



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA

IAGO TORRES CORTÊS DE SOUSA

Efeitos da sinvastatina na via do mevalonato e na expressão de genes da síntese e da resposta ao estresse de parede celular em *Staphylococcus aureus*

Piracicaba

2021

IAGO TORRES CORTÊS DE SOUSA

Efeitos da sinvastatina na via do mevalonato e na expressão de genes da síntese e da resposta ao estresse de parede celular em *Staphylococcus aureus*

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Mestre em Odontologia, na Área de Farmacologia, Anestesiologia e Terapêutica.

Orientadora: Profª Drª Karina Cogo Müller

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À
VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO
DEFENDIDA PELO ALUNO IAGO
TORRES CORTÊS DE SOUSA E
ORIENTADA PELA PROFA. DRA.
KARINA COGO MÜLLER

Piracicaba

2021

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Odontologia de Piracicaba
Marilene Girello - CRB 8/6159

So85e Sousa, Iago Torres Cortês de, 1996-
Efeitos da simvastatina na via do mevalonato e na expressão de genes da síntese e da resposta ao estresse de parede celular em *Staphylococcus aureus* / Iago Torres Cortês de Sousa. – Piracicaba, SP : [s.n.], 2021.

Orientador: Karina Cogo Müller.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Simvastatina. 2. *Staphylococcus aureus*. 3. Reposicionamento de medicamentos. 4. Agentes antibacterianos. 5. Expressão gênica. I. Müller, Karina Cogo, 1980-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Effects of simvastatin on the mevalonate pathway and on the expression of genes related to cell wall synthesis and stress response in *Staphylococcus aureus*

Palavras-chave em inglês:

Simvastatin

Staphylococcus aureus

Drug repositioning

Antibacterial agents

Gene expression

Área de concentração: Farmacologia, Anestesiologia e Terapêutica

Titulação: Mestre em Odontologia

Banca examinadora:

Karina Cogo Müller [Orientador]

Luciana Salles Branco de Almeida

Aline Rogéria Freire de Castilho

Data de defesa: 23-08-2021

Programa de Pós-Graduação: Odontologia

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0002-1931-7644>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/4786208368191526>



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Faculdade de Odontologia de Piracicaba

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Dissertação de Mestrado, em sessão pública realizada em 23 de agosto de 2021, considerou o candidato IAGO TORRES CORTÊS DE SOUSA aprovado.

PROF^a. DR^a. KARINA COGO MÜLLER

PROF^a. DR^a. LUCIANA SALLES BRANCO DE ALMEIDA

PROF^a. DR^a. ALINE ROGÉRIA FREIRE DE CASTILHO

A Ata da defesa, assinada pelos membros da Comissão Examinadora, consta no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa da Unidade.

DEDICATÓRIA

Aos que estão comigo nas trincheiras da vida.

“- Quem está ao teu lado nas trincheiras?

- E isso importa?

- Mais do que a própria guerra.”

Ernest Hemingway.

AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Odontologia de Piracicaba, na pessoa do diretor, Prof. Dr. Francisco Haiter Neto.

Ao Departamento de Biociências da FOP-UNICAMP, na pessoa de seu Chefe Profa. Dra. Cíntia Pereira Machado Tabchoury.

Aos professores das Áreas de Fisiologia e Biofísica e Farmacologia, Anestesiologia e Terapêutica, Profa. Dra. Fernanda Klein Marcondes, Prof. Dr. Yuri Martins Costa, Prof. Dr. Francisco Carlos Groppo, Profa. Dra. Michelle Franz Montan Braga Leite e Profa. Dra. Karina Cogo-Müller.

À Coordenadoria de Pós-Graduação (CPG) da FOP-UNICAMP, na pessoa de sua coordenadora Profa. Dra. Karina Gonzales Silvério Ruiz

Ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia, na pessoa de sua coordenadora Profa. Dra. Michelle Franz Montan Braga Leite.

À área de Periodontia (departamento de Prótese e Periodontia) pelo suporte ao desenvolvimento deste trabalho, na pessoa do Prof. Dr. Renato Corrêa Viana Casarim e sua orientanda Camila Schmidt Stolf.

À área de Microbiologia e Imunologia (departamento de Diagnóstico Oral) pelo suporte ao desenvolvimento deste trabalho, na pessoa da Profa. Dra. Renata de Oliveira Mattos Graner, aos alunos Victor Aragão Abreu de Freitas, Hassan Naveed, Eduardo Martinelli Franco e Geovanny Cuya Salvatierra e à técnica dos laboratórios da área Valéria Alessandra Prado Defavari Franco.

Aos professores das bancas de qualificação de primeira e de segunda fase, bem como da banca de defesa, Profa. Dra. Renata de Oliveira Mattos Graner, Profa. Dra. Janaína de Cássia Orlandi Sardi, Profa. Dra. Patricia Oliveira de Lima, Profa. Dra. Luciana Salles Branco de Almeida e Profa. Dra. Aline Rogéria Freire de Castilho pelas valiosas contribuições neste trabalho.

À técnica do laboratório de Farmacologia, Anestesiologia e Terapêutica, Eliane Melo, pela solicitude e orientações.

À Sra. Érica Alessandra Sinhoreti, à Sra. Ana Paula Carone e à Sra. Raquel Quintana Sachi e Leandro Viganó, membros da CPG da FOP-UNICAMP, e à Srta. Elisa dos Santos, secretária do PPG-O da FOP-UNICAMP pela cordialidade, solicitude e presteza de seus serviços.

Às agências de fomento à pesquisa. O presente trabalho foi realizado com apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), processo nº 2018/20593-0, do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), processo nº 131737/2019-8 e da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de financiamento 001.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

À Deus, pelo dom da vida, pela força e coragem para realização deste projeto.

À minha mãe, pai e irmãos, que torcem pelo meu sucesso e que de maneiras distintas me possibilitaram chegar até aqui, com amor e respeito: Rita Célia Torres Cortês de Sousa, José Edmilson Oliveira de Sousa, Higo Fernando Torres Cortês de Sousa e Alex Antônio Torres Cortês de Sousa.

À toda minha família Torres Cortês, pelos momentos de lazer, conforto e respeito, representada pelos meus avós, Clementino Paulo Cortez (*in memoriam*) e Maria do Carmo Costa Cortez (*in memoriam*). Sem o discernimento de vocês, com ideais à frente de seu tempo, nada disso seria possível.

À família Oliveira de Sousa, pelo apoio, suporte e momentos vividos.

Aos amigos que caminham comigo nesta jornada de pós-graduação, em especial os que convivem comigo dividindo experiências, moradia e a vida: Ana Ferreira Souza, Aylla Mesquita Pestana, Camilla Karoline de Carvalho Beckman e Márcio Santos de Carvalho.

Às amigas conquistadas nesse período de mestrado, em especial Ademir Melo Leite Filho, Diego Romário da Silva, Ive Barteli Camatta, Kátia de Pádua Silva, Larissa Pavanello, Rafaela Durrer Parolina de Carvalho, Rosana Rodrigues Marana e Sindy Magri Roque.

À minha orientadora, Profa. Dra. Karina Cogo-Müller, por todos os ensinamentos, conhecimento, sensibilidade, paciência, respeito e confiança nesta jornada tão desafiadora para mim.

EPÍGRAFE

“Há uma estrada de pedra que passa na fazenda
É teu destino, é tua senda, onde nascem tuas canções.
As tempestades do tempo que marcam tua história
Fogo que queima na memória e acende os corações.”

Mauricio Santini e Paula Fernandes.

RESUMO

Introdução: A sinvastatina é um fármaco hipolipemiante associado a melhorias nas condições cardiovasculares de pacientes afetados por dislipidemias. Em células humanas, atua inibindo a enzima 3-Hidroxi-3-MetilGlutaril Coenzima-A Redutase (HMG-CoA Redutase), reduzindo a síntese de colesterol, em uma via conhecida como “via do mevalonato”. Nos últimos anos, têm sido reportados vários efeitos não-lipídeo relacionados, associados à sinvastatina, os chamados efeitos pleiotrópicos como a atividade antimicrobiana, sendo o *Staphylococcus aureus* uma das bactérias mais sensíveis ao fármaco. **Objetivo:** Investigar o efeito da sinvastatina sobre a via de produção de mevalonato e sobre a expressão de genes relacionados à síntese de peptidoglicanos e à produção de fatores de virulência em resposta ao estresse de parede celular em cepas de *S. aureus*. **Material e Métodos:** *S. aureus* ATCC 29213 e ATCC 33591 foram expostos a concentrações inibitórias e subinibitórias de sinvastatina na presença de mevalonato exógeno em diferentes concentrações (25 µM, 100 µM, 200 µM, 500 µM e 1 mM) e o crescimento bacteriano foi acompanhado durante 24 horas. Ainda, *S. aureus* ATCC 29213 foi submetido ao tratamento com uma concentração subinibitória de sinvastatina (7,8 µg / mL) durante 6 horas e ensaios de análise de expressão gênica relativa foram conduzidos para avaliar a influência do tratamento nos genes envolvidos na síntese de peptidoglicano (*uppS*, *uppP* e *murG*), bem como na resposta ao estresse de parede celular (*vraX*, *sgtB* e *tcaA*). **Resultados:** A adição de mevalonato conseguiu reverter de maneira parcial ou total a inibição causada pela sinvastatina em cepas de *S. aureus* ATCC 29213 e ATCC 33591 ($p < 0,05$. ANOVA 2 fatores – Bonferroni). Para as concentrações inibitórias de sinvastatina (31,25 µg / mL para *S. aureus* ATCC 29213 e 62,5 µg / mL para ATCC 33591), as maiores concentrações de mevalonato (1 mM, 500 µM e 200 µM na cepa 29213 e 1 mM, 500 µM, 100 µM e 25 µM para 33591) reverteram de forma parcial o crescimento bacteriano. Para as concentrações subinibitórias de sinvastatina (15,62 µg / mL e 7,8 µg / mL para ATCC 29213, e 31,25 µg / mL para ATCC 33591), a adição de menores concentrações de mevalonato (500 µM, 200 µM, 100 µM e 25 µM) promoveu reversão total ou parcial do crescimento bacteriano. A concentração de sinvastatina a 15,65 µg / mL, não promoveu efeito inibitório na cepa 33591. Adicionalmente, foi observado aumento de 28 vezes na expressão do gene *vraX* ($p < 0,001$. Teste *t de student*) e uma redução de 30% na expressão de *murG* ($p < 0,05$. Teste *t*). Foi observada, ainda, uma redução de 10% na expressão do gene *tcaA* e um aumento de 2 vezes em *uppS*, porém sem significância estatística, não havendo alteração na expressão de *sgtB* e *uppP*. **Conclusão:** A inibição causada pela sinvastatina foi revertida total ou parcialmente pela adição de diferentes concentrações de mevalonato. Ainda, sinvastatina promoveu aumento na expressão do gene *vraX* e redução em *murG*. Os resultados do presente estudo fornecem evidências adicionais para o entendimento do mecanismo de ação antimicrobiano da sinvastatina.

