



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA**

**Avaliação do efeito modulador de diferentes estatinas
sobre danos ao DNA induzidos pela doxorrubicina em
células somáticas de *Drosophila melanogaster***

Aluna: Priscila Capelari Orsolin

Orientador: Prof. Dr. Júlio César Nepomuceno

UBERLÂNDIA, MG
2015



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

**Avaliação do efeito modulador de diferentes estatinas
sobre danos ao DNA induzidos pela doxorrubicina em
células somáticas de *Drosophila melanogaster***

Aluna: Priscila Capelari Orsolin

Orientador: Prof. Dr. Júlio César Nepomuceno

Tese apresentada à Universidade Federal de
Uberlândia como parte dos requisitos para
obtenção do título de Doutor em Genética e
Bioquímica (Área de concentração: Genética).

UBERLÂNDIA, MG
2015



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

O76a
2015

Orsolin, Priscila Capelari, 1986-
Avaliação do efeito modulador de diferentes estatinas sobre danos ao
DNA induzidos pela doxorubicina em células somáticas de *Drosophila*
melanogaster / Priscila Capelari Orsolin. - 2015.
117 p. : il.

Orientador: Júlio César Nepomuceno.
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa
de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica.
Inclui bibliografia.

1. Génetica - Teses. 2. Estatinas - Teses. 3. *Drosophila melanogaster*
- Teses. 4. Doxorubicina - Teses. I. Nepomuceno, Júlio César, . II.
Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em
Genética e Bioquímica. III. Título.

CDU: 577.1



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

**Avaliação do efeito modulador de diferentes estatinas
sobre danos ao DNA induzidos pela doxorrubicina em
células somáticas de *Drosophila melanogaster***

Aluna: Priscila Capelari Orsolin

COMISSÃO EXAMINADORA

Presidente: Prof^a. Dr^a. Sandra Morelli

Examinadores: Prof. Dr. Alexandre Azenha Alves de Rezende

Prof^a. Dr^a. Ana Maria Bonetti

Prof^a. Dr^a. Heloísa Helena Rodrigues de Andrade

Prof. Dr. Rafael Rodrigues Dihl

Data de defesa: 23/07/2015

As sugestões da Comissão Examinadora e as Normas da PGGB para o formato da Tese foram contempladas.

Prof. Dr. Júlio César Nepomuceno

“Se enxerguei mais longe foi porque me apoiei no ombro de gigantes”.

Isaac Newton

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me amparar nos momentos difíceis, me dar força e determinação para superar as dificuldades e por me mostrar os caminhos certos nas horas incertas.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Júlio César Nepomuceno, grande exemplo de competência e dedicação. Agradeço imensamente pelo acolhimento e pelos valiosos ensinamentos, desde a graduação. Sem sua ajuda, confiança e incentivo eu não teria chegado até aqui. Obrigada por não medir esforços para que meu sonho se tornasse realidade. Você despertou em mim o interesse pela genética e pela docência... Serei eternamente grata!

Aos meus pais, Vilson e Janéte, pelo amor, carinho, dedicação e apoio. Obrigada por acreditarem tanto em mim e me incentivarem a lutar pelos meus sonhos. Tenho muito orgulho de ser filha de vocês!

À minha irmã, Silvana, agradeço pelo apoio e incentivo constantes. Obrigada por vibrar pelas minhas conquistas e me encorajar nos momentos difíceis! Agradeço, também, pelo valioso auxílio na correção da tese.

Ao meu marido, Fernando, pela paciência, carinho, companheirismo e amor. Por sua compreensão diante da minha ausência em tantos momentos importantes e por seu incentivo, que me motivou a lutar por meus objetivos e sonhos.

Aos meus afilhados, Pietro e Valentina, por trazerem paz e alegria aos meus dias! Obrigado, também, por todo amor!

Ao meu cunhado, Douglas, pelo apoio e incentivo.

Aos colegas do Laboratório de Citogenética e Mutagenese do Centro Universitário de Patos de Minas (LABCIM), por toda ajuda. Mais do que companheiros de Laboratório, somos uma família. Sinto-me privilegiada em fazer parte dessa equipe!

As minhas amigas e companheiras de doutorado, Nayane Moreira Machado e Rosiane Gomes Silva Oliveira, pela companhia, incentivo e estímulo constantes. Obrigada pelos momentos agradáveis compartilhados. Certamente tudo teria sido bem mais difícil sem vocês ao meu lado!

Aos amigos de sempre, agradeço pela amizade sem cobranças, pelo incentivo e pelos tantos bons momentos compartilhados.

Aos membros da Comissão Examinadora dessa tese, Prof^a. Dr^a. Ana Maria Bonetti, Prof. Dr. Alexandre Azenha Alves de Rezende, Prof^a. Dr^a. Heloísa Helena Rodrigues de Andrade, Prof. Dr. Rafael Rodrigues Dihl e Prof. Dr^a. Sandra Morelli, por aceitarem o convite para fazer parte dessa comissão, pela leitura do trabalho e pelas valiosas sugestões apresentadas.

Ao Prof. Dr. Mário Antônio Spanó, pela colaboração e auxílio nas etapas finais do doutorado.

Aos professores do Programa de Pós Graduação em Genética e Bioquímica da Universidade Federal de Uberlândia, pelos ensinamentos e contribuição em minha formação acadêmica.

À Janaina de Sousa Mota, secretária do Programa de Pós-graduação em Genética e Bioquímica, pela imensa colaboração em todos os momentos necessários. Sua cordialidade, preocupação e colaboração sempre serão lembrados.

A CAPES, pela concessão da bolsa de doutorado.

APOIO FINANCEIRO

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Citogenética e Mutagênese do Centro Universitário de Patos de Minas – UNIPAM – Patos de Minas, MG.

Recebemos o apoio financeiro dos seguintes órgãos e instituições:

- Centro Universitário de Patos de Minas – UNIPAM.
- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq);
- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal do Nível Superior (CAPES);
- Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG);
- Universidade Federal de Uberlândia – UFU;

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 1- Fundamentação teórica

Figura 1. Estrutura química da molécula de colesterol.....	4
Figura 2. Via de biossíntese do colesterol.....	7
Figura 3. (A) Ponto de atuação das estatinas na via de síntese do colesterol; (B) Estrutura química do substrato HMG-CoA; (C) Estrutura química da sinvastatina. Em destaque a semelhança entre o substrato e o grupo químico da estatina.....	12
Figura 4. Propostas de mecanismos antitumorais dos inibidores da HMG-CoA redutase.....	15
Figura 5. Estrutura química das diferentes estatinas.....	18
Figura 6. Estrutura química da Doxorrubicina.....	22
Figura 7. Esquema simplificado dos principais mecanismos propostos para a toxicidade cardíaca e para a atividade antitumoral da Doxorrubicina.....	24
Figura 8. Casal de <i>Drosophila melanogaster</i> . À esquerda a fêmea e à direita o macho.....	26
Figura 9. Pelos <i>mwh</i> e <i>flr³</i> - Fotomicrografia, microscópio óptico de luz (aumento de 400x). (A) Pêlos <i>multiple wing hairs</i> ; (B) Pêlos <i>flare</i>	27
Figura 10. Esquema representativo dos cruzamentos realizados no teste Smart: (A) Cruzamento Padrão (ST)- fêmeas virgens <i>flr³</i> cruzadas com machos <i>mwh</i> ; (B) Cruzamento de Alta Capacidade de Bioativação (HB)- fêmeas virgens <i>ORR</i> cruzadas com machos <i>mwh</i> , com seus respectivos descendentes, indivíduos trans-heterozigotos marcados (MH) e heterozigotos balanceados (BH), diferenciados pelo fenótipo da asa.....	29

Capítulo 2- Modulating effect of synthetic statins against damage induced by doxorubicin in somatic cells of *Drosophila melanogaster*

Figure 1. Chemical structures of atorvastatin (A) and rosuvastatin (B).....	67
--	----

Figure 2. Percentage of survival of flies evaluated after metamorphosis from third-stage larvae (72h) treated with different concentrations of atorvastatin and rosuvastatin alone and in combination with DXR.....	68
--	----

Capítulo 3- Efeito modulador da sinvastatina sobre danos ao DNA induzidos pela doxorrubicina em células somáticas de *Drosophila melanogaster*

Figura 1. Fórmula estrutural da sinvastatina.....	94
--	----

Figura 2. Porcentagem de sobrevivência das moscas após a metamorfose das larvas de 72h tratadas com diferentes concentrações de sinvastatina, isoladamente e em associação com a DXR.....	95
--	----

LISTA DE TABELAS

Capítulo 2- Modulating effect of synthetic statins against damage induced by doxorubicin in somatic cells of *Drosophila melanogaster*

Table 1. Summary of results obtained in the marked trans-heterozygous descendants (MH) and balancer-heterozygous (BH) of *Drosophila melanogaster* derived from the standard (ST) cross and the high bioactivation (HB) cross treated with different atorvastatin concentrations (separately and in combination with DXR), positive control (DXR 0.125 mg/mL) and negative control (5% ethanol)..... 69

Table 2. Summary of results obtained in the marked trans-heterozygous descendants (MH) and balancer-heterozygous (BH) of *Drosophila melanogaster* derived from the standard (ST) cross and the high bioactivation (HB) cross treated with different rosuvastatin concentrations (separately and in combination with DXR), positive control (DXR 0.125 mg/mL) and negative control (5% ethanol)..... 71

Capítulo 3- Efeito modulador da sinvastatina sobre danos ao DNA induzidos pela doxorrubicina em células somáticas de *Drosophila melanogaster*

Tabela 1. Resumo dos resultados obtidos nos descendentes trans-heterozigotos marcados (MH) e heterozigotos balanceados (BH) de *Drosophila melanogaster*, derivados do cruzamento padrão (ST), tratados com diferentes concentrações de sinvastatina (isoladamente e em associação com DXR), controle positivo (DXR 0,125 mg/mL) e controle negativo (etanol 5%)..... 96

Tabela 2. Resumo dos resultados obtidos nos descendentes trans-heterozigotos marcados (MH) e heterozigotos balanceados (BH) de *Drosophila melanogaster*, derivados do cruzamento de alta biativação (HB), tratados com diferentes concentrações de sinvastatina (isoladamente e em associação com DXR), controle positivo (DXR 0,125 mg/mL) e controle negativo (etanol 5%)..... 98

RESUMO

As estatinas são fármacos antilipêmicos que promovem inibição da HMG-CoA redutase, enzima essencial na via de biossíntese do colesterol. Além de inibir a síntese do colesterol, elas podem atuar inibindo a formação de outros produtos, como os isoprenoides, o que confere a essa classe de drogas benefícios adicionais, dentre os quais, efeitos antiproliferativos, anti-invasivos e pró-apoptóticos. A presente tese foi desenvolvida com o objetivo de avaliar o efeito mutagênico/recombinogênico de três estatinas amplamente difundidas no mercado: atorvastatina, rosuvastatina e sinvastatina, bem como os possíveis efeitos moduladores dessas estatinas sobre danos ao DNA induzidos pela doxorrubicina (DXR), um fármaco antitumoral, que promove intercalação com a molécula de DNA e produz radicais livres. Tal análise foi realizada por meio do teste para detecção de mutação e recombinação somática (SMART), em asas de *Drosophila melanogaster*. Para isso, larvas descendentes dos cruzamentos padrão (ST) e de alta bioativação (HB) foram tratadas cronicamente com cinco concentrações de cada estatina, isoladamente e em associação com a DXR (em sistema de co-tratamento). Os resultados revelaram ausência de efeito mutagênico/recombinogênico para as três estatinas testadas. A análise dos descendentes co-tratados (DXR + estatinas) revelou um efeito modulador dessas estatinas sobre os danos induzidos pela DXR em *D. melanogaster*. Esse efeito modulador, entretanto, foi distinto entre os fármacos testados. Tal resposta foi verificada em todas as concentrações nos descendentes dos cruzamentos ST e HB tratados com rosuvastatina; apenas em descendentes do cruzamento HB tratados com atorvastatina e, principalmente, nos descendentes do cruzamento ST tratados com sinvastatina. Esses resultados denotam que, embora as estatinas possuam o mesmo mecanismo de ação, existem diferenças quanto à eficácia das respostas observadas para cada estatina individualmente. A indução de apoptose e, principalmente, a atividade antioxidante dessa classe de drogas parecem ser os principais mecanismos envolvidos na redução da frequência de manchas mutantes e a consequente modulação do dano induzido pela DXR em *D. melanogaster*.

Palavras-chave: Estatinas. Efeito modulador. DXR. Smart. *Drosophila melanogaster*.

ABSTRACT

Statins are antilipemics drugs that promote inhibition of HMG-CoA reductase, an essential enzyme in the cholesterol biosynthetic pathway. Besides inhibiting cholesterol synthesis, can also inhibit the formation of other products, such as isoprenoids, which confers additional benefits this class of drugs, among which, antiproliferative, anti-invasive and pro-apoptotic effects. This thesis has been developed in order to assess the mutagenic/recombinogenic effect of three commonly prescribed statins: atorvastatin, rosuvastatin and simvastatin as well as the possible modulatory effects of statins on DNA damage induced by doxorubicin (DXR), an antitumor drug that promotes intercalation with the DNA molecule and produces free radicals. This analysis was performed using the somatic mutation and recombination test (SMART) in *Drosophila melanogaster*. For this analysis, larvae descendants from the standard (ST) cross and the high bioactivation (HB) cross were treated chronically with five concentrations of each statin alone and in combination with DXR (in a co-treatment system). The results revealed no mutagenic/recombinogenic effect for the three statins tested. The analysis of the co-treated descendants (DXR + statins) revealed a modulating effect of statins on damages induced by DXR in *D. melanogaster*. This modulating effect, however, was different among the tested drugs. Such a response was observed at all concentrations in the descendants of the ST and HB crosses treated with rosuvastatin; only in descendants of the HB cross treated with atorvastatin and especially in descendants of the ST cross treated with simvastatin. These results show that although statins have the same mechanism of action, there are differences in the effectiveness of responses observed for each statin individually. Induction of apoptosis and, primarily, antioxidant activity appear to be the main mechanisms involved in reducing the frequency of mutant spots and consequent modulation of the damage induced by DXR in *D. melanogaster*.

Keywords: Statins. Modulatory Effect. DXR. Smart. *Drosophila melanogaster*.

SUMÁRIO

APRESENTAÇÃO.....	1
 CAPÍTULO 1- Fundamentação teórica	
1. Colesterol.....	4
1.1 <i>Biossíntese do colesterol.....</i>	5
2. Via do mevalonato em insetos.....	8
3. Estatinas.....	9
3.1 <i>Origem das estatinas: breve histórico.....</i>	10
3.2 <i>Mecanismo de ação.....</i>	11
3.3 <i>Efeitos pleiotrópicos.....</i>	13
3.3.1 Efeitos sobre o câncer.....	14
3.4 <i>Propriedades farmacocinéticas.....</i>	17
3.4.1 Atorvastatina.....	20
3.4.2 Rosuvastatina.....	20
3.4.3 Sinvastatina.....	21
4. Doxorrubicina.....	21
5. Somatic Mutation and Recombination Test- SMART.....	25
5.1 <i>Linhagens mutantes de <i>Drosophila melanogaster</i>.....</i>	27
5.2 <i>Cruzamentos.....</i>	28
REFERÊNCIAS.....	31
 CAPÍTULO 2- Modulating effect of synthetic statins against damage induced by doxorubicin in somatic cells of <i>Drosophila melanogaster</i>.....	41
 CAPÍTULO 3- Efeito modulador da sinvastatina sobre danos ao DNA induzidos pela doxorrubicina em células somáticas de <i>Drosophila melanogaster</i>.....	73
 CONCLUSÕES GERAIS.....	99
 ANEXO.....	101

APRESENTAÇÃO

As estatinas são fármacos hipolipemiantes que bloqueiam a síntese de colesterol endógeno, por meio de uma inibição competitiva da 3-hidróxi-3-metilglutaril CoA redutase (HMG-CoA redutase), enzima chave no processo em questão. Ao inibir a síntese de colesterol, as estatinas promovem uma melhoria no perfil lipídico (redução nos níveis de LDL e triglicérides, e aumento nos níveis de HDL). Tais modificações no perfil lipídico contribuem para a redução da mortalidade cardiovascular, da incidência de eventos isquêmicos coronarianos agudos e do acidente vascular cerebral.

Estas substâncias, capazes de mimetizar o substrato natural na via de biossíntese do colesterol (via do mevalonato), podem ser divididas em duas categorias principais, as estatinas naturais e as sintéticas. Tais estatinas diferem essencialmente umas das outras em função de características como: potência, perfil farmacocinético, via de metabolização, hidrofiliabilidade ou lipofiliabilidade, interação farmacológica, meia-vida plasmática e efeitos indesejados relacionados, sobretudo, à miotoxicidade. Nesse contexto, embora todas as estatinas possuam o mesmo mecanismo de ação, existem diferenças quanto à eficácia das respostas observadas para cada estatina individualmente.

A elevada seletividade das estatinas junto à enzima HMG-CoA redutase e vários dos efeitos pleiotrópicos (independentes do colesterol) destes fármacos parecem estar associados à menor ativação de algumas proteínas que interferem em importantes vias de sinalização celular (proteínas Ras e Rho, por exemplo). Dessa forma, a redução do mevalonato culmina em redução na ativação dessas proteínas, promovendo efeitos pleiotrópicos, como: atividade antioxidante, anti-inflamatória, imunomoduladora, antitrombogênica e de melhoria da função endotelial, além de propriedades antineoplásicas, incluindo redução na progressão do ciclo celular, supressão da angiogênese e inibição do crescimento tumoral.

Diante do exposto, este trabalho foi desenvolvido com o objetivo principal de avaliar o efeito mutagênico/recombinogênico de diferentes estatinas (atorvastatina, rosuvastatina e simvastatina), bem como os possíveis efeitos moduladores dessas estatinas sobre danos ao DNA induzidos pela doxorrubicina, por meio do teste para detecção de mutação e recombinação somática (SMART) em asas de *Drosophila melanogaster*.

A apresentação deste trabalho foi dividida em três capítulos:

Capítulo I: Contempla a fundamentação teórica, abordando aspectos preliminares necessários à compreensão do assunto. Inicialmente são apresentadas informações sobre o colesterol, sua importância biológica e seu processo de biossíntese. Na sequência, realiza-se uma abordagem histórica sobre as diferentes estatinas (naturais e sintéticas) disponíveis no mercado, contemplando o mecanismo de ação desses fármacos e seus efeitos pleiotrópicos, com ênfase no efeito sobre o câncer. Por fim, são fornecidas informações sobre a doxorrubicina (agente utilizado como controle positivo na presente pesquisa) e, também, sobre a *Drosophila melanogaster* e o teste para detecção de mutação e recombinação somática (SMART), ferramenta utilizada para avaliação dos possíveis efeitos moduladores das estatinas testadas.

Capítulo II: Apresenta o artigo intitulado “Modulating effect of synthetic statins against damage induced by doxorubicin in somatic cells of *Drosophila melanogaster*”, publicado no periódico “Food and Chemical Toxicology”, em abril de 2015 (v.81, p.111–119). Esse capítulo foi redigido em língua inglesa, seguindo as normas de formatação do referido periódico.

Capítulo III: Apresenta o artigo intitulado “Efeito modulador da sinvastatina sobre danos ao DNA induzidos pela doxorrubicina em células somáticas de *Drosophila melanogaster*” enviado para publicação, também, no periódico “Food and Chemical Toxicology”.

CAPÍTULO I

FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

1. Colesterol

O colesterol (Figura 1) é um lipídeo esteroide que está presente nos tecidos e no plasma do organismo animal sob a forma livre ou em combinação com um ácido graxo de cadeia longa, na forma esterificada (ésteres de colesterol). Trata-se de um lipídeo anfipático e, por isso, constitui um componente essencial das membranas celulares, auxiliando na manutenção da permeabilidade e fluidez adequadas (GUYTON; HALL, 2011; MURRAY et al., 2013). Além do papel estrutural essencial nas membranas das células animais, o colesterol é precursor da vitamina D, de ácidos biliares e de uma série de hormônios, como andrógenos, progesterona, estrógenos e adrenocorticoides (CAMPO; CARVALHO, 2007; MARZZOCO; TORRES, 2007; NELSON; COX, 2011; SILVA, 2013).

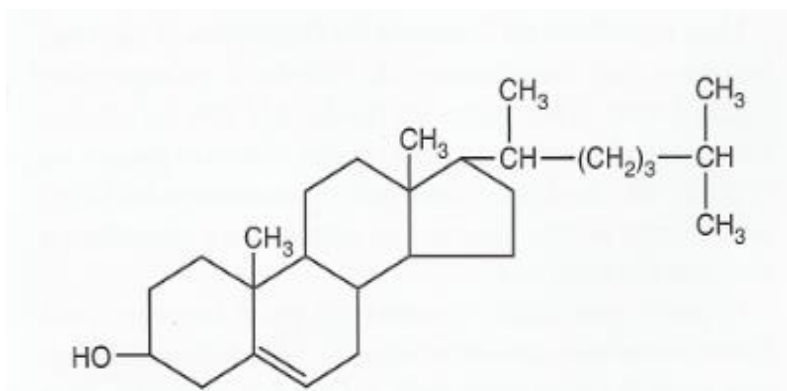


Figura 1. Estrutura química da molécula de colesterol.
Fonte: GUYTON; HALL (2011).

No plasma, o colesterol é transportado em associação com lipoproteínas. A lipoproteína de baixa densidade (LDL) é o veículo que fornece o colesterol e o éster de colesterol a muitos tecidos. Já a lipoproteína de alta densidade (HDL) faz a remoção do colesterol livre dos tecidos e o transporte até o fígado, onde é eliminado do organismo em sua forma inalterada ou após conversão em ácidos biliares (MURRAY et al., 2013).

Em indivíduos saudáveis, a síntese e a utilização de colesterol são fortemente reguladas, no sentido de se evitar seu acúmulo e deposição anormal no organismo. Entretanto, em processos patológicos, o papel do colesterol está

diretamente associado à gênese da aterosclerose de artérias vitais (GUYTON; HALL, 2011; MURRAY et al., 2013). A aterosclerose constitui o principal fator dentre os que contribuem para o desenvolvimento da doença vascular cerebral e da doença arterial coronariana (MOTTA, 2009; NELSON; COX, 2011). Nesse contexto, existe uma forte evidência de que a redução do colesterol plasmático total e do colesterol LDL é acompanhada de uma diminuição proporcional da incidência de doenças cardiovasculares (JOHANSSON et al., 2006; ABBAS et al., 2012; SABINA et al., 2012).

A regulação da concentração do colesterol plasmático ocorre por duas vias: a endógena e a exógena. Entretanto, a maior parte do colesterol corporal total é obtida através da síntese endógena (GUYTON; HALL, 2011). Através dessa via, o colesterol é sintetizado pelo fígado e tecidos extra-hepáticos. Pela via exógena, o colesterol proveniente da dieta e de fontes biliares é absorvido no intestino. O fígado e os intestinos são responsáveis, cada qual, por cerca de 10% da síntese total. Entretanto, quase todos os tecidos são capazes de sintetizar colesterol, e o processo ocorre no retículo endoplasmático e no citosol (MURRAY et al., 2013; SILVA, 2013).

1.1 Biossíntese do colesterol

A síntese de colesterol constitui um processo fisiológico vital, cuja via é composta por várias etapas. A Acetil-Coenzima A (Acetil-CoA), produzida durante o metabolismo de carboidratos, lipídeos e proteínas é a precursora da síntese de colesterol, uma vez que constitui a fonte dos 27 átomos de carbono da molécula (MURRAY et al., 2013; SILVA, 2013).

A primeira etapa da biossíntese de colesterol no organismo é realizada pela associação de três moléculas de acetil-CoA para formação de 3-hidróxi-3-metilglutaril-CoA (HMG-CoA). Posteriormente, a HMG-CoA é reduzida a mevalonato, sendo essa reação irreversível e catalisada pela HMG-CoA redutase. Como esta conversão é decisiva e sem retorno, a HMG-CoA redutase torna-se, dessa forma, o principal ponto de regulação da via, limitando a velocidade da mesma (MARZZOCO; TORRES, 2007; NELSON, COX, 2011).

A condensação de três moléculas de pirofosfato de isopentenila (com 5 átomos de carbono), obtido a partir do mevalonato (6 átomos de carbono), fornece o intermediário farnesil pirofosfato (estrutura com 15 átomos de carbono) (CAMPO; CARVALHO, 2007; MURRAY et al., 2013). Alternativamente, o farnesil pirofosfato (FPP) pode ser também utilizado na síntese de outros importantes poliisoprenoides, como dolicol, um álcool poliisoprenil envolvido na transmissão de sinal da membrana neuronal, ou ainda, a cadeia lateral da ubiquinona (coenzima Q), cofator na cadeia respiratória das mitocôndrias (BRODY, 1994; MADSEN, 2008; MURRAY et al., 2013). O mevalonato é, portanto, precursor de todos os isoprenoides e esteroides dos organismos vivos (BROWN et al., 1983; MADSEN, 2008).

A reação entre duas moléculas do intermediário isoprenoide C₁₅ gera o derivado esqualeno (30 átomos de carbono). O esqualeno, por sua vez, sofre um processo de ciclização devido à reação de epoxidação, movimentação de elétrons e migração de dois grupos metilas. Essa etapa, ao contrário das demais, requer oxigênio molecular. Dessa forma, origina-se o lanosterol, que é convertido em colesterol após uma série de vinte etapas, a partir da remoção de três grupamentos metila, redução da dupla ligação por NADPH (nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzido) e movimentação da dupla ligação no anel de lanosterol (CAMPO; CARVALHO, 2007; MURRAY et al., 2013). As principais etapas da via de síntese do colesterol estão esquematizadas na Figura 2.

Diversos fatores que regulam a síntese de colesterol atuam modulando a atividade da enzima HMG-CoA redutase, a qual reduz HMG-CoA a mevalonato (GUYTON; HALL, 2011). Por meio dessa enzima, considerada “*marcapasso*” na síntese do colesterol, há diferentes tipos de controles metabólicos, dentre eles: (1) inibição por *feedback*: o colesterol é um inibidor por *feedback* da referida enzima, promovendo a diminuição da síntese endógena desse produto; (2) regulação hormonal: a administração de insulina ou de hormônios tireoidianos aumenta a atividade da HMG-CoA redutase, enquanto o glucagon ou os glicorticoides, reduzem-na; (3) inibição por drogas: as estatinas, por exemplo, são inibidores competitivos da HMG-CoA redutase (LUDKE; LÓPEZ, 1999; GUYTON; HALL, 2011; MURRAY et al., 2013).

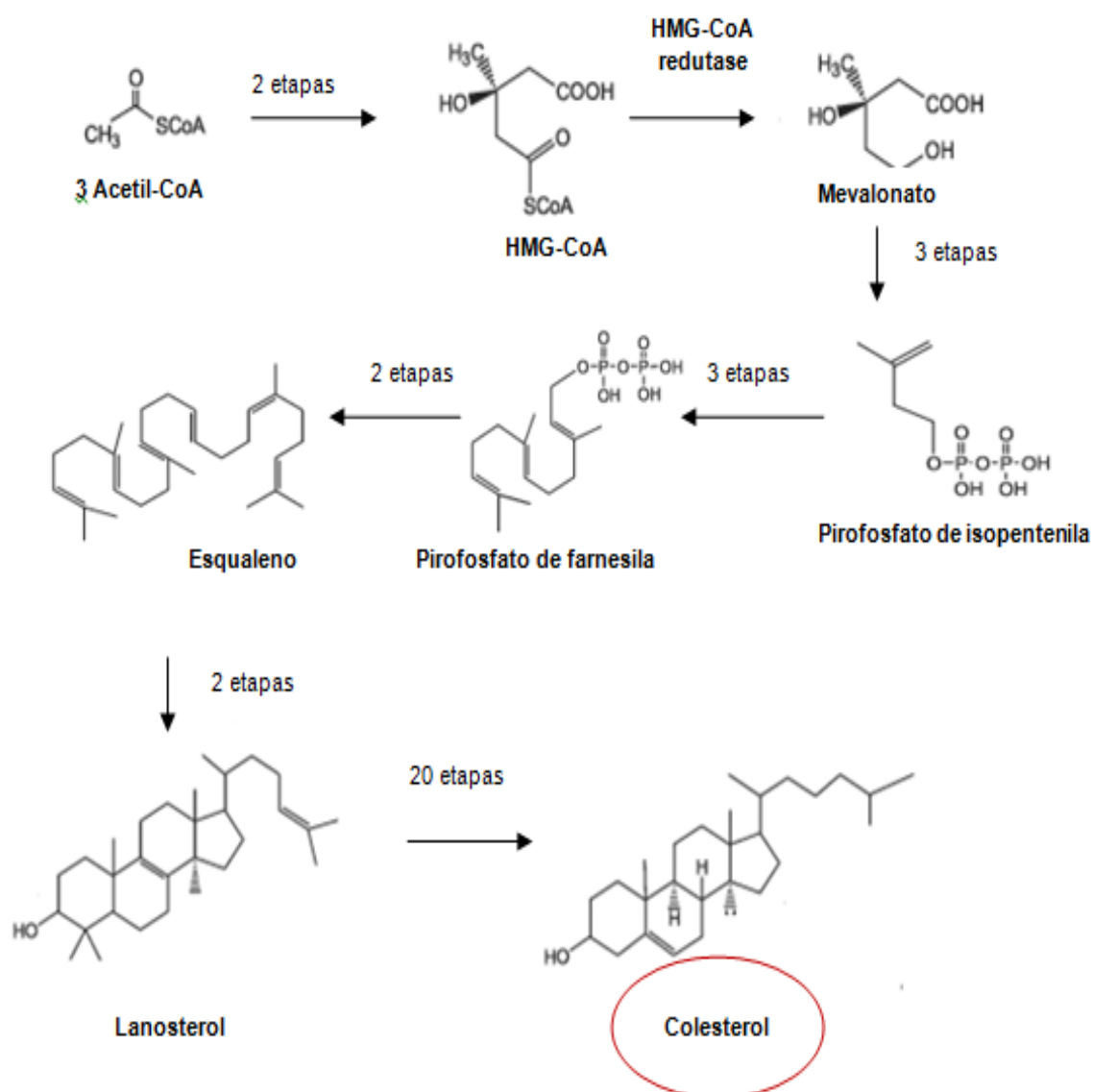


Figura 2. Via de biossíntese do colesterol.
 Fonte: Adaptado de CAMPO; CARVALHO (2007).

A via de síntese do colesterol endógeno, a via do mevalonato, é igualmente importante em animais invertebrados, embora, nesse caso, os produtos finais sejam outros: os isoprenoides, substâncias essenciais que exercem efeitos sobre diversas funções celulares (CHAN et al., 2003), como mostrado na sequência.

2. Via do mevalonato em insetos

No que se refere à via do mevalonato, várias enzimas envolvidas nesse processo, inclusive a HMG-CoA redutase, são comuns a mamíferos e insetos, resultando na produção de isoprenoides (BELLÉS et al., 2005; SPINDLER et al., 2012).

Compostos isoprenoides são encontrados em todas as formas de vida, e o precursor obrigatório para estas moléculas é o mevalonato. Em células de vertebrados, grande parte do mevalonato é destinado para a síntese de esteróis. Nos insetos, ao contrário, como não há síntese de esqualeno ou esteróis, a via destina-se à formação de isoprenoides como prenil benzoquinonas e poliprenoides. Por isso, insetos fornecem, também, um modelo ideal para compreensão dos mecanismos de regulação da enzima HMG-CoA redutase, de forma independente de esteróis (BROWN et al., 1983).

