reagent WST-1 protocol, 2006.