Palavras-chave: Sinvastatina; *Staphylococcus aureus*; Reposicionamento de medicamentos; Agentes antibacterianos; Expressão gênica.

ABSTRACT

Background: Simvastatin is a lipid-lowering drug associated with improvements in cardiovascular conditions in patients affected by dyslipidemia. In human cells, it acts by inhibiting the enzyme 3-Hydroxy-3-MethylGlutaryl Coenzyme-A Reductase (HMG-CoA reductase), reducing cholesterol synthesis, in a pathway known as the “mevalonate pathway”. In recent years, several non-lipid related effects associated with simvastatin have been reported, the so-called pleiotropic effects such as antimicrobial activity, with *Staphylococcus aureus* being one of the most sensitive bacteria to the drug.

Objective: To investigate the effect of simvastatin on the mevalonate pathway and on the expression of genes related to peptidoglycan synthesis and the production of virulence factors in response to cell wall stress in *S. aureus* strains. **Material and Methods:** *S. aureus* ATCC 29213 and ATCC 33591 were exposed to inhibitory and subinhibitory concentrations of simvastatin in the presence of exogenous mevalonate at different concentrations (25 μ M, 100 μ M, 200 μ M, 500 μ M and 1 mM) and growth bacterial was followed for 24 hours. Furthermore, *S. aureus* ATCC 29213 was subjected to treatment with a sub-inhibitory concentration of simvastatin (7.8 μ g / mL) for 6 hours and relative gene expression analysis assays were conducted to evaluate the influence of the treatment on genes involved in the synthesis of peptidoglycan (*uppS*, *uppP* and *murG*) as well as in response to cell wall stress (*vraX*, *sgtB* and *tcaA*). **Results:** The addition of mevalonate was able to partially or completely reverse the inhibition caused by simvastatin in *S. aureus* ATCC 29213 and ATCC 33591 strains ($p < 0.05$. 2-way ANOVA – Bonferroni). For inhibitory concentrations of simvastatin (31.25 μ g / mL for *S. aureus* ATCC 29213 and 62.5 μ g / mL for ATCC 33591), the highest concentrations of mevalonate (1 mM, 500 μ M and 200 μ M in strain 29213 and 1 mM, 500 μ M, 100 μ M and 25 μ M for 33591) partially reversed bacterial growth. For subinhibitory concentrations of simvastatin (15.62 μ g / mL and 7.8 μ g / mL for ATCC 29213, and 31.25 μ g / mL for ATCC 33591), the addition of lower concentrations of mevalonate (500 μ M, 200 μ M, 100 μ M and 25 μ M) promoted total or partial reversion of bacterial growth. Simvastatin concentration at 15.65 μ g / mL did not promote an inhibitory effect on strain 33591. Additionally, a 28-fold increase in *vraX* gene expression was observed ($p < 0.001$. Student t test, unpaired, two-tailed) and a 30% reduction in *murG* expression ($p < 0.05$. t-test). It was also observed a 10% reduction in *tcaA* gene expression and a 2-fold increase in *uppS*, but without statistical significance, with no change in *sgtB* and *uppP* expression. **Conclusion:** The inhibition caused by simvastatin was totally or partially reversed by the addition of different concentrations of mevalonate. Furthermore, simvastatin promoted an increase in the expression of the *vraX* gene and a reduction in *murG*. The results of the present study provide additional evidence for understanding simvastatin's antimicrobial mechanism of action.

Key-words: Simvastatin; *Staphylococcus aureus*; Drug repositioning; Anti-bacterial agents. Gene expression.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 REVISÃO DA LITERATURA	16
2.1 As estatinas e o uso terapêutico no controle do colesterol humano.....	16
2.2 O colesterol e a via do mevalonato humana	17
2.3 A sinvastatina.....	20
2.4 Os efeitos pleiotrópicos e a atividade antimicrobiana	21
2.5 <i>Staphylococcus aureus</i> e a via do mevalonato bacteriana	23
2.6 A produção de peptidoglicano e a resposta de <i>S. aureus</i> ao estresse de parede celular ..	26
3 PROPOSIÇÃO	29
Objetivo Geral:	29
Objetivos Específicos:	29
4. MATERIAL E MÉTODOS	30
4.1 Microrganismos utilizados e condições de cultivo	30
4.2 Substâncias testadas	30
4.3. Ensaio do efeito do mevalonato exógeno na inibição bacteriana induzida pela sinvastatina.....	31
4.3.1 Concentrações das substâncias e grupos testados	31
4.4 Avaliação da expressão de genes relacionados com a formação de peptidoglicano e de genes associados à resposta ao estresse de parede celular em <i>S. aureus</i>	32
4.4.1 Substâncias utilizadas e grupos testados	33
4.4.2 Construção dos primers	33
4.4.3 Extração de RNA e transcrição reversa.....	35
4.4.4 Análise da expressão gênica.....	35
4.4.5 O método do Cq comparativo	36
4.5 Análise Estatística.....	37
5. RESULTADOS	38
5.1 A adição de mevalonato conseguiu reverter de maneira parcial ou total a inibição causada pela sinvastatina em cepas de <i>S. aureus</i> ATCC 29213 e ATCC 33591.....	38
5.2 A sinvastatina promoveu alterações na expressão dos genes <i>vraX</i> e <i>murG</i> em <i>S. aureus</i> ATCC 29213.....	41
6. DISCUSSÃO	43
7. CONCLUSÃO.....	50
REFERÊNCIAS	51
ANEXO 1- RELATÓRIO DE SIMILARIDADE.....	69

1 INTRODUÇÃO

As estatinas constituem um grupo de fármacos hipolipemiantes relacionados com a diminuição da morbidade e mortalidade cardiovascular (Davidson, 2002; Cziraky et al., 2008; Sociedade Brasileira de Cardiologia, 2017). Atuam nas células eucarióticas como inibidores competitivos da enzima 3-Hidroxi-3-MetilGlutaril Coenzima-A Redutase (HMG-CoA Redutase), reduzindo a síntese de colesterol, em uma via conhecida como “via do mevalonato” (Endo et al., 1976; Goldstein e Brown, 1990; Endo, 2004). Como consequência desta inibição, promovem a redução dos níveis da lipoproteína de baixa densidade (do inglês, *Low Density Lipoprotein, LDL*), além de uma discreta redução nos níveis de triglicérides plasmáticos e um pequeno aumento nos níveis de lipoproteínas de alta densidade (do inglês, *High Density Lipoprotein, HDL*) (Isley et al., 2006; Miller et al., 2006; Sociedade Brasileira de Cardiologia, 2017).

Além de seus efeitos clínicos cardiovasculares (Isley et al., 2006; Miller et al., 2006), as estatinas têm sido associadas a outros efeitos, não lipídeos-relacionados, chamados de efeitos pleiotrópicos, como atividade antioxidante (Matalka et al., 2013), anticarcinogênica (Park et al., 2013; Yu X et al., 2013; Iannelli et al., 2018), antimicrobiana (Jerwood et al., 2008; Bergman et al., 2011; Graziano et al., 2015; Thangamani et al., 2015), entre outros.

Apesar de vários estudos relatarem o potencial antimicrobiano das estatinas, seu mecanismo de ação antimicrobiano ainda permanece desconhecido e parece ser tanto estatina-específica, visto que nem todas as estatinas apresentam potencial de inibição bacteriana, como espécie-específica, visto que bactérias como *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* apresentam-se resistentes a estes fármacos enquanto *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Bacillus anthracis* e *Moraxella catarrhalis*, entre outros, são sensíveis (Bergman et al., 2011; Graziano et al., 2015; Jerwood et al., 2008; Thangamani et al., 2015).

Dentre as estatinas, a sinvastatina tem disso relatada como o fármaco da classe com maior potencial antibacteriano, atuando como fármaco bacteriostático ou bactericida, de acordo com a concentração, com capacidade inibitória tanto em células planctônicas quanto em biofilmes (Jerwood et al., 2008; Bergman et al., 2011; Thangamani et al., 2015; Graziano, et al., 2015).

Staphylococcus aureus, bactéria aeróbica Gram-positiva presente na pele de indivíduos saudáveis, mas também relacionada a infecções hospitalares, comunitárias e à

crescente capacidade de resistência a antimicrobianos (Lakhundi e Zhang, 2018), já demonstrou ser sensível à ação da sinvastatina em concentrações em torno de 15,65µg/mL e 31,25 µg/mL, a depender da cepa (Graziano et al., 2015). Um importante ponto que diferencia algumas bactérias sensíveis das resistentes à ação da sinvastatina é a forma de obtenção de isoprenoides, substâncias fundamentais para a formação da parede celular bacteriana. Os isoprenóides são essenciais para síntese do peptidoglicano devido à obrigatoriedade da incorporação do isoprenoide undecaprenil fosfato no início da via metabólica de formação de peptidoglicano ainda em níveis citoplasmáticos (Matsumoto et al., 2016). Segundo esses autores, cepas de *S. aureus* mutantes para o gene *mvaA*, responsável pela produção do mevalonato, tiveram alterações na formação da parede celular (Matsumoto et al., 2016).