A via do mevalonato constitui uma rota metabólica ramificada com base em polimerização redutora da acetil-CoA, o que resulta na formação de uma grande diversidade de compostos isoprenoides, que estão envolvidos na prenilação de proteínas ligadas a membranas e desempenham um papel importante na sinalização celular e na carcinogênese. Os produtos finais da via também incluem mensageiros hormonais, tais como citocininas e fitoalexinas em plantas, hormônios esteroides em mamíferos, e secreções defensivas, feromônios e hormônio juvenil em insetos (SEYBOLD; TITTIGER, 2003; BELLÉS et al., 2005).

O hormônio juvenil (HJ) está entre os principais hormônios envolvidos com os processos de desenvolvimento (larval e adulto), metamorfose, metabolismo, polimorfismo e reprodução de insetos (HOFFMAN; LORENZ, 1998). A rota de síntese do HJ envolve a formação de dois importantes precursores (comuns à síntese de colesterol em vertebrados): o mevalonato e o farnesil pirofosfato (BELLÉS et al., 2005).

A análise genética da migração de células germinativas em *Drosophila* também revela que o metabolismo lipídico desempenha um papel importante durante várias fases da migração dessas células. Nesse contexto, sabe-se que a

HMG-CoA redutase fornece sinais de atração para as células germinativas desses insetos, o que estimula a migração dessas células (SANTOS; LEHMANN, 2004; DESHPANDE; SCHELD, 2005). Isso é importante porque nessa espécie, as células germinativas primordiais se originam em um local separado da gônada somática. Assim, a fim de formar gametas funcionais, células germinativas migram ao longo de tecidos embrionários para atingir a parte somática da gônada (SANTOS; LEHMANN, 2004).

Sabendo, portanto, que a via do mevalonato constitui uma rota comum a mamíferos e insetos, torna-se possível compreender os efeitos não associados ao colesterol (pleiotrópicos) das estatinas, utilizando a *Drosophila melanogaster* como organismo teste.

3. Estatinas

As estatinas são os fármacos mais utilizados, atualmente, no tratamento das hiperlipidemias, em prevenção primária e secundária, com o propósito de reduzir os níveis de colesterol e, conseqüentemente, o risco de desenvolvimento de doenças coronarianas (CAMPO; CARVALHO, 2007). Elas têm sido amplamente utilizadas para baixar os níveis de lipoproteínas de baixa densidade (LDL), colesterol total e triglicérides e, adicionalmente, promovem um pequeno aumento nos níveis de lipoproteínas de alta densidade (HDL), sem reações adversas graves (KAWATA et al., 2001; McTAGGART; JONES, 2008).

Constituem compostos naturais (produzidos por fungos) ou sintéticos amplamente utilizados na atualidade com intuito de promover a redução dos níveis de colesterol plasmático, por meio da inibição da enzima 3-hidróxi-3-metilglutaril coenzima-A (HMG-CoA) redutase, que catalisa a conversão de HMG-CoA em mevalonato, um intermediário importante no metabolismo do colesterol (ISTVAN; DEISENHOFER, 2001; BONETTI et al., 2003; CHAN et al., 2003; FONSECA, 2005; BRUNTON et al., 2012; GAZZERRO et al., 2012; SPINDLER et al., 2012).

3.1 Origem das estatinas: breve histórico

Em 1971, o microbiologista Akira Endo, juntamente com seus colaboradores, descobriu que culturas de fungos *Penicillium citrinum* produziam um potente inibidor da biossíntese do colesterol. Eles encontraram uma substância que promovia uma disfunção considerável na biossíntese de esteróis e/ou isoprenoides atuando, portanto, na defesa de certos micro-organismos contra outros que necessitavam desses compostos para seu crescimento (ENDO et al., 1976). Tais estudos resultaram na descoberta de um potente inibidor da HMG-CoA redutase, a mevastatina (ou compactina), em 1976, sendo sua afinidade pelo sítio enzimático cerca de 10.000 vezes superior ao substrato HMG-CoA (CAMPO; CARVALHO, 2007). Esta foi a primeira estatina a ser estudada em seres humanos, evidenciando o potencial terapêutico dessa classe de fármacos (YAMAMOTO et al., 1980; BRUNTON et al., 2012). A partir de tal descoberta, vários análogos da mevastatina foram desenvolvidos (COSTA, 2010).

Posteriormente, foi isolada a lovastatina (mevinolina) de *Aspergillus terreus* e *Monascus ruber*, tendo a mesma sido aprovada em 1987 pela *Food and Drug Administration* (FDA) e produzida pela primeira vez pela indústria farmacêutica Merck. A lovastatina começou a ser utilizada para uso terapêutico, em substituição à mevastatina, após ter sido comprovado que esta era capaz de alterar a morfologia intestinal de cachorros e provocava hepatotoxicidade em ratos (CAMPO; CARVALHO, 2007; SANTIAGO, 2011).

Após a lovastatina, seguiram-se a fluvastatina, a pravastatina e a sinvastatina, aprovadas e comercializadas em muitos países (HUNNINGHAKE, 1992). A introdução de novos derivados sintéticos da classe das estatinas ocorreu alguns anos após, com o lançamento da atorvastatina e da cerivastatina (CAMPO; CARVALHO, 2007). A cerivastatina, em pouco tempo, foi retirada do mercado devido aos efeitos colaterais apresentados, muitos dos quais resultantes de interações promovidas por suas propriedades indutoras do citocromo P450 (VIEGAS JÚNIOR; BOLZANI, 2006).

Em agosto de 2003, foi aprovada pelo FDA, a rosuvastatina (CAMPO; CARVALHO, 2007), um potente inibidor da HMG-CoA redutase, com efeito

superior em comparação com as demais estatinas disponíveis até então (SHAH et al., 2011). A pitavastatina é a mais recente estatina disponibilizada no mercado, também conhecida como itavastatina e nisvastatina. Foi desenvolvida em 2003, no Japão, e aprovada em 2009 pelo FDA (LILLY; KOWA, 2010).

Atualmente, no mundo inteiro, existem sete estatinas comercializadas: lovastatina, que deriva da fermentação fúngica (natural), sinvastatina e pravastatina (semissintéticas) e as resultantes de processos de síntese total: atorvastatina, fluvastatina, pitavastatina e rosuvastatina (CAMPO; CARVALHO, 2007; FONSECA et al., 2009; GAZZERRO et al., 2012).

3.2 Mecanismo de ação

O mecanismo de ação das estatinas consiste na inibição competitiva e reversível da enzima HMG-CoA redutase, através da ligação do seu análogo de HMG-CoA à parte ativa da enzima. Este análogo bloqueia o acesso do substrato HMG-CoA a essa região catalítica, inibindo a formação de mevalonato (ISTVAN; DEISENHOFER, 2001; FONSECA, 2005; HINDLER et al., 2006; CAMPO; CARVALHO, 2007; GAZZERRO et al., 2012; SABINA et al., 2012). A forte ligação existente entre as estatinas e HMG-CoA redutase se deve à presença entre elas de grande número de interações de Van der Waals, que são forças de atração resultantes da polarização das moléculas (ISTVAN; DEISENHOFER, 2001). A Figura 3 esquematiza o local (ponto) de atuação desses fármacos na via de síntese endógena do colesterol, bem como a semelhança química entre o substrato original (HMG-CoA) e as estatinas (no exemplo, a sinvastatina).

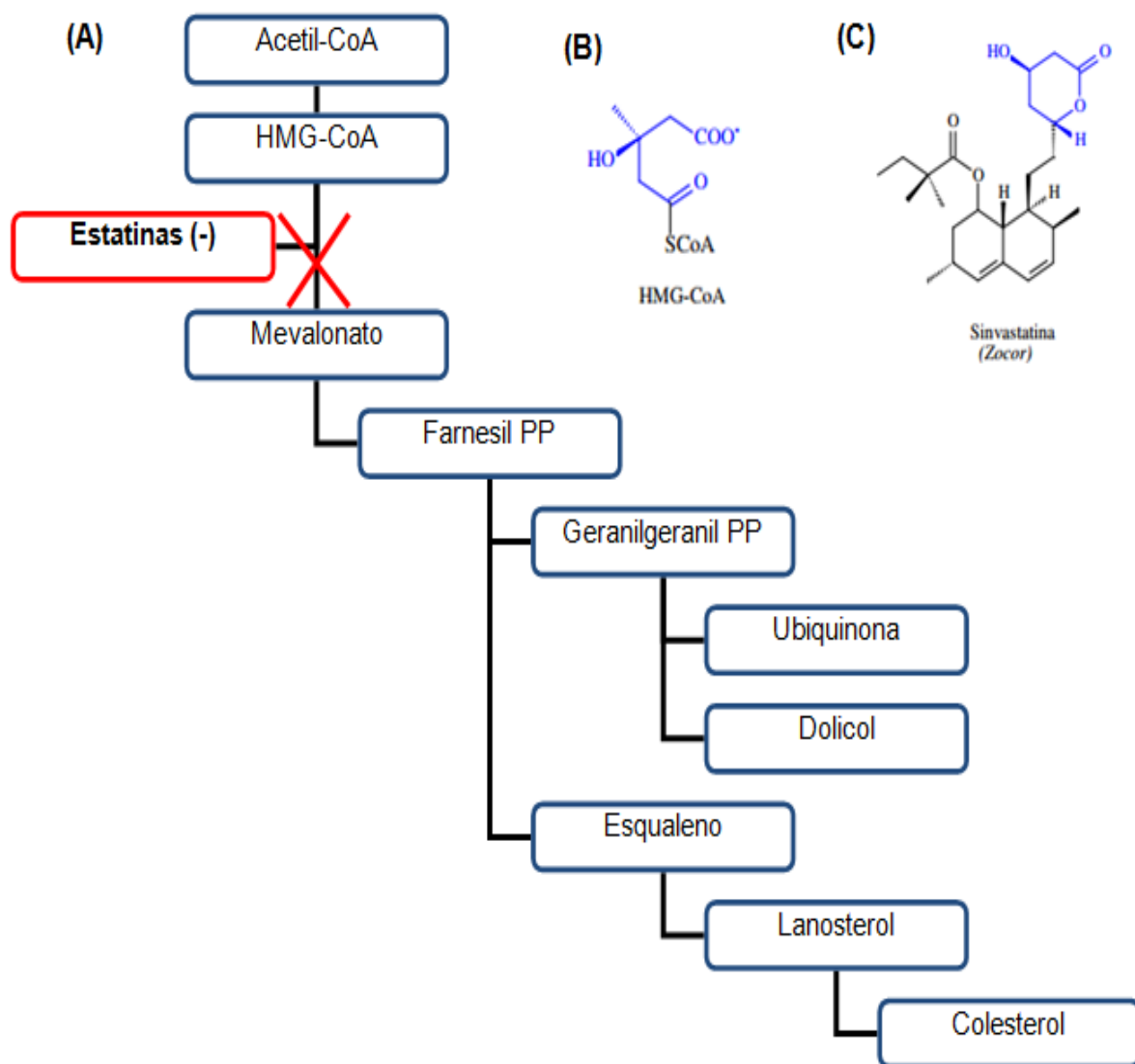


Figura 3. (A) Ponto de atuação das estatinas na via de síntese do colesterol; (B) Estrutura química do substrato HMG-CoA; (C) Estrutura química da sinvastatina. Em destaque a semelhança entre o substrato e o grupo químico da estatina.

Fonte: Adaptado de SANTOS; SILVA (2010).

Essa redução na concentração intracelular de colesterol desencadeia medidas homeostáticas, como estímulo à síntese de mais receptores e aumento de atividade do receptor da LDL na membrana celular dos hepatócitos, fazendo com que esta lipoproteína seja rapidamente removida da circulação, trazendo seu conteúdo de colesterol para dentro do hepatócito (SABINA et al., 2012; BRUNTON et al., 2012).

As estatinas têm efeitos adicionais sobre o perfil lipídico, uma vez que promovem, também, aumento da concentração do colesterol HDL e diminuição de

triglicérides (TG). Por meio de mecanismos de ação secundários, reduzem os níveis de lipoproteínas aterogênicas, como apolipoproteína B100 e outras lipoproteínas ricas em TG (SABINA et al., 2012). Além disso, têm uma série de efeitos benéficos que independem das suas propriedades modificadoras sobre o metabolismo lipídico, os chamados efeitos pleiotrópicos (HINDLER et al., 2006; APRIGLIANO et al., 2008; ZHANG et al., 2010; ZEYBEK et al., 2011).

3.3 Efeitos pleiotrópicos

A inibição da síntese de mevalonato pelas estatinas leva a uma diminuição no colesterol e também de uma série de metabólitos intermediários importantes, como: isoprenoides, farnesil pirofosfato (FPP) e geranylgeranyl pirofosfato (GGPP), que estão envolvidos em reações pós-traducionais (prenilação) de várias proteínas da família de proteínas G de baixo peso molecular (Ras e Rho), que modulam uma variedade de processos celulares, incluindo sinalização celular, diferenciação, proliferação e apoptose (CAMPO; CARVALHO, 2007; HINDLER et al., 2006; SHIRAI et al., 2007; ZEYBEK et al., 2011). Essa prenilação pós-traducional é essencial para a função das proteínas G. Sabe-se que FPP prenila Ras e que GGPP prenila Rho (COLLISSON et al., 2002), e isso tem implicações importantes nos aspectos acima mencionados.

Ambas as proteínas, Ras e Rho, são pequenas proteínas ligantes de GTP, envolvidas na transmissão de sinais celulares que alternam entre ciclos de um estado inativo (quando ligadas a uma guanosina difosfato- GDP), para um estado ativo (quando ligadas a uma guanosina trifosfato- GTP). As estatinas, ao inibirem a isoprenilação das proteínas Ras e Rho, levam à inativação e à acumulação dessas proteínas no citoplasma, o que contribui para alguns dos efeitos pleiotrópicos das estatinas (LIAO; LAUFS, 2005; LIAO; ZHOU, 2010).

Dentre os efeitos pleiotrópicos conhecidos das diversas estatinas disponíveis no mercado, estão: atividade antioxidante (MENNICKENT et al., 2008; SCHUPP et al., 2008; ZEYBEK et al., 2011), anti-inflamatória (WEITZ-SCHMIDT et al., 2002; SHISHEHBOR et al., 2003), imunomoduladora (RESCH et al., 2006), antitrombogênica e de melhoria da função endotelial (YILDIRIR;

MUDERRISOGLU, 2004; JOHN et al., 2005). Estudos têm evidenciado, também, várias propriedades antineoplásicas associadas a esses fármacos, incluindo redução na progressão do ciclo celular, supressão da angiogênese, inibição do crescimento tumoral (KUSAMA et al., 2002; DEMIERRE et al., 2005; HINDLER et al., 2006; LARA; ESPINOZA, 2011) e indução de apoptose (BARDOU et al., 2010; CAFFORIO et al., 2005; YANAE et al., 2011; ZHANG et al., 2010). Tais efeitos têm conduzido o desenvolvimento de estudos visando novas aplicações terapêuticas, sobretudo no campo de doenças neurodegenerativas e oncológicas.

3.3.1 Efeitos sobre o câncer

As estatinas têm sido relacionadas à inibição de proliferação tumoral em modelos animais contra melanoma, carcinoma mamário, adenocarcinoma pancreático, fibrosarcoma, glioma, neuroblastoma e linfoma. Em estudos pré-clínicos, as estatinas têm demonstrado, ainda, capacidade de potencializar os efeitos antitumorais de algumas citocinas e agentes quimioterápicos (CAMPO; CARVALHO, 2007).

Segundo Bardou et al. (2010), existem vários mecanismos que podem estar relacionados aos efeitos antitumorais das estatinas, incluindo indução da apoptose (por diferentes vias), inibição do crescimento celular, inibição da angiogênese e melhoria da resposta imunitária.

Chan et al. (2003) resumem os possíveis mecanismos antitumorais dos inibidores da enzima HMG-CoA redutase, em três categorias principais, como mostra a Figura 4: (1) efeitos antiproliferativos: em células tumorais esses inibidores promovem o bloqueio da transição das fases G1 para fase S do ciclo celular, efeito esse que é revertido com a adição de mevalonato; (2) indução de apoptose: as estatinas demonstraram induzir a apoptose por meio das vias intrínseca e extrínseca, levando à morte celular. Apesar do mecanismo da apoptose, induzida pelas estatinas, não ser completamente elucidado, é provável que seja devido à depleção de proteínas geranilgeraniladas ou farnesiladas (BARDOU et al., 2010); (3) efeitos anti-invasivos: os inibidores da HMG-CoA redutase também demonstram inibir vias de sinalização celular, além de promover

redução de moléculas de adesão e inibição de fatores de migração tumoral, o que reduz o risco de metástase (CHAN et al., 2003; SLEIJFER et al., 2005).

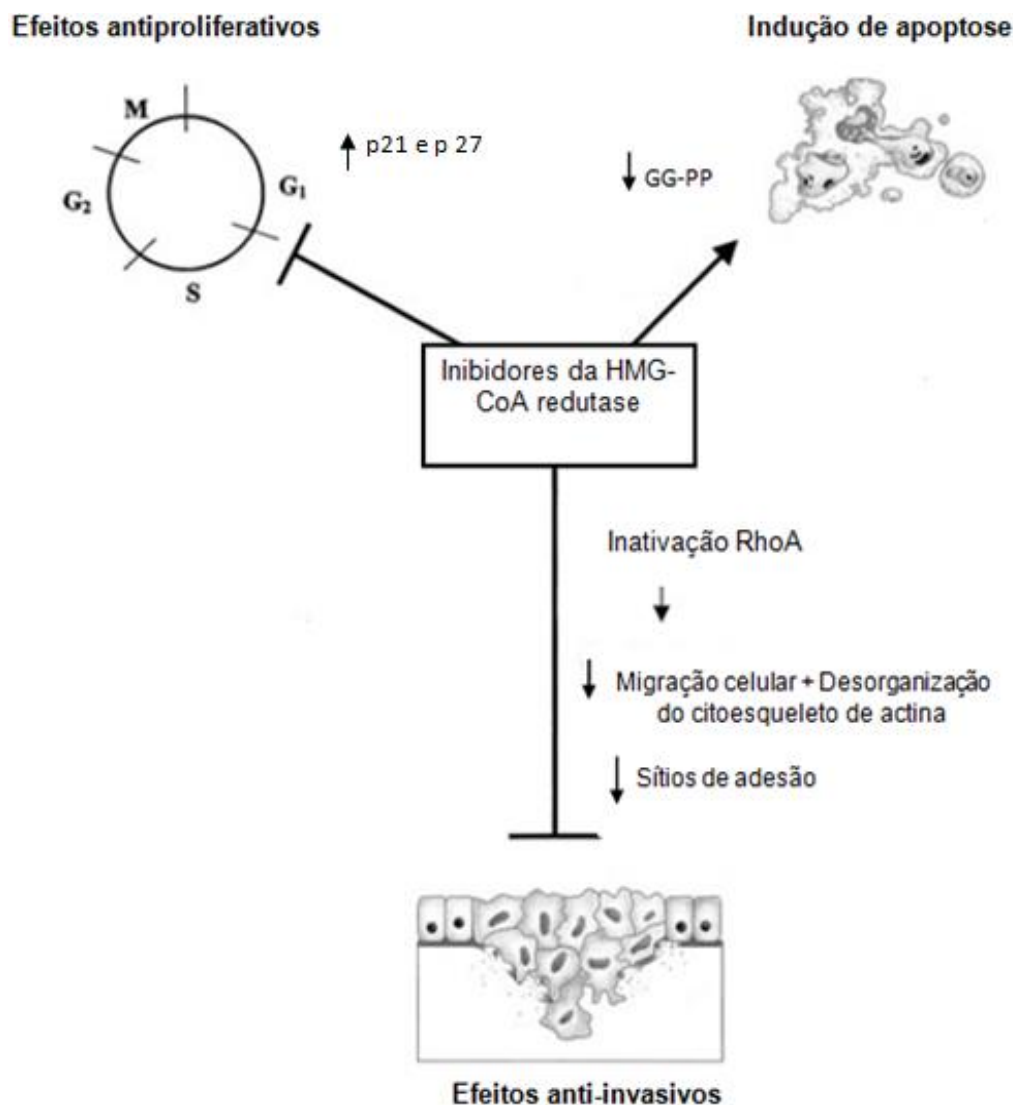


Figura 4. Propostas de mecanismos antitumorais dos inibidores da HMG-CoA redutase.
Fonte: Adaptado de CHAN et al. (2003).

Vários estudos têm sido conduzidos utilizando estatinas no tratamento de células tumorais *in vitro*. Colisson et al. (2002) verificaram que a atorvastatina é capaz de inibir a invasão *in vitro* de células de melanoma humano, por meio da modulação negativa de geranilgeranilação. Nesse caso, a atorvastatina inibiu a ativação Rho e reverteu o fenótipo metastático de células de melanoma humano. Aprigliano et al. (2008) também relatam que a atorvastatina induz a apoptose em células estreladas hepáticas (HSCs), sendo essa indução diretamente relacionada

com um aumento da atividade das caspase-3 e caspase-9, por meio de uma via *ERK*-dependente.

Takeda et al. (2007) demonstraram que a sinvastatina é capaz de suprimir a sobrevivência celular e a atividade invasiva de células de carcinoma escamoso de cabeça e pescoço por meio da inativação da integrina $\beta 1$ (envolvida na cascata de sinalização de *ERK*). Os referidos autores também verificaram a ativação dos inibidores de CDKs, p21 e p27, e da caspase-3.

Estudo desenvolvido por Fromigué et al. (2008), com diferentes culturas de células cancerosas humanas derivadas de osteossarcomas, mostrou que a atorvastatina é capaz de maximizar o efeito de agentes anticancerígenos, como a doxorrubicina, o que resulta em uma maior eficácia não só nos mecanismos envolvidos com a apoptose, mas também na inibição dos processos de invasão e migração das células de osteossarcoma.

Zeybek et al. (2011) avaliaram os efeitos da rosuvastatina no tratamento de carcinoma papilífero da tireoide B-CPAP e verificaram que o tratamento com rosuvastatina causou um aumento, dose e tempo dependentes, na atividade da caspase-3 e no índice de apoptose. A rosuvastatina induziu mudanças autofágicas em células de câncer de tireoide, o que sugere, segundo os referidos autores, que essa estatina pode ser uma alternativa de tratamento para esse tipo de câncer.

Usme et al. (2011) utilizaram células de osteossarcoma para avaliar o efeito da sinvastatina sobre o tumor. Os referidos autores constataram que a sinvastatina reduz a viabilidade celular de uma forma dependente da dose e do tempo. A indução de apoptose foi demonstrada com administração de sinvastatina em células trofoblásticas.

Além dos efeitos acima descritos, Sugiyama et al. (2005) relatam que as estatinas também promovem aumento de enzimas antioxidantes, tais como: catalase e glutathione redutase, além de diminuir a expressão do fator de necrose tumoral alfa (TNF α) em células tumorais. A redução da inflamação e do estresse oxidativo associado às estatinas não é atribuído diretamente ao efeito de redução de lipídios, indicando que as estatinas apresentam, também, atividade antioxidante e anti-inflamatória. Essas propriedades contribuem para o efeito antitumoral das estatinas (KABEL, 2013).

A ação antioxidante das estatinas também já foi relatada em diversos estudos anteriores (SHISHEHBOR et al., 2003; MENNICKENT et al., 2008; ZEYBEK et al., 2011). Foi verificado que elas são capazes de reduzir níveis de nitrotirosina (NO₂Tyr), um produto da ação de radicais livres em resíduos de proteínas. Entretanto, pouco se sabe sobre a supressão *in vivo* de vias oxidativas alternativas após a administração de estatinas (SHISHEHBOR et al., 2003).

3.4 Propriedades farmacocinéticas

Apesar de estatinas naturais ou sintéticas compartilharem o mesmo mecanismo de ação, existem diferenças quanto à atividade e farmacocinética desses fármacos (FONSECA, 2005; LUDKA, 2012). As estruturas químicas das estatinas determinam a solubilidade em água, o que, por sua vez, influencia na absorção, distribuição, metabolismo e excreção (SCHACHTER, 2005). As propriedades farmacocinéticas das diferentes estatinas são orquestradas, portanto, por diversos fatores, incluindo lipossolubilidade, administração (metabólitos na forma ativa ou inativa), absorção e metabolismo (GAZZERRO et al., 2012).

As estruturas químicas das estatinas (Figura 5) podem ser divididas em três grupos principais: (1) estrutura análoga ao HMG-CoA, que é o substrato da enzima alvo; (2) estrutura hidrofóbica de anel ligada covalentemente ao análogo da HMG-CoA e envolvida na ligação da estatina à HMG-CoA redutase; (3) grupos laterais dos anéis que definem as propriedades de solubilidade dessas drogas (hidrofilicidade ou lipofilicidade) (GAW; PACKARD, 2000).

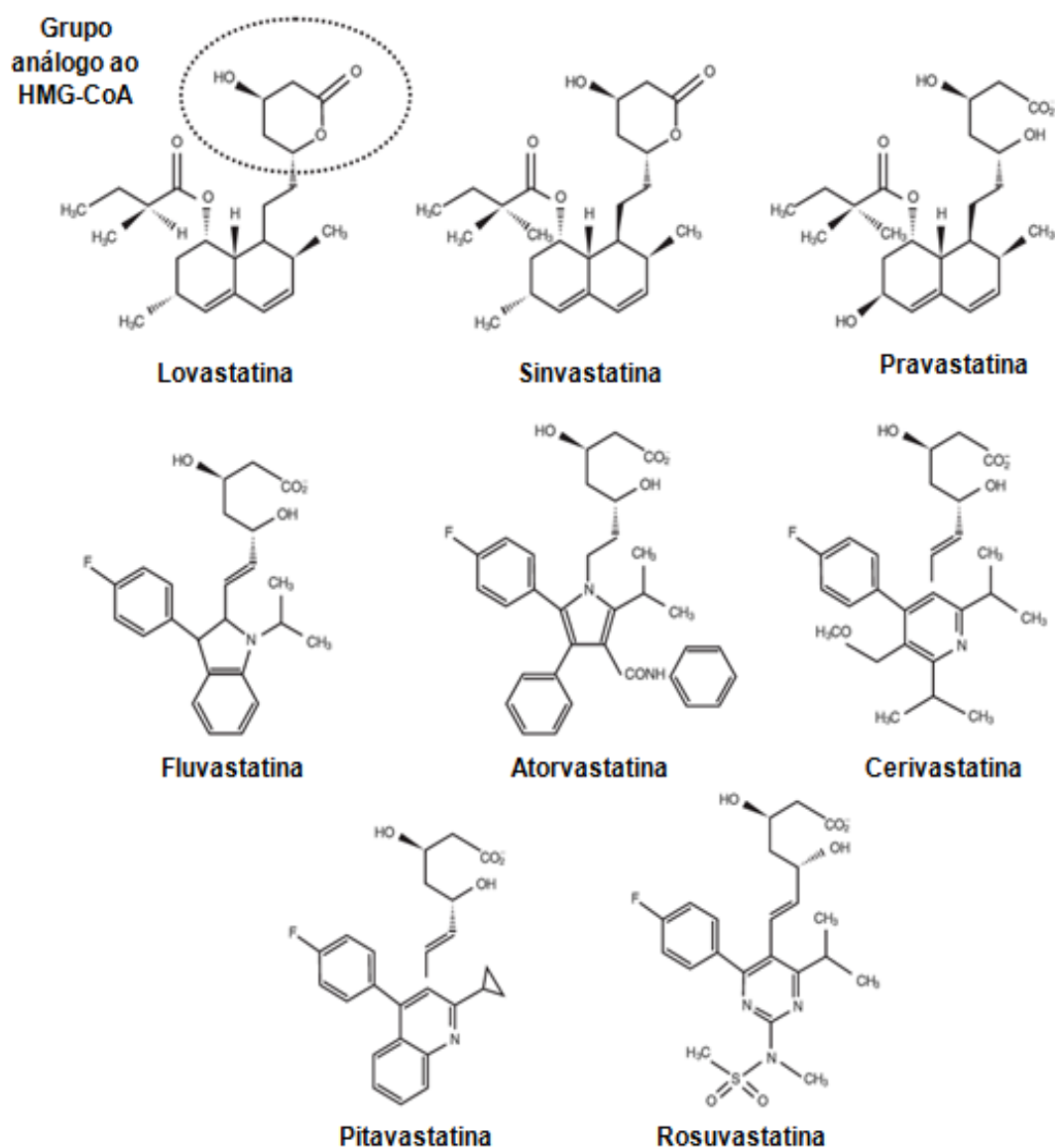


Figura 5. Estrutura química das diferentes estatinas.
 Fonte: Adaptado de SCHACHTER (2005).

Nesse contexto, algumas estatinas possuem uma ampla seletividade de atuação, principalmente em decorrência de características como a lipossolubilidade. Com base nesse aspecto, verifica-se que a pravastatina e a rosuvastatina são fármacos que podem ser considerados relativamente hidrossolúveis, quando comparados com as demais estatinas, consideradas, portanto, lipossolúveis (FONSECA, 2005; SABINA et al., 2012). Apesar de apresentarem solubilidades distintas, tanto as estatinas hidrossolúveis como as lipossolúveis, são relativamente hepatosseletivas. Enquanto as estatinas

lipofílicas penetram nos hepatócitos por mecanismo de difusão passiva, as hidrofílicas penetram por transporte ativo, tendo estas últimas uma hepatosseletividade superior (GAZZERRO et al., 2012), porém, com um potencial reduzido para absorção pelas células periféricas (SCHACHTER, 2005).

As estatinas hidrossolúveis, pravastatina e rosuvastatina, precisam de um ânion orgânico transportador de polipeptídeos (OATP) para entrar no hepatócito. Lovastatina e sinvastatina penetram os hepatócitos em parte na forma de lactonas (lipossolúvel), difundindo através da membrana plasmática e, em parte em sua forma ácida (hidrossolúvel), através do OATP1B1. A atividade desse transportador (OATP1B1) parece ser importante, também, no acesso da pitavastatina ao hepatócito (SABINA et al., 2012). Por isso, interações farmacológicas que reduzam a disponibilidade do OATPs ou polimorfismos genéticos que diminuam sua expressão podem promover diminuição da efetividade dessas estatinas (FONSECA, 2005).

Após a administração oral, a absorção intestinal das estatinas é bastante variável (30-85%). Com exceção da sinvastatina e da lovastatina, as demais estatinas são administradas na forma de β -hidroxiácido, forma inibidora da HMG-CoA redutase. Essas duas estatinas, ao contrário, são pró-fármacos, administrados na forma de lactonas inativas, necessitando de transformação hepática para conversão em β -hidroxiácido (metabólito ativo) (BRUNTON et al., 2012; SABINA et al., 2012; GAZZERRO et al., 2012).

Ocorre extensa captação hepática de primeira passagem de todas as estatinas. Por isso, a biodisponibilidade sistêmica das estatinas e de seus metabólitos hepáticos varia de 5-30% da dose administrada (BRUNTON et al., 2012). A maioria das estatinas é metabolizada por enzimas do sistema citocromo P450 (CYP)3A4 (exceto a fluvastatina que usa a via CYP2C9 e a pravastatina que é transformada enzimaticamente no citosol do hepatócito e não usa as enzimas CYP) (GAZZERRO et al., 2012). Estatinas lipofílicas são mais suscetíveis ao metabolismo pelo citocromo P450, com exceção de pitavastatina, que sofre metabolismo limitado por essa via. A pravastatina e rosuvastatina são relativamente hidrofílicas e, por isso, a metabolização pelas enzimas do citocromo P450 é limitada (SCHACHTER, 2005).