Bactérias como *S. aureus* possuem a via do mevalonato para obtenção desses isoprenoides, via considerada comum a espécies de eucariotos, algumas bactérias e arqueias. No entanto, bactérias como *E. coli*, resistente à sinvastatina, possuem a via alternativa do metileritritol-fosfato (MEP) para obtenção desses isoprenoides, evolutivamente considerada uma via metabólica mais recente (Hammond e White, 1970; Wilding et al., 2000; Balibar et al., 2009; Lombard e Moreira, 2011; Heuston et al., 2012; Perez-Gil e Rodríguez-Concepción, 2013; Matsumoto et al., 2016).

Além das diferentes vias para obtenção de isoprenoides de parede celular (Lombard e Moreira, 2011), foi sugerida uma outra possível razão para as diferentes susceptibilidades bacterianas às estatinas, como por exemplo a constituição da parede celular, sugerindo que bactérias Gram-positivas seriam sensíveis enquanto as Gram-negativas apresentar-se-iam resistentes (Thangamani et al., 2015). No entanto, estudos mostraram a capacidade inibitória da sinvastatina contra espécies de *Porphyromonas gingivalis* e *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, bactérias Gram-negativas (Emami et al., 2014; Ko et al., 2017; Kaminska et al., 2019; Carvalho, 2019).

As evidências de atividade antimicrobiana da sinvastatina (Jerwood et al., 2008; Bergman et al., 2011; Thangamani et al., 2015; Graziano et al., 2015; Ko et al., 2017) tem possibilitado a discussão sobre o reposicionamento deste fármaco no tratamento de infecções. O reposicionamento de fármacos é uma estratégia para identificar novos usos, não descritos na bula, para medicamentos já aprovados por agências reguladoras (Ashburn e Thor, 2004; Pushpakom et al., 2019) e tem sido cada vez mais estimulado em virtude da redução na descoberta de novas moléculas com atividade antimicrobiana, bem como em virtude do tempo

e da quantidade de recursos necessários para que uma nova droga seja lançada no mercado (Konreddy et al., 2019).

Ainda a realização de estudos relacionados ao reposicionamento da sinvastatina contra *S. aureus* pode ajudar, além do entendimento de seu mecanismo de ação antimicrobiano e seu possível uso terapêutico para este fim, no melhor entendimento dos mecanismos de virulência e adaptação de *S. aureus*, bem como no risco de resistência antimicrobiana pelo uso contínuo da sinvastatina.

Diante disto, partindo do pressuposto de que a sinvastatina possa interferir na via do mevalonato bacteriano de maneira semelhante a seu mecanismo de ação relatado para os seres humanos (Endo et al., 1976; Goldstein e Brown, 1990; Endo, 2004; Isley et al., 2006; Miller et al., 2006), resultando em redução ou interrupção da produção de mevalonato, essencial para a síntese de isoprenoides de parede celular em *S. aureus* (Matsumoto et al., 2016), este estudo buscou investigar o efeito da sinvastatina sobre a via do mevalonato bacteriano através da avaliação do efeito da adição de mevalonato em bactérias tratadas com sinvastatina. Ainda, sabendo que bactérias como *S. aureus* respondem à situações que comprometam a homeostase celular (Gao et al., 2007), buscou-se avaliar também possíveis influências do tratamento com sinvastatina sobre a expressão de genes relacionados à produção (*uppS*, *uppP* e *murG*) e resposta de *S. aureus* ao estresse de parede celular (*vraX*, *sgtB* e *tcaA*) (Kuroda et al., 2003; Balibar et al., 2006; Scherl et al., 2006; McCallum et al., 2011; Heuston et al., 2012; Matsumoto et al., 2016; Kawakami e Fujisaki, 2018) uma vez que a via do mevalonato em *S. aureus* está relacionada à síntese de peptidoglicano (Matsumoto et al., 2016).

A hipótese desse estudo é de que a sinvastatina atue interferindo na via do mevalonato bacteriano e que esta interferência resulte em alterações na expressão de genes relacionados à formação da parede celular, bem como na regulação positiva de genes de resposta ao estresse de parede. Ainda, hipotetizamos que a capacidade inibitória da sinvastatina sobre *S. aureus* possa ser revertida pela adição de mevalonato no meio de cultura contendo bactérias tratadas com o fármaco.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 As estatinas e o uso terapêutico no controle do colesterol humano

As estatinas constituem um grupo de fármacos hipolipemiantes, relacionados com a diminuição da morbidade e mortalidade cardiovascular (Davidson, 2002; Cziraky et al., 2008). Atualmente, fazem parte deste grupo a lovastatina, sinvastatina, pravastatina, fluvastatina, atorvastatina, rosuvastatina e pitavastatina (Hennessy et al., 2016; Sociedade Brasileira de Cardiologia, 2017; FDA, 2021; ANVISA, 2021). Nas células eucarióticas, esses fármacos atuam como inibidores competitivos da enzima 3-Hidroxi-3-MetilGlutaril Coenzima-A Redutase (HMG-CoA Redutase), uma enzima-chave para a síntese de colesterol, dentre outros produtos, presente em uma via metabólica conhecida como “via do mevalonato I” (Goldstein e Brown, 1990; Endo et al., 1976; Endo, 2004).

Estruturalmente, as estatinas assemelham-se a um intermediário meio-reduzido, o Hidroxi-Metil-Glutaril (HMG), da Hidroxi-Metil-Glutaril Coenzima-A (HMG-CoA), competindo com este produto pela ligação com a enzima HMG-CoA Redutase. Por serem inibidores competitivos, em teoria, a ligação das estatinas com a HMG-CoA Redutase pode ser revertida com o aumento da concentração do substrato natural HMG, porém a afinidade das estatinas com a HMG-CoA Redutase é cerca de 10^5 vezes maior que a do substrato natural, tendo efeito em escala nanomolar enquanto o substrato natural desempenha função nas células em escala micromolar, possuindo baixo potencial para deslocar as estatinas ligadas à HMG-CoA Redutase (Endo et al., 1976; Corsini et al., 1995; Endo, 2004).

Historicamente, a mevastatina (também conhecida por compactina) foi a primeira droga inibidora da HMG-CoA Redutase, descoberta no início da década de 70 e extraída do fungo *Penicillium citrinum* (Endo et al, 1976; Endo, 2004), porém sem indicação de uso em pacientes atualmente (Sociedade Brasileira de Cardiologia, 2017; ANVISA, 2021; FDA, 2021). A lovastatina foi descoberta em seguida, sendo uma substância natural derivada do fungo *Aspergillus terreus* (Endo, 2004). A sinvastatina surgiu depois baseada na lovastatina, diferenciando-se pela adição de um grupo metil, tornando o fármaco mais lipofílico e potente (Sirtori, 1990), sendo, portanto, um composto semi-sintético (Endo, 2004). Tanto a lovastatina quanto a sinvastatina possuem uma estrutura química que as classificam como pró-drogas, necessitando de metabolismo prévio para tornarem-se ativas e desempenharem o efeito terapêutico esperado (ambas possuem um anel lactona fechado na estrutura de ligação com a

HMG-CoA Redutase, que precisa estar aberto, sendo necessária sua clivagem no fígado ou no trato gastrointestinal) (Endo, 2004; Bersot, 2012; Sirtori, 2014).

Já a pravastatina, uma droga também semi-sintética como a sinvastatina, possui em sua estrutura o anel lactona aberto e, portanto, já é ativa sem necessidade de metabolismo prévio para seu efeito terapêutico, assim como os representantes sintéticos (tipo 2) do grupo (fluvastatina, atorvastatina, rosuvastatina e pitavastatina), que vieram em seguida (Endo et al., 1976; Corsini et al., 1995; Endo, 2004; Bersot, 2012; Sirtori, 2014; Iannelli et al., 2018).

Como principais efeitos terapêuticos das estatinas, tem-se a redução do colesterol intracelular e, consequentemente, da biossíntese da lipoproteína de baixa densidade (LDL-colesterol) (Isley et al., 2006; Miller et al., 2006), cujo principal componente é o colesterol (Sociedade Brasileira de Cardiologia, 2017). O excesso de LDL-colesterol aumenta o risco de aterosclerose, doença associada com a epidemiologia de doenças cardiovasculares como infarto agudo do miocárdio, angina de peito, morte súbita, insuficiência cardíaca e acidente vascular encefálico (Sociedade Brasileira de Cardiologia, 2017). Adicionalmente, promovem em menor extensão a redução dos triglicerídios plasmáticos e aumento da lipoproteína de alta densidade (HDL-colesterol) (Isley et al., 2006; Miller et al., 2006; Sociedade Brasileira de Cardiologia, 2017).

Terapeuticamente, estes fármacos hipolipemiantes são associados também a medidas não-farmacológicas para o tratamento das dislipidemias, tais como: controle da dieta, perda de peso, cessação do tabagismo e alcoolismo, bem como prática de atividade física (Sociedade Brasileira de Cardiologia, 2017).

2.2 O colesterol e a via do mevalonato humana

Clinicamente, existem quatro tipos principais de lipídeos no organismo humano: o colesterol, precursor de vitamina D, ácidos biliares, hormônios esteroides e constituinte de membranas celulares; os triglicérides, relacionados ao armazenamento de energia e formados a partir de ácidos graxos e glicerol; os fosfolipídeos, constituintes das membranas celulares; e os ácidos graxos, que podem ser saturados, monoinsaturados e polinsaturados (Guyton e Hall, 2011; Sociedade Brasileira de Cardiologia, 2017).

O colesterol, em especial, pode ser obtido tanto da dieta (via exógena), quanto das células do fígado, principalmente (via endógena) (Magalhães, 2010) e circula pelo corpo, através do sangue, associados a proteínas denominadas apolipoproteínas, formando as lipoproteínas. Existem quatro tipos principais de lipoproteínas: as lipoproteínas de densidade muito baixa (do inglês, VLDL); as de densidade intermediária (IDL); as de baixa densidade

(LDL); e as de alta densidade (HDL) (Sociedade Brasileira de Cardiologia, 2017). O colesterol é comumente ligado às LDLs, responsáveis por seu transporte para os tecidos, ou às HDLs, responsáveis pelo chamado “transporte reverso do colesterol”, que resulta na captura do colesterol dos tecidos periféricos e o transporta de volta para o fígado (Sociedade Brasileira de Cardiologia, 2017).

A via endógena de produção de colesterol (figura 1) é resultado de uma série de reações enzimáticas presentes na chamada “via do mevalonato I” (Goldstein et al., 1990; Iannelli et al., 2018). Nos eucariotos, a via inicia-se com a ligação do Acetil-CoA com Acetoacetil-CoA pela ação da enzima HMG-CoA sintetase dando origem à HMG-CoA (Goldstein e Brown, 1990), que por sua vez sofre redução pela enzima HMG-CoA Redutase dando origem ao mevalonato. O mevalonato sofre fosforilação e é transformado em mevalonato 5-fosfato (mevalonato-P) pela mevalonato kinase (MK). Em seguida, a fosfomevalonato kinase (PMK) transforma o mevalonato-P em mevalonato 5-difosfato (mevalonato PP). O mevalonato PP é transformado em isopentenil pirofosfato (IPP), o primeiro isoprenoide da via, pela enzima difosfo-mevalonato decarboxilase. Então, o IPP é convertido em dimetilalil pirofosfato (DMAPP) pela enzima isopentenil pirofosfato isomerase (IPP-isomerase). O DMAPP é condensado com IPP formando geranyl-PP e com outro IPP para formar farnesil-PP, pela enzima farnesil pirofosfato sintase (FPPS). Por fim, a enzima escaleno sintetase (SS) converte o farnesil-PP em escaleno, que sofre 19 sucessivas reações até formar colesterol (Goldstein et al., 1990; Iannelli et al., 2018). Ainda, a via do mevalonato dá origem a outros subprodutos relacionados, por exemplo, com o processo de carcinogênese e resposta imune (Thurnher et al., 2013; Iannelli et al., 2018).

Conforme apresentado anteriormente, as estatinas atuam como inibidores competitivos da enzima HMG-CoA Redutase na via do mevalonato das células eucarióticas, reduzindo os níveis de colesterol (Goldstein e Brown, 1990; Endo et al., 1976; Endo, 2004; Isley et al., 2006; Miller et al., 2006). A redução do colesterol intracelular provoca duas respostas fisiológicas importantes: (a) um aumento na síntese de HMG-CoA e HMG-CoA Redutase, resultado de mecanismos de *feedback* (Brown e Goldstein, 1980; Goldstein e Brown, 1990); e (b) um aumento de receptores hepáticos de LDL (Bilheimer et al., 1983; Sociedade Brasileira de Cardiologia, 2017). O aumento da síntese de HMG-CoA e HMG-CoA Redutase, no entanto, não é suficiente para compensar a inibição provocada pelo uso constante das estatinas. Ainda, o aumento dos receptores hepáticos de LDL aumenta a captação hepática e consequentemente o metabolismo do colesterol (Bilheimer et al., 1983; Sociedade Brasileira de Cardiologia, 2017). A via do mevalonato humana é apresentada na figura 1.

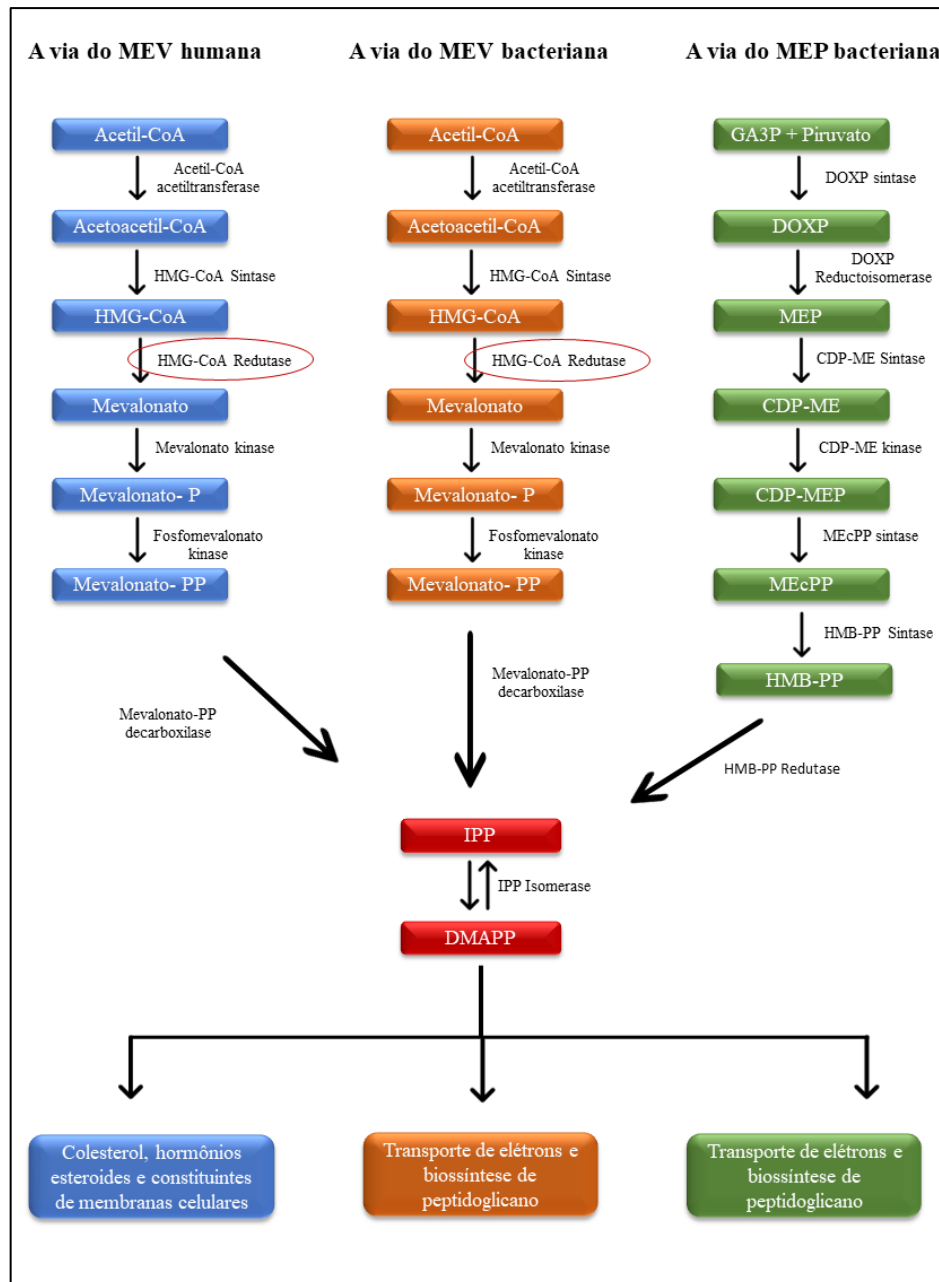


Figura 1: Representação da via do mevalonato humana (caixas em azul), bacteriana (caixas em laranja) e via do MEP bacteriana (caixas em verde), com suas respectivas enzimas até a formação de IPP e DMAPP. A enzima HMG-CoA Redutase é identificada em um círculo vermelho. Caixas vermelhas representam substratos comuns às três vias metabólicas representadas. Reações sequenciais para formação de colesterol ou peptidoglicano foram omitidas. Na via do mevalonato humana, outras substâncias são formadas além das representadas na figura. Legendas: HMG-CoA= Hidroxi-Metil-Glutaril Coenzima-A; DOXP= 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate; MEP= 2C-methyl-D-erythritol4-phosphate; CDP-ME= 4-Diphosphocytidyl-2Cmethyl-D-erythritol; CDP-MEP= 4-diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol-2-phosphate; MEcPP= 2C-methyl-D-erythritol 2,4-cyclopyrophosphate; HMB-PP= 1-hydroxy-2-methyl-2-(E)-butenyl 4-diphosphate; IPP= isopentyl diphosphate; DMAPP= dimethylalil diphosphate. Esta figura foi feita com base nos estudos de Lombard & Moreira (2011), Heuston et al., (2011) e Iannelli et al., (2018).

2.3 A sinvastatina

A sinvastatina é uma droga semi-sintética que surgiu após a lovastatina, como modificação da estrutura desta, diferenciando-se em sua estrutura química apenas na adição de um grupo metil (Sirtori, 1990), tornando-se mais lipofílica e uma inibidora mais potente da HMG-CoA Redutase (Sirtori, 2014).

Atualmente, é indicada principalmente para casos de hipercolesterolemia familiar, hipertrigliceridemia e redução de eventos cardiovasculares. A dose recomendada varia de 10 a 80 mg por dia, administrada por via oral no período da noite, sendo a dose ajustada de acordo com a meta de nível de LDL, bem como interações com outras drogas e fatores de risco cardiovasculares, como hipertensão, síndrome metabólica, tabagismo, histórico familiar de doença coronariana, entre outros (Sociedade Brasileira de Cardiologia, 2017; Talreja et al., 2020). Terapeuticamente, são recomendados 10 mg de sinvastatina para redução menor que 30% de LDL, 20 a 40 mg para redução de 30-50% de LDL e 40 mg com 10 mg de ezetimiba para redução de acima de 50% de LDL (Sociedade Brasileira de Cardiologia, 2017).

Como características farmacocinéticas, possui boa absorção intestinal (60-85%), porém sofre intenso metabolismo hepático pelo sistema CYP450 (redução de até 80%), apresentando biodisponibilidade abaixo de 5% da dose administrada. No entanto, a dose necessária para inibição da HMG-CoA Redutase é cerca de 1-2 nM de seu metabólito ativo (IC₅₀ HMG-CoA Redutase), dose menor que a necessária para lovastatina, pravastatina e fluvastatina (Sirtori, 2014).