A lovastatina, pravastatina e sinvastatina são derivadas de metabólitos fúngicos e possuem meias-vidas de 1-3 horas. A atorvastatina, a cerivastatina (retirada do mercado em 2001), fluvastatina, pitavastatina e rosuvastatina são compostos totalmente sintéticos, com meias-vidas variando entre 1h e 19h para a fluvastatina e rosuvastatina, respectivamente (SCHACHTER, 2005). As meias-vidas mais longas dessas últimas estatinas parecem contribuir para maior eficácia na redução dos níveis de colesterol (BRUNTON et al., 2012).

A análise das diferenças entre as estatinas ajuda a fornecer uma base racional para a sua utilização na prática clínica. Considerando o exposto, e que ensaios clínicos demonstram que a rosuvastatina parece ser a mais eficaz dentre as estatinas para reduzir os níveis de colesterol LDL, seguido de atorvastatina e sinvastatina (SCHACHTER, 2005), essas três estatinas foram escolhidas para realização da presente pesquisa.

3.4.1 Atorvastatina

A atorvastatina (Lipitor®) foi lançada no mercado pela Pfizer, em 1993 (VIEGAS JÚNIOR; BOLZANI, 2006). É a segunda estatina totalmente sintética desenvolvida e é amplamente comercializada como uma droga que reduz os níveis de colesterol (LDL). A atorvastatina é lipofílica e se liga extensivamente às proteínas plasmáticas, apresentando seletividade hepática quanto à inibição da HMG-CoA redutase. Em geral, os efeitos colaterais dessa estatina são bem tolerados (SCHACHTER, 2005) e uma grande quantidade de dados clínicos tem demonstrado a segurança da utilização de altas doses de atorvastatina (SCHWARTZ et al., 2004), o que justifica a sua vasta utilização.

3.4.2 Rosuvastatina

A rosuvastatina (Crestor®, Astra-Zeneca), descoberta em 1999, foi aprovada pelo FDA em agosto de 2003, sendo outro potente fármaco da classe das estatinas (VIEGAS JÚNIOR; BOLZANI, 2006). A rosuvastatina tem um

caráter mais hidrofílico quando comparado às demais estatinas. Essa hidrofiliabilidade deve-se às cadeias laterais que consistem no grupo sulfonamida de metano (ABBAS et al., 2012). Por isso, ela exibe baixa difusão passiva para as células não hepáticas e afixez pelas células hepáticas via transporte seletivo. Além disso, a relativa hidrossolubilidade dessa droga requer menor necessidade de metabolismo pelo citocromo P450. Seu maior número de sítios ligantes à enzima HMG-CoA redutase distingue essa estatina como o mais potente inibidor dessa enzima já desenvolvido (McKENNEY, 2005).

3.4.3 Sinvastatina

A sinvastatina (Zocor®) é um derivado semissintético da lovastatina (produzido pelos filamentos dos fungos *Aspergillus terreus*) e comercializado pela indústria farmacêutica Merck. Essa substância ingressou no mercado na década de 70 como o primeiro fármaco antiolesterolêmico semissintético, atuando como inibidor de HMG-CoA redutase e representando, portanto, autêntica inovação terapêutica para controle do colesterol plasmático (VIEGAS JÚNIOR; BOLZANI, 2006). A sinvastatina é usada como pró-fármaco, na forma de lactonas, que são enzimaticamente convertidas pela ação de esterases aos correspondentes hidroxiácidos ativos para inibição de HMG-CoA redutase (CAMPO; CARVALHO, 2007).

Nesse estudo foram testados os possíveis efeitos moduladores da atorvastatina, rosuvastatina e sinvastatina, contra os reconhecidos efeitos mutagênicos e recombinogênicos do quimioterápico doxorubicina (utilizado como controle positivo).

4. Doxorubicina (DXR)

A doxorubicina, também conhecida como adriamicina, é um antibiótico glicosídico, pertencente ao grupo das antraciclinas, produzido pela bactéria *Streptomyces peucetius* var. *caesius*, podendo também ser sintetizado quimicamente a partir da daunorrubicina (SINGAL et al., 2000). Encontra-se entre

os mais importantes agentes antitumorais existentes, sendo utilizada desde a década de 60 na prática oncológica (KANG et al., 2002; NASCIMENTO; MARTINS, 2005).

A molécula de DXR possui um aminoaçúcar, a daunosamina, ligado por meio de uma ponte glicosídica ao núcleo da droga, uma aglicona composta por uma estrutura tetracíclica que contém um anel hidroquinona e outro quinona (Figura 6). Estruturalmente o anel quinona é de especial interesse em decorrência de seu potencial em gerar radicais livres, uma vez que pode atuar como doador e receptor de elétrons (SINGAL et al., 2000; MINOTTI et al., 2004).

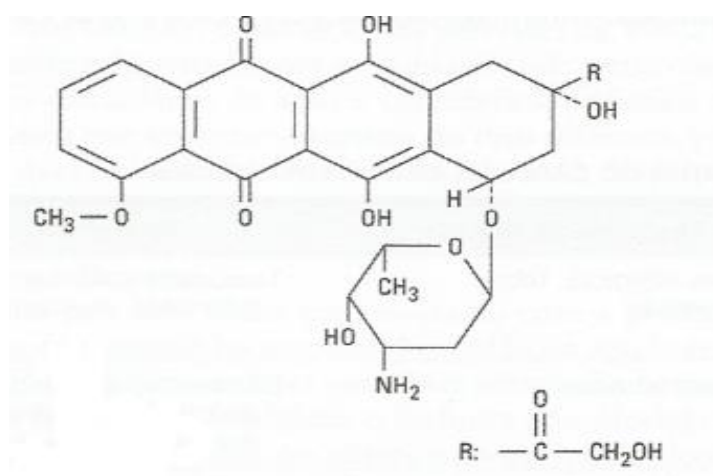


Figura 6. Estrutura química da Doxorubicina.
Fonte: KATZUNG (2006).

A DXR exibe amplo espectro de atividade clínica contra neoplasias malignas hematológicas, bem como contra uma ampla variedade de tumores sólidos, como carcinomas de mama, endométrio, ovário, testículo, tireoide, estômago, fígado e pulmão (CHU; SARTORELLI, 2005; KATZUNG, 2006; OLIVEIRA SÁ et al., 2009). Contudo, o uso da DXR em doses terapêuticas é limitado devido às diversas toxicidades manifestadas, incluindo: cardíaca, renal, hematológica e testicular (KANG et al., 2002). A cardiotoxicidade, entretanto, é o efeito principal (CRAIG; STITZEL, 2005; BRUNTON et al., 2012; KIM et al., 2012).

Segundo Simunek e colaboradores (2009), têm sido apresentadas propostas (teorias) para explicar o motivo pelo qual o coração é o principal alvo da toxicidade desses fármacos: (1) a abundância de mitocôndrias nesse tecido pode

aumentar consideravelmente a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs); (2) os níveis das enzimas catalase e glutathione peroxidase são menores nesse tecido, o que resulta em uma menor atividade antioxidante endógena; (3) há maior retenção da DXR no tecido cardíaco do que em outros tecidos.

No que se refere ao mecanismo de ação antitumoral, a doxorrubicina liga-se fortemente ao DNA devido à sua capacidade de intercalar-se entre pares de bases, concentrando-se, preferencialmente, nas estruturas nucleares. Ao intercalar-se à molécula de DNA, a DXR promove rupturas na molécula, inibindo a síntese de DNA e de RNA (CRAIG; STITZEL, 2005; KAISEROVÁ et al., 2006).

Além da intercalação com a molécula de DNA, sabe-se que as antraciclinas exercem sua ação através de outros mecanismos: (1) inibição da topoisomerase II, uma DNA girase de atividade intensa em células em proliferação (CRAIG; STITZEL, 2005; KATZUNG, 2006; RANG et al., 2007); (2) ligação às membranas celulares, com alteração de sua fluidez e transporte de íons; (3) produção de radicais livres semiquinonas e radicais livres de oxigênio por meio de um processo redutor mediado por enzimas (NASCIMENTO; MARTINS, 2005; KATZUNG, 2006).

No que se refere à geração de radicais livres, sabe-se que o anel antraciclina da DXR pode sofrer redução de um elétron formando radicais livres, que podem reagir com macromoléculas teciduais (CRAIG; STITZEL, 2005; BRUNTON et al., 2012). As antraciclinas reagem com a citocromo P450 redutase, na presença de NADPH, formando intermediários de radicais semiquinonas, os quais, por sua vez, podem reagir com o oxigênio gerando radicais superóxidos. Estes podem gerar peróxido de hidrogênio e radicais hidroxil (BRUNTON et al., 2012). Esse tipo de interação sugere um mecanismo alternativo de citotoxicidade para as antraciclinas. Em particular, a cardiotoxicidade das antraciclinas pode resultar da produção de radicais livres de oxigênio (CRAIG; STITZEL, 2005).

O ciclo redox da DXR é acompanhado também pela liberação de ferro da ferritina, principal proteína de armazenamento fisiológico de ferro, resultando na formação de complexos DXR-ferro (MINOTTI et al., 2004; KAISEROVÁ et al., 2006). Estes complexos são capazes de promover a conversão de superóxido e peróxido de hidrogênio em radicais hidroxil, podendo iniciar a peroxidação lipídica e provocar significativa disfunção mitocondrial (MINOTTI et al., 2004).

Nesse contexto, Kaiserová et al. (2006) confirmam que as interações da DXR com ferro são bastante complexas. Algumas delas incluem a participação de radicais livres (citadas acima), enquanto outras são independentes desse mecanismo. Os efeitos independentes de radicais livres incluem, por exemplo, desregulação na homeostase do ferro por meio da sua interação com a proteína de regulação do ferro e inibição da mobilização de ferro pela ferritina (efeitos mediados pelo Fe), enquanto que a inflamação, a disfunção endotelial e a alteração na homeostase do cálcio são independentes do ferro e de EROs, como mostra a Figura 7. A referida figura apresenta, ainda, os principais mecanismos antitumorais da DXR, descritos anteriormente.

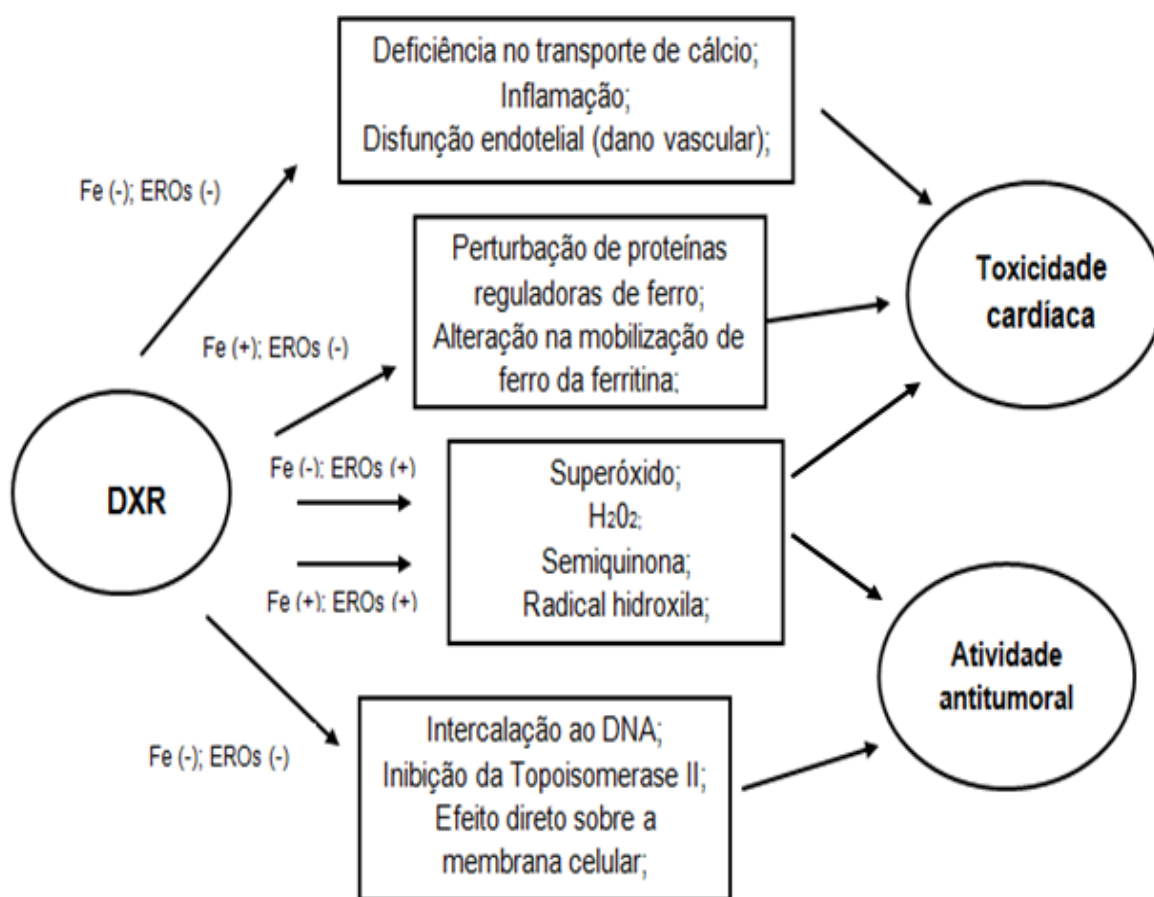


Figura 7. Esquema simplificado dos principais mecanismos propostos para a toxicidade cardíaca e para a atividade antitumoral da Doxorubicina.

Fonte: Adaptado de KAISEROVÁ et al. (2006).

A intrínseca ligação entre inibição de topoisomerasas, bloqueio da síntese e replicação do DNA e indução de quebras duplas, associadas ao fato de

que este último evento representa um dos principais substratos para a ocorrência de recombinação, colocam essa droga, também, como potente agente recombinogênico (LEHMANN et al., 2003).

A redução dos danos induzidos pela DXR tem sido demonstrada em vários estudos envolvendo sua associação com diferentes agentes por meio do teste para detecção de mutação e recombinação somática (SMART) em *D. melanogaster* (COSTA; NEPOMUCENO, 2006; DIAS et al., 2009; REZENDE et al., 2009), ferramenta utilizada para realização da presente pesquisa.

5. Somatic Mutation and Recombination Test- SMART

As células animais sofrem continuamente alterações sutis e progressivas na sequência de DNA, denominadas mutações, que podem ocorrer de forma espontânea, associadas a erros durante o processo de duplicação, ou podem ser induzidas devido à exposição a uma série de agentes físicos, químicos e/ou biológicos, presentes no meio, denominados agentes mutagênicos (LOURO et al., 2002; OJOPI; DIAS NETO, 2004).

Considerando o exposto, a genética toxicológica constitui uma importante área da ciência envolvida no estudo das propriedades mutagênicas dessas substâncias as quais os organismos estão expostos, utilizando diversos ensaios biológicos para avaliar danos que estes podem vir a causar ao DNA, na presença ou ausência de sistemas de metabolização (FONSECA; PEREIRA, 2004). Dentre esses ensaios, destaca-se o SMART (*Somatic Mutation and Recombination Test*), desenvolvido por Graf et al. (1984).

O SMART, realizado em *Drosophila melanogaster*, é um sistema teste somático, de curta duração, empregado para detecção de substâncias capazes de promover alterações no DNA sendo, também, muito utilizado para avaliação/detecção de substâncias antimutagênicas e/ou antirecombinogênicas (GRAF et al., 1984; GRAF; SINGER, 1992; GRAF et al., 1998).

A *D. melanogaster* (Figura 8), organismo eucarioto, tem se mostrado ideal para estudos de mutagenicidade e antimutagenicidade *in vivo*, uma vez que possui um número de cromossomos reduzido, fornece um grande número de

indivíduos por progênie, possui sistema enzimático similar ao de mamíferos e tempo curto de geração (GRAF et al., 1984; BIER, 2005).



Figura 8. Casal de *Drosophila melanogaster*. À esquerda a fêmea e à direita o macho.
Fonte: Disponível em:< <http://www.exploratorium.edu>>. Acesso em: 12/02/2015.

Além desses fatores, o sequenciamento genômico da *D. melanogaster* revelou elevada conservação evolutiva com o genoma humano, em nível de sequência de DNA e de funções gênicas, o que reflete considerável homologia entre as espécies (BIER, 2005). A análise do genoma da *Drosophila* mostra, também, que vários genes implicados em cânceres humanos têm equivalência na mosca. Além disso, muitas vias de desenvolvimento e cascatas de sinalização, implicados em vários aspectos da progressão do câncer, foram identificados e caracterizados nesse organismo teste (TICKKO; RUSSEL, 2002; BIER, 2005). O extensivo conhecimento acerca do genoma da *D. melanogaster* tem feito desse organismo um modelo importante para estudos genéticos em eucariontes (AKMOUTSOU et al., 2011).

Essencialmente o teste SMART em asas de *D. melanogaster* baseia-se na análise de alterações genéticas provocadas em células (disco imaginal) que estão se dividindo por mitose durante o desenvolvimento. Essas alterações genéticas induzem o aparecimento de manchas mutantes, originadas a partir da perda de heterozigose em células heterozigotas para genes marcadores recessivos. A análise dos possíveis danos induzidos é realizada por meio da observação de grupos de células (clones mutantes), na superfície das asas de moscas adultas, que expressam fenotipicamente os genes marcadores *mwh* ou *flr*³, responsáveis por alterações na forma dos pelos, no primeiro caso originando

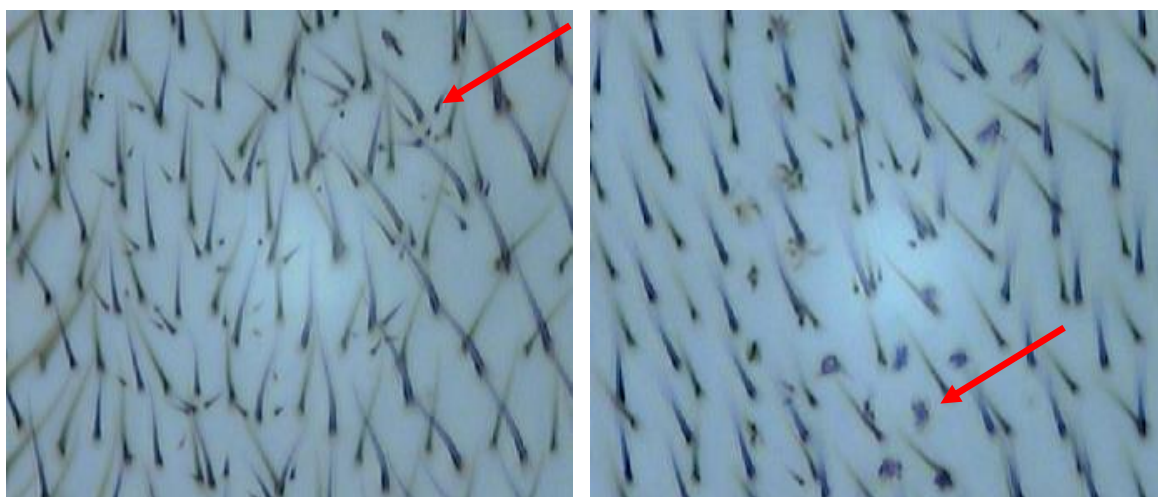
pelos múltiplos e, no segundo, dando origem a um pelo em formato de “chama de vela” (GRAF et al., 1984; GUZMÁN-RINCÓN; GRAF, 1995; GRAF et al., 1998).

5.1 Linhagens mutantes de *Drosophila melanogaster*

Três linhagens de *D. melanogaster* são utilizadas para realização do teste para detecção de mutação e recombinação somática:

(1) *Linhagem multiple wing hairs (mwh/mwh)*: os indivíduos dessa linhagem possuem o gene marcador *mwh* no cromossomo 3 (3-0,3) em uma posição distal. Na presença desse alelo mutante ocorre uma alteração no formato dos pelos das asas de *D. melanogaster*, que passam a apresentar dois ou mais pelos por célula, ao invés de apenas um (Figura 9, A).

(2) *Linhagem flare 3 (flr³)*: os indivíduos dessa linhagem possuem o gene marcador *flr³* localizado no cromossomo 3 (3-38,8) em uma posição mais proximal em relação ao centrômero. O fenótipo provocado por esse alelo mutante é um pelo mal formado que se assemelha a uma “chama de vela” (Figura 9, B).



(A)

(B)

Figura 9. Pelos *mwh* e *flr³*- Fotomicrografia, microscópio óptico de luz (aumento de 400x). (A) Pêlos *multiple wing hairs*; (B) Pêlos *flare*.

Fonte: Fotos retiradas no Laboratório de Citogenética e Mutagenese (UNIPAM).

O gene marcador *flr³* é letal em homozigose e, por isso, esse alelo é mantido na linhagem estoque na presença de um balanceador cromossômico

(*TM3, Bd^s*), que se caracteriza por apresentar múltiplas inversões. Como característica, os indivíduos portadores desse balanceador possuem a borda das asas com formato recortado (GUZMÁN-RINCON; GRAF, 1995). A presença desse balanceador inviabiliza, também, o aparecimento de células com eventos recombinacionais (LINDSLEY; ZIMM, 1992).

(3) *Linhagem ORR (Oregon R, flare³)*: os indivíduos pertencentes a essa linhagem possuem a mesma constituição genética dos indivíduos que pertencem à linhagem *flare³*, porém, diferem por apresentar os cromossomos 1 e 2 provenientes da linhagem Oregon R resistente ao DDT, com alta expressividade das enzimas citocromo P450 (FRÖLICH; WRÜGLER, 1989; GRAF; VAN SCHAIK, 1992). A linhagem *ORR* foi criada com o objetivo de aumentar o desempenho do referido teste no caso da ativação de pró-mutágenos dependentes de ativação via citocromo P450 (ANDRADE; LEHMANN, 2003). Por isso, o teste permite avaliar agentes mutagênicos e antimutagênicos de ação direta ou indireta, de acordo com o nível basal e alto de enzimas de metabolização do citocromo P450.

5.2 Cruzamentos

Dois cruzamentos são utilizados para a realização do SMART:

(1) Cruzamento Padrão (ST- *Standard Cross*): fêmeas virgens "*flr³*", com composição genética *flr³/In(3LR)TM3, ri pp sep I(3)89Aa bx^{34e} e Bd^s* cruzadas com machos *mwh/mwh* (composição genética *y; mwh jv*) (GRAF et al., 1989).

(2) Cruzamento de Alta Capacidade de Bioativação (HB - *High Bioactivation Cross*): fêmeas virgens *ORR/ORR* (com composição genética *flr³/In(3LR)TM3,ri p^psep I(3)89Aa bx^{34e} e Bd^s*) cruzadas com machos *mwh/mwh* (GRAF; VAN SCHAIK, 1992).

A partir desses cruzamentos são obtidos dois tipos de descendentes: trans-heterozigotos marcados (MH) e heterozigotos balanceados (BH). Os MH (*+flr³/mwh+*) apresentam cromossomos estruturalmente normais, sendo as asas fenotipicamente caracterizadas por borda com aspecto liso, enquanto os BH (*mwh+/+TM3, Bd^s*) caracterizam-se fenotipicamente pela presença de asas com aspecto serrilhado (GUZMÁN-RINCÓN; GRAF, 1995), como mostra a Figura 10.

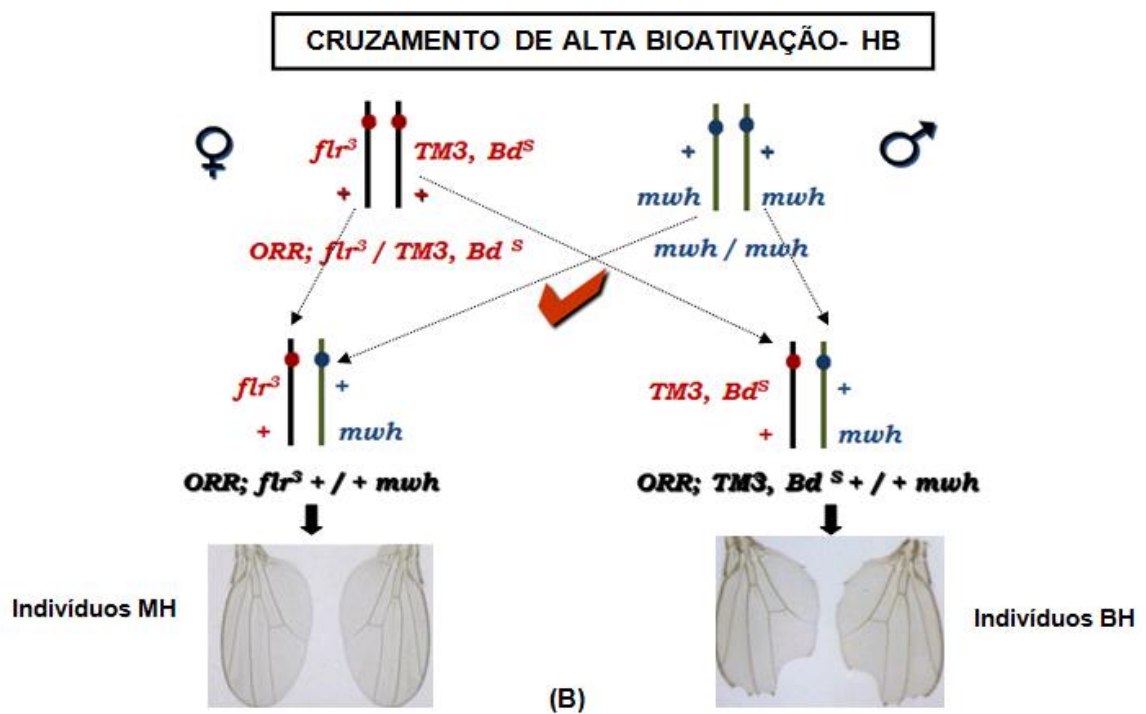
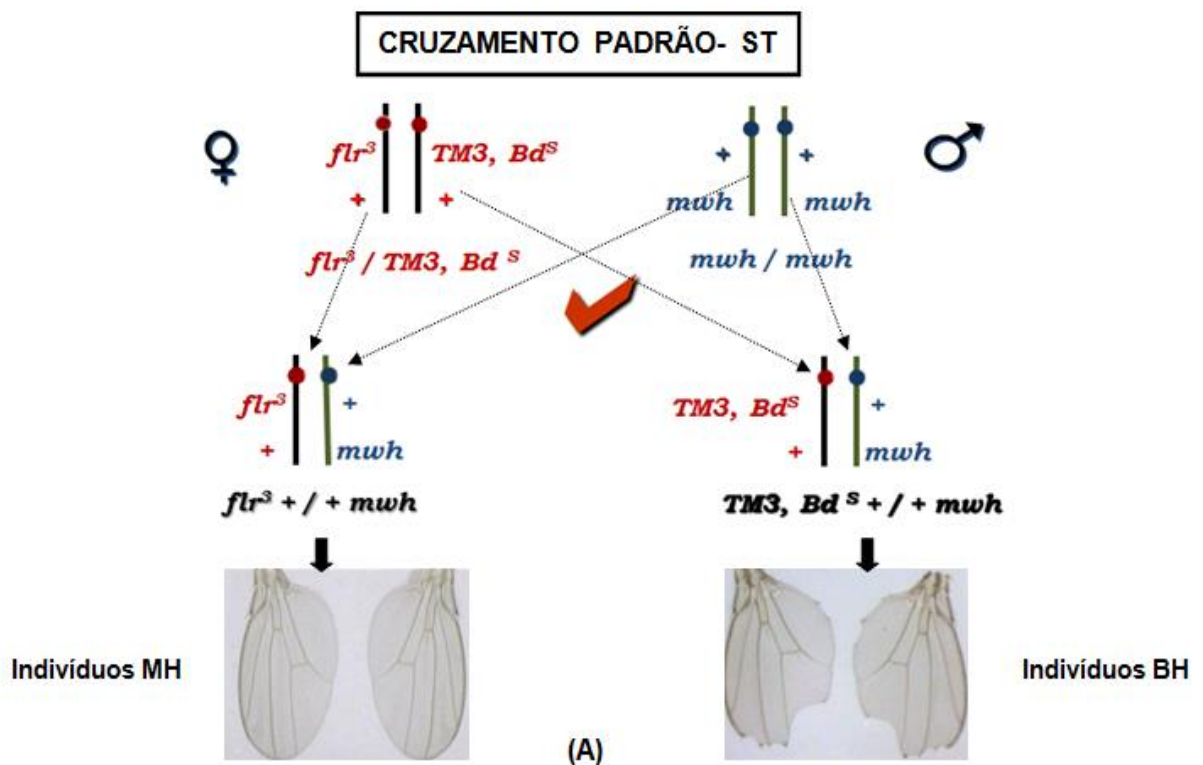


Figura 10. Esquema representativo dos cruzamentos realizados no teste Smart: **(A)** Cruzamento Padrão (ST)- fêmeas virgens flr^3 cruzadas com machos mwh ; **(B)** Cruzamento de Alta Capacidade de Bioativação (HB)- fêmeas virgens ORR cruzadas com machos mwh , com seus respectivos descendentes, indivíduos trans-heterozigotos marcados (MH) e heterozigotos balanceados (BH), diferenciados pelo fenótipo da asa.

Os indivíduos MH expressam pelos mutantes nas asas, originados de mutação ou recombinação, ocorridas no locus gênico *mwh* ou *flr*³. Já os descendentes BH possuem um cromossomo balanceador TM3/*Bd*^S, com múltiplas inversões, que inviabiliza o aparecimento de células com eventos recombinogênicos e, por isso, apenas eventos mutacionais levam à formação de manchas mutantes nesses descendentes (GUZMÁN-RINCON; GRAF, 1995).

A análise das superfícies ventral e dorsal das asas fornecem dados quantitativos e sobre o tipo de mancha, o que permite identificar o tipo de evento induzido. Manchas simples, que expressam apenas um dos genes mutantes, *mwh* ou *flr*³, indicam ocorrência de mutação ou recombinação. Manchas gêmeas, formadas por células adjacentes expressando os genes *mwh* e *flr*³ simultaneamente, originam-se por recombinação (GRAF et al., 1984).

Além da classificação quanto ao tipo (simples ou gêmea), as manchas são classificadas quanto ao tamanho. Assim, as manchas se classificam em simples pequenas, quando possuem um ou dois pelos mutantes, caracterizadas por se formarem durante o último e penúltimo ciclos de divisão mitótica. Ou manchas simples grandes, quando existem três ou mais pelos mutantes, originados mais precocemente (durante o desenvolvimento larval no início das divisões mitóticas) (GRAF et al., 1998).

O Teste para a Detecção de Mutação e Recombinação Somática, nos últimos anos, tem sido bastante utilizado e tem se mostrado muito eficiente, tanto na análise de efeitos mutagênicos e recombinogênicos, como na identificação de antimutagenicidade de agentes químicos, físicos e biológicos (COSTA; NEPOMUCENO, 2006; CASTRO et al., 2008; DIAS et al., 2009; DUTRA et al., 2009; REZENDE et al., 2009; ORSOLIN et al., 2012).