Dentre os efeitos colaterais mais graves das estatinas de maneira geral, porém raros, estão anormalidades hepáticas como hepatite colestática e insuficiência hepática, eventos cardiovasculares como fibrilação atrial, bem como alterações musculoesqueléticas como miopatias e rabdomiólise. Estas últimas mais relacionadas com altas doses do fármaco e por período prologado de uso (80 mg nos primeiros 12 meses, idosos, associação com outros fármacos, bem como em situações predisponentes à rabdomiólise) (Forcadell-Peris e Diego-Cabanes, 2014; Sociedade Brasileira de Cardiologia, 2017; Talreja et al., 2020).

Além da redução dos níveis de LDL-colesterol e triglicérides, a sinvastatina também tem sido associada à efeitos como melhorias na função endotelial mediada por óxido nítrico, promovendo relaxamento e consequentemente melhorias no fluxo sanguíneo (Koh et al., 2002; Landmesser et al., 2004; Jones e Davidson, 2005; Guven et al., 2006; Jensen et al., 2006) e na musculatura lisa, reduzindo níveis de fatores de crescimento endotelial, associados a estabilização de placas ateromatosas (Giurgea et al., 2006; Rung et al., 2006). Ainda, recentemente foram demonstrados outros efeitos das estatinas, não lipídeo-relacionados, como

a capacidade antimicrobiana de alguns fármacos do grupo (Jerwood e Cohen, 2008; Bergman et al., 2011; Farmer et al., 2013; Thangamani et al., 2015; Graziano et al., 2015), em especial da sinvastatina que mostrou potencial de inibição bacteriana superior às outras drogas do grupo para determinadas espécies bacterianas (Graziano et al., 2015; Thangamani et al., 2015).

2.4 Os efeitos pleiotrópicos e a atividade antimicrobiana

Além da capacidade de reduzir o colesterol, as estatinas apresentam efeitos que não podem ser associados apenas às reduções lipídicas, os chamados efeitos não-lipídeo-relacionados ou efeitos pleiotrópicos, como atividade antioxidante (Matalka et al., 2013), ação anticarcinogênica (Yu X et al., 2013; Park et al., 2013), efeito anti-agregante plaquetário (Luzak et al., 2012), antiviral (Kishta et al., 2016), antimicrobiano (Jerwood e Cohen, 2008; Bergman et al., 2011; Thangamani et al., 2015; Graziano et al., 2015), entre outros.

Com relação à ação antimicrobiana, têm sido relatado um efeito protetor do uso contínuo de estatinas contra bacteremias (Kruger et al., 2006; Thomsen et al., 2006; Nseir et al., 2012), pneumonias e até mesmo sepse, muitas delas relacionadas a infecções por *S. aureus* (Liappis et al., 2001; Janda et al., 2010; McDowell et al., 2011; López-Cortés et al., 2013; Khan et al., 2013). Ainda, estudos em humanos e em modelos animais têm reportado alterações na microbiota intestinal pelo uso de estatinas, utilizadas por via oral. Um estudo observacional mostrou associação do uso de estatinas à uma redução na prevalência de disbiose intestinal (Vieira-Silva et al., 2020) e modelos animais, utilizando camundongos, mostraram alterações na proporção bacteriana de espécies do filo *Firmicutes*, ao qual pertence *S. aureus*, reduzindo sua população pelo uso de atorvastatina (Zimmermann et al., 2020) e sinvastatina (Zhang et al., 2020), com aumento na proporção de bactérias do filo *Bacteroidetes* (Zimmermann et al., 2020; Zhang et al., 2020). O filo *Firmicutes* é constituído predominantemente de espécies Gram-positivas, enquanto o *Bacteroidetes* Gram-negativas (Jandhyala et al., 2015; Schade e Weindenmaier, 2016; Seong et al., 2018)

Estudos *in vitro* mostraram que as estatinas, em especial a sinvastatina, apresentam atividade antimicrobiana contra diversas espécies bacterianas, como *S. aureus*, espécies de *Enterococcus*, *Bacillus anthracis*, *Listeria monocytogenes*, *Streptococcus pneumoniae* e *Moraxella catarrhalis* (Jerwood e Cohen., 2008; Bergman et al., 2011; Thangamani et al., 2015). No estudo de Thangamani e colaboradores (2015), todas as bactérias Gram-positivas testadas, sejam elas aeróbias ou anaeróbias, foram inibidas pela ação das estatinas. No entanto, bactérias Gram-negativas, como *Pseudomonas aeruginosa*, não foram sensíveis a nenhum dos

fármacos, sugerindo que a diferença de sensibilidade estava correlacionada ao tipo de parede celular (Thangamani et al., 2015).

No entanto, apesar da hipótese de que as estatinas, incluindo a sinvastatina, atuassem apenas em bactérias Gram-positivas e que a composição da parede celular bacteriana Gram-negativa pudesse oferecer resistência à inibição das estatinas (Thangamani et al., 2015), estudos mostraram que bactérias Gram-negativas como *Porphyromonas gingivalis*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* e *Enterobacter aerogenes* apresentaram-se susceptíveis (Emani et al., 2014; Ko et al., 2017; Kaminska et al., 2019; Carvalho, 2019). Foi observado que contra bactérias Gram-positivas, a sinvastatina tem demonstrado maior atividade inibitória e para as Gram-negativas a atorvastatina tem tido atividade similar ou até mesmo superior à sinvastatina (Ko et al., 2017).

Bergman e colaboradores (2011) testaram os efeitos de estatinas contra cepas de *S. pneumoniae*, *M. catarrhalis* e *H. influenzae*. Neste ensaio, a sinvastatina teve efeito bacteriostático para *S. pneumoniae*, *M. catarrhalis* na concentração de 15,6µg/mL. Já outras estatinas como a pravastatina e fluvastatina obtiveram atividade antimicrobiana significativamente inferior. Para *H. influenzae*, porém, nenhuma estatina teve efeito até concentrações de 250 µg/mL (Bergman et al., 2011).

O nosso grupo de pesquisa avaliou o efeito da atorvastatina, pravastatina e sinvastatina sobre o crescimento e viabilidade de espécies de *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *E. coli* e *Enterococcus faecalis* na forma planctônica e em biofilme (Graziano et al., 2015). Dentre as estatinas, a sinvastatina apresentou melhor atividade antimicrobiana, sendo capaz de inibir o crescimento de células bacterianas na forma planctônica, inibir a formação do biofilme bacteriano bem como matar o biofilme já formado, apresentando perfil de atividade semelhante à vancomicina e gentamicina e tendo como microrganismo mais sensível *S. aureus* (Graziano et al., 2015).

Algumas diferenças podem ser listadas entre as bactérias sensíveis e resistentes à ação da sinvastatina, como por exemplo a via de obtenção de isoprenoides. Estudos filogenéticos propuseram que a principal via de obtenção de isoprenoides, substâncias fundamentais à fisiologia celular de eucariotos, bactérias e arqueias, seja a via do mevalonato, considerada a via ancestral comum para esses domínios de vida (Lombard e Moreira, 2011). No entanto, no decorrer da evolução, em algumas bactérias, teria surgido uma via alternativa para obtenção dessas substâncias, a via do Metileritritol-4-Fosfato (MEP) (Lombard e Moreira, 2011; Perez-Gil et al., 2013) (Figura 1). Em bactérias como *S. aureus*, relatadas como sensíveis

à sinvastatina (Graziano et al., 2015), a via para obtenção de isoprenóides é a via metabólica do mevalonato (Matsumoto et al., 2016). Nas células bacterianas, essa via é chamada de “via do mevalonato bacteriana” ou “via do mevalonato II”, que a diferencia da “via do mevalonato I” presente, por exemplo, nas células humanas (Matsumoto et al., 2016). Bactérias como *E. coli* e *P. aeruginosa*, relatadas como resistentes à sinvastatina, não possuem a via do mevalonato e produzem isoprenóides pela via do MEP (Perez-Gil et al., 2013; Graziano et al., 2015; Thangamani et al., 2015). Sendo assim, substâncias que tenham ação sobre a via do mevalonato das bactérias (ex.: os inibidores da HMGCoA Redutase – as estatinas) teriam ação antimicrobiana específica sobre espécies bacterianas que possuem a via do mevalonato, não tendo ação sobre espécies que utilizam a via alternativa do MEP. No entanto, bactérias como a *E. coli* se mostraram sensíveis aos efeitos da sinvastatina após serem submetidas a doses subinibitórias de colistina (Thangamani et al., 2015), o que sugere que a ação das estatinas sobre a viabilidade bacteriana possa se dar por outras vias metabólicas.

Diante desses achados, a atividade antimicrobiana das estatinas parece ser tanto espécie-específica quanto estatina-específica, já que nem todas as estatinas apresentam perfis semelhantes de atividade bacteriostática e/ou bactericida, bem como espécies como *H. influenzae*, *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli* apresentaram-se resistentes aos efeitos da sinvastatina, o que dificulta o entendimento de seu possível mecanismo de ação antimicrobiano (Bergman et al., 2011; Graziano et al., 2015).

2.5 *Staphylococcus aureus* e a via do mevalonato bacteriana

S. aureus é uma bactéria aeróbica, Gram-positiva e comumente presente de forma comensal e assintomática em seres humanos saudáveis, principalmente na pele e em regiões mucosas como a mucosa nasal (Gould e Chamberlaine, 1995; Wertheim et al., 2005; Lakhundi e Zhang, 2018). No entanto, é também uma das causas mais comuns de infecções em humanos, estando associado a infecções hospitalares e comunitárias (Diekema et al., 2001; Boucher e Corey, 2008; Smidt et al., 2015; Lakhundi e Zhang, 2018; He e Wunderink, 2020), além de infecções de pele (Krishna e Miller, 2012; Iwamoto et al., 2019), do trato respiratório (He e Wunderink, 2020), endocardite (Galar et al., 2019; Horino e Hori, 2020), entre outras. Descoberto por volta dos anos 1880 (Ogston, 1881; Ogston, 1882; Cowan et al., 1954), tem demonstrado uma alta capacidade de desenvolvimento de resistência à antibióticos, como o aparecimento de cepas resistentes às penicilinas e à vancomicina (Rammelkamp e Maxon,

1942; Kirby, 1944; Lindsay e Holden, 2004; Schito, 2006; Boucher e Corey, 2008; Cameron et al., 2011; Pourmand et al., 2017; Lakhundi e Zhang, 2018).

Como já mencionado em tópicos anteriores, vários domínios de vida produzem isoprenoides para diversas funções celulares, incluindo as bactérias (Goldstein et al., 1990; Balibar et al., 2009; Lombard e Moreira, 2011; Heuston et al., 2021; Matsumoto et al., 2016; Iannelli et al., 2018). No caso específico de *S. aureus*, esta bactéria utiliza estritamente a via do mevalonato para obtenção desses isoprenoides, fundamentais na síntese de peptidoglicano de parede celular (Hammond e White, 1970; Wilding et al., 2000; Heuston et al., 2013; Matsumoto et al., 2016).

Na via de mevalonato bacteriana para a biossíntese de isoprenoides, moléculas de Acetil-CoA são transformadas em Acetoacetil-CoA pela enzima acetiltransferase (gene *atoB*), sendo posteriormente transformado em 3-hidroxi-3-metilglutarylCoA (HMG-CoA) pela HMG-CoA sintase (gene *mvaS*). Este derivado de CoA é então reduzido a mevalonato pela HMG-CoA Redutase (gene *mvaA*). No próximo passo da via, o mevalonato é fosforilado duas vezes (fosfo-mevalonato e difosfo-mevalonato), pela ação das enzimas mevalonato kinase (gene *mvaK1*) e fosfomevalonato kinase (gene *mvaK2*), respectivamente, e posteriormente é formado um precursor de 5 carbonos, isopentil difosfato (IPP) ou então seu isômero, dimetilalil difosfato (DMAPP), pela ação da difosfomevalonato decarboxylase (gene *mdp*). A reação entre IPP e DMAPP é uma reação reversível que é catalisada pela IPP isomerase (gene *ipi*) (Bochar et al., 1999; Balibar et al., 2009; Heuston et al., 2012). O IPP dá origem ao farnesil difosfato (FPP), que forma então undecaprenil difosfato (UPP) pela ação da enzima UPP sintase (gene *uppS*). Posteriormente, UPP é desfosforilado à undecaprenil fosfato (UP) pela ação da enzima UPP difosfatase (gene *uppP*) (Shimizu et al., 1998; Koyama, 1999; Kawakami e Fujisaki, 2018).

Em *S. aureus*, UP participa da formação do lipídio I, quando se liga ao pentapeptídeo do ácido N-acetil murâmico de difosfato de uridina (pentapeptídeo UDP-MurNAc) para formar N-acetilmuramil-(pentapeptídeo)-difosforil UOH (lipídio I) com a participação da enzima MraY. Depois, lipídio I reage com difosfato de uridina N-acetil glucosamina (UDP-GlcNAc) para formar N-acetilglucosaminil-N-acetilmuramil-(pentapeptídeo)-difosforil UOH (lipídio II) e uridina difosfato (UDP) pela ação de MurG (Mengin-Lecreulx et al., 1991; Bugg et al., 2006; Kawakami e Fujisaki, 2018). Lipídio II é um precursor de peptidoglicano da parede celular, um hetepolissacarídeo essencial na estrutura da mesma (Matsumoto et al., 2016; Kawakami e Fujisaki, 2018).

A figura 2 apresenta os passos da via do mevalonato bacteriana e sua importância na formação de peptidoglicano de *S. aureus*. Os genes apresentados na figura se referem especificamente aos genes de *S. aureus*.

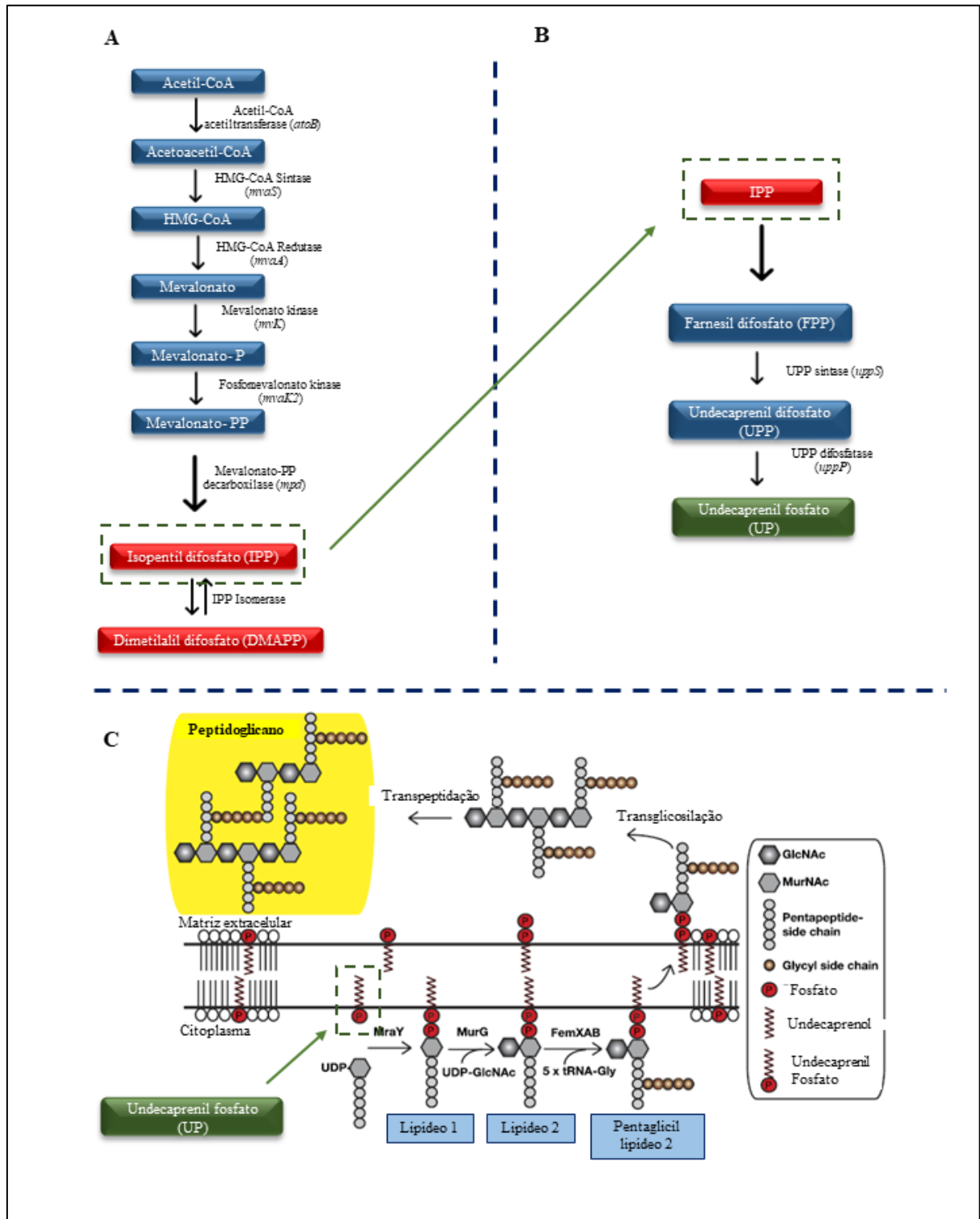


Figura 2: A via do mevalonato e a produção de peptidoglicano de *S. aureus*. Em parênteses e após estão apresentados os genes de *S. aureus* responsáveis pela produção das respectivas enzimas. (A) A via do

mevalonato bacteriana. (B) Produção de Undecaprenil fosfato em bactérias a partir do Isopentenil difosfato (IPP). (C) A participação do Undecaprenil fosfato na síntese de peptidoglicano. A figura C foi adaptada de Matsumoto et al., 2016, que possui licença de reprodução *Creative Commons*.

2.6 A produção de peptidoglicano e a resposta de *S. aureus* ao estresse de parede celular

Conforme apresentado no item anterior, o isoprenoide undecaprenil fosfato participa da formação de lipídeo 1 (figura 2), necessário para a formação de peptidoglicano de parede celular de *S. aureus* (Matsumoto et al., 2016). Além dos genes envolvidos na síntese de peptidoglicano, *S. aureus* também responde ao estresse causados na parede celular através de alterações na expressão de genes associados ou não à formação de parede celular. A exposição a antibióticos que atuam na parede celular ou que causam depleção de enzimas essenciais de síntese de parede celular desencadeia uma série de reações que visa a manutenção da viabilidade bacteriana, tais como a indução de genes e produção de proteínas de estresse (Kuroda et al, 2003).

Um dos principais fatores de resposta ao estresse em parede celular é a ativação do sistema sensor-transdutor de dois ou três componentes (VraSR ou VraTSR) (Utaida et al, 2003; Belcheva e Golemi-Kotra, 2008; Dengler et al, 2011; Dengler et al, 2016). Um sistema de dois componentes consiste em um grupo de proteínas transdutoras de sinais que respondem a alterações nas condições ambientais de um ser vivo (Stock et al., 2000; Groisman, 2016), estando relacionados à resposta adaptativa à estímulos do hospedeiro ou ambientais. Geralmente são formadas por proteínas transmembrana que sofrem autofosforilação na presença de um estímulo e emite um sinal para proteínas intracelulares regulatórias que, uma vez ativadas, se ligam a regiões regulatórias promovendo expressão de genes necessários à adaptação fisiológica (Stock et al., 2000; Gao e Stock, 2009; Capra e Laub, 2012)

O sistema VraSR controla a transcrição de até 50 genes, conhecidos coletivamente como genes de “estímulo de estresse da parede celular” (do inglês, *Cell Wall Stress Stimulon*, CWSS) (Utaida et al, 2003; Belcheva e Golemi-Kotra, 2008; Dengler et al, 2011; Dengler et al, 2016). O mais sensível indicador da ativação de CWSS em *S. aureus* é o gene *sas016* (*vraX*), produzido como resultado de diversas reações a partir da ativação do sistema VraSR (figura 3), porém com funções ainda não completamente esclarecidas (Dengler, et al, 2012).