REFERÊNCIAS

- ABBAS, A.; MILLES, J.; RAMACHANDRAN, S. Rosuvastatin and atorvastatin: comparative effects on glucose metabolism in non-diabetic patients with dyslipidaemia. *Clinical Medicine Insights: Endocrinology and Diabetes*, v. 5, p.13-30, 2012.
- AKMOUTSOU, P., MADEMTZOGLU, D., AKOU, I., ONOUFRIADIS, A., PAPADOPOULOU, X., KOUNATIDIS, I., FRANTZIOS, G., PAPADAKIS, G., VASILIAKIS, K., PAPADOPOULOS, N.T., MAVRAGANI-TSIPIDOU, P. Evaluation of toxicity and genotoxic effects of spinosad and deltamethrin in *Drosophila melanogaster* and *Bactrocera oleae*. *Pest Management Science*, v.67, p.1534-1540, 2011.
- ANDRADE, H. H. R. de; LEHMANN, M. Teste para detecção de mutação e recombinação somática em *Drosophila melanogaster*. In: RIBEIRO, L. R.; SALVADORI, D. M. F.; MARQUES, E. K. *Mutagenese ambiental*. Canoas: Ulbra, 2003. Cap.11. p.281-307.
- APRIGLIANO, I.; DUDAS, J.; RAMADORI, G.; SAILE, B. Atorvastatin induces apoptosis by a caspase-9-dependent pathway: an in vitro study on activated rat hepatic stellate cell. *Liver international*, v. 28, p.546-57, 2008.
- BARDOU, M., BARKUN, A., MARTEL, M. Effect of statin therapy on colorectal cancer. *Gut*, v.59, p.1572-1585, 2010.
- BELLÉS, X.; MARTÍN, D.; PIULACHS, M.D. The mevalonate pathway and the synthesis of juvenile hormone in insects. *Annual Review of Entomology*, v.50, p.181-199, 2005.
- BIER, E. *Drosophila*, the golden bug, emerges as a tool for human genetics. *Nature Reviews Genetics*, v. 6, n.1, p.09-23, 2005.
- BONETTI, P.O.; LERMAN, L.O.; NAPOLI, C.; LERMAN, A. Statin effects beyond lipid lowering- are they clinically relevant? *European Heart Journal*, v. 24, p. 225–248, 2003.
- BRODY, T. *Nutritional Biochemistry*. San Diego: Academic Press, 1994. 658p.
- BROWN, C.; HAVEL, C.M.; WATSON, J.A. Isoprene Synthesis in Isolated Embryonic *Drosophila* Cells. *The Journal of Biological Chemistry*, v.258, n.13, p.8512-8518, 1983.

BRUNTON, L. L.; CHABNER, B. A.; KNOLLMANN, B. C. *Goodman & Gilman: As Bases Farmacológicas da Terapêutica*. McGraw Hill, 12.ed. 2012. 2112p.

CAFFORIO, P.; DAMMACCO, F.; GERNONE, A.; SILVESTRIS, F. Statins activate the mitochondrial pathway of apoptosis in human lymphoblasts and myeloma cells. *Carcinogenesis*, v.26, p.883-891, 2005.

CAMPO, V.L.; CARVALHO, I. Estatinas hipolipêmicas e novas tendências terapêuticas. *Química Nova*, v. 30, p.01-14, 2007.

CASTRO, A. J. S.; GRISÓLIA, C. K. ; ARAÚJO, B. C.; DIAS, C. D.; DUTRA, E. S.; NEPOMUCENO, J. C. Recombinogenic effects of the aqueous extract of pulp from pequi fruit (*Caryocar brasiliense Camb*) on somatic cells of *Drosophila melanogaster*. *Genetics and Molecular Research*, v. 7, p. 1375-1383, 2008.

CHAN, K.K.; OZA, A.M.; SIU, L.L. The statins as anticancer agents. *Clin. Cancer Research*, v. 9, p. 10–19, 2003.

CHU, E.; SARTORELLI, A. C. Quimioterapia do câncer. In: KATZUNG, B. G. *Farmacologia Básica e Clínica*. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005. Cap. 55. p.751-777.

COLLISSON, E. A.; CARRANZA, D. C.; CHEN I. Y.; KOLODNEY, M. S. Isoprenylation is necessary for the full invasive potential of RhoA overexpression in human melanoma cells. *Journal of Investigative Dermatology*, v. 119, p. 1172-1176, 2002.

COSTA, R.A.P. *Proteção por L-carnitina ou piracetam contra a morte celular causada por sinvastatina em células tumorais e não tumorais*. 75p. Dissertação de Mestrado (Faculdade de Ciências Médicas), Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2010.

COSTA, W.F.; NEPOMUCENO, J.C. Protective effects of a mixture of antioxidant vitamins and mineral on the genotoxicity of doxorubicin in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, v.47, p.18–24, 2006.

CRAIG, C. R.; STITZEL, R. E. *Farmacologia Moderna: com aplicações clínicas*. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005. 815 p.

DEMIERRE, M.F.; HIGGINS, P.D.; GRUBER, S.B.; HAWK, E.; LIPPMAN, S.M. Statins and cancer prevention. *Nature Reviews Cancer*, v.5, p.930-942, 2005.

DESHPANDE, G.; SCHEDL, P. HMGCoA reductase potentiates hedgehog signaling in *Drosophila melanogaster*. *Developmental Cell*, v.9, p.629–638, 2005.

DIAS, C.D.; ARAÚJO, B.C.; DUTRA, E.S.; NEPOMUCENO, J.C. Protective effects of β -carotene against the genotoxicity of doxorubicin in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. *Genetics and Molecular Research*, v.8, p.1367-1375, 2009.

DUTRA, E. S.; CASTRO, A. J. S.; DIAS, C. D.; NEPOMUCENO, J. C. Effect of organic tomato (*Lycopersicon esculentum*) extract on the genotoxicity of doxorubicin in the *Drosophila* wing spot test (SMART). *Genetics and Molecular Biology*, v. 32, p. 134-152, 2009.

ENDO A.; KURODA, M.; TSUJITA, Y. ML-236A, ML-236B and ML-236C. New inhibitors of cholesterol synthesis produced by *Penicillium citrinum*. *The Journal of Antibiotics*, v. 29, p.1346-1348, 1976.

FONSECA, F.A.H. Farmacocinética das estatinas. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, v. 85, p.9-14, 2005.

FONSECA, C.A; PEREIRA, D. G. Aplicação da genética toxicológica em planta com atividade medicinal. *Informa*, v. 16, n. 7-8, 2004.

FONSECA, A. C.; RESENDER, R.; OLIVEIRA, C.R.; PEREIRA, C. M. Cholesterol and statins in Alzheimer's disease: current controversies. *Experimental Neurology*, v. 223, p.282-293, 2009.

FRÖLICH, A.; WÜGLER, F.E. New tester strains with improved bioactivation capacity for the *Drosophila* wing-spot test. *Mutation Research*, v.216, p.179-187, 1989.

FROMIGUÉ, O.; HAMIDOUCHE, Z.; MARIE, P.J. Statin-induced inhibition of 3-hydroxy-3-methyl glutaryl coenzyme A reductase sensitizes human osteosarcoma cells to anticancer drugs. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, v.325, p.595-600, 2008.

GAZZERRO, P.; PROTO, M. C.; GANGEMI, G.; MALFITANO, A. M.; CIAGLIA, E.; PISANTI, S.; SANTORO, A.; LAZZA, C.; BIFULCO, M. Pharmacological actions of statins: a critical appraisal in the management of cancer. *Pharmacological Reviews*, v.64, p.102–146, 2012.

GAW, A.; PACKARD, C.J. Comparative chemistry, pharmacology and mechanism of action of the statins. In: GAW, A.; PACKARD, C.J.; SHEPHERD, J. (Eds).

Statins: The HMG-CoA reductase inhibitors in perspective. London: Martin Dunitz, p.49-61, 2000.

GRAF, U.; ABRAHAM, S.K.; GUZMÁN-RINCÓN, J.; WÜRGLER, F.E. Antigenotoxicity studies in *Drosophila melanogaster*. *Mutation Research*, v.402, p.203-209, 1998.

GRAF, U.; FREI, H.; KÄGI, A.; KATZ, A. J.; WÜRGLER, F. E. Thirty compounds tested in the *Drosophila* wing spot test. *Mutation Research*, v. 222, p. 359-373, 1989.

GRAF.U.; SINGER D. Genotoxicity testing of promutagens in the wing Somatic Mutation and Recombination Test In *Drosophila melanogaster*. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, v.8, p.15-27, 1992.

GRAF, U.; VAN SCHAIK, N. Improved high bioactivation cross for the wing somatic and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Mutation Research*, v. 271, p. 59-67, 1992.

GRAF, U.; WÜRGLER, F. E.; KATZ, A. J.; FREI, H.; JUON, H.; HALL, C. B.; KALE, P. G. Somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, v. 6, p.153-188, 1984.

GUYTON, A.C.; HALL, J.E. *Tratado de Fisiología Médica*. 12.ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2011.1151p.

GUZMÁN-RICÓN, J.; GRAF, U. *Drosophila melanogaster* somatic mutation and recombination test as a biomonitor. In: BUTTERWORTH F. M. et al. (eds). Biomonitoring and biomarkers as indicators of environmental changes. *Phenunm Press*, New York, p.169-181, 1995.

HINDLER, K.; ELTZSCHIG, H.K.; FOX, A.A.; BODY, S.C.; SHERMAN, S.K.; COLLARD, C.D. Influence of statins on perioperative outcomes. *Journal of Cardiothoracic and Vascular Anesthesia*, v.20, p.251–258, 2006.

HOFFMANN, K. H.; LORENZ, M.W. Recent advances in hormones in insect pest control. *Phytoparasitica*, v.26, n.4, p. 323-330, 1998.

HUNNINGHAKE, D.B. HMG-CoA reductase inhibitors *Current Opinion in Lipidology*, v.3, p.22-28, 1992.

ISTVAN, E.S.; DEISENHOFER, J. Structural mechanism for statin inhibition of HMG-CoA reductase. *Science*, v.292, p.1160-1164, 2001.

JOHANSSON, S.; MING, E.E.; WALLANDER, M.A.; RODRIGUEZ, L.A.G.; HERINGS, R.M.C.; GOETTSCH, W.G.; PEREZ, A.G.; McAFFE, A.T.; WALKER, A.M. Rosuvastatin safety: a comprehensive, international pharmacoepidemiology programme. *Pharmacoepidemiology and drug safety*, v.15, p. 454–461, 2006.

JOHN, S.; SCHNEIDER, M.P.; DELLES, C.; JACOBI, J.; SCHMIEDER, R.E. Lipid-independent effects of statins on endothelial function and bioavailability of nitric oxide in hypercholesterolemic patients. *American Heart Journal*, v.149, n.3, 2005.

KABEL, A. M. Statins: A New Hope for Cancer Therapy. *Journal of Cancer Research and Treatment*, v.1, n.2, p.36-38, 2013.

KAISEROVÁ, H.; Den HARTOG, G.J.M.; SIMUNEK, T.; SCHRÖTEROVÁ, L.; KVASNICKOVÁ, E.; BAST, A. Iron is not involved in oxidative stress-mediated cytotoxicity of doxorubicin and bleomycin. *British Journal of Pharmacology*, v.149, n.7, p.920-930, 2006.

KANG, J.; LEE, Y.; NO, K.; JUNG, E.; SUNG, J.; KIM, Y.; NAM, S. Ginseng intestinal metabolite-I (GIM-I) reduces doxorubicin toxicity in mouse testis. *Reproductive Toxicology*, v.16, p.291-298, 2002.

KATZUNG, B. G. *Farmacologia Básica e Clínica*. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. 991 p.

KAWATA, S.; YAMASAKI, E.; NAGASE, T.; INUI, Y.; ITO, N.; MATSUDA, Y.; INADA, M.; TAMURA, S.; NODA, S.; IMAY, Y.; MATSUZAWA, Y. Effect of pravastatin on survival in patients with advanced hepatocellular carcinoma. A randomized controlled trial. *British Journal of Cancer*, v.84, p.886-891, 2001.

KIM, Y.H.; PARK, S.M.; KIM, M.; KIM, S.H.; LIM, S.Y; AHN, J.C.; SONG, W.H.; SHIM, W.J. Cardioprotective effects of rosuvastatin and carvedilol on delayed cardiotoxicity of doxorubicin in rats. *Toxicology Mechanisms and Methods*, v.22, p.488-498, 2012.

KUSAMA, T.; MUKAI, M.; IWASAKI, T.; TATSUTA, M.; MATSUMOTO, Y.; AKEDO, H.; INOUE, M.; NAKAMURA, H. 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase inhibitors reduce human pancreatic cancer cell invasion and metastasis. *Gastroenterology*, v.122, p.308-317, 2002.

LARA, M.C.; ESPINOZA, J.A.M. Cytotoxic evaluation of fluvastatin and rosuvastatin and effect of fluvastatin in the hela cell cycle. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, v.5, p.189-193, 2011.

LEHMANN, M.; FRANCO, A.; VILAR, K.S.P.; REGULY, M.L.; ANDRADE, H.H.R. Doxorubicin and two of its analogues are preferential inducers of homologous recombination compared with mutational events in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. *Mutation Research*, v.539, p.167-175, 2003.

LIAO, J. K.; LAUFS, U. Pleiotropic effects of statins. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, v.45, p. 89-118, 2005.

LIAO, J.K.; ZHOU, Q. Pleiotropic Effects of Statins: Basic Research and Clinical Perspectives. *Circulation Journal*, v.74, p.818-826, 2010.

LILLY, E.; KOWA, P. Debut new statin Livalo in USA. *The Pharma Letter*. 2010. Disponível em: <<http://www.thepharmaletter.com/article/eli-lilly-and-kowa-pharma-debut-new-statin-livalo-in-usa>>. Acesso em: 13 mar. 2012.

LINDSLEY, D.L.; ZIMM, G.G. *The genome of Drosophila melanogaster*. 1st edition. Academic Press, San Diego, 1133p. 1992.

LOURO, I. D.; LLERENA Jr., J. C.; MELO, M. S. V.; ASHTON-PROLLA, P.; FROES, N. C. *Genética Molecular do Câncer*. 2. ed. São Paulo: MSG Produção Editorial, 2002.

LUDKA, F.K. *Avaliação da associação entre o efeito neuroprotetor e antidepressivo da atorvastatina em camundongos*. 95p. Dissertação (Mestrado em Neurociências), Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2012.

LUDKE, M. do C.M.M.; LÓPEZ, J. Colesterol e composição dos ácidos graxos nas dietas para humanos e na carcaça suína. *Ciência Rural*, v.29, n.1, p.181-187, 1999.

MADSEN, L. Activation of Liver X Receptors Prevents Statin-induced Death of 3T3-L1. *Journal of Biological Chemistry*, v. 283, n. 33, p. 22723–22736, 2008.

MARZZOCO, A.; TORRES, B. B. *Bioquímica Básica*. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007.404p.

MCKENNEY, J.M. Efficacy and safety of rosuvastatin in treatment of dyslipidemia. *American Journal of Health-System Pharmacy*, v.62, p.1033-1047, 2005.

MCTAGGART, F.; JONES, P. Effects of statins on high-density lipoproteins: a potential contribution to cardiovascular benefit. *Cardiovascular Drugs and Therapy*, v.22, p.321-338, 2008.

MENNICKENT, S.C.; BRAVO, M.D.; CALVO, C.M., AVELLO, M.L. Efectos pleiotrópicos de las estatinas. *Revista médica de Chile*, v.136, p.775-782, 2008.

MINOTTI, G.; MENNA, P.; SALVATORELLI, E.; CAIRO, G.; GIANNI, L. Anthracyclines: molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity. *Pharmacological Reviews*, v. 56, p.185–229, 2004.

MOTTA, V.T. *Bioquímica Clínica para Laboratório: Princípios e Interpretações*. 5.ed. Rio de Janeiro: MedBook, 2009. 400p.

MURRAY, R. K.; BENDER, D. A.; BOTHAM, K. M.; KENNELLY, P. J.; RODWELL, V. W.; WEIL, P. A. *Harper: Bioquímica Ilustrada*. 29. ed. São Paulo: Atheneu, 2013, 832p.

NASCIMENTO, M. C. M. O.; MARTINS, A. S. Cardiomiopatia induzida pela adriamicina: uma revisão. *Arquivos de Ciências e Saúde*, São José do Rio Preto v. 12, n. 2, p.111-115, 2005.

NELSON, D. L.; COX, M. M. *Lehninger: Princípios de bioquímica*. 5.ed. Porto Alegre: Artmed, 2011. 1274p.

OJOPI, E. P. B.; DIAS NETO, E. Genômica e oncologia. In: MIR, L. (Org.). *Genômica*. São Paulo: Atheneu, 2004. Cap 19. p.364-385.

OLIVEIRA SÁ, M. P. B. de; GOMES, R. A. F.; SILVA, N. P. C.; OLIVEIRA SÁ, M. V. B. de; CALADO FILHO, I. Cardiotoxicidade e quimioterapia. *Revista Brasileira de Clínica Médica*, v. 7, p. 326-330, 2009.

ORSOLIN, P.C.; SILVA-OLIVEIRA, R.G.; NEPOMUCENO, J.C. Assessment of the mutagenic, recombinagenic and carcinogenic potential of orlistat in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. *Food and Chemical Toxicology*, v.50, p.2598–2604, 2012.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M.; FLOWER, R. J. *Farmacologia*. 6. ed. São Paulo: Elsevier, 2007. 829p.

RESCH, U.; TATZBER, F.; BUDINSKY, A.; SINZINGER, H. Reduction of oxidative stress and modulation of autoantibodies against modified low-density lipoprotein after rosuvastatin therapy. *British Journal of Clinical Pharmacology*, v.63, p.262-274, 2006.

REZENDE, A. A. de; GRAF, U.; GUTERRES, Z. R.; KERR, W.E.; SPANÓ, M.A. Protective effects of proanthocyanidins of grape (*Vitisvinifera* L.) seeds on DNA damage induced by Doxorubicin in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. *Food and Chemical Toxicology*, v.47, p.1466-1472, 2009.

SABINA, A.G.; DÁVILA, J.G., SERRANO, P.S.; JUANATEY, C.G.; PACHECO, R.M. Consideraciones específicas en la prescripción e intercambio terapéutico de estatinas. *Farmacia Hospitalaria*, v.36, n.2, p97-108, 2012.

SANTIAGO, M. A. M. da C. *Estatinas: efeitos tóxicos e novas aplicações*. 86p. Dissertação de Mestrado (Ciências Farmacêuticas), Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade Fernando Pessoa, Porto, 2011.

SANTOS, A.C.; LEHMANN, R. Isoprenoids Control Germ Cell Migration Downstream of HMG-CoA Reductase. *Developmental Cell*, v.6, n.2, p.283–293, 2004.

SANTOS, L.N.; SILVA, F. V. da. Reações adversas às estatinas: mecanismo de ação e evidências clínicas. *Revista de Ciências Médicas e Biológicas*, v.9, n.1, p.79-86, 2010.

SCHACHTER, M. Chemical, pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of statins: an update. *Fundamental & Clinical Pharmacology*, v.19, p.117-125, 2005.

SCHUPP, N., SCHMID, U., HEIDLAND, A., STOPPER, H. Rosuvastatin protects against oxidative stress and DNA damage in vitro via upregulation of glutathione synthesis. *Atherosclerosis*, v.199, p.278–287, 2008.

SCHWARTZ, G.G.; BOLOGNESE, M.A.; TREMBLAY, B.P.; CAPLAN, R.; HUTCHINSON, H.; RAZA, A.; CRESSMAN, M. Efficacy and safety of rosuvastatin and atorvastatin in patients with hypercholesterolemia and a high risk of coronary heart disease: a randomized, controlled trial. *American Heart Journal*, v.148, e4, 2004.

SEYBOLD, S.J; TITTIGER, C. Biochemistry and Molecular Biology of de novo isoprenoid pheromone production in the Scolytidae. *Annual Review of Entomology*, v.48, p.425–53, 2003.

SHAH, Y.; IQBAL, Z.; AHMAD, L.; KHAN, A.; KHAN, M. I.; NAZIR, S.; NASIR, F. Simultaneous determination of rosuvastatin and atorvastatin in human serum using RP-HPLC/UV detection: method development, validation and optimization of

various experimental parameters. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, v.15, p. 557-563, 2011.

SHIRAI, H.; AUTIERI, M.; EGUCHI, S. Small GTP-binding proteins and mitogen-activated protein kinases as promising therapeutic targets of vascular remodeling. *Current Opinion in Nephrology and Hypertension*, v.16, p.111-115, 2007.

SHISHEHBOR, M.H.; BRENNAN, M.L.; AVILES, R.J.; FU, X.; PENN, M.S.; SPRECHER, D.L.; HAZEN, S. L. Statins promote potent systemic antioxidant effects through specific inflammatory pathways. *Circulation*, v.108, p.426-431, 2003.

SILVA, S. M. da. *As estatinas como anti-dislipidémicos hoje e como anti-inflamatórios amanhã*. 46p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias, Lisboa, 2013.

SIMUNEK, T.; STIRBA, M.; POPELOVÁ, O.; ADAMCOVÁ, M.; HRDINA, R.; GERSL, V. Anthracycline-induced cardiotoxicity: overview of studies examining the roles of oxidative stress and free cellular iron. *Pharmacological Reports*, v. 61, p.154-171, 2009.

SINGAL, P.K.; LI, T.; KUMAR, D.; DANELISEN, I.; ILISKOVIC, N. Adriamycin-induced heart failure: mechanism and modulation. *Molecular and Cellular Biochemistry*, v.20, p.77–86, 2000.

SLEIJFER, S.; VAN DER GRASST, A.; PLANTING, A.S.; STOTER, G.; VERWEIJ, J. The potential of statins as part of anti-cancer treatment. *European Journal of Cancer*, v. 41, n.4, p.516-522, 2005.

SPINDLER, S.R.; LI, R.; DHAHBI, J.M.; YAMAKAWA, A.; MOTE, P.; BODMER, R.; OCORR, K.; WILLIAMS, R.T.; WANG, Y.; ABLAO, K.P. Statin treatment increases lifespan and improves cardiac health in *Drosophila* by decreasing specific protein prenylation. *PLoS One*, v.7, 2012. Disponível em: <<http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0039581>>. Acesso em: 12 abr. 2014.

SUGIYAMA, M.; OHASHI, M.; TAKASE, H.; SATO, K.; UEDA, R.; DOHI, Y. Effects of atorvastatin on inflammation and oxidative stress. *Heart Vessels*, v.20, p.133-136, 2005.

TAKEDA, I.; MARUYA, C.I.; SHIRASAKI, T.; MIZUKAMI, H.; TAKAHATA, T.; MYERS, J.N.; KAKEHATA, S.; YAGIHASHI, S.; SHINKAWA, H. Simvastatin

inactivates β 1-integrin and extracellular signal-related kinase signaling and inhibits cell proliferation in head and neck squamous cell carcinoma cells. *Cancer Science*, v.98, n.6, p.890-899, 2007.

TICKKO, S.; RUSSELL, S.S. *Drosophila melanogaster* as a model system for drug discovery and pathway screening. *Current Opinion in Pharmacology*, v.2, p.555-560, 2002.

USME, M.C. S.; ORDÓÑEZ, N.; PÉREZ, A.U.; PÉREZ, L.F.; GÓMEZ, M.S. Anti-tumor effects of simvastatin on UMR 106 osteosarcoma cell line. *Revista de la Academia Colombiana de Ciencias*, v.35, n.136, p.287-294, 2011.

VIEGAS JÚNIOR, C.; BOLZANI, V. da S. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. *Química Nova*, v.29, n. 2, p.326-337, 2006.

WEITZ-SCHMIDT, G.; WELZENBACH, K.; BRINKMANN, V.; KAMATA, T.; KALLEN, J.; BRUNS, C.; COTTENS, S.; TAKADA, Y.; HOMMEL, U. Statins selectively inhibit leukocyte function antigen-1 by binding to a novel regulatory integrin site. *Nature Medicine*, v.7, p. 687-692, 2001.

YAMAMOTO, A.; SUDO, H.; ENDO, A. Therapeutic effects of ML-236B in primary hypercholesterolemia. *Atherosclerosis*, v. 35, p. 259-266, 1980.

YANAE, M.; TSUBAKI, M.; SATOU, T.; ITOH, T.; IMANO, M.; YAMAZOE, Y.; NISHIDA, S. Statin induced apoptosis via the suppression of ERK1/2 and Akt activation by inhibition of the geranylgeranyl-pyrophosphate biosynthesis in glioblastoma. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, v.30, p.74-82, 2011.

YILDIRIR, A.; MUDERRISOGLU, H. Non-lipid effects of statins: emerging new indications. *Current Vascular Pharmacology*, v.2, p.309-318, 2004.

ZEYBEK, N.D.; GULCELIK, N.E.; KAYMAZ, F.F.; SARISOZEN, C.; VURAL, I.; BODUR, E.; CANPINAR, H.; USMAN, A.; ASAN, E. Rosuvastatin induces apoptosis in cultured human papillary thyroid cancer cells. *Journal of Endocrinology*, v.210, p.105–115, 2011.

ZHANG, W.; WU, J.; ZHOU, L.; XIE, H.; ZHENG, S. Fluvastatin, a lipophilic statin, induces apoptosis in human hepatocellular carcinoma cells through mitochondria-operated pathway. *Indian Journal of Experimental Biology*, v.48, p.1167-1174, 2010.

CAPÍTULO II

**Modulating effect of synthetic statins against
damage induced by doxorubicin in somatic cells of
*Drosophila melanogaster***

Food and Chemical Toxicology, v.81, p.111–119, 2015.

(ANEXO)

Research Article

Modulating effect of synthetic statins against damage induced by doxorubicin in somatic cells of *Drosophila melanogaster*

P.C. Orsolin^a, R. G. Silva-Oliveira^a, J.C Nepomuceno^{a,b*}

^a *Universidade Federal de Uberlândia, Instituto de Genética e Bioquímica, Bloco 2E, Campus Umuarama, Uberlândia, Minas Gerais, Brazil*

^b *Centro Universitário de Patos de Minas, Laboratório de Citogenética e Mutagênese, Patos de Minas, Minas Gerais, Brazil*

Running title: Modulating effect of synthetic statins against damage induced by doxorubicin.

Abstract

The competitive inhibitors of HMG-CoA reductase, popularly known as statins, exert pleiotropic effects, which result from the ability of statins to inhibit the synthesis of isoprenoids, which are fundamental for the functioning of proteins responsible for intracellular signaling. Some recent studies suggest an important role associated with the use of antineoplastic atorvastatin and rosuvastatin, the statins most widely used today. In this study, the *Drosophila* wing spot test was used to evaluate possible protective effects of atorvastatin and rosuvastatin against damage induced by DXR. Larvae were chronically treated with negative control (ethanol 5%), positive control (DXR 0.125 mg/mL) and five different concentrations of atorvastatin and rosuvastatin. The results demonstrated absence of a mutagenic effect for the two statins tested. The analysis of the descendants co-treated with DXR and atorvastatin/rosuvastatin revealed a modulatory effect of these statins on damage induced by DXR. This effect was verified in all concentrations tested in the descendants of the ST and HB crosses treated with rosuvastatin, and only in descendants of the HB cross treated with atorvastatin. Induction of apoptosis and antioxidant activity appear to be the main mechanisms involved in reducing the frequency of mutant spots and consequent modulation of the damage induced by DXR.

Keywords: Atorvastatin. Rosuvastatin. Modulatory Effect. Smart. *Drosophila melanogaster*.

Abbreviations:

BH, balancer heterozygote descendants;
CYP, cytochrome P450;
CYP2C9, cytochrome P450 2C9;
CYP 2C19, cytochrome P450 2C19;
DXR, doxorubicin;
eNOS, endothelial nitric oxide synthase;
ERK- extracellular regulated kinase;
HB, high bioactivation cross;
HDL, high-density lipoprotein;
HMG-CoA, 3-hydroxy-3-methylglutaryl Coenzyme A;
LDL, low-density lipoprotein;
MH, marker trans heterozygous descendants;
NADPH, nicotinamide adenine dinucleotide phosphate;
ROS, reactive oxygen species;
SMART, Somatic mutation and recombination test;
ST, standard cross;

1. Introduction

Statins are the most commonly used drugs in the treatment of hyperlipidemia, in primary and secondary prevention, with the goal of reducing the levels of cholesterol and, consequently, the risk of developing coronary heart disease (Campo and Carvalho, 2007). They have been widely used to lower the levels of low-density lipoproteins (LDL cholesterol), total cholesterol and triglycerides and, additionally, promote a small increase in the levels of high-density lipoproteins (HDL cholesterol), without severe adverse reactions (Kawata et al, 2001; McTaggart and Jones, 2008). These effects result from the inhibitory activity of statins on the enzyme HMG-CoA (3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A) reductase, with the property of blocking the conversion of the substrate HMG-CoA to mevalonate, the initial steps of inhibiting cholesterol biosynthesis (Bonetti et al., 2003; Istvan and Deisenhofer, 2001). In insects, such as the *Drosophila melanogaster*, this enzyme catalyzes the biosynthesis of a precursor of mevalonate for the production of isoprenoids, which are essential for cell differentiation (Deshpande and Scheld, 2005; Gertler et al, 1988).

In addition to their ability to reduce cholesterol, statins have additional recognized pharmacological properties (pleiotropic effects), including antioxidant (Mennickent et al., 2008; Schupp et al., 2008; Zeybek et al., 2011), anti-inflammatory (Weitz-Schmidt et al., 2001; Shishehbor et al., 2003), immunomodulating (Resch et al., 2006) and anti-thrombogenic activity, and improvement of endothelial function (Yildirim et al., 2004; John et al., 2005). Studies have also evidenced several antineoplastic properties associated with these drugs, including a reduction in the progression of the cell cycle, suppression of angiogenesis, inhibition of tumor growth (Kusama et al., 2002; Demierre et al., 2005; Hindler et al., 2006; Lara and Espinoza, 2011) and induction of apoptosis (Cafforio et al., 2005; Bardou et al., 2010; Zhang et al. 2010; Yanae et al., 2011). The pleiotropic effects of statins result predominantly from their capacity to inhibit the synthesis of isoprenoids, which are essential to the functioning of proteins responsible for intracellular signaling, such as Ras and Rho (Shirai et al., 2007). Such effects have led to the development of studies exploring new therapeutic applications, especially in the field of neurodegenerative diseases and oncology.

Although natural and synthetic statins share the same action mechanism, there are differences in the activity, pharmacokinetics, pharmacological interaction, half-life and unwanted effects related to hepatotoxicity and miotoxicity. Thus, the differences that they present in permeability and metabolism may explain the differences in their pleiotropic effects (Campo and Carvalho, 2007; Zhou and Liao, 2010). Atorvastatin is a synthetic statin that binds extensively to plasma proteins and has hepatic selectivity for the inhibition of HMG-CoA reductase. In general, the side effects of statins are well tolerated (Schachter, 2005) and a large amount of clinical data have demonstrated the safety of the use of high doses of atorvastatin (Schwartz et al., 2004), which justifies its wide use.

Until the adoption of rosuvastatin, in 2003, atorvastatin was the most effective drug in the statin class of drugs, but recent studies suggest rosuvastatin is a potent inhibitor of HMG-CoA reductase, possessing a greater effect compared to conventional statins (Shah et al., 2011). It is the latest, fully synthetic, orally active and hepatic selective statin, excreted 90% unchanged in the feces, with low metabolism via cytochrome P450 (Cheng-Lai, 2003; Chagas and Galvão, 2004). Currently, therefore, rosuvastatin and atorvastatin are the leading statins (Shah et al., 2011).