Tais CWSS podem ser induzidos pela redução de genes relacionados à biossíntese da parede celular, como MurA, MurZ, MurB, MurF e PBP2 ou alterações na via do mevalonato

bacteriano (Gardete et al, 2006; Sobral et al, 2007; Blake et al, 2009), além de danos diretos na parede celular como pelo uso de antibióticos glicopeptídeos, beta-lactâmicos e bacitracina (Kuroda et al., 2003). O sistema também pode ser ativado pela depleção de proteínas envolvidas na divisão celular, como proteínas LCP (LytR-CpsA-Psr) (Dengler et al., 2012) e tem mostrado forte relação com a resistência de cepas *S. aureus*, como as cepas resistentes à vancomicina e aos beta-lactâmicos, participando da resposta primária bacteriana ao estresse de parede (Kuroda et al, 2003). Acredita-se que a transcrição dos genes CWSS proteja a bactéria contra os danos na parede celular, uma vez que podem estar relacionadas com a codificação de proteínas associadas à síntese da parede celular como a SgtB (Wang et al 2001; Sengupta et al, 2012), MurZ (Blake et al, 2009; Sengupta et al, 2012), PBP2 (Pinho et al, 2001; Sengupta et al, 2012), FmtA (Fan et al, 2007), entre outros.

Kuroda e colaboradores (2003) mostraram que a exposição de *S. aureus* a antibióticos de parede celular resultou no aumento da expressão dos genes *vraS*, *vraR*, *pbp2*, *sgtB*, *fmtA*, *saeS* e *coa* genes após 10 minutos de tratamento. Ainda, o mesmo estudo mostrou que o sistema VraSR parece coordenar importantes passos da biossíntese de parede celular, como a produção do monômero precursor da síntese de Mureína (MurZ) e polimerização de peptidoglicano (PBP2 e SgtB). Ainda, Balibar e colaboradores (2009) mostraram que interferências na produção de enzimas participantes da via do mevalonato de *S. aureus*, como a HMG-CoA Redutase, resultaram em aumento da expressão de genes como *sgtB* e *tcaA*, entre outros.

As proteínas VraS são tipicamente proteínas quinases transmembrana com múltiplos domínios sensitivos que detectam estímulos específicos (Gao et al., 2007; Belcheva e Golemi-Kotra, 2008; Tajbakhsh e Golemi-Kotra, 2019). Uma vez estimuladas, provocam fosforilação e consequente ativação da proteína VraR que posteriormente sofre dimerização e induz a expressão de *vraX* e dos genes CWSS (Scherl et al 2006; Belcheva e Golemi-Kotra, 2008; Eldholm et al., 2010; McCallum et al, 2011; Belcheva et al., 2012; Leonard et al, 2013; Malin et al 2017). A VraR também é uma proteína multidomínio, com um domínio N-terminal relacionado à sua fosforilação (domínio regulador) e domínio C-terminal que se liga ao DNA (domínio efetor). A VraS é ativada em um tempo médio de 10 min a partir de fatores que interfiram e causem estresse em parede celular de *S. aureus* e, uma vez ativada, causa fosforilação imediata da VraR (aproximadamente 10 segundos) (Belcheva e Golemi-Kotra, 2008; Dengler et al., 2011; Tajbakhsh e Golemi-Kotra, 2019).

A figura 3 apresenta as reações envolvidas na estimulação do sistema VraSR.

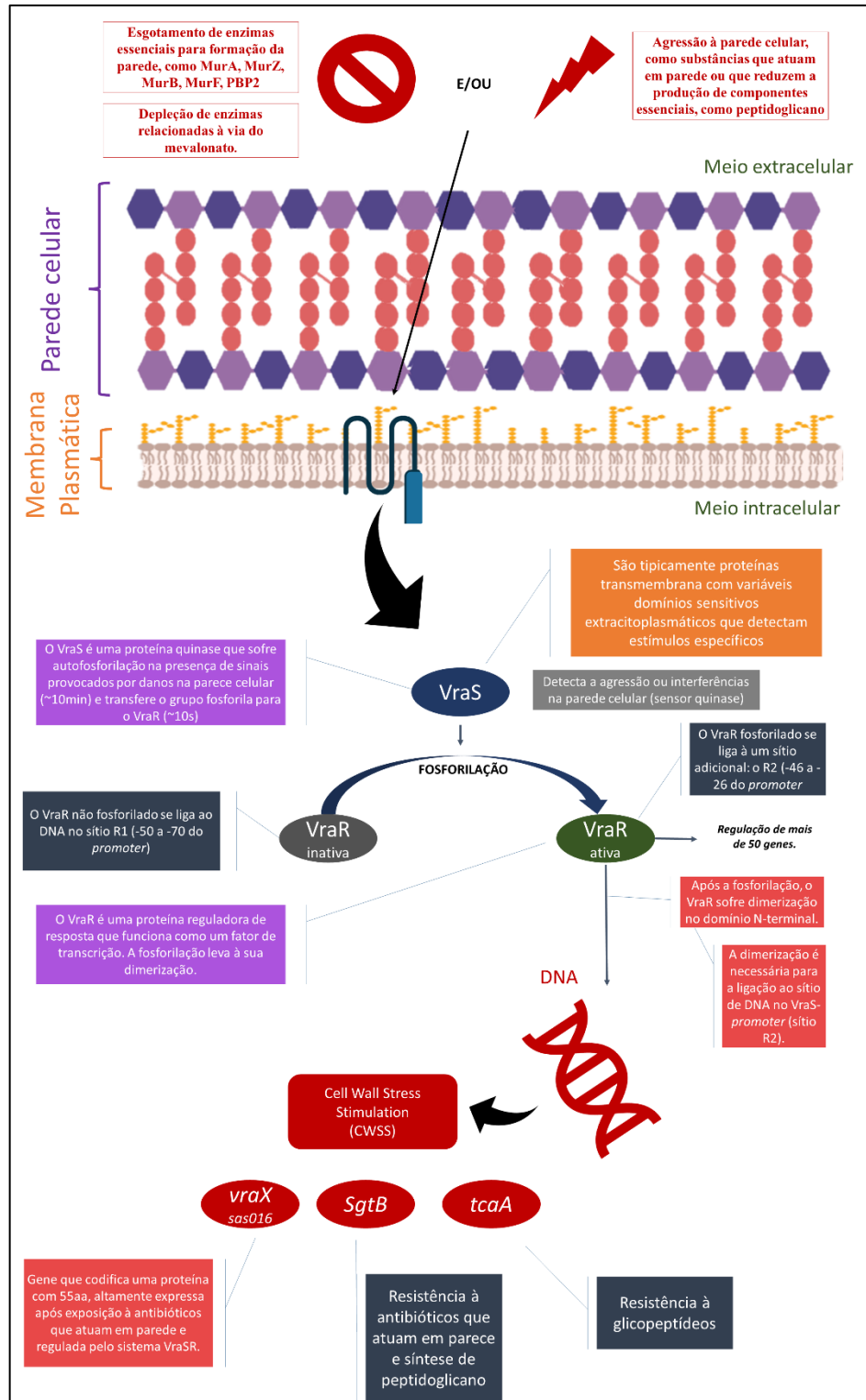


Figura 3: O VraSR percebe interferências na parede celular e induz a produção de CWSS. VraSR, do inglês, *Vancomycin resistance associated sensor/regulator*. Esta figura foi feita, em parte, utilizando a ferramenta Biorender (app.biorender.com).

3 PROPOSIÇÃO

Objetivo Geral:

O objetivo deste estudo foi investigar o efeito da sinvastatina na via de produção de mevalonato e na expressão de genes relacionados à síntese de peptidoglicanos e à produção de fatores de virulência em resposta ao estresse de parede celular em cepas de *S. aureus*.

Objetivos Específicos:

- Verificar se o efeito antimicrobiano da sinvastatina é reduzido ou revertido com a adição de mevalonato.
- Verificar alterações na expressão de genes relacionados à síntese de peptidoglicanos de parede celular.
- Verificar a expressão de genes de virulência de *S. aureus* em resposta ao estresse de parede celular.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Microrganismos utilizados e condições de cultivo

Staphylococcus aureus ATCC 29213 e ATCC 33591 (meticilina-resistente) foram utilizados para os ensaios do efeito da adição de mevalonato na inibição bacteriana induzida pela sinvastatina. Para a análise da expressão gênica na síntese de parede celular e fatores de virulência foi utilizado *S. aureus* ATCC 29213. Os organismos foram estocados em freezer -80°C, em *Brain Heart Infusion* (BHI) (KASVI, Itália) contendo 20% de glicerol (Dinâmica Química Contemporânea®, Indaiatuba, SP, BR), até serem usados nos ensaios. Todos os microrganismos testados foram reativados em *Tryptic Soy Agar* (TSA) (Difco™, Sparks, MD, USA) durante 24 horas (h), a 37 °C em estufa de aerobiose (Novatecnica, Piracicaba, SP, BR). Os inóculos bacterianos foram preparados em *Mueller Hinton Broth* (MHB) (Difco™, Sparks, MD, USA) na absorbância de 0.1 ($1-2 \times 10^8$ células) medida em espectrofotômetro de tubos (660 nm) (Único, Princeton, NJ, USA). Para os ensaios envolvendo mevalonato exógeno, o inóculo foi ajustado para $1-2 \times 10^5$ (diluição de 1000 vezes em MHB), de acordo com as normas do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2012).

4.2 Substâncias testadas

A sinvastatina (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA, PHR1438) foi a substância usada em todos os ensaios. Para o ensaio do mevalonato, foi utilizado (RS)-mevalonato (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA, 90469), com base no estudo de Matsumoto e colaboradores (2016). A sinvastatina foi diluída em dimetilsulfóxido 100% (DMSO, Êxodo científica, Sumaré, SP, BR) e o mevalonato em água destilada estéril. Para todos os experimentos, a concentração máxima final de DMSO foi de 2,5%.