Antineoplastic doxorubicin (DXR) is a powerful and effective chemotherapeutic agent in the treatment of several types of tumors, but its use is limited due to its cardiotoxicity (Tallaj et al., 2005; Navarro et al., 2006). Its main action is the inhibition of the enzyme topoisomerase II, resulting in an accumulation of breaks in DNA stands which, if not repaired, can result in mutations and chromosomal aberrations (Islaih et al., 2005). The reduction of damage induced by DXR has been demonstrated in several studies involving their association with different agents via the somatic mutation and recombination test (SMART) in *D. melanogaster* (Costa and Nepomuceno, 2006; Dias et al., 2009; Rezende et al., 2009).

SMART provides the detection of a wide variety of genetic alterations such as point mutations, deletions, some types of chromosomal aberrations and mitotic recombination (Graf et al., 1984). The wing spot test is also ideally suited for antimutagenicity studies (Graf et al., 1998). This test is based on the premise

that genetic changes induced in cells that divide by mitosis induce the appearance of mutant spots which arise from loss of heterozygosity in cells heterozygous for recessive marker genes. The analysis of possible induced damage is achieved by observing cell groups on the surface of the wings of adult flies that express the phenotypic marker genes *mwh* or *flr*³, which are responsible for changes in the shape of the hair (Graf et al., 1984; Guzmán-Rincon and Graf, 1995; Graf et al., 1998).

Although they are currently several known pleiotropic effects associated with the use of statins, identified through different models and experimental procedures, there are no studies evaluating the potential mutagenic and/or antimutagenic effects on *Drosophila melanogaster*. Furthermore, genotoxicity studies involving statins are controversial: research shows an absence of mutagenic effects of atorvastatin from tests on *E. coli* and *S. typhimurium* and micronuclei in rats (Ciaravino et al., 1995). In the case of rosuvastatin, research by Berber et al. (2014) suggests that statins induce the appearance of chromosomal aberrations, micronuclei, and promote DNA damage identified by the comet assay in human peripheral blood. Considering the above, the present study was developed to evaluate possible genotoxic effects of atorvastatin and rosuvastatin, as well as possible modulatory effects against DNA damage induced by doxorubicin through SMART in *D. melanogaster*.

2. Material and Methods

2.1. Chemicals

Two synthetic statins were tested in this study: atorvastatin calcium (Fig. 1), high purity, 99%, (CAS 134523-03-8, lot L387764 produced by the Laboratory EMS, São Paulo, Brazil) and rosuvastatin calcium (Fig. 1), also of high purity, 99% (CAS 147098-20-2, lot L405058 produced by the Laboratory Germed, São Paulo, Brazil). All solutions and dilutions (in 5% ethanol) were prepared immediately before use.

For the positive control we used doxorubicin (CAS 25316-40-9, lot 83520, manufactured by Eurofarma Laboratories Ltda, São Paulo, Brazil). Ethanol

5% was used as the negative control. The use of DXR as a positive control in our work, as well as the concentrations used, was based on studies done previously, which demonstrated generation of reactive oxygen species and induction of homologous recombination in *D. melanogaster*.

2.2 Somatic Mutation and Recombination Test (SMART) in *Drosophila melanogaster*

2.2.1 Stock strains and crosses

For this test, three mutant strains of *D. melanogaster*, provided by Dr. Ulrich Graf, Institute of Toxicology, University of Zurich, Schwerzenbach, Switzerland, were used. These strains are: *mwh*, *flr*³ and *ORR*, carriers of the genetic markers multiple wing hairs (*mwh*, 3 to 0.3) and *flare-3* (*flr*³, 3 to 38.8). These strains were subjected to two scheme crosses: (1) Standard Cross (ST), in which virgin females *flr*³/*ln(3LR)TM3*, *ri p^p sep l(3)89Aa bx^{34e}* and *Bd^s* were crossed with males *mwh/mwh* (Graf et al., 1989); and (2) High Bioactivation Cross (HB), in which virgin females *ORR/ORR*; *flr*³/*ln(3LR)TM3*, *ri p^p sep l(3)89Aa bx^{34e}* and *Bd^s* were crossed with males *mwh / mwh* (Graf and Van Schaik, 1992).

Individuals belonging to the *ORR* strain have high expression of cytochrome P450 enzymes (Graf and Van Schaik, 1992). Therefore, this strain of *D. melanogaster* was created with the goal of increasing the activation of pro-mutagens dependent activation via cytochrome P450 (Andrade and Lehmann, 2003). In this context, considering that the two statins tested are biometabolized by microsomal cytochrome P450 enzymes, especially atorvastatin, which is biotransformed primarily by the cytochrome P4503A4 (Park et al., 2006), the analysis of the HB descendants in this research becomes relevant.

From these crosses two types of descendants were obtained: marker trans-heterozygotes (MH) and balancer heterozygotes (BH). The MH (*mwh*+/+*flr*³) present structurally normal chromosomes, and are phenotypically characterized by smooth wing edges, while the BH (*mwh*+/+*TM3*, *Bd^s*) present a balancer chromosome, with multiple inversions (*TM3*, *Bd^s*), phenotypically characterized by serrated wing edges (Guzmán-Rincon and Graf, 1995).

2.2.2 Treatments and data analysis

The egg collection from the descendants of the ST and HB crosses occurred during a period of 8 hours, in vials containing a solid base of agar (3% agar in water) and a layer of yeast supplemented with sucrose. After 72 ± 4 hours the larvae were washed with reverse osmosis water, collected with the aid of a fine mesh sieve and placed in glass vials containing 1.5 g of instant mashed potatoes (HIKARI®, São Paulo, Brazil). In each vial, 5 mL of the substance to be tested was added: Atorvastatin in five different concentrations (21.25; 42.5; 85; 170 and 340 μ M) or rosuvastatin (18.75; 37.5; 75; 150 and 300 μ M), diluted in ethanol 5%, alone and in association with the DXR (0.125 mg/mL). Doxorubicin (DXR 0.125 mg/mL) was used for the positive control and ethanol 5% for the negative control. All compounds were tested in two independent series, kept at $25 \pm 1^\circ\text{C}$ and relative humidity of approximately 60%.

After hatching, adult flies were collected and stored in 70% ethanol for posterior analysis. Subsequently the wings were removed and mounted on slides containing Faure's solution (50 mg of arabic gum, 30g of chloral hydrate, 30 mL of glycerol, 50 mL of water). Both surfaces of the dorsal and ventral wings were analyzed by optical microscope at a magnification of 400x to identify mutant spots in different sectors.

To assess the cytotoxicity of the concentrations, the adult flies in the tubes treated with atorvastatin and rosuvastatin were counted. A test for cytotoxicity was then performed in tubes of 100 larvae each, exposed to the concentrations of compounds tested. The number of surviving flies per treatment provided an indicator of the toxicity of the compounds.

2.2.3 Statistical Analysis

The frequencies of each type of spot (simple small, simple large or twin) and the total frequency of spots per fly, for each treatment, were compared in pairs (negative control *versus* statins; DXR alone *versus* statins + DXR), in accordance with the multiple decision procedure proposed by Frei and Würigler (Frei and Würigler, 1988), which results in four possible diagnoses: positive, negative,

inconclusive or weakly positive. The relative frequencies of each group were compared using the conditional binomial test of Kastenbaum and Bowman (Kastembaum and Bowman, 1970), at a significance level of 5%. However, since false positive results can occur, all final weak positive results were analyzed with the non-parametric U test, by Mann, Whitney and Wilcoxon (Frei and Wrügler, 1995). The percentages of inhibition of statins (atorvastatin and rosuvastatin) were calculated using the frequency of clones per 10^5 cells, corrected by the control, as follows: $[(\text{DXR alone} - \text{Statin} + \text{DXR}) / \text{DXR alone}] \times 100$ (Abraham, 1994).

3. Results

In this study all compounds were tested in chronic treatments (approximately 48h) on larvae descendants of the ST and HB crosses. All of the compounds were tested in two different experiments, and the results were gathered for the purpose of statistical analyses, after checking that there was no heterogeneity in the samples. Prior to the genotoxicity analysis, atorvastatin and rosuvastatin were subjected to a cytotoxicity test.

The concentrations used in this study were initially outlined on the basis of previous studies involving cell culture (Zeybek et al., 2011). Once established, these concentrations were subjected to a test for cytotoxicity in *D. melanogaster*, with the aim of evaluating the survival percentage of individuals treated with the different doses. In this context, a pilot experiment was performed with the test compounds (atorvastatin and rosuvastatin), where the final concentrations employed in the genotoxicity experiment were also based on these data. The toxicity was determined as a function of increasing the percentage of treated larvae that did not reach the adult stage. Higher doses selected for the study induced a mortality rate of less than 30%. The criteria for choosing the final concentrations are centered on two main reasons: the reduction of the percentage of survival of larvae is a clear indication that the compounds affect the larvae and, in addition, the number of emerging adults must be sufficiently high to allow the implementation of the treatments (Carmona et al., 2011; Demir et al., 2013).

Once the cytotoxicity test was done the survival curves for each statin tested alone and in combination with doxorubicin were established (Fig. 2). No

toxic effect was observed in the treatments performed with different concentrations of atorvastatin alone and in association with the DXR, not even at the highest concentration tested (340 μ M). All concentrations showed survival rates of more than 92%. Except for the treatment with rosuvastatin, where a slightly lower survival rate was found for the highest concentration tested (300 μ M), producing a mortality rate of nearly 30% in the HB cross larvae descendants. Although this concentration reduced survival rates, it was also tested in association with DXR, where it presented the same effect. All the survival percentages, however, were within the established limit of 70%. According to Narapusetti et al. (2014), the mean plasma concentration of rosuvastatin, in human plasma following oral dosing of rosuvastatin (40 mg), was 10 ng/mL, after 12 hours. Thus, the concentration used in our experiments was higher than that in human plasma. The mean plasma concentration of atorvastatin, in human plasma following oral dosing of atorvastatin (80 mg), was 70.6 ng/mL, after 2 hours (Partani et al., 2014).

The results obtained from the treatment with atorvastatin in MH descendants of the ST and HB crosses, treated with different concentrations of atorvastatin alone and in association with DXR, are presented in Table 1. The individuals treated with the different concentrations of atorvastatin alone (21.25; 42.5; 85; 170 and 340 μ M) showed no significant difference in the total number of spots observed when compared to the negative control ($p > 0.05$). This result shows no mutagenic effect for this drug in the descendants of both ST and HB crosses. The treatment with doxorubicin produced positive results for all spot categories, when compared to the negative control ($p < 0.05$). This increase in frequency of mutant spots in the individuals treated with DXR confirms its genotoxic effect, primarily from recombination, verified by the increase of twin spots and results obtained with the descendants of the BH line, shown previously.

Analysis of the data from the co-treatment of atorvastatin with doxorubicin in MH individuals, descendants of the ST cross, revealed no significant difference in the total number of spots in the individuals treated with different concentrations in relation to the positive control ($p > 0.05$). However, this result was not observed in the descendants of the HB cross. In the MH individuals obtained from this cross, a statistically significant reduction was observed in the number of simple spots and in the total number of sport for all concentrations

tested ($p < 0.05$). These results reveal a modulatory effect of atorvastatin on DXR in descendants of the HB cross, which possess high levels of cytochrome P450.

In view of the modulatory effect found in the results, descendants of the genotype *mwh+/+TM3* (BH) were analyzed. These individuals express only mutational events, because the *TM3* chromosome has multiple inversions, which, in the event of recombination, make the cells non-viable. A comparison of the spot frequencies of MH and BH individuals indicated that recombination is the primary response to treatment with DXR alone (58.33%) and that treatment with atorvastatin, in all the concentrations tested, inhibited the damage induced by DXR, with an inhibitory effect that ranged between 56.55% and 81.03% for the different concentrations. Recombination was also the primary event related to mutant spots produced by DXR in association with atorvastatin in the lower concentrations tested. In the concentrations 21.25; 42.5; 85; 170 and 340 μM plus DXR, 58.27%, 55.07%, 51.53%, 42.82% and 49.34% of the spots were due to recombination changes, respectively.

The results obtained from the treatment with rosuvastatin in MH descendants of the ST and HB crosses, treated alone or with different concentrations of rosuvastatin in association with DXR are presented in Table 2. Rosuvastatin alone did not result in any significant difference in any of the classes of spots analyzed, in the concentrations used, when compared to the negative control ($p > 0.05$). This result reflects the absence of a mutagenic effect for this drug, in descendants of both ST and HB crosses, for all the concentrations tested (18.75; 37.5; 75; 150 and 300 μM). The treatment with doxorubicin again induced positive results for all spot categories, when compared to the negative control ($p < 0.05$).

When analyzing the data from the co-treatment of rosuvastatin with doxorubicin in MH descendants of the ST cross, there was a reduction in damage to DNA induced by DXR for all the concentrations tested, without a dose-dependent effect. These reductions were statistically significant for the total number of spots, when compared to DXR alone ($p < 0.05$). For the simple spot category there was a reduction in the co-treatments involving rosuvastatin at the concentrations 18.75; 37.5; 75 and 300 μM plus DXR. In the simple large spot category there was a significant reduction at the concentrations 18.75; 150 and

300 μ M plus DXR and, for the twin spot category, this reduction occurred at all concentrations, and was significant for the concentrations 75 and 150 μ M plus DXR.

Analysis of these data (co-treatment of rosuvastatin with DXR in MH individuals), however, descendants of the HB cross, also reflected the modulatory effect on damage to DNA induced by DXR for all concentrations tested, with no dose-dependent relationship. In this case, co-treatments involving rosuvastatin at all concentrations tested (18.75; 37.5; 75, 150 and 300 μ M) plus DXR (0.125 mg/mL) produced statistically significant reductions in the frequency of simple small spots and total number of spots, when compared to DXR alone ($p < 0.05$).

After a reduction in total number of spots was determined, individuals of the BH (genotype *mwh*+/*TM3*) line, obtained from ST and HB crosses, were also analyzed. The results showed that rosuvastatin presented reductions in the number of spots ranging from 55.45% to 81% in the descendants of the HB cross and between 67.84% and 90.06% in the descendants of the ST cross. The comparison between spot frequencies for MH and BH individuals indicated that recombination is the primary response to the treatment with DXR alone (53.80% and 53.85%, in the descendants of ST and HB crosses, respectively).

With regard to the proportion of spots resulting from mutation and recombination in individuals treated with rosuvastatin in association with DXR, it was found that, for the descendants of the ST cross, the five concentrations tested induced changes in the recombination activity of DXR, at times increasing and at other times decreasing the recombinogenic effect. For the associations with 18.75; 37.5; 75; 150 and 300 μ M of rosuvastatin plus DXR the following recombination percentages were obtained, respectively: 61.86%, 40.17%, 52.56%, 62.56% and 44.06%. In the descendants of the HB cross, recombination was responsible for a considerably smaller proportion of the spots produced by DXR in association with rosuvastatin for the five concentrations tested (18.75; 37.5; 75, 150 and 300 μ M): 37.30%, 32.60%, 44.78%, 36.62% and 7.48% of the mutant spots were due to changes from recombination, respectively. Therefore, these data indicate that rosuvastatin, in this case, reduced the recombinogenic effects of DXR.

4. Discussion

In the present study, the possible effects of atorvastatin and rosuvastatin, alone or in combination with the chemotherapeutic agent DXR, were analyzed using two crosses (ST and HB), with the somatic mutation and recombination test (SMART) in *D. melanogaster*. The results observed in both crosses revealed that neither atorvastatin nor rosuvastatin present mutagenic effects on the somatic cells of *D. melanogaster*, since isolated treatment did not result in changes in the frequencies of mutant spots. As expected, a significant increase was also observed in all spot categories in individuals treated only with DXR (positive control).

With regard to the effects induced in the somatic cells of *D. melanogaster*, DXR's most significant contribution was its ability to generate free radicals, producing oxidative stress, and also inducing recombination. These effects also reported in a series of previous studies using SMART (Lehmann et al., 2003; Costa and Nepomuceno, 2006; Dias et al., 2009; Rezende et al., 2009; Rezende et al., 2011, Orsolin et al., 2012). Although homologous recombination represents an important DNA repair process, there is growing evidence that deleterious genomic rearrangements can result from this recombination, which means that occurrences of this type may be determinant in carcinogenesis (Arossi et al., 2009).

In relation to the results of the co-treatment of the statins evaluated with DXR, a modulatory effect of these drugs was observed on DNA damage induced by DXR. The mechanisms by which the statins reduce the frequency of mutant spots, induced by DXR, were not directly evaluated in this study. It is believed, however, that they may be in some way associated with the activation of the apoptotic pathway. According to Bardou et al. (2010), statins are able to induce apoptosis through intrinsic and extrinsic pathways, leading to cell death. Although the mechanism for apoptosis, induced by statins, has not been completely elucidated, it is likely that it is due to the depletion of geranylgeranylated or farnesylated proteins, which may be dependent on the cell type or state of differentiation.

The synthesis of isoprenoids (Geranylgeranyl-PP and Farnesyl-PP) is altered by the inhibition of HMG-CoA reductase by the statins, leading to the deficient formation of intermediaries in the transcription and transduction of cellular signaling, which in turn impacts various cell functions (Chan et al., 2003; Hindler et al., 2006). The isoprenoids produced from this pathway promote post-transduction modifications in various cellular proteins, whose function is negatively affected by the absence of isoprenylation (Miida et al., 2004; Ma and Ma, 2011; Spindler et al., 2012). In general, these proteins promote special cellular response processes, like the regulation of growth and cellular differentiation (Miida et al., 2004). It has also been reported that Rho geranylgeranylation plays an important role in cell proliferation and apoptosis, in addition to controlling cell migration. In this context, since statins inhibit both geranylgeranylation and, therefore, the activation of Ras and/or Rho, it is therefore plausible that they could potentially inhibit the malignant phenotype of tumor cells (Bifulco, 2008). This mechanism may also explain the reduction in mutant spots when these statins are associated with DXR.

Another effect that could be associated with the production of damage induced by DXR, observed in the present study, is the anti-oxidant activity of statins. It is widely recognized that among the deleterious effect of DXR are: inhibition of topoisomerase II, intercalation with the DNA molecule, and generation of free radicals that act as potent alkylating agents, in normal and malignant tissues (Islaih et al., 2005; Navarro et al., 2006). The results of the co-treatment of DXR with statins point to a possible antimutagenic action of statins when associated with DXR. The statins may have inactivated it or its metabolic products, which are free radicals generated in the transformation of this genotoxic agent, resulting in a reduction in the frequency of mutant spots.

The antioxidant action of statins has also been confirmed in previous studies (Shishehbor et al., 2003; Mennickent et al., 2008; Zeybek et al., 2011). It has been confirmed that they are capable of reducing levels of nitrotyrosine (NO₂Tyr), a product of the action of free radicals on protein residues (Shishehbor et al., 2003). According to Mennickent et al. (2008), the antioxidant effects of the statins are primarily related to the following factors: reduction of plasma lipids; direct capture of reactive oxygen species (ROS); effect on inflammatory cells,

since phagocytes are an important source of ROS; and inhibition of the enzyme vascular NADPH (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate) oxidase.

Some observational studies have elucidated the effect of statins on reducing the incidence of various types of cancers, such as breast cancer, pancreatic cancer, fibrosarcoma, glioma, neuroblastoma and lymphoma, resulting in the slowing of tumor growth and inhibiting metastatic processes. Preclinical trials have also confirmed that statins show an ability to maximize the antitumor effects of some cytokines and chemotherapeutic agents (Campo and Carvalho, 2007). These studies, taken as a whole, suggest that collectively statins may, in addition to playing a crucial role as a drug to reduce lipids in the prevention of cardiovascular diseases, act as an anticancer agent.

Statins, although they have the same mechanism, are different in terms of lipophilicity, half-life and potential for the inhibition of extra-hepatic HMG-CoA reductase (Campo and Carvalho, 2007; Zhou and Liao, 2010). In this way, the differences that they present in tissue permeability and metabolism may justify the differences that statins present in secondary effects, as well as pleiotropic effects (Zhou and Liao, 2010).

Atorvastatin is considered a relatively lipophilic statin, while rosuvastatin is more hydrophilic, in comparison with other statins. This hydrophilicity is due to the lateral chains that make up the methanesulfonamide group (Abbas et al., 2012). This is why it exhibits low passive diffusion to the non-hepatic cells and avidity for hepatic cells via selective transport. In addition, the relative hydrosolubility of this drug lessens the need for metabolism by the P450 enzyme. Its higher number of linking sites for the enzyme HMG-CoA reductase makes this statin the most potent inhibitor of this enzyme ever developed (McKenney, 2005). Moreover, there are differences in half-lives, which in the case of atorvastatin is approximately 14 hours, while rosuvastatin is around 19 hours (Campo and Carvalho, 2007; Abbas et al., 2012). These pharmacokinetic and pharmacodynamic differences are probably associated with the differences seen in the modulatory effect on DXR. In our study, the results suggest that rosuvastatin possesses greater potential to inhibit the damage induced by DXR on the somatic cells of *D. melanogaster*.

Considering these differences, specifically with regard to atorvastatin, the results of the present study revealed that it does not have a mutagenic effect on *D. melanogaster* and, just the opposite, is capable of reducing damage induced by DXR. In a study conducted by Ciavarino et al. (1995) the genotoxicity of atorvastatin was evaluated in a variety of test systems, *in vitro* and *in vivo*, including mutagenicity tests with bacteria, like *E. coli* and *S. typhimurium*, tests to evaluate chromosome aberrations in lung cell cultures of Chinese hamsters and tests to evaluate micro-nuclei of rat. In this study, the results obtained, overall, reveal an absence of mutagenic, clastogenic and genotoxic effects of this statin.

With regard to the association between atorvastatin and DXR, Ramanjaneyulu et al. (2013) investigated the possible protective effects exerted by atorvastatin against oxidative stress and damage to DNA induced by DXR in the heart and testicles of rats. The protective role of atorvastatin in rats treated with DXR was evident based on an improvement in oxidative stress and a reduction in damage to DNA.

El-Moselhy and El-Sheikh (2014) investigated the mechanisms by which hepatic and renal damage induced by DXR could be prevented by concomitant administration of atorvastatin (10 mg/kg). The results also revealed that associations of atorvastatin with DXR lead to a reduction in oxidative stress induced by DXR, both in the kidney and liver. The association also resulted in a reduction in the inflammatory effects induced by DXR.

In addition, the results obtained for the treatment with atorvastatin in association with DXR show that, although this drug is capable of inhibiting damage induced by DXR, it did little to alter the recombinogenic profile of DXR, which reinforces the possibility that the reduction in the frequency of mutant spots, in this case, is directly related to the apoptotic activity of atorvastatin. The apoptotic effect of atorvastatin on lymphoblasts and human myeloma cells has already been reported by Cafforio et al. (2005). The authors confirmed that the apoptotic circuit induced by atorvastatin in the cell lines was presumably regulated by the proteins Ras and Rho and that the apoptotic pathway was regulated by caspases. On the other hand, Costa and Nepomuceno (2006) verified a reduction of DXR recombinagenic activity in *D. melanogaster* using a cotreatment with antioxidant vitamins. According to the authors, when DXR is given in cotreatment a

desmutagenic effect may occur. Desmutagens deactivate genotoxic agents either chemically or enzymatically. According to them, during simultaneous administration of DXR and multivitamin (MV), direct interactions between the components of MV and DXR or their metabolites are possible, and a desmutagenic mode of action for MV is a plausible mechanism. In our study, it is possible that statins, with their antioxidant activity, provided a desmutagenic effect, reducing the recombinagenic activity of DXR.

The results also showed that atorvastatin only presented this modulatory effect in descendants of the HB cross, which possess high levels of cytochrome P450 (CYP). According to Park et al. (2006), atorvastatin undergoes extensive first-pass metabolism at the hepatic level and the enzyme cytochrome P450 plays a fundamental role in metabolizing this drug. The main products of this transformation are o- and p-hydroxylate compounds, which possess pharmacological activity (Malinowski, 1998).

With regard to the effect rosuvastatin, the results obtained in the present study also point to the absence of any mutagenic effect and a reduction in the damage induced by DXR, although this effect was identified both in descendants of the ST cross and descendants of the HB cross, which reflects that this effect is independent of metabolic biotransformation. According to Fonseca (2005), rosuvastatin is biotransformed by the isoenzymes CYP2C9 (primarily) and CYP2C19, although the biometabolism pathways of this compound are not that important, since rosuvastatin is only partially metabolized.

A recent study conducted by Berber et al. (2014) showed that rosuvastatin presented genotoxic effects based on results obtained through the evaluation of chromosomal aberrations, micronuclei and damage to DNA (comet assay). These results should be considered, especially since they were observed in human peripheral lymphocytes. However, there are no results on the genotoxicity of rosuvastatin in other types of cells and animal models and the results obtained here reveal that under the experimental conditions rosuvastatin did not present a genotoxic effect in *D. melanogaster*.

With regard to the results obtained for the association of rosuvastatin with DXR, Kim et al. (2012) found similar responses when evaluating the long-term cardioprotective effects of rosuvastatin co-administered with DXR in rats. The

concomitant administration of rosuvastatin and DXR appeared to alleviate the cardiotoxicity induced by DXR in the hearts of rats. However, the authors did not directly evaluate which mechanisms were associated with the reduction of this cardiotoxicity.

The results obtained for the treatment with rosuvastatin in association with DXR also showed that this drug is capable of inhibiting the recombinogenic activity of DXR, something not seen in the treatment with atorvastatin. Therefore, it can be assumed that the antioxidant activity of rosuvastatin was more significant. During the simultaneous administration of DXR and rosuvastatin, direct interactions between the components of rosuvastatin and DXR or their metabolites are possible, and anti-mutagenic activity, in this case, is also a plausible mechanism.

Studies suggest the importance of the antioxidant activity associated with the use of rosuvastatin. Studies show that rosuvastatin can reverse heart diseases, like hypertension, arteriosclerosis, ischemia, congestive heart failure and miocardiopathy, by reducing reactive oxygen species. It attenuates the oxidative stress by mediating various antioxidant effects like the reduction of NADPH oxidase, decoupling endothelial nitric oxide synthase (eNOS), positively regulating enzymatic anti-oxidant defense mechanisms and inhibiting hydrogen peroxide (Schupp et al., 2008; Mahalwar and Khanna, 2013).

We cannot discard, however, the apoptotic role of this statin, which is also recognized (as with statins) and may have influenced the reduction of mutant spots. Zeybek et al. (2011) evaluated the effects of rosuvastatin in the treatment of papillary thyroid carcinoma (B-CPAP) and confirmed that the treatment with rosuvastatin led to a dose and time-dependent increase in the activity of caspase-3 and in the apoptosis index. Rosuvastatin induced autophagic changes in papillary thyroid cancer (B-CPAP) cells and caused an autophagic change in apoptosis, which suggests that this statin could be used as an alternative treatment for papillary thyroid cancer.

In summary, the present study shows that, under the experimental conditions, the synthetic statins (atorvastatin and rosuvastatin) present a modulatory effect on the genotoxicity of DXR in the somatic cells of *D. melanogaster*, where this effect, in the case of atorvastatin, is dependent on

biotransformation by the cytochrome P450 enzymatic system and, for rosuvastatin, independent of this metabolic transformation mechanism. This modulation effect appears to be associated with the apoptotic and antioxidant activities of this class of drugs. Further studies need to be conducted in order to gain a better understanding of the exact mechanisms involved in the modulating activity of the statins, to ensure safe, effective use of this class of drugs.

Conflict of interest statement

The authors declare that there are no conflicts of interest.

Acknowledgments

This study was supported by the Brazilian agencies CNPq, CAPES and FAPEMIG under the auspices of the Universidade Federal de Uberlândia (UFU) and Centro Universitário de Patos de Minas (UNIPAM).

References

- Abbas, A., Milles, J., Ramachandran, S., 2012. Rosuvastatin and atorvastatin: comparative effects on glucose metabolism in non-diabetic patients with dyslipidaemia. *Clinical Medicine Insights: Endocrinology and Diabetes* 5, 13-30.
- Abraham, S.K., 1994. Antigenotoxicity of coffee in the *Drosophila* assay for somatic mutation and recombination. *Mutagenesis* 9, 383–386.
- Andrade, H.H.R., Lehmann, M., 2003. Teste para detecção de mutação e recombinação somática em *Drosophila melanogaster*. In: Ribeiro, L.R., Salvadori, D.M.F., Marques, E.K. (Eds.), *Mutagênese ambiental*. Canoas, Ulbra, pp. 281-307.
- Arossi, G.A., Dih, R.R., Lehmann, M., Cunha, K.S., Regul, M.L., Andrade, H.H.R., 2009. In vivo genotoxicity of dental bonding agents. *Mutagenesis* 24, 169–172.
- Bardou, M., Barkun, A., Martel, M., 2010. Effect of statin therapy on colo rectal cancer. *Gut*. 59, 1572-1585.
- Berber, A. A., Celik, M., Aksoy, H., 2014. Genotoxicity evaluation of HMG CoA reductase inhibitor rosuvastatin. *Drug Chem Toxicol.* 37, 316-321.
- Bifulco, M., 2008. Therapeutic potential of statins in thyroid proliferative disease. *Nat. Clin. Pract. Endocrinol. Metab.* 4, 242–243.
- Bonetti, P.O., Lerman, L.O., Napoli, C., Lerman, A., 2003. Statin effects beyond lipid lowering- are they clinically relevant? *Eur. Heart. J.* 24, 225–248.
- Cafforio, P., Dammacco, F., Gernone, A., Silvestris, F., 2005. Statins activate the mitochondrial pathway of apoptosis in human lymphoblasts and myeloma cells. *Carcinogenesis* 26, 883-891.
- Campo, V.L., Carvalho, I., 2007. Estatinas hipolipêmicas e novas tendências terapêuticas. *Química Nova* 30, 01-14.
- Carmona, E.R., Creus, A., Marcos, R., 2011. Genotoxicity testing of two lead-compounds in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. *Mutat. Res.* 724, 35-40.
- Chagas, A.C.P., Galvão, T.F.G., 2004. Novas evidências no tratamento das dislipidemias. Há justificativas para uma nova estatina? *Rev. Bras. Medicina* 61, 676-681.
- Chan, K.K., Oza, A.M., Siu, L.L., 2003. The statins as anticâncer agents. *Clin. Cancer Res.*, 9, 10–19.

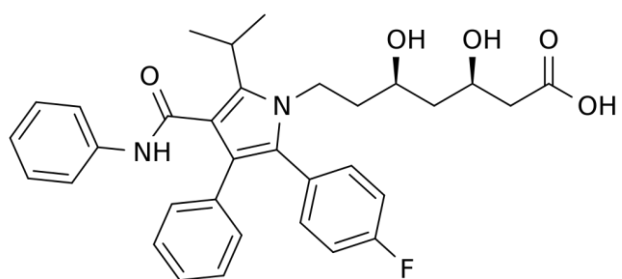
- Cheng-Lai, A., 2003. Rosuvastatin: a new HMG-CoA reductase inhibitor for the treatment of hypercholesterolemia. *Heart Dis.* 5, 72-78.
- Ciaravino V., Kropko, M. L., Rothwell, C. E., Hovey, C.A., Theiss, J. C., 1995. The genotoxicity profile of atorvastatin, a new drug in the treatment of hypercholesterolemia. *Mutat Res.* 343, 95-107.
- Costa, W.F., Nepomuceno, J.C., 2006. Protective effects of a mixture of antioxidant vitamins and mineral on the genotoxicity of doxorubicin in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. *Environ. Mol. Mutagen.* 47, 18–24.
- Demierre, M.F., Higgins, P.D., Gruber, S.B., Hawk, E., Lippman, S.M., 2005. Statins and cancer prevention. *Nat. Rev. Cancer* 5, 930-942.
- Demir, E., Turna, F., Kaya, B., Creus, A., Marcos, R., 2013. Mutagenic/recombinogenic effects of four lipid peroxidation products in *Drosophila*. *Food Chem. Toxicology* 53, 221-227.
- Deshpande, G., Schedl, P., 2005. HMGCoA reductase potentiates hedgehog signaling in *Drosophila melanogaster*. *Dev. Cell* 9, 629–638.
- Dias, C.D., Araújo, B.C., Dutra, E.S., Nepomuceno, J.C., 2009. Protective effects of β -carotene against the genotoxicity of doxorubicin in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. *Genet. Mol. Res.* 8, 1367-1375.
- El-Moselhy, M.A., El-Sheikh, A.A., 2014. Protective mechanisms of atorvastatin against doxorubicin-induced hepato-renal toxicity. *Biomed Pharmacother.* 68, 101-110.
- Fonseca, F.A.H., 2005. Farmacocinética das estatinas. *Arq. Bras. Cardiol.* 85, 09-14.
- Frei, H., Würgler, F.E., 1988. Statistical methods to decide whether mutagenicity test data from *Drosophila* assay indicate a positive, negative or inconclusive result. *Mutat. Res.* 203, 297–308.
- Frei, H., Würgler, F.E., 1995. Optimal experimental design and sample size for the statistical evaluation of data from somatic mutation and recombination test (SMART) in *Drosophila*. *Mutat. Res.* 334, 247–258.
- Gertler, F.B., Chiu, C.Y., Richter-Mann, L., Chin, D. J., 1988. Developmental and metabolic regulation of the *Drosophila melanogaster* 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl Coenzyme A Reductase. *Mol. Cell. Biol.* 8, 2713-2721.
- Graf, U., Abraham, S.K., Guzmán-Rincón, J., Würgler, F.E., 1998. Antigenotoxicity studies in *Drosophila melanogaster*. *Mutat. Res.* 402, 203–209.

- Graf, U., Frei, H., Kägi, A., Katz, A.J., Würigler, F.E., 1989. Thirty compounds tested in the *Drosophila* wing spot test. *Mutat. Res.* 222, 359–373.
- Graf, U., Van Schaik, N., 1992. Improved high bioactivation cross for the wing somatic and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Mutat. Res.* 271, 59–67.
- Graf, U., Würigler, F.E., Katz, A.J., Frei, H., Juon, H., Hall, C.B., Kale, P.G., 1984. Somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Environ. Mutagen.* 6, 153–188.
- Guzmán-Ricon, J., Graf, U., 1995. Biomonitoring and Biomarkers as Indicators of Environmental Change. Plenum Press, New York, pp. 169–181.
- Hindler, K., Eltischig, H.K., Fox, A.A., Body, S.C., Shernan, S.K., Collard, C.D., 2006. Influence of statins on perioperative outcomes. *J. Cardiothorac. Vasc. Anesth.* 20, 251–258.
- Islaih, M., Halstead, B.W., Kadura, I.A., Li, B., Reid-Hubbard, J.L., Flick, L., Altizer, J.L., Thom Deahl, J., Monteith, D.K., Newton, R.K., Watson, D.E., 2005. Relationships between genomic, cell cycle, and mutagenic responses of TK6 cells exposed to DNA damaging chemicals. *Mutat. Res.* 578, 100–116.
- Istvan, E.S., Deisenhofer, J., 2001. Structural mechanism for statin inhibition of HMG-CoA reductase. *Science* 292, 1160–1164.
- John, S., Schneider, M.P., Delles, C., Jacobi, J., Schmieder, R.E., 2005. Lipid-independent effects of statins on endothelial function and bioavailability of nitric oxide in hypercholesterolemic patients. *Am. Heart J.* 149, 473.
- Kastenbaum, M.A., Bowman, K.O., 1970. Tables for determining the statistical significance of mutation frequencies. *Mutat. Res.* 9, 527–549.
- Kawata, S., Yamasaki, E., Nagase, T., Inui, Y., Ito, N., Matsuda, Y., Inada, M., Tamura, S., Noda, S., Imai, Y., Matsuzawa, Y., 2001. Effect of pravastatin on survival in patients with advanced hepatocellular carcinoma. A randomized controlled trial. *Br. J. Cancer* 84, 886–891.
- Kim, Y.H., Park, S.M., Kim, M., Kim, S.H., Lim, S.Y., Ahn, J.C., Song, W.H., Shim, W.J., 2012. Cardioprotective effects of rosuvastatin and carvedilol on delayed cardiotoxicity of doxorubicin in rats. *Toxicol. Mech. Methods.* 22, 488–498.
- Kusama, T., Mukai, M., Iwasaki, T., Tatsuta, M., Matsumoto, Y., Akedo, H., Inoue, M., Nakamura, H., 2002. 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase inhibitors reduce human pancreatic cancer cell invasion and metastasis. *Gastroenterology* 122, 308–317.

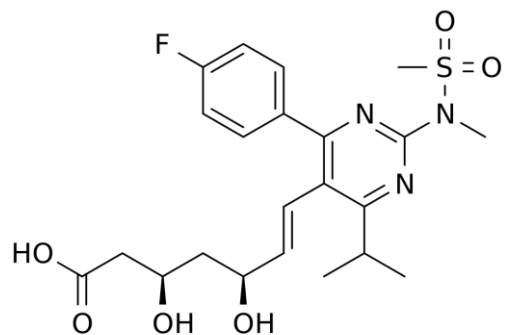
- Lara, M.C., Espinoza, J.A.M., 2011. Cytotoxic evaluation of fluvastatin and rosuvastatin and effect of fluvastatin in the hela cell cycle. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology* 5, 189-193.
- Lehmann, M., Franco, A., Vilar, K.S.P., Reguly, M.L., Andrade, H.H.R., 2003. Doxorubicin and two of its analogues are preferential inducers of homologous recombination compared with mutational events in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. *Mutat. Res.* 539, 167-175.
- Ma, S., Ma, C.C., 2011. Recent development in pleiotropic effects of statins on cardiovascular disease through regulation of transforming growth factor-beta superfamily. *Cytokine Growth Factor Rev.* 22, 167–175.
- Mahalwar, R., Khanna, D., 2013. Pleiotropic antioxidant potential of rosuvastatina in preventing cardiovascular disorders. *Eur. J. Pharmacol.*, 711:57–62.
- Malinowski, J.M., 1998. Atorvastatin: a hydroxymethylglutaryl- coenzymeA reductase inhibitor. *Am. J. Health Syst. Pharm.* 55, 2253-226.
- McKenney, J.M. , 2005. Efficacy and safety of rosuvastatin in treatment of dyslipidemia. *Am J Health Syst Pharm.* 62, 1033-1047.
- McTaggart, F., Jones, P., 2008. Effects of statins on high-density lipoproteins: a potential contribution to cardiovascular benefit. *Cardiovasc. Drugs Ther.* 22, 321–338.
- Mennickent S.C., Bravo, M.D., Calvo, C.M., Avello, M.L., 2008. Efectos pleiotrópicos de las estatinas. *Rev. med. Chile* 136, 775-782.
- Miida, T., Hirayama, S., Nakamura, Y., 2004. Cholesterol-independent effects of statins and new therapeutic targets: ischemic stroke and dementia. *J. Atheroscl. Thromb.* 11, 253-264.
- Narapusetti, A., Bethanabhatla, S., Sockalingam, S. A., Repaka, N., Saritha, V., 2014. Simultaneous determination of rosuvastatin and amlodipine in human plasma using tandem mass spectrometry: Application to disposition kinetics. *Journal of Advanced Research*. Article in Press.
- Navarro, R., Busnadiego, I., Ruiz-Larrea, M. B., Ruiz-Sanz, J.I., 2006. Superoxide anions are involved in doxorubicin-induced ERK activation in hepatocyte cultures. *Ann. NY Acad. Sci.* 1090, 419–428.
- Orsolin, P.C., Silva-Oliveira, R.G., Nepomuceno, J.C., 2012. Assessment of the mutagenic, recombinagenic and carcinogenic potential of orlistat in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. *Food Chem. Toxicology* 50, 2598-2604.

- Park, J.E., Kim, K.B., Bae, S.K., Moon, B.S., Liu, K.H., Shin, J.G., 2008. Contribution of cytochrome P450 3A4 and 3A5 to the metabolism of atorvastatin. *Xenobiotica* 38, 1240-1251.
- Partani, P., Verma, S. M., Gurule, S., Khuroo, A., Monif, T., 2014. Simultaneous quantitation of atorvastatin and its two active metabolites in human plasma by liquid chromatography/(-) electrospray tandem mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical Analysis* 4, 26-36.
- Ramanjaneyulu, S. V., Trivedi, P.P., Kushwaha, S., Vikram, A., Jena, G. B., 2013. Protective role of atorvastatin against doxorubicin-induced cardiotoxicity and testicular toxicity in mice. *J. Physiol. Biochem.* 69, 513-525.
- Resch, U., Tatzber, F., Budinsky, A., Sinzinger, H., 2006. Reduction of oxidative stress and modulation of autoantibodies against modified low-density lipoprotein after rosuvastatin therapy. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 63, 262-274.
- Rezende, A. A. de, Graf, U., Guterres, Z. R., Kerr, W.E., Spanó, M.A., 2009. Protective effects of proanthocyanidins of grape (*Vitisvinifera* L.) seeds on DNA damage induced by Doxorubicin in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. *Food Chem. Toxicology* 47, 1466-1472.
- Rezende, A.A.de; Silva, M.L.A., Tavares, D.C., Cunha, W.R., Rezende, K.C.S., Bastos, J.K., Lehmann, M., Andrade, H.H.R. de, Guterres, Z.R., Silva, L.P., Spanó, M.A., 2011. The effect of the dibenzylbutyrolactoliclignan (-)-cubebin on doxorubicin mutagenicity and recombinogenicity in wing somatic cells of *Drosophila melanogaster*. *Food Chem. Toxicology* 49, 1235–124.
- Schachter, M., 2005. Chemical, pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of statins: an update. *Fundam. Clin. Pharmacol.* 19, 117-125.
- Schupp, N., Schmid, U., Heidland, A., Stopper, H., 2008. Rosuvastatin protects against oxidative stress and DNA damage in vitro via upregulation of glutathione synthesis. *Atherosclerosis* 199, 278–287.
- Schwartz, G.G., Bolognese, M.A., Tremblay, B.P., Caplan, R., Hutchinson, H., Raza, A., Cressman, M., 2004. Efficacy and safety of rosuvastatin and atorvastatin in patients with hypercholesterolemia and a high risk of coronary heart disease: a randomized, controlled trial. *Am. Heart J.* 148, e4.
- Shah, Y., Iqbal, Z., Ahmad, L., Khan, A., Khan, M. I., Nazir, S., Nasir, F., 2011. Simultaneous determination of rosuvastatin and atorvastatin in human serum using RP-HPLC/UV detection: method development, validation and optimization of various experimental parameters. *J Chromatogr.B Analyt.Technol. Biomed. Life Sci.* 15, 557-563.

- Shirai, H., Autieri, M., Eguchi, S., 2007. Small GTP-binding proteins and mitogen-activated protein kinases as promising therapeutic targets of vascular remodeling. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* 16, 111-115.
- Shishehbor, M.H., Brennan, M.L., Aviles, R.J., Fu, X., Penn, M.S., Sprecher, D.L., Hazen, S. L., 2003. Statins promote potent systemic antioxidant effects through specific inflammatory pathways. *Circulation*. 108, 426-431.
- Spindler, S.R., Li, R., Dhahbi, J.M., Yamakawa, A., Mote, P., Bodmer, R., Ocorr, K., Williams, R.T, Wang, Y., Ablao, K.P., 2012. Statin treatment increases lifespan and improves cardiac health in *Drosophila* by decreasing specific protein prenylation. *PLoS One* 7, e39581.
- Tallaj, J.A., Franco, V., Rayburn, B.K., Pinderski, L., Benza, R.L., Pamboukian, S., Foley B., Bourge, R.C., 2005. Response of doxorubicin-induced cardiomyopathy to the current management strategy of heart failure. *J. Heart Lung Transplant.* 24, 2196-2201.
- Weitz-Schmidt, G., Welzenbach, K., Brinkmann, V., Kamata, T., Kallen, J., Bruns, C., Cottens, S., Takada, Y., Hommel, U., 2001. Statins selectively inhibit leukocyte function antigen-1 by binding to a novel regulatory integrin site. *Nat. Med.* 7, 687-692.
- Yanae, M., Tsubaki, M., Satou, T., Itoh, T., Imano, M., Yamazoe, Y., Nishida, S., 2011. Statin induced apoptosis via the suppression of ERK1/2 and Akt activation by inhibition of the geranylgeranyl-pyrophosphate biosynthesis in glioblastoma. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* 30, 74-82.
- Yildirim, A., Muderrisoglu, H., 2004. Non-lipid effects of statins: emerging new indications. *Curr. Vasc. Pharmacol.* 2, 309-318.
- Zeybek, N. D., Gulcelik, N.E., Kaymaz, F.F., Sarisozen, C., Vural, I., Bodur, E., Canpinar, H., Usman, A., Asan, E., 2011. Rosuvastatin induces apoptosis in cultured human papillary thyroid cancer cells. *J. Endocrinol.* 210, 105–115.
- Zhang, W., Wu, J., Zhou, L., Xie, H., Zheng, S., 2010. Fluvastatin, a lipophilic statin, induces apoptosis in human hepatocellular carcinoma cells through mitochondria-operated pathway. *Indian. J. Exp. Biol.* 48, 1167-1174.
- Zhou, Q., Liao, J., 2010. Pleiotropic effects of statins - Basis cresearch and clinical perspectives, *Circulation Journal*, 74, n.5, 818-826.



A



B

Figure 1. Chemical structures of atorvastatin (A) and rosuvastatin (B).

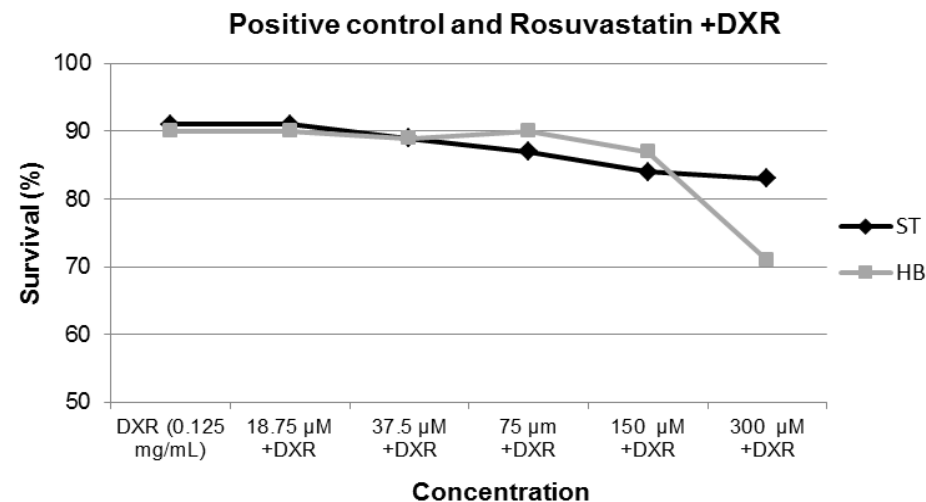
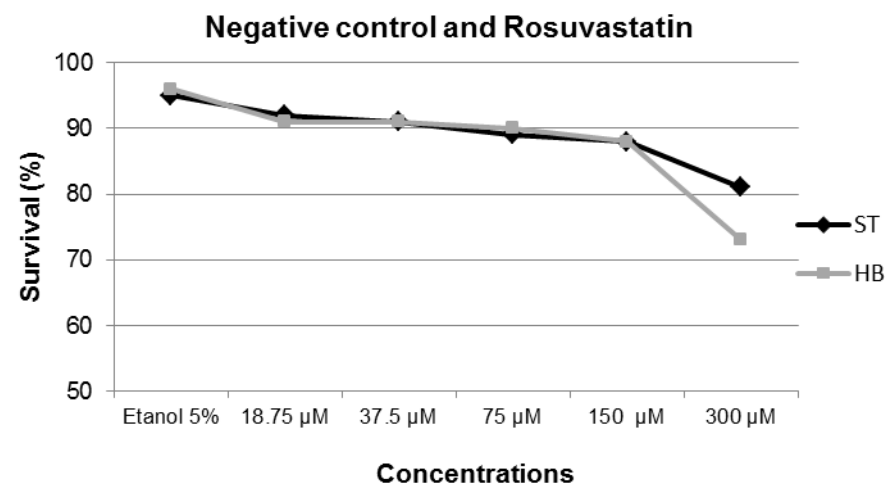
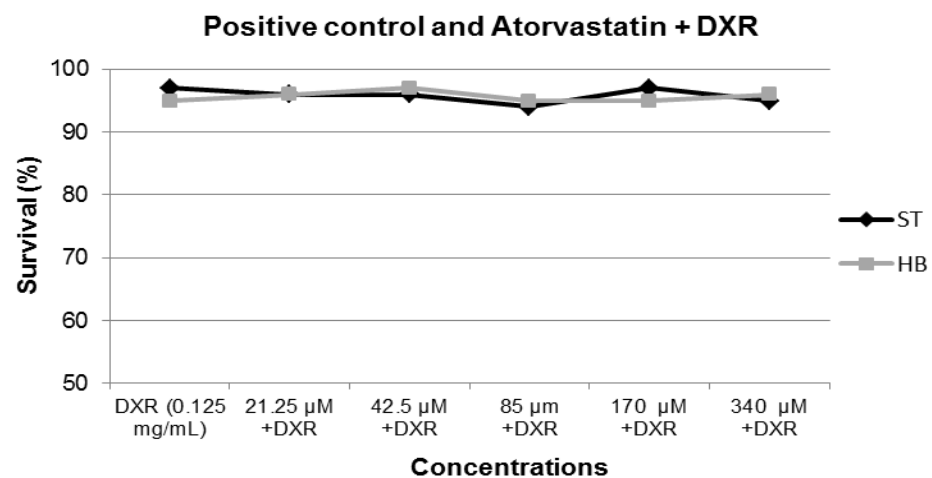
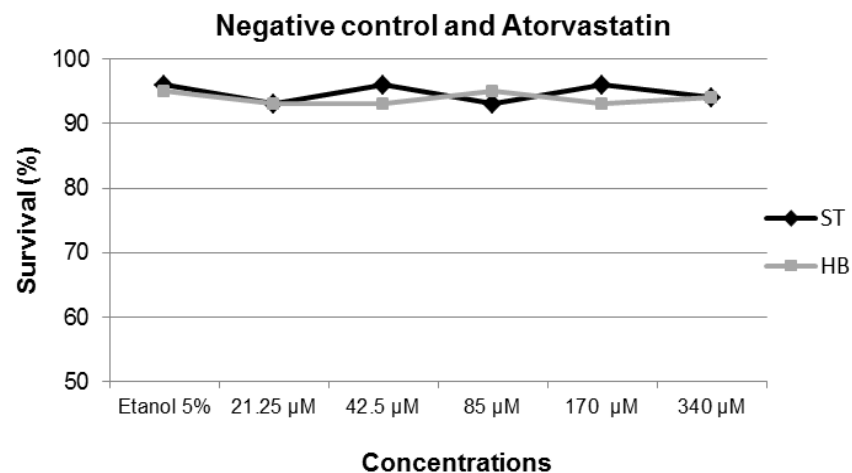


Figure 2. Percentage of survival of flies evaluated after metamorphosis from third-stage larvae (72h) treated with different concentrations of atorvastatin and rosuvastatin alone and in combination with DXR.

Table 1. Summary of results obtained in the marked trans-heterozygous descendants (MH) and balancer-heterozygous (BH) of *Drosophila melanogaster* derived from the standard cross (ST) and the high bioactivation cross (HB) treated with different atorvastatin concentrations (separately and in combination with DXR), positive control (DXR 0.125 mg/mL) and negative control (5% ethanol).

Treatments			Spots per fly (N ⁰ of spots); statistical diagnosis ^a								Frequency of clone formation/ 10 ⁵ cells per cell division ^d				Recombination (%)	Inhibition ^e (%)	
DXR (mg/mL)	Atorvastatin (μM)	Number of flies (N)	Small single (1-2 cels) ^b m=2		Large single (>2 cels) ^b m=5		Twin m=5		Total spots m=2		Spots with <i>mwh</i> clone ^c (n)	Mean clone size class ^{c,d} (l)	Observed	Control corrected			
ST																	
<i>mwh/flr</i> ³																	
0	0	60	0.63	(38)	0.08	(05)	0.05	(03)	0.77	(46)	42	1.81		1.43			
0	21.25	60	0.65	(39)-	0.02	(01)-	0.03	(02) i	0.70	(42)-	39	1.54	{5.33}	1.33	-0.10		
0	42.5	60	0.78	(47)-	0.10	(06) i	0.00	(00)-	0.88	(53)-	48	1.71	{1.00}	1.64	0.20		
0	85	60	0.63	(38)-	0.03	(02) -	0.05	(03) i	0.72	(43)-	41	1.63	{9.00}	1.40	-0.03		
0	170	60	0.65	(39)-	0.07	(04) i	0.00	(00) i	0.72	(43)-	40	1.73	{3.50}	1.37	-0.07		
0	340	60	0.38	(23)-	0.07	(04) i	0.02	(01) i	0.47	(28)-	25	1.84	{1.76}	0.85	-0.58		
0.125	0	60	1.22	(73)+	0.27	(16)+	0.17	(10)+	1.65	(99)+	84	2.17	{2.52}	2.87	1.43		
0.125	21.25	60	0.63	(38)*	0.37	(22) i	0.30	(18) i	1.30	(78)-	75	3.07	{4.67}	2.56	1.13		
0.125	42.5	60	0.62	(37)*	0.53	(32)*	0.20	(12) i	1.35	(81)-	77	3.08	{4.60}	2.63	1.20		
0.125	85	60	0.42	(25)*	0.50	(30)*	0.40	(24)*	1.32	(79)-	75	3.51	{5.67}	2.56	1.13		
0.125	170	60	0.83	(50)*	0.20	(12) i	0.27	(16) i	1.30	(78)-	76	2.17	{2.62}	2.60	1.16		
0.125	340	60	1.05	(63)-	0.40	(24) i	0.20	(12) i	1.65	(99)-	95	2.49	{3.04}	3.24	1.81		
HB																	
<i>mwh/flr</i> ³																	
0	0	60	1.10	(66)	0.08	(05)	0.03	(02)	1.22	(73)	73	1.63		2.49			
0	21.25	60	1.12	(67)-	0.12	(07) i	0.03	(02) i	1.27	(76)-	76	1.66	{2.33}	2.60	0.10		
0	42.5	60	1.23	(74)-	0.13	(08) i	0.05	(03) i	1.42	(85)-	85	1.71	{2.17}	2.90	0.41		
0	85	60	0.82	(49)-	0.07	(04) i	0.02	(01) i	0.90	(54)-	54	1.63	{1.63}	1.84	-0.65		
0	170	60	1.02	(61)-	0.08	(05) i	0.00	(00) i	1.10	(66)-	65	1.58	{2.00}	2.22	-0.27		
0	340	60	1.03	(62)-	0.07	(04) i	0.00	(00) i	1.10	(66)-	66	1.44	{3.43}	2.25	-0.24		
0.125	0	60	2.20	(132)+	0.43	(26)+	0.05	(03) i	2.68	(161) +	158	2.00	{2.32}	5.40	2.90	58.33	
0.125	21.25	60	1.37	(82)*	0.43	(26)-	0.03	(02) i	1.83	(110) *	108	2.31	{3.74}	3.69	1.20	58.27	58.62
0.125	42.5	60	1.53	(92)*	0.22	(13)+	0.05	(03) i	1.80	(108) *	107	1.90	{2.47}	3.65	1.16	55.07	60.00
0.125	85	60	1.35	(81)*	0.37	(22)-	0.07	(04) i	1.78	(107) *	105	2.22	{3.56}	3.59	1.09	51.53	62.41
0.125	170	60	1.52	(91)*	0.30	(18) i	0.03	(02) i	1.85	(111) *	110	1.99	{2.70}	3.76	1.26	42.82	56.55

0.125	340	60	1.02	(61)*	0.33	(20) i	0.15	(09) i	1.50	(90) *	89	2.37	{5.75}	3.04	0.55	49.34	81.03
<i>mwh/TM3</i>																	
0	0	20	0.45	(09)	0.00	(00)			0.45	(09)	9	1.22		0.92			
0.125	0	20	1.05	(21)+	0.05	(01)i	f		1.10	(22)+	22	1.36	{1.46}	2.25	1.33		
0.125	21.25	20	0.75	(15)i	0.00	(00)i			0.75	(15)i	15	1.00	{0.67}	1.54	0.61		
0.125	42.5	20	0.80	(16)i	0.00	(00)i			0.80	(16)i	16	1.13	{1.00}	1.64	0.72		
0.125	85	20	0.85	(17)i	0.00	(00)i			0.85	(17)i	17	1.18	{1.13}	1.74	0.82		
0.125	170	20	1.05	(21)-	0.00	(00)i			1.05	(21)-	21	1.24	{1.25}	2.15	1.23		
0.125	340	20	0.75	(15)i	0.00	(00)i			0.75	(15)i	15	1.27	{1.33}	1.54	0.61		

Marker-trans-heterozygous flies (*mwh/flr³*) and balancer-heterozygous flies (*mwh/TM3*) were evaluated.

* $p \leq 0.05$ vs. DXR only.

^a Statistical diagnoses according to Frei and Würzler (1995). U-test, two sided; probability levels: -, negative; +, positive; i, inconclusive; $p \leq 0.05$ vs. negative control (5% ethanol).

^b Including rare single *flr³* spots.

^c Considering the *mwh* clones for the single spots and *mwh* for the twin spots.

^d Frequency of clone formation: clones/flies/48,800 cells (without size correction).

^e Calculated as [(DXR alone – Statin + DXR / DXR alone) $\times$ 100], according to Abraham (1994).

^f Balancer chromosome TM3 does not carry the *flr³* mutation and recombination is suppressed, due to the multiple inverted regions in these chromosomes.

Table 2. Summary of results obtained in the marked trans-heterozygous descendants (MH) and balancer-heterozygous (BH) of *Drosophila melanogaster* derived from the standard cross (ST) and the high bioactivation cross (HB) treated with different rosuvastatin concentrations (separately and in combination with DXR), positive control (DXR 0.125 mg/mL) and negative control (5% ethanol).

Treatments			Spots per fly (N ⁰ of spots); statistical diagnosis ^a								Frequency of clone formation/ 10 ⁵ cells per cell division ^d		Recombination (%)	Inhibition ^e (%)		
DXR (mg/mL)	Rosuvastatin (μM)	Number of flies (N)	Small single (1-2 céls) ^b <i>m</i> =2		Large single (>2 céls) ^b <i>m</i> =5		Twin <i>m</i> =5		Total spots <i>m</i> =2		Spots with <i>mwh</i> clone ^c (<i>n</i>)	Mean clone size class ^{c,d} (<i>i</i>)			Observed	Control corrected
ST																
<i>mhw/flr</i> ³																
0	0	60	0.83	(50)	0.03	(02)	0.03	(02)	0.90	(54)	54	1.72		1.84		
0	18.75	60	0.58	(35)-	0.03	(02) i	0.05	(03) i	0.67	(40)-	35	1.60	{1.95}	1.20	-0.65	
0	37.5	60	0.63	(38)-	0.00	(00) i	0.00	(00) i	0.63	(38)-	33	1.33	{2.33}	1.13	-0.72	
0	75	60	0.40	(24)-	0.05	(03) i	0.00	(00) i	0.45	(27)-	24	1.88	{1.60}	0.82	-1.02	
0	150	60	0.67	(40)-	0.03	(02) i	0.00	(00) i	0.70	(42)-	35	1.60	{1.95}	1.20	-0.65	
0	300	60	0.73	(44) -	0.02	(01) i	0.07	(04) i	0.82	(49)-	48	1.60	{2.67}	1.64	-0.20	
0.125	0	60	1.10	(66)+	0.45	(27)+	0.30	(18)+	1.85	(111)+	104	2.70	{3.76}	3.55	1.71	53.80
0.125	18.75	60	0.72	(43)+	0.22	(13)+	0.18	(11) i	1.12	(67)*	63	2.52	{7.33}	2.15	0.31	61.86
0.125	37.5	60	0.77	(46)+	0.27	(16) i	0.17	(10) i	1.20	(72) *	78	2.84	{6.63}	2.39	0.55	40.17
0.125	75	60	0.70	(42)+	0.28	(17) i	0.13	(08)+	1.12	(67)*	63	2.81	{9.33}	2.15	0.31	52.56
0.125	150	60	0.85	(51) -	0.18	(11)+	0.07	(04)+	1.10	(66)*	64	1.98	{3.40}	2.19	0.34	62.56
0.125	300	60	0.60	(36)+	0.20	(12)+	0.20	(12) i	1.00	(60)*	59	2.51	{11.00}	2.02	0.17	44.06
<i>mwh/TM3</i>																
0	0	20	0.35	(07)	0.00	(00)			0.35	(07)	07	1.29		0.72		
0.125	0	20	0.70	(14)i	0.10	(02)i		f	0.80	(16)+	16	1.31	{1.33}	1.64	0.92	
0.125	18.75	20	0.40	(08)i	0.00	(00)i			0.40	(08)i	8	1.50	{3.00}	0.82	0.10	
0.125	37.5	20	0.70	(14)i	0.00	(00)i			0.70	(14)i	14	1.07	{0.86}	1.43	0.72	
0.125	75	20	0.50	(10)i	0.00	(00)i			0.50	(10)i	10	1.30	{1.33}	1.02	0.31	
0.125	150	20	0.40	(08)i	0.00	(00)i			0.40	(08)i	08	1.13	{0.00}	0.82	0.10	
0.125	300	20	0.55	(11)i	0.00	(00)i			0.55	(11)i	11	1.36	{1.50}	1.13	0.41	
HB																
<i>mwh/flr</i> ³																
0	0	60	0.97	(58)	0.07	(04)	0.02	(01)	1.05	(63)	62	1.56		2.12		
0	18.75	60	0.82	(49)-	0.02	(01)-	0.00	(00) i	0.83	(50)-	50	1.46	{2.00}	1.71	-0.41	
0	37.5	60	0.95	(57)-	0.12	(07) i	0.02	(01) i	1.08	(65)-	64	1.80	{9.00}	2.19	0.07	

0	75	60	1.05	(63)-	0.12	(07) i	0.03	(02) i	1.20	(72)-	69	1.71	{3.00}	2.36	0.24		
0	150	60	1.02	(61)-	0.05	(03) i	0.02	(01) i	1.08	(65)-	65	1.52	{0.67}	2.22	0.10		
0	300	60	1.03	(62)-	0.05	(03) i	0.00	(00) i	1.08	(65)-	60	1.55	{2.00}	2.05	-0.07		
0.125	0	60	2.23	(134)+	0.27	(16)+	0.15	(09)+	2.65	(159)+	156	1.87	{2.07}	5.33	3.21	53.85	
0.125	18.75	60	1.27	(76)*	0.30	(18) i	0.05	(03) i	1.62	(97)*	91	2.04	{3.07}	3.11	0.99	37.30	69.16
0.125	37.5	60	1.02	(61)*	0.28	(17) i	0.07	(04) i	1.37	(82)*	80	2.08	{3.83}	2.73	0.61	32.60	81.00
0.125	75	60	1.10	(66)*	0.32	(19) i	0.08	(05) i	1.50	(90)*	87	2.29	{4.08}	2.97	0.85	44.78	73.52
0.125	150	60	1.12	(67)*	0.48	(29)*	0.17	(10) i	1.77	(106)*	104	2.59	{4.10}	3.55	1.43	36.62	55.45
0.125	300	60	1.33	(80)*	0.22	(13) i	0.07	(04) i	1.62	(97)*	94	1.77	{2.16}	3.21	1.09	7.48	66.04
<i>mwh/TM3</i>																	
0	0	20	0.60	(12)	0.05	(01)			0.65	(13)	13	1.54		1.33			
0.125	0	20	1.15	(23)+	0.05	(01)i			1.20	(24)+	24	1.21	{0.82}	2.46	1.13		
0.125	18.75	20	0.90	(18)i	0.05	(01)i	f		0.95	(19)i	19	1.32	{0.83}	1.95	0.61		
0.125	37.5	20	0.70	(14)i	0.20	(04)i			0.90	(18)i	18	1.89	{2.80}	1.84	0.51		
0.125	75	20	0.70	(14)i	0.10	(02)i			0.80	(16)i	16	1.44	{1.00}	1.64	0.31		
0.125	150	20	1.10	(22)-	0.00	(00)i			1.10	(22)-	22	1.27	{0.89}	2.25	0.92		
0.125	300	20	1.40	(28)i	0.05	(01)i			1.45	(29)-	29	1.24	{1.00}	2.97	1.64		

Marker-trans-heterozygous flies (*mwh/flr³*) and balancer-heterozygous flies (*mwh/TM3*) were evaluated.

* $p \leq 0.05$ vs. DXR only.

^a Statistical diagnoses according to Frei and Würzler (1995). U-test, two sided; probability levels: -, negative; +, positive; i, inconclusive; $p \leq 0.05$ vs. negative control (5% ethanol).

^b Including rare single *flr³* spots.

^c Considering the *mwh* clones for the single spots and *mwh* for the twin spots.

^d Frequency of clone formation: clones/fly/48,800 cells (without size correction).

^e Calculated as [(DXR alone – Statin + DXR / DXR alone) × 100], according to Abraham (1994).

^f Balancer chromosome TM3 does not carry the *flr³* mutation and recombination is suppressed, due to the multiple inverted regions in these chromosomes.

CAPÍTULO III

**Efeito modulador da sinvastatina sobre danos ao
DNA induzidos pela doxorrubicina em células
somáticas de *Drosophila melanogaster***

**Efeito modulador da sinvastatina sobre danos ao DNA induzidos
pela doxorrubicina em células somáticas de *Drosophila
melanogaster***

P.C. Orsolin^a, R.G. Silva-Oliveira^a; J.C. Nepomuceno^{a,b*}

^a *Universidade Federal de Uberlândia, Instituto de Genética e Bioquímica, Bloco 2E, Campus Umuarama, Uberlândia, Minas Gerais, Brazil*

^b *Centro Universitário de Patos de Minas, Laboratório de Citogenética e Mutagênese, Patos de Minas, Minas Gerais, Brazil*

Resumo

A sinvastatina é um fármaco antilipêmico que promove inibição da HMG-CoA redutase, enzima essencial na via de biossíntese do colesterol. Além de inibir a síntese do colesterol, a sinvastatina pode atuar inibindo a formação de outros produtos, como os isoprenoides, o que confere a essa droga benefícios adicionais, dentre os quais, efeitos antiproliferativos, anti-invasivos e pró-apoptóticos. O presente trabalho foi desenvolvido com o objetivo de avaliar o efeito mutagênico/recombinogênico da sinvastatina, bem como os possíveis efeitos moduladores dessa estatina sobre danos ao DNA induzidos pela doxorrubicina (DXR), um fármaco antitumoral, que promove intercalação com a molécula de DNA e produz radicais livres. Tal análise foi realizada por meio do teste para detecção de mutação e recombinação somática (SMART), em *Drosophila melanogaster*. Para isso, larvas descendentes dos cruzamentos padrão (ST) e de alta bioativação (HB) foram tratadas cronicamente com cinco concentrações de sinvastatina, isoladamente e em associação com a DXR. Os resultados revelaram ausência de efeito mutagênico/recombinogênico da sinvastatina em todas as concentrações testadas, nos descendentes dos cruzamentos ST e HB. Foi observado, também, efeito modulador da sinvastatina sobre danos ao DNA induzidos pela DXR. A redução na frequência total de manchas mutantes foi verificada nos descendentes de ambos os cruzamentos, porém, a inibição foi mais eficaz nos descendentes do cruzamento padrão (ST), que apresentam níveis basais de citocromo P450. Acredita-se que esse efeito modulador esteja associado principalmente a atividade antioxidante dessa classe de drogas, embora tal parâmetro não tenha sido diretamente avaliado nessa pesquisa.

Palavras-chave: Sinvastatina. Doxorrubicina. Efeito modulador. *Drosophila melanogaster*.

1. Introdução

A sinvastatina é um fármaco antilipêmico, da classe das estatinas, que atua na redução dos níveis de colesterol plasmático e, conseqüentemente, na redução do risco de aterosclerose e infarto do miocárdio (Sparrow et al., 2001; Tang et al., 2006). As estatinas foram primeiramente derivadas do fungo *Penicillium citrinum* e seu mecanismo de ação consiste na inibição da 3-hidróxi-3-metilglutaril-coenzima A redutase (HMG-CoA redutase), enzima presente no retículo endoplasmático celular, responsável pela conversão do HMG-CoA a mevalonato, na via de biossíntese do colesterol (Hindler et al., 2006; Saito et al., 2008). O ponto principal de limitação e controle no metabolismo intracelular do colesterol dá-se justamente nessa fase, sendo largamente influenciado pelo grau de atividade da referida enzima (Marie et al., 2008). A inibição da HMG-CoA redutase promove redução dos níveis de colesterol LDL, através de dois mecanismos principais: redução da síntese endógena de colesterol e, simultaneamente, aumento da síntese de receptores para o colesterol LDL nas células hepáticas, o que aumenta a depuração do mesmo (Fonseca, 2005).

Existem diferenças farmacocinéticas marcantes entre as estatinas atualmente disponíveis no mercado, incluindo variações no coeficiente de hidrofiliabilidade, via hepática de metabolização, tempo de meia-vida plasmática e eficácia na redução do perfil lipídico. As estatinas também diferem na capacidade de interação com outras drogas que empregam a mesma via de metabolização (Fonseca, 2005; Schachter, 2005). Nesse contexto, embora todas as estatinas possuam o mesmo mecanismo de ação, existem diferenças quanto à eficácia das respostas observadas para cada estatina individualmente.

Com relação à estrutura química, as estatinas possuem um anel de lactona aberto ou fechado (que confere uma semelhança estrutural com a HMG-CoA), constituindo a porção ativa dessa classe de drogas. A sinvastatina, especificamente, possui um anel de lactona fechado, sendo considerada um pró-fármaco, ativado *in vivo*, mediante reação química ou enzimática (Campo e Carvalho, 2007; Banzato, 2013). Nesse processo de metabolização, a forma de lactona é convertida na forma ativa hidroxíácido (Chan et al., 2003; Marinho et al.,

2012). A sinvastatina é derivada do 2'-metilado da lovastatina, um composto proveniente do primeiro produto isolado dos fungos, a compactina, sendo, por isso, considerada uma estatina semissintética (Levinski e Brown, 2007).

Além da ação principal de inibição da síntese do mevalonato, com consequente redução nos níveis de colesterol, a sinvastatina também pode atuar inibindo a formação de outros produtos, como os isoprenoides (Demierre et al., 2005), incluindo os grupos farnesil e geranilgeranil, que se ligam a várias proteínas (superfamília Ras/Rho) por meio de prenilação, durante o processo pós-traducional (Edwards e Ericsson, 1999; Yamashita et al., 2008), o que confere a essa droga benefícios adicionais (pleiotrópicos). Tais benefícios incluem efeitos antiproliferativos, anti-invasivos e pró-apoptóticos (Colisson et al., 2002; Liao, 2002; Chan et al., 2003; Sleijfer et al., 2005). A ação antioxidante das estatinas também já foi relatada em estudos anteriores (Shishehbor et al., 2003; Mennickent et al., 2008).

O amplo conhecimento acerca da genética da *Drosophila melanogaster* e a longa experiência experimental com esse organismo fez com ele se tornasse de utilidade única em pesquisas na área de mutação genética e toxicologia (Sarıkaya e Memmi, 2013). O SMART (Somatic mutation and recombination test), realizado em *D. melanogaster*, é um sistema teste somático, de curta duração, empregado para detecção de substâncias capazes de promover alterações no DNA sendo, também, muito utilizado para detecção de substâncias antimutagênicas/antirecombinogênicas (Graf e Singer, 1992; Graf et al., 1998). Esse bioensaio baseia-se na premissa de que, durante o desenvolvimento embrionário da *D. melanogaster*, grupos de células se proliferam mitoticamente até se diferenciarem em estruturas do corpo da mosca adulta. Se ocorrerem alterações genéticas nas células do disco imaginal, um clone de células mutantes será formado, sendo detectado como uma mancha de pelos mutantes nas asas da mosca adulta (Guzman-Ricón e Graf, 1995). A análise dessas alterações genéticas determina a expressão fenotípica dos genes marcadores *mhw* ou *flr*³, responsáveis por mudanças na forma dos tricomas (Graf et al., 1984).

Considerando o exposto, o presente trabalho foi desenvolvido com o objetivo principal de avaliar, por meio do teste SMART, o efeito mutagênico/recombinogênico da sinvastatina, isoladamente, bem como os possíveis efeitos moduladores dessa estatina sobre danos ao DNA induzidos pela

doxorubicina (DXR). A DXR é um fármaco antitumoral da classe das antraciclinas, que promove intercalação com a molécula de DNA e inibição da topoisomerase II (Islaih et al., 2005), além de produzir radicais livres (Nascimento e Martins, 2005; Kaiserová et al., 2006).

2. Material e Métodos

2.1 Agentes químicos

A substância testada foi a sinvastatina (Sinvastacor[®]), CAS 79902-63-9, lote CV6653, fórmula molecular $C_{25}H_{38}O_5$, massa molecular 418,57 g/mol, produzida pela Sandoz do Brasil Indústria Farmacêutica, Cambé, Paraná. Cinco concentrações de sinvastatina foram preparadas para realização do experimento: 12,5; 25; 50; 100 e 200 μ M. A estrutura química do fármaco testado está apresentada na Figura 1.

Doxorrubicina (Adriblastina[®], CAS 25316-40-9, lote 3PL0341, registrada, importada e distribuída pelo laboratório Pfizer, Guarulhos, São Paulo) foi utilizada como controle positivo. A doxorubicina possui fórmula molecular $C_{27}H_{29}NO_{11}\cdot HCl$, peso molecular de 580 g/mol e foi utilizada na concentração de 0,125 mg/mL. O controle negativo empregado como referência e para diluição das demais substâncias foi o etanol 5%. Todas as diluições foram preparadas imediatamente antes da utilização.

2.2 Somatic Mutation and Recombination Test (SMART) em *Drosophila melanogaster*

2.2.1 Linhagens estoque e cruzamentos

Três linhagens mutantes de *D. melanogaster* foram utilizadas: *mwh*, *flr*³ e *ORR*, portadoras dos marcadores genéticos *multiple wing hairs* (*mwh*, 3-0,3) e *flare*³ (*flr*³, 3-38,8). Informações mais detalhadas sobre os símbolos genéticos e descrições dessas linhagens podem ser encontradas em Lindsley e Zimm (1992).

Tais linhagens foram submetidas a dois esquemas de cruzamentos:

a) Cruzamento Padrão (ST), no qual fêmeas virgens *flr³/ln(3 LR)TM3, ri p^p sep I(3)89Aa bx^{34e}* e *Bd^s* foram cruzadas com machos *mwh/mwh* (Graf et al., 1989);

b) Cruzamento de Alta Capacidade de Bioativação (HB), no qual fêmeas virgens *ORR/ORR; flr³/ln(3 LR)TM3, ri p^p sep I(3)89Aa bx^{34e}* e *Bd^s* foram cruzadas com machos *mwh/mwh* (Graf e Van Schaik, 1992).

A utilização desses dois tipos de cruzamentos permite a avaliação de agentes mutagênicos e antimutagênicos de ação direta ou indireta, de acordo com o nível basal e alto de enzimas de metabolização do citocromo P450. Isso é possível porque a linhagem *ORR* (empregada no cruzamento HB) foi criada com o objetivo de aumentar o desempenho do referido teste no caso da ativação de pró-mutágenos dependentes de ativação via citocromo P450 (Andrade e Lehmann, 2003).

A partir desses cruzamentos foram obtidos dois tipos de descendentes: trans-heterozigotos marcados (MH, *mwh+/+flr³*), que apresentam asas com a borda lisa, e heterozigotos balanceados (BH, *mwh+/+TM3,Bd^s*), contendo asas com aspecto serrilhado (Guzmán- Rincón e Graf, 1995).

2.2.2 Tratamentos

A coleta de ovos dos descendentes dos dois cruzamentos anteriormente descritos, ST e HB, foi realizada durante um período de 8 horas, em frascos contendo uma base sólida de ágar e uma camada de fermento biológico suplementado com sacarose. Após 72 ± 4 horas, larvas de terceiro estágio foram lavadas com água osmose reversa, coletadas, e colocadas em frascos de vidro contendo 1,5 g de meio de purê de batatas instantâneo (HIKARI®). Em cada frasco foram adicionados 5 mL de sinvastatina (nas concentrações 12,5; 25; 50; 100 e 200µM), diluídas em etanol 5%, isoladamente e em associação com a DXR. A associação entre a DXR e a sinvastatina ocorreu em sistema de co-tratamento.

Essas larvas foram submetidas a um tratamento crônico, por um período de aproximadamente 48 horas, quando estas passam para o estágio de pupa. As larvas foram contadas (em grupos de 100) antes da distribuição em uma das séries desses frascos, permitindo a execução de um ensaio de toxicidade. Todos os

compostos foram testados em duplicata (séries independentes), realizadas a $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ e umidade relativa de aproximadamente 60%.

2.2.3 Preparação das lâminas e análise microscópica

Após a eclosão, os adultos emergentes de ambos os cruzamentos, portadores dos genótipos trans-heterozigotos ($mwh+/+flr^3$) e heterozigotos balanceados ($mwh+/+TM3,Bd^S$) foram coletados e conservados em etanol 70%. Posteriormente, as asas foram removidas (com auxílio de pinças entomológicas) e montadas em lâminas codificadas contendo solução Faure (50 mg de goma arábica, 30 g de hidrato de cloral, 30 mL de glicerol, 50 mL de água). Tais lâminas foram analisadas ao microscópio óptico, em ampliação de 400x, visando à identificação de manchas mutantes em diferentes setores das asas.

2.2.4 Análise estatística

O teste binominal condicional de Kastenbaum e Bowman (1970), ao nível de 5% de significância, foi utilizado para comparar as frequências de cada tipo de mancha (simples pequena, simples grande ou gêmea) e a frequência total de manchas por mosca, para cada tratamento, sendo essa comparação feita aos pares (controle negativo *versus* sinvastatina; DXR isoladamente *versus* sinvastatina+DXR). O procedimento de decisão múltipla descrito por Frei e Würigler (1988) foi utilizado para julgar a resposta como positiva, fracamente positiva, negativa ou inconclusiva. Todos os resultados com diagnóstico fraco positivo foram analisados com o teste *U*, não-paramétrico, de Mann, Whitney e Wilcoxon (Frei e Würigler, 1995). O percentual de inibição da sinvastatina foi calculado utilizando-se a frequência de clones por 10^5 células, corrigidas pelo controle, como se segue: $[(\text{DXR sozinha} - \text{Sinvastatina} + \text{DXR}) / \text{DXR sozinha} \times 100]$ (Abraham, 1994).

Com base na frequência de indução de manchas mutantes (por 10^5 células por divisão), a atividade recombinogênica foi calculada por comparação do padrão de frequência de clones obtidos a partir dos descendentes MH e BH, como se segue: Frequência de mutação (FM) = frequência de clones nos descendentes

BH/ frequência de clones nos descendentes MH. Frequência de recombinação (FR)= 1 - frequência de mutação (FM) (Rezende et al., 2011).

3. Resultados

Previamente à análise pelo teste de mutação e recombinação somática, a sinvastatina foi submetida a um teste de toxicidade em *Drosophila melanogaster*, com o intuito de avaliar o percentual de sobrevivência dos indivíduos tratados com as diferentes concentrações utilizadas. A toxicidade é determinada em função do número de larvas que não atingem a fase adulta. Tal análise é crucial uma vez que a redução do percentual de sobrevivência larval é uma indicação de que os compostos afetaram o desenvolvimento das larvas e, além disso, o número de adultos emergentes deve ser suficientemente elevado para permitir a execução dos tratamentos posteriores (Demir et al., 2013).

As concentrações utilizadas nesse teste foram inicialmente delineadas com base em estudo realizado por Spindler et al. (2012), utilizando a *D. melanogaster*. Uma vez estabelecidas as concentrações, as larvas, descendentes do cruzamento padrão e de alta bioativação, foram submetidas a um tratamento crônico (período aproximado de 48 horas) com as substâncias testadas. Após esse período, procedeu-se à contagem do número de moscas que eclodiram em cada esquema de tratamento, sendo esse número utilizado para calcular as taxas de sobrevivência após a exposição.

Sendo assim, com base na análise inicial de toxicidade foram estabelecidas as curvas de sobrevivência, incluindo o percentual de moscas que eclodiram quando tratadas isoladamente com sinvastatina e em esquema de associação (sinvastatina + doxorrubicina) (Figura 2). Foram identificados, também, os percentuais de sobrevivência em ambos os controles: DXR e etanol 5%. Como pode ser observado, em nenhuma das concentrações analisadas foi identificado efeito tóxico da sinvastatina, nem mesmo na maior concentração testada, uma vez que em todas as concentrações o percentual de sobrevivência foi superior a 85% (tanto nos descendentes do cruzamento ST, como do HB). Por isso, as cinco

concentrações testadas: 12,5; 25; 50; 100 e 200 μ M, foram utilizadas para realização do teste SMART.

Os resultados obtidos no teste para detecção de mutação e recombinação somática em *D. melanogaster*, para os descendentes trans-heterozigotos marcados (MH) e heterozigotos balanceados (BH) do cruzamento padrão (ST), tratados isoladamente e co-tratados com a doxorrubicina, são apresentados na Tabela 1. Como esperado, o controle positivo (DXR) promoveu aumento estatisticamente significativo ($p < 0,05$) em todas as categorias de manchas mutantes (simples, grandes, gêmeas e no total de manchas), quando comparado ao controle negativo, o que confirma sua forte atividade, sobretudo, em relação à recombinação, confirmada após análise dos descendentes heterozigotos balanceados.

Com relação ao tratamento com sinvastatina, observa-se que em nenhuma das cinco concentrações testadas (12,5; 25; 50; 100 e 200 μ M) houve aumento na frequência total de manchas mutantes ($p > 0,05$), quando comparado ao controle negativo, o que sugere ausência de efeito mutagênico/recombinogênico desse fármaco. Entretanto, ao se avaliar os descendentes tratados concomitantemente com sinvastatina e doxorrubicina, observa-se que, em todas as concentrações testadas, a sinvastatina reduziu a frequência de manchas simples e o total de manchas (quando comparado ao controle positivo isoladamente). O percentual de inibição variou entre 67,07% e 87,55%, sendo esses valores obtidos, respectivamente, nas concentrações de 25 μ M e 100 μ M. O efeito, portanto, não foi dose dependente.

Uma vez que esse efeito modulador foi identificado, os descendentes heterozigotos balanceados (*mwh/TM3*) foram analisados, com o intuito de identificar os percentuais de eventos mutagênicos e recombinogênicos. A comparação entre as frequências de manchas de indivíduos MH e BH revelou que a recombinação é a principal resposta para o tratamento de DXR isolada (50,45%). A recombinação, entretanto, não foi o principal evento relacionado às manchas mutantes produzidas por DXR em associação com sinvastatina (na maioria das concentrações). Nas concentrações de 12,5; 25; 50; 100 e 200 μ M + DXR, 40,82; 53,05; 34,01; 31,82 e 32,17% das manchas foram devido a alterações recombinogênicas, respectivamente. Portanto, esses dados indicam que a sinvastatina, na presença de

níveis basais de citocromo P450, reduz significativamente o número de manchas mutantes, alterando (diminuindo) o perfil recombinogênico da doxorubicina.

Os resultados referentes aos descendentes (MH e BH) do cruzamento de alta bioativação (HB), tratados isoladamente e em associação com a doxorubicina são apresentados na Tabela 2. Mais uma vez, verifica-se aumento significativo ($p < 0,05$) na frequência total de manchas identificada no controle positivo, quando comparada à frequência do controle negativo. A DXR, portanto, induziu o aparecimento de manchas mutantes, apresentando principalmente atividade recombinogênica (69,92%).

No que diz respeito ao tratamento com sinvastatina, os resultados revelam que, em nenhuma das cinco concentrações testadas, houve diferença entre a frequência total de manchas mutantes e a frequência identificada no controle negativo ($p > 0,05$). Tais resultados sugerem, portanto, que, mesmo após intensa biotransformação metabólica, a sinvastatina não possui efeito mutagênico e/ou recombinogênico em *D. melanogaster*.

Já a análise dos descendentes co-tratados com sinvastatina e doxorubicina mostram que na maior concentração testada, 200 μ M, a sinvastatina reduziu significativamente ($p < 0,05$) a frequência total de manchas, em comparação à frequência observada nos indivíduos tratados apenas com DXR (controle positivo). Nas demais concentrações não foram observadas reduções estatisticamente significativas nas frequências totais de manchas.

Os resultados revelam, ainda, que a sinvastatina, na concentração de 200 μ M, nos descendentes do cruzamento HB, apresentou percentual de redução na frequência de manchas de 65,48%. No que se refere à proporção de manchas obtidas por mutação e recombinação, observa-se que 64,52% das manchas mutantes estão relacionadas às alterações recombinogênicas. Portanto, esses dados sugerem que a sinvastatina, embora tenha reduzido significativamente o número de manchas mutantes na maior concentração testada, pouco alterou o perfil recombinogênico da DXR, após intensa biotransformação metabólica.

4. Discussão

O presente estudo investigou a ação mutagênica e recombinogênica da sinvastatina, isoladamente, bem como os possíveis efeitos moduladores dessa estatina sobre danos ao DNA induzidos pela doxorrubicina em células somáticas de *D. melanogaster*. Os efeitos aqui demonstrados corroboram com resultados anteriores, também identificados por meio do teste SMART em *D. melanogaster*, realizados com duas estatinas sintéticas (atorvastatina e rosuvastatina), em nosso laboratório, e reportados em publicação anterior (Orsolin et al., 2015).

Na pesquisa referida, os resultados demonstraram ausência de efeito mutagênico para atorvastatina e rosuvastatina e efeito modulador dessas duas estatinas sobre os danos ao DNA induzidos pela DXR. Esse efeito foi verificado em todas as concentrações testadas nos descendentes dos cruzamentos ST e HB tratados com rosuvastatina, e apenas em descendentes do cruzamento HB tratados com atorvastatina.

Em estudo desenvolvido por Peron et al. (2008), com o objetivo de avaliar a citotoxicidade e a mutagenicidade da sinvastatina em células de medula óssea de Ratos Wistar, tratados *in vivo*, e em células meristemáticas de raiz de *Allium cepa* L., verificou-se, também, que a sinvastatina não possui ação citotóxica, nem efeito mutagênico, uma vez que não promoveu aumento no número de aberrações cromossômicas.

Nas presentes condições experimentais observou-se que a sinvastatina, além de não apresentar efeito mutagênico/recombinogênico, apresentou uma resposta moduladora sobre a atividade da doxorrubicina. Tal resposta foi observada nos descendentes de ambos os cruzamentos, padrão e de alta bioativação, porém, a inibição foi mais eficaz nos descendentes do cruzamento ST. As diferenças entre os dois cruzamentos, ST e HB, estão relacionadas com os níveis de citocromo P450.

No cruzamento HB é utilizada a linhagem *ORR*, que apresenta os cromossomos 1 e 2 provenientes da linhagem Oregon R, resistente ao DDT, com alta expressividade das enzimas citocromo P450 (Frölich e Wrügler, 1989; Graf e Van Schaik, 1992). Já os descendentes do cruzamento ST possuem níveis basais de citocromo P450. Segundo Andrade e Lehmann (2003), a linhagem *ORR* foi

desenvolvida com o objetivo de aumentar o desempenho do teste SMART no caso da ativação de pró-mutágenos que dependem de ativação via citocromo P450.

A sinvastatina é um pró-fármaco, administrado na forma de lactona inativa, necessitando de transformação hepática para conversão em β -hidroxiácido, seu metabólito ativo (Sabina et al., 2012; Gazzo et al., 2012). A maioria das estatinas, incluindo a sinvastatina, é metabolizada por enzimas do sistema citocromo P450 (CYP3A4) (Gazzo et al., 2012). A CYP3A4 é a isoenzima do citocromo P450 mais abundante no fígado e intestino delgado; ela atua no metabolismo oxidativo de cerca de 50% de todos os fármacos disponíveis no mercado (Granvil et al., 2003). O CYP3A4 de mamíferos é análogo à família CYP6 em *Drosophila* (Tijet et al., 2001).

Através desses sistemas de biotransformação, como o citocromo P450, substâncias biologicamente inativas podem ser introduzidas no organismo e convertidas em metabólitos ativos devido às alterações em sua estrutura. Entretanto, embora a finalidade da biotransformação dos xenobióticos seja a detoxificação, nem sempre o metabólito é menos tóxico do que o próprio composto (Guecheva e Henriques, 2003). O processo de biotransformação pode gerar intermediários tóxicos, eletrofílicos, mutagênicos ou carcinogênicos (Hodgson e Rose, 2007).

Na presente pesquisa, embora a biotransformação não tenha gerado metabólitos ativos com efeito mutagênico/recombinogênico, os produtos resultantes da biotransformação metabólica da sinvastatina, quando associados à doxorubicina (em sistema de co-tratamento), reduziram o número total de manchas mutantes. Porém, com um efeito de inibição menos eficaz (observado apenas na maior concentração) ao obtido sem transformação metabólica (observado em todas as concentrações testadas).

Os mecanismos pelos quais a sinvastatina reduz os danos ao DNA induzidos pela DXR não foram avaliados diretamente nesta pesquisa. Contudo, a utilização do sistema de co-tratamento permite a análise do efeito da sinvastatina em etapas que antecedem a indução de danos pela DXR, permitindo avaliar seu efeito modulador. Sendo assim, pode-se supor, com base nos resultados obtidos na presente pesquisa, que os metabólitos ativos da sinvastatina, resultantes do processo de biotransformação, seriam capazes de interagir diretamente com grupos

ativos da DXR, alterando a resposta de inibição, verificada nos descendentes do cruzamento padrão (ST). Essa é uma possibilidade, contudo, que não pode ser explicada com exatidão, visto que através da presente pesquisa não é possível identificar como ocorre essa interação entre as duas substâncias.

Os resultados referentes aos indivíduos tratados com DXR confirmam o efeito recombino gênico desse fármaco. No que se refere ao mecanismo de ação, a doxorrubicina liga-se fortemente ao DNA devido à sua capacidade de intercalar-se entre pares de bases. Ao intercalar-se à molécula de DNA, a DXR promove rupturas na molécula, inibindo a síntese de DNA e de RNA (Craig e Stitzel, 2005; Kaiserová et al., 2006). Além disso, também promove a produção de radicais livres (Nascimento e Martins, 2005). Segundo Lehmann et al. (2003), a intrínseca ligação entre inibição de topoisomerasas, bloqueio da síntese e replicação do DNA e indução de quebras duplas, associadas ao fato de que este último evento representa um dos principais substratos para a ocorrência de recombinação, colocam a DXR, também, como potente agente recombino gênico. Esse efeito recombino gênico já foi reportado em uma série de pesquisas anteriores realizadas em células somáticas de *D. melanogaster* (Lehmann et al., 2003; Costa e Nepomuceno, 2006; Rezende et al., 2009; Orsolin et al., 2012; Orsolin et al., 2015).

Outro possível mecanismo para explicação na redução do número de manchas mutantes promovida pela sinvastatina, quando associada à DXR, poderia estar associado ao efeito antioxidante das estatinas. Elbaky et al. (2006) investigaram possíveis efeitos protetores da sinvastatina sobre a nefrotoxicidade induzida pela adriamicina em ratos e verificaram que a administração de sinvastatina, antes e concomitante com a adriamicina, promoveu redução na peroxidação lipídica e aumento na atividade de enzimas antioxidantes.

De forma similar, Elbaky et al. (2010) investigaram possíveis efeitos protetores da sinvastatina sobre a cardiotoxicidade induzida pela doxorrubicina. Os referidos autores verificaram que a administração de sinvastatina também reduziu significativamente as alterações miocárdicas induzidas por tratamento com DXR. Tais resultados sugerem que a sinvastatina oferece proteção quanto à lesão cardíaca induzida por DXR, em termos de estresse oxidativo.

Ungureanu et al. (2003) observaram que indivíduos hipercolesterolêmicos, que receberam doses diárias de sinvastatina (10mg/dia, durante 8 meses), além de diminuição significativa do colesterol total, apresentaram melhoria significativa em alguns parâmetros antioxidantes enzimáticos: superóxido dismutase, glutathione peroxidase e catalase.

Além desse reconhecido efeito antioxidante da sinvastatina, que poderia ter resultado na redução de manchas mutantes induzidas pela DXR, tal redução poderia, também, associar-se ao efeito apoptótico desse fármaco. Em estudo realizado por Yanae et al. (2011) foi demonstrado que as estatinas inibem a proliferação celular e induzem apoptose em células de glioma de ratos. Observou-se, também, um aumento da atividade da caspase-3, enzima com papel central nesse processo. Além disso, as estatinas diminuíram os níveis de Ras reguladas pelas vias ERK1/2 e Akt. De acordo com os autores citados, tais achados indicam que estatinas podem ser utilizadas como agentes anticancerígenos em glioblastoma.

Takeda et al. (2007) também demonstraram que a sinvastatina é capaz de suprimir a sobrevivência celular e a atividade invasiva de células de carcinoma escamoso de cabeça e pescoço por meio da inativação da integrina $\beta 1$ (envolvida na cascata de sinalização de *ERK*). Os referidos autores verificaram, ainda, a ativação dos inibidores de CDKs, p21 e p27, e da caspase-3. Segundo Bardou et al. (2010), as estatinas, no caso do câncer colo retal, podem opor-se ao crescimento do câncer ao induzir apoptose, por meio de uma diminuição da expressão de proteínas anti-apoptóticas como a BC12 ou cIAP1 e de um aumento da expressão de proteínas pró-apoptóticas, como a BMP, por exemplo.

Em função dos efeitos acima descritos, as estatinas, incluindo a sinvastatina, tem sido evidenciadas em função de possíveis efeitos antitumorais. Nesse sentido, Bardou et al. (2010) afirmam que existem vários mecanismos que podem justificar os efeitos antitumorais das estatinas, incluindo a indução da apoptose (por diferentes vias), inibição do crescimento celular, inibição da angiogênese e a melhoria da resposta imunitária.

Em conclusão, os resultados relatados evidenciam que, nas presentes condições experimentais, a sinvastatina apresentou um efeito modulador sobre danos ao DNA induzidos pela doxorrubicina em células somáticas de *D.*

melanogaster. Acredita-se que esse efeito modulador esteja associado às atividades apoptótica e, principalmente, antioxidante dessa classe de drogas, embora tais efeitos não tenham sido diretamente avaliados nessa pesquisa. Sugere-se, portanto, que novos estudos, envolvendo outros organismos testes e modelos experimentais, sejam conduzidos com o intuito de promover maior compreensão sobre a atividade moduladora da sinvastatina em relação à substâncias indutoras de danos ao DNA, como a doxorrubicina.

Referências

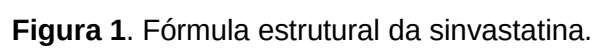
- Abraham, S.K., 1994. Antigenotoxicity of coffee in the *Drosophila* assay for somatic mutation and recombination. *Mutagenesis* 9, 383–386.
- Andrade, H.H.R., Lehmann, M., 2003. Teste para detecção de mutação e recombinação somática em *Drosophila melanogaster*. In: Ribeiro, L.R., Salvadori, D.M.F., Marques, E.K. (Eds.), *Mutagênese ambiental*. Canoas, Ulbra, pp. 281-307.
- Banzato, T. P., 2013. *Avaliação da toxicidade reprodutiva da sinvastatina em ratos adultos*. Dissertação (Biologia Geral e Aplicada), Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.
- Bardou, M., Barkun, A., Martel, M., 2010. Effect of statin therapy on colorectal cancer. *Gut*. 59, 1572-1585.
- Campo, V.L., Carvalho, I., 2007. Estatinas hipolipêmicas e novas tendências terapêuticas. *Química Nova* 30, 01-14.
- Chan, K. K., Oza, A. M., Siu, L. L., 2003. The statins as anticancer agents. *Clin. Cancer Research* 9, 10–19.
- Collisson, E. A., Carranza, D. C., Chen I. Y., Kolodney, M. S., 2002. Isoprenylation is necessary for the full invasive potential of RhoA overexpression in human melanoma cells. *Journal of Investigative Dermatology* 119, 1172-1176.
- Costa, W.F., Nepomuceno, J.C., 2006. Protective effects of a mixture of antioxidant vitamins and mineral on the genotoxicity of doxorubicin in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. *Environ. Mol. Mutagen.* 47, 18–24.
- Craig, C. R., Stitzel, R. E. 2005. *Farmacologia Moderna: com aplicações clínicas*. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 815 p.
- Demierre, M.F., Higgins, P.D., Gruber, S.B., Hawk, E., Lippman, S.M., 2005. Statins and cancer prevention. *Nat. Rev. Cancer* 5, 930-942.
- Demir, E., Turna, F., Kaya, B., Creus, A., Marcos, R., 2013. Mutagenic/recombinogenic effects of four lipid peroxidation products in *Drosophila*. *Food Chem. Toxicology* 53, 221-227.
- Edwards, P. A., Ericsson, J. 1999. Sterols and isoprenoids: signalling molecules derived from the cholesterol biosynthetic pathway. *Annu. Rev. Biochem.* 68, 157–185.

- Elbaky, N. A. A., Hammad, L. N., Atia, T. A. 2006. Protective Effect of Simvastatin Against Adriamycin-Induced Nephrotoxicity in Rats; Biochemical and Histological Study. *The Egyptian Journal of Hospital Medicine* 25, 725-739.
- Elbaky, N. A. A., Ali, A. A., Ahmed, R. A. 2010. Cardioprotective effect of simvastatin on doxorubicin -induced cardiotoxicity in rats. *J. Basic Appl. Sci.* 6, 1-11.
- Fonseca, F.A.H., 2005. Farmacocinética das estatinas. *Arq. Bras. Cardiol.* 85, 09-14.
- Frei, H., Würgler, F. E., 1988. Statistical methods to decide whether mutagenicity test data from *Drosophila* assay indicate a positive, negative or inconclusive result. *Mutat. Res.* 203, 297–308.
- Frei, H., Würgler, F. E. 1995. Optimal experimental design and sample size for the statistical evaluation of data from somatic mutation and recombination test (SMART) in *Drosophila*. *Mutat. Res.* 334, 247-258.
- Frölich, A., Würgler, F. E., 1989. New tester strains with improved bioactivation capacity for the *Drosophila* wing-spot test. *Mutat. Res.* 216, 179–187.
- Gazzerro, P., Proto, M. C.; Gangemi, G., Malfitano, A. M., Ciaglia, E., Pisanti, S.; Santoro, A., Laezza, C., Bifulco, M. 2012. Pharmacological actions of statins: a critical appraisal in the management of câncer. *Pharmacological Reviews* 64,102–146.
- Graf, U., Abraham, S.K., Guzmán-Rincón, J., Würgler, F.E., 1998. Antigenotoxicity studies in *Drosophila melanogaster*. *Mutat. Res.* 402, 203–209.
- Graf, U., Frei, H., Kägi, A., Katz, A.J., Würgler, F.E., 1989. Thirty compounds tested in the *Drosophila* wing spot test. *Mutat. Res.* 222, 359–373.
- Graf, U., Singer, D. 1992. Genotoxicity testing of promutagens in the wing Somatic Mutation and Recombination Test In *Drosophila melanogaster*. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental* 8, 15-27.
- Graf, U., Van Schaik, N., 1992. Improved high bioactivation cross for the wing somatic and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Mutat. Res.* 271, 59–67.
- Graf, U., Würgler, F.E., Katz, A. J., Frei, H., Juon, H., Hall, C.B., Kale, P.G., 1984. Somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Environ. Mutagen.* 6, 153–188.
- Granvil, C. P., Yu, A. M., Elizondo, G., Akiyama, T. E., Cheung, C., Feigenbaum, L., Kraus, K. W., Gonzales, F. J. 2003. Expression of the human CYP3A4 gene in the small intestine of transgenic mice: in vitro metabolism and pharmacokinetics of midazolam. *Cancer Lett.* 167, 99-104.

- Guecheva, T. K.; Henriques, J. A. P. 2003. *Metabolismo de xenobióticos*: citocromo P-450. In: Silva, J., Erdtmann, B., Henriques, J. A. P. (Orgs.). *Genética toxicológica*. Porto Alegre: Alcance. Cap.11. p.223-247.
- Guzmán-Ricon, J., Graf, U., 1995. Biomonitoring and Biomarkers as Indicators of Environmental Change. *Phenunm Press*, New York, pp. 169–181.
- Hindler, K., Eltzschig, H.K., Fox, A.A., Body, S.C., Shernan, S.K., Collard, C.D., 2006. Influence of statins on perioperative outcomes. *J. Cardiothorac. Vasc. Anesth.* 20, 251–258.
- Hodgson E., Rose, R. L. 2007. The importance of cytochrome P450 2B6 in the human metabolism of environmental chemicals. *Pharmacology e Therapeutics* 113, 420-428.
- Islaih, M., Halstead, B.W., Kadura, I.A., Li, B., Reid-Hubbard, J.L., Flick, L., Altizer, J.L., Thom Deahl, J., Monteith, D.K., Newton, R.K., Watson, D.E., 2005. Relationships between genomic, cell cycle, and mutagenic responses of TK6 cells exposed to DNA damaging chemicals. *Mutat. Res.* 578, 100-116.
- Kaiserová, H., Den Hartog, G. J. M., Simunek, T., Schroterová, L., Kvasnicková, E., Bast, A., 2006. Iron is not involved in oxidative stress-mediated cytotoxicity of doxorubicin and bleomycin. *British Journal of Pharmacology* 149, 920-930.
- Kastenbaum, M.A., Bowman, K.O., 1970. Tables for determining the statistical significance of mutation frequencies. *Mutat. Res.* 9, 527–549.
- Lehmann, M., Franco, A., Vilar, K.S.P., Reguly, M.L., Andrade, H.H.R., 2003. Doxorubicin and two of its analogues are preferential inducers of homologous recombination compared with mutational events in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. *Mutat. Res.* 539, 167-175.
- Levinski, R.J., Brown, H., 2007. Statins. Too many people are taking them (and they're doing far less good than you think). *Lancet* 69, 268–269.
- Liao, J. K., 2002. Beyond lipid lowering: the role of statins in vascular protection. *Int J Cardiol.* 86, 05-18.
- Lindsley, D. L., Zimm, G. G., 1992. The genome of *Drosophila melanogaster*. 1st edition. *Academic Press*, San Diego, 1133p.
- Marie, I., Delafenetre, H., Massy, N., Thuillez, C., Noblet, C., 2008. Tendinous disorders attributed to statins: a study on ninety-six spontaneous reports in the period 1990-2005 and review of the literature. *Arthritis Rheum* 59, 367-72.
- Marinho, F. D. M., Diniz, M. M. L., Zanon, J. C. da C., Reis, I. A., Lima, A. A., Soares, C. D. V., 2012. Influência da temperatura em estudos de dissolução de formas farmacêuticas contendo sinvastatina. *Rev. Bras. Farm.* 93, 38-42.

- Mennickent S.C., Bravo, M.D., Calvo, C.M., Avello, M.L., 2008. Efectos pleiotrópicos de las estatinas. *Rev. med. Chile* 136, 775-782.
- Nascimento, M. C. M. O., Martins, A. S., 2005. Cardiomiopatia induzida pela adriamicina: uma revisão. *Arquivos de Ciências e Saúde* 12, 111-115.
- Orsolin, P.C., Silva-Oliveira, R.G., Nepomuceno, J.C., 2012. Assessment of the mutagenic, recombinagenic and carcinogenic potential of orlistat in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. *Food Chem. Toxicology* 50, 2598-2604.
- Orsolin, P. C.; Silva-Oliveira, R. G., Nepomuceno, J. C., 2015. Modulating effect of synthetic statins against damage induced by doxorubicin in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. *Food and Chemical Toxicology* 81,111–119.
- Peron, A. P., Felipes, J., Oliveira, A. C. S., Vicentin, V. E. P. 2008. Investigação da citotoxicidade e mutagenicidade do hipocolesteremiante sinvastatina em células de ratos wistar e de *Allium cepa* L. *Revista Brasileira de Toxicologia* 21, 93-96.
- Rezende, A. A. de, Graf, U., Guterres, Z. R., Kerr, W.E., Spanó, M.A., 2009. Protective effects of proanthocyanidins of grape (*Vitisvinifera* L.) seeds on DNA damage induced by Doxorubicin in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. *Food Chem. Toxicology* 47, 1466-1472.
- Rezende, A.A.de; Silva, M.L.A., Tavares, D.C., Cunha, W.R., Rezende, K.C.S., Bastos, J.K., Lehmann, M., Andrade, H.H.R. de, Guterres, Z.R., Silva, L.P., Spanó, M.A., 2011. The effect of the dibenzylbutyrolactoliclignan (-)-cubebin on doxorubicin mutagenicity and recombinogenicity in wing somatic cells of *Drosophila melanogaster*. *Food Chem. Toxicology* 49, 1235–124.
- Sabina, A. G., Dávila, J. G., Serrano, P. S., Juanetey, C. G., Pacheco, R. M. 2012. Consideraciones específicas en la prescripción e intercambio terapéutico de estatinas. *Farmacia Hospitalaria* 36, 97-108.
- Saito, A., Saito, N., Mol, W., Furukawa, H., Tsutsumida, A., Oyama, A., Sekido, M., Sasaki, S., Yamamoto, Y., 2008. Simvastatin inhibits growth via apoptosis and the induction of cell cycle arrest in human melanoma cells. *Melanoma Res.* 18, 85-94.
- Sarikaya, R., Memmi, B. K., 2013. Detection of transfluthrin and metofluthrin genotoxicity in the ST cross of the *Drosophila* Wing Spot Test. *Chemosphere* 93, 238–242.
- Schachter, M., 2005. Chemical, pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of statins: an update. *Fundam. Clin. Pharmacol.* 19, 117-125.

- Shishehbor, M.H., Brennan, M.L., Aviles, R.J., Fu, X., Penn, M.S., Sprecher, D.L., Hazen, S. L., 2003. Statins promote potent systemic antioxidant effects through specific inflammatory pathways. *Circulation* 108, 426-431.
- Sleijfer, S., Van Der Grast, A., Planting, A. S., Stoter, G., Verweij, J., 2005. The potential of statins as part of anti-cancer treatment. *European Journal of Cancer* 41, 516-522.
- Sparrow, C. P., Burton, C. A., Hernandez, M., Mundt, S., Hassing, H., Patel, S., Rosa, R., Hermanowski-Vosatka, A., Wang, P. R., Zhang, D., Peterson, L., Detmers, P. A., Chao, Y. S., Wright, S. D., 2001. Simvastatin has anti-inflammatory and antiatherosclerotic activities independent of plasma cholesterol lowering. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 21, 115–121.
- Spindler, R. S., Li, R., Dhahbi, J. M., Yamakawa, A., Mote, P., Bodmer, R., Ocorr, K., Willians, R. T., Wang, Y., Ablao, K. P. 2012. Statin Treatment Increases Lifespan and Improves Cardiac Health in *Drosophila* by Decreasing Specific Protein Prenylation. *PLoS One*. 7(6): e39581.
- Takeda, I., Maruya, C. I., Shirasaki, T., Misukami, H., Takahata, T., Myers, J. N., Kakehata, S., Yagihashi, S., Shimkawa, H. Simvastatin inactivates β 1-integrin and extracellular signal-related kinase signaling and inhibits cell proliferation in head and neck squamous cell carcinoma cells. *Cancer Science* 98, 890-899.
- Tang, D, Park, H., Georgescu, S. P., Sebt, S. M., Hamilton, A. D., Galper, J. B., 2006. Simvastatin potentiates tumor necrosis factor α -mediated apoptosis of human vascular endothelial cells via the inhibition of the geranylgeranylation of RhoA. *Life Sciences* 79, 1484–1492.
- Tijet, N., Helvig, C., Feyereisen, R., 2001. The cytochrome P450 gene superfamily in *Drosophila melanogaster*: annotation, intron–exon organization and phylogeny. *Gene* 262, 189–198.
- Ungureanu, D., Filip, C., Artenie, A., Artenie, R., 2003. Evaluation of simvastatin antioxidant effects. *Rev. Med. Chir. Soc. Med. Nat. Iasi*. 107, 66-71.
- Yamashita, M., Otsuka, F., Mukai, T., Otani, H., Inagaki, K., Miyoshi, T., Goto, J., Yamamura, M., Makino, H., 2008. Simvastatin antagonizes tumor necrosis factor- α inhibition of bone morphogenetic proteins-2-induced osteoblast differentiation by regulating Smad signaling and Ras/Rho-mitogen-activated protein kinase pathway. *Journal of Endocrinology* 196, 601–613.
- Yanae, M., Tsubaki, M., Satou, T., Itoh, T., Imano, M., Yamazoe, Y., Nishida, S., 2011. Statin induced apoptosis via the suppression of ERK1/2 and Akt activation by inhibition of the geranylgeranyl-pyrophosphate biosynthesis in glioblastoma. *J. Exp. Clin. Cancer Res*. 30, 74-82.



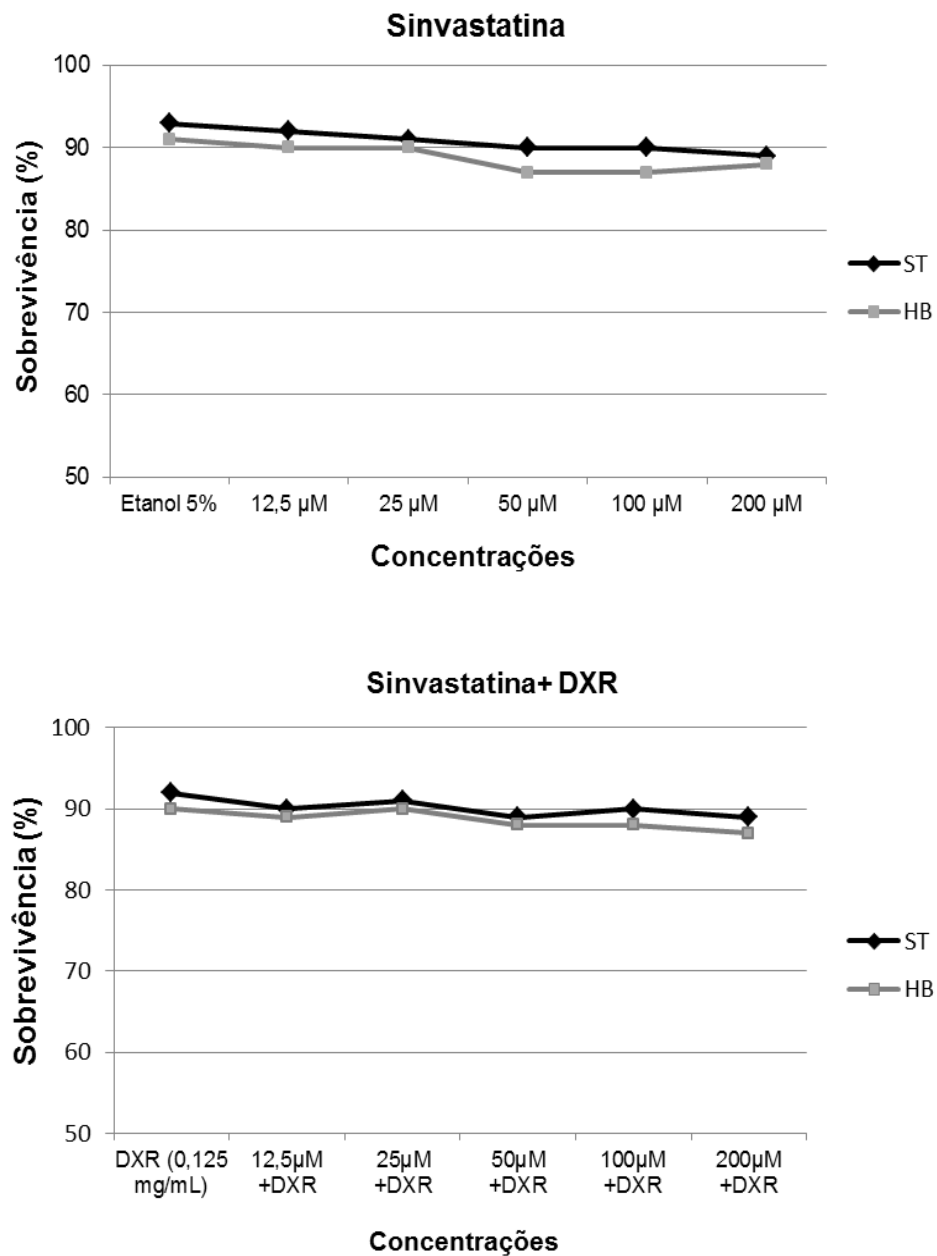


Figura 2. Porcentagem de sobrevivência das moscas após a metamorfose das larvas de 72h tratadas com diferentes concentrações de sinvastatina, isoladamente e em associação com a DXR.

Tabela 1. Resumo dos resultados obtidos nos descendentes trans-heterozigotos marcados (MH) e heterozigotos balanceados (BH) de *Drosophila melanogaster*, derivados do cruzamento padrão (ST), tratados com diferentes concentrações de sinvastatina (isoladamente e em associação com DXR), controle positivo (DXR 0,125 mg/mL) e controle negativo (etanol 5%).

Tratamentos		Número de moscas (N)	Manchas por indivíduo (N ^o de moscas); diagnóstico estatístico ^a							Total de clones <i>mwh</i> ^c (n)	Frequência de indução de manchas (por 10 ⁵ células por divisão) ^d		Recombinação (%)	Inibição ^e (%)	
DXR (mg/mL)	Sinvastatina (μM)		Simples pequenas (1-2 céls) ^b m=2		Simples grandes (>2 céls) ^b m=5		Gêmeas m=5		Total de manchas m=2		Observado	Corrigido pelo controle			
ST															
<i>mwh/flr</i> ³															
0	0	60	0.38	(23)	0.02	(1)	0.00	(0)	0.40	(24)	24	0.82			
0	12.5	60	0.33	(20)-	0.00	(0)i	0.03	(2)i	0.37	(22)-	22	0.75	-0.07		
0	25	60	0.32	(19)-	0.03	(2)i	0.00	(0)i	0.35	(21)-	21	0.72	-0.10		
0	50	60	0.38	(23)-	0.07	(4)i	0.00	(0)i	0.45	(27)-	27	0.92	0.10		
0	100	60	0.40	(24)-	0.02	(1)i	0.00	(0)i	0.42	(25)-	25	0.85	0.03		
0	200	60	0.47	(28)i	0.00	(0)i	0.02	(1)i	0.48	(29)-	27	0.92	0.10		
0.125	0	60	1.65	(99)+	0.20	(12)+	0.10	(6)+	1.95	(117)+	97	3.31	2.49	50.45	
0.125	12.5	60	0.43	(26)*	0.22	(13)i	0.08	(5)i	0.73	(44)*	43	1.47	0.65	40.82 73.90	
0.125	25	60	0.53	(32)*	0.13	(8)i	0.13	(8)i	0.80	(48)*	48	1.64	0.82	53.05 67.07	
0.125	50	60	0.42	(25)*	0.22	(13)i	0.10	(6)i	0.73	(44)*	43	1.47	0.65	34.01 73.90	
0.125	100	60	0.33	(20)*	0.17	(10)i	0.07	(4)i	0.57	(34)*	33	1.13	0.31	31.86 87.55	
0.125	200	60	0.37	(22)*	0.18	(11)i	0.15	(9)i	0.70	(42)*	42	1.43	0.61	32.17 75.50	
<i>mwh/TM3</i>															
0	0	40	0.28	(11)	0.00	(0)			0.28	(11)	11	0.56			
0.125	0	40	0.68	(27)+	0.13	(5)+			0.80	(32)+	32	1.64	1.08		
0.125	12.5	40	0.43	(17)i	0.00	(0)*			0.43	(17)*	17	0.87	0.31		
0.125	25	40	0.38	(15)*	0.00	(0)*			0.38	(15)*	15	0.77	0.20		
0.125	50	40	0.45	(18)i	0.03	(1)i			0.48	(19)*	19	0.97	0.41		
0.125	100	40	0.38	(15)*	0.00	(0)*			0.38	(15)*	15	0.77	0.20		
0.125	200	40	0.48	(19)i	0.00	(0)*			0.48	(19)*	19	0.97	0.41		

Moscas trans-heterozigotas marcadas (*mwh/flr*³) e heterozigotas balanceadas (*mwh/TM3*) foram analisadas.

* p ≤ 0.05 vs. DXR isolada;

^a Diagnóstico estatístico de acordo com Frei and Würigler (1995); níveis de probabilidade: -, negativo; +, positivo; i, inconclusivo; p ≤ 0.05 vs. controle negativo (etanol 5%).

- ^b Incluindo manchas simples *flr*³ raras.
- ^c Considerando clones *mwh* para manchas simples *mwh* e para manchas gêmeas.
- ^d Frequência de formação de clone: clones / moscas / 48.800 células (tamanho sem correção).
- ^e Calculado como: [(DXR isolada – sinvastatina + DXR / DXR isolada) × 100], de acordo com Abraham (1994).
- ^f Apenas manchas simples *mwh* podem ser observadas em indivíduos heterogizotos *mhw/TM3*, já que o cromossomo balanceador *TM3* não contém o gene mutante *flr*³.

Tabela 2. Resumo dos resultados obtidos nos descendentes trans-heterozigotos marcados (MH) e heterozigotos balanceados (BH) de *Drosophila melanogaster*, derivados do cruzamento de alta bioativação (HB), tratados com diferentes concentrações de sinvastatina (isoladamente e em associação com DXR), controle positivo (DXR 0,125 mg/mL) e controle negativo (etanol 5%).

Tratamentos		Número de moscas (N)	Manchas por indivíduo (N ⁰ de moscas); diagnóstico estatístico ^a								Frequência de indução de manchas (por 10 ⁵ células por divisão) ^d			Recombinação (%)	Inibição ^e (%)
DXR (mg/mL)	Sinvastatina (µM)		Simples pequenas (1-2 céls) ^b m=2		Simples grandes (>2 céls) ^b m=5		Gêmeas m=5		Total de manchas m=2		Total de clones <i>mwh</i> ^c (n)	Observado	Corrigido pelo controle		
HB															
<i>mwh/flr</i> ³															
0	0	60	1.10	(66)	0.03	(02)	0.02	(1)	1.15	(69)	69	2.36			
0	12.5	60	1.12	(67)-	0.08	(5)i	0.02	(1)i	1.22	(73)-	71	2.42	0.07		
0	25	60	1.05	(63)-	0.08	(5)i	0.03	(2)i	1.17	(70)-	70	2.39	0.03		
0	50	60	1.30	(78)-	0.08	(5)i	0.00	(0)i	1.38	(83)-	82	2.80	0.44		
0	100	60	1.20	(72)-	0.07	(4)i	0.05	(3)i	1.32	(79)-	79	2.70	0.34		
0	200	60	1.32	(79)-	0.03	(2)i	0.02	(1)i	1.37	(82)-	82	2.80	0.44		
0.125	0	60	1.48	(89)-	2.20	(132)+	0.10	(6)i	3.78	(227)+	225	7.68	5.33	69.92	
0.125	12.5	60	1.43	(86) ns	1.38	(83)*	0.13	(8)i	2.95	(177) ns	173	5.91	3.55		
0.125	25	60	1.48	(89) ns	1.35	(81)*	0.07	(4)i	2.90	(174) ns	174	5.94	3.59		
0.125	50	60	1.27	(76) ns	1.55	(93)*	0.25	(15)*	3.07	(184) ns	182	6.22	3.86		
0.125	100	60	1.40	(84) ns	1.05	(63)*	0.25	(15)*	2.70	(162) ns	161	5.50	3.14		
0.125	200	60	1.22	(73) ns	0.77	(46)*	0.08	(5)i	2.07	(124)*	123	4.20	1.84	64.52	65.48
<i>mwh/TM3</i>															
0	0	40	0.38	(15)	0.00	(0)	<i>f</i>		0.38	(15)	15	0.77			
0.125	0	40	0.98	(39)i	0.15	(6)i			1.13	(45)+	45	2.31	1.54		
0.125	200	40	0.73	(29)i	0.00	(0)*			0.73	(29)*	29	1.49	0.72		

Moscas trans-heterozigotas marcadas (*mwh/flr³*) e heterozigotas balanceadas (*mwh/TM3*) foram analisadas.

* p ≤ 0.05 vs. DXR isolada; ns: não significativo.

^a Diagnóstico estatístico de acordo com Frei and Würigler (1995); níveis de probabilidade: -, negativo; +, positivo; i, inconclusivo; p ≤ 0.05 vs. controle negativo (etanol 5%).

^b Incluindo manchas simples *flr³* raras.

^c Considerando clones *mwh* para manchas simples *mwh* e para manchas gêmeas.

^d Frequência de formação de clone: clones / moscas / 48.800 células (tamanho sem correção).

^e Calculado como: [(DXR isolada – sinvastatina + DXR / DXR isolada) × 100], de acordo com Abraham (1994).

^f Apenas manchas simples *mwh* podem ser observadas em indivíduos heterogizotos *mhw/TM3*, já que o cromossomo balanceador *TM3* não contém o gene mutante *flr³*.

CONCLUSÕES GERAIS

Em conclusão, os resultados apresentados na presente tese evidenciam que, nas condições experimentais adotadas, as três estatinas testadas (atorvastatina, rosuvastatina e sinvastatina) não apresentaram efeito mutagênico e/ou recombinogênico em *D. melanogaster*.

Ao mesmo tempo, observou-se que, as três estatinas apresentaram efeito modulador sobre danos ao DNA induzidos pela doxorrubicina em células somáticas de *D. melanogaster*. Esse efeito modulador, entretanto, foi distinto entre os fármacos testados. Tal resposta foi verificada em todas as concentrações nos descendentes dos cruzamentos ST e HB tratados com rosuvastatina; apenas em descendentes do cruzamento HB tratados com atorvastatina e, principalmente, nos descendentes do cruzamento ST tratados com sinvastatina. Esses resultados denotam que, embora as estatinas possuam o mesmo mecanismo de ação, existem diferenças quanto à eficácia das respostas observadas para cada estatina individualmente, sendo tais respostas relacionadas à estrutura química das mesmas. As diferenças estruturais conferem diferenças em termos de perfil farmacocinético, via de metabolização, hidrofiliabilidade ou lipofiliabilidade, interação farmacológica, entre outros fatores.

Acredita-se que o efeito modulador sobre a ação da doxorrubicina esteja associado às atividades apoptótica e, sobretudo, antioxidante dessa classe de drogas, embora tais parâmetros não tenham sido avaliados diretamente nesse estudo.

ANEXO



Modulating effect of synthetic statins against damage induced by doxorubicin in somatic cells of *Drosophila melanogaster*



P.C. Orsolin^a, R.G. Silva-Oliveira^a, J.C. Nepomuceno^{a,b,*}

^aInstituto de Genética e Bioquímica, Universidade Federal de Uberlândia, Bloco 2E, Campus Umuarama, Uberlândia, Minas Gerais, Brazil

^bLaboratório de Ciogenética e Mutagênese, Centro Universitário de Patos de Minas, Patos de Minas, Minas Gerais, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 19 February 2015

Accepted 1 April 2015

Available online 3 April 2015

Keywords:

Atorvastatin

Rosuvastatin

Modulatory effect

Smart

Drosophila melanogaster

ABSTRACT

The competitive inhibitors of HMG-CoA reductase, popularly known as statins, exert pleiotropic effects, which result from the ability of statins to inhibit the synthesis of isoprenoids, which are fundamental for the functioning of proteins responsible for intracellular signaling. Some recent studies suggest an important role associated with the use of antineoplastic atorvastatin and rosuvastatin, the statins most widely used today. In this study, the *Drosophila* wing spot test was used to evaluate possible protective effects of atorvastatin and rosuvastatin against damage induced by DXR. Larvae were chronically treated with negative control (ethanol 5%), positive control (DXR 0.125 mg/mL) and five different concentrations of atorvastatin and rosuvastatin. The results demonstrated absence of a mutagenic effect for the two statins tested. The analysis of the descendants co-treated with DXR and atorvastatin/rosuvastatin revealed a modulatory effect of these statins on damage induced by DXR. This effect was verified in all concentrations tested in the descendants of the ST and HB crosses treated with rosuvastatin, and only in descendants of the HB cross treated with atorvastatin. Induction of apoptosis and antioxidant activity appear to be the main mechanisms involved in reducing the frequency of mutant spots and consequent modulation of the damage induced by DXR.

© 2015 Published by Elsevier Ltd.

1. Introduction

Statins are the most commonly used drugs in the treatment of hyperlipidemia, in primary and secondary prevention, with the goal of reducing the levels of cholesterol and, consequently, the risk of developing coronary heart disease (Campo and Carvalho, 2007). They have been widely used to lower the levels of low-density lipoproteins (LDL cholesterol), total cholesterol and triglycerides and,

effects result from the inhibitory activity of statins on the enzyme HMG-CoA (3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A) reductase, with the property of blocking the conversion of the substrate HMG-CoA to mevalonate, the initial steps of inhibiting cholesterol biosynthesis (Bonetti et al., 2003; Istvan and Deisenhofer, 2001). In insects, such as the *Drosophila melanogaster*, this enzyme catalyzes the biosynthesis of a precursor of mevalonate for the production of isoprenoids, which are essential for cell differentia-