As concentrações de sinvastatina utilizadas como valor de concentração inibitória mínima (CIM) foram baseadas no estudo de Graziano e colaboradores (Graziano et al., 2015) sendo as seguintes:

- Para *S. aureus* ATCC 29213: 15,65 µg/mL.
- Para *S. aureus* ATCC 33591: 31,25 µg/mL.

4.3. Ensaio do efeito do mevalonato exógeno na inibição bacteriana induzida pela sinvastatina

4.3.1 Concentrações das substâncias e grupos testados

Três concentrações de sinvastatina foram escolhidas (1xCIM, 2xCIM e 1/2xCIM), de acordo com as CIM (Graziano et al., 2015). As concentrações de mevalonato foram determinadas com base em estudos prévios que avaliaram o efeito da adição de mevalonato para compensar inibições na via do mevalonato de *S. aureus*. Várias concentrações de mevalonato foram sugeridas como suficientes para reverter a ausência de mevalonato endógeno bacteriano, tais como: 80 μM (Matsumoto et al., 2016), 200 μM (Balibar et al., 2009), 500 μM (Reichert et al., 2018) e 960 μM (Yu W et al., 2013). Diante disso, optou-se por avaliar uma ampla faixa de concentrações de mevalonato, partindo de 25 μM a 1 mM (25 μM , 100 μM , 200 μM , 500 μM e 1 mM). O ensaio foi realizado em placas de 96 poços.

Os grupos testados foram, para cada cepa bacteriana estudada:

- Grupo teste sinvastatina (SNV): MHB + inóculo bacteriano + sinvastatina nas 3 concentrações estabelecidas.
- Grupo teste mevalonato (MVL): MHB + inóculo bacteriano + sinvastatina nas 3 concentrações estabelecidas + mevalonato nas 5 concentrações estabelecidas.
- Grupo controle de inóculo bacteriano (Controle): MHB + inóculo.
- Grupo controle de veículo: MHB + inóculo + DMSO nas respectivas concentrações encontradas na utilização da sinvastatina.
- Grupo controle de contaminação: somente MHB.
- Grupo controle de turbidez dos reagentes utilizados: SNV + MVL.

Os experimentos foram realizados em quintuplicata para cada concentração de sinvastatina e de mevalonato testadas, em dois momentos diferentes. A diluição da sinvastatina foi realizada de maneira seriada para reduzir o risco de precipitação do fármaco, de acordo com as recomendações do CLSI (CLSI, 2012). As diferentes concentrações de mevalonato foram adicionadas à concentração de sinvastatina desejada. A figura 4 apresenta o desenho geral das placas de 96 poços usadas. Para cada ensaio, levando em consideração as diferentes concentrações de mevalonato requeridas, foram utilizadas 3 placas diferentes para cada cepa bacteriana testada. As placas foram incubadas em estufa de aerobiose, a 37°C, durante 24 h. O

crescimento bacteriano foi avaliado através de leitor de microplacas (660nm) (Biochrom Ltd, Cambrigde, CB, England) nos tempos: 0 h, 4 h, 8 h, 16 h e 24 h.

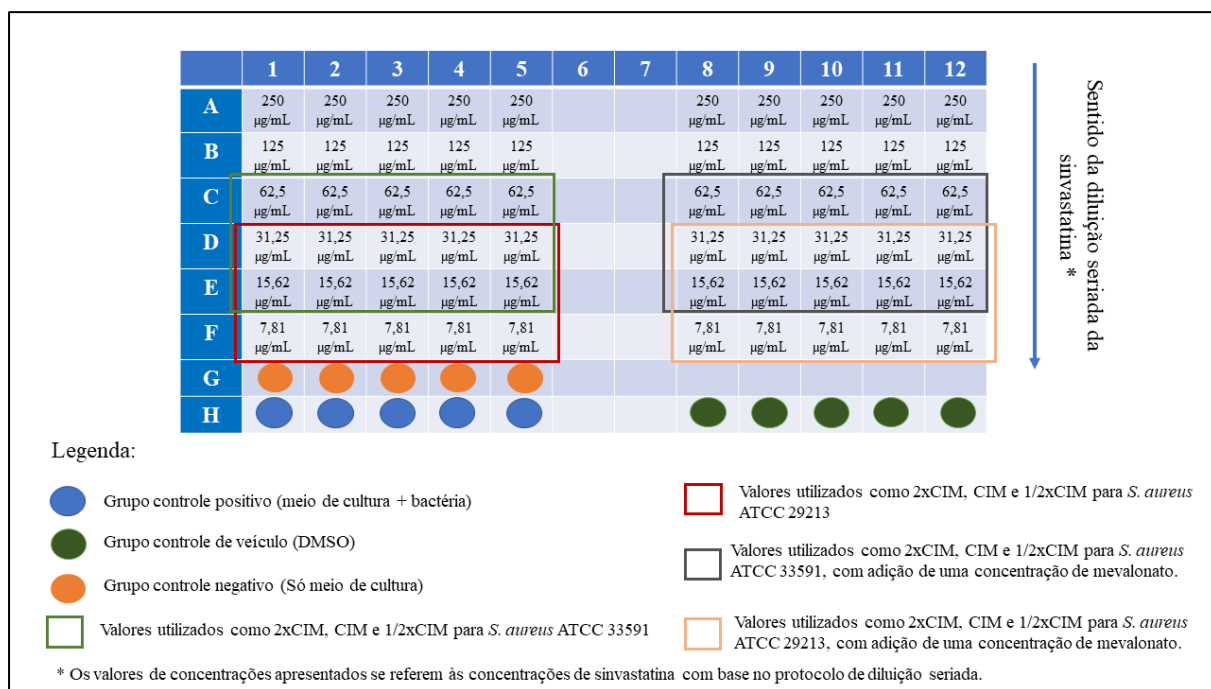


Figura 4: Desenho geral da placa utilizada no ensaio do mevalonato.

4.4 Avaliação da expressão de genes relacionados com a formação de peptidoglicano e de genes associados à resposta ao estresse de parede celular em *S. aureus*.

Com base no estudo de Heuston e colaboradores (2012) e Matsumoto e colaboradores (2016), que descrevem a cadeia de reações enzimáticas relacionadas à formação de parede celular bacteriana a partir da formação dos primeiros isoprenoides da via do mevalonato bacteriano (figura 2), foram selecionados os seguintes genes:

- *uppS*: responsável pela produção da enzima UPP sintase, que catalisa a reação de farnesil difosfato (FPP) para undecaprenil difosfato (UPP) (Kawakami e Fujisaki, 2018).

- *uppP*: responsável pela produção da enzima Upp difosfatase, que catalisa a reação de undecaprenil difosfato (UPP) para undecaprenil fosfato (UP) (Kawakami e Fujisaki, 2018).

- *murG*: que participa da formação de lipídeo 2, precursor de outros lipídeos envolvidos na formação de peptidoglicano (Matsumoto et al., 2016).

Ainda, com a finalidade de avaliar indiretamente a ação da sinvastatina sobre a formação da parede celular bacteriana ou até mesmo de um possível dano na parede celular por outras vias metabólicas ou na própria parede diretamente, avaliamos a expressão de genes relacionados à resposta de *S. aureus* ao estresse de parede celular. Para isso, três genes foram escolhidos:

- *vraX*: expresso em resposta a danos na parede celular, bem como à depleção de enzimas essenciais para formação da parede celular ou até mesmo alterações na via do mevalonato bacteriano (Scherl et al., 2006; Balibar et al., 2006; McCallum et al., 2011).
- *sgtB*: expresso em resposta a antibióticos que atuam em parede celular, como as penicilinas e associado à síntese de peptidoglicano (Kuroda et al, 2003; Balibar et al., 2009).
- *tcaA*: expresso como resposta e resistência a glicopeptídeos (Balibar et al., 2009).

4.4.1 Substâncias utilizadas e grupos testados

As bactérias (*S. aureus* ATCC 29213) foram crescidas em tubos vidro com 10 mL de meio MHB e foram expostas a concentração subinibitória de sinvastatina (1/2xCIM) para permitir mínimo crescimento bacteriano em exposição à estatina utilizada, necessário para gerar quantidades de células suficientes para os procedimentos seguintes.

Os grupos testados foram, em quintuplicata:

- Grupo teste (MHB + inóculo + sinvastatina 1/2xCIM)
- Grupo controle (MBH + inóculo)
- Grupo controle negativo (MHB, somente)

O inóculo bacteriano foi ajustado em 0.1 (660 nm), conforme explicado no item 4.1 e as bactérias foram crescidas em quintuplicata em estufa de aerobiose, a 37 °C, durante 6 h, até que o grupo controle atingisse absorvância de 0.5 (660 nm), avaliada em espectrofotômetro de tubos. A concentração de DMSO neste ensaio foi de 0,1%.

4.4.2 Construção dos primers

Para a análise da expressão gênica, a sequência de nucleotídeos dos genes pretendidos foi consultada na base de dados do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/>). A partir das sequências, os primers foram

desenhados utilizando o software Primer3 Plus (<https://primer3plus.com/>). As sequências de nucleotídeos dos primers foram verificadas quanto à homologia aos genes de *S. aureus* por meio da ferramenta *BLAST Nucleotide* (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) e os primers foram confeccionados na empresa Thermofisher Scientific® (Thermofisher Scientific, Invitrogen, Waltham, MA, EUA). O quadro 1 apresenta a sequência de nucleotídeos dos primers desenhados.

Quadro 1- Sequência de nucleotídeos dos primers desenhados. Legenda: pb = pares de bases.

Gene	Sequências <i>Forward</i> e <i>Reverse</i> .	Tamanho do produto esperado	Temperatura de anelamento	Referência
<i>uppS</i>	5' TTC GTC AAA GTC AGG CCA TA 3'	245 pb	59,3 °C	Desenhado nesse estudo
	3' ATG GTG GCA GAG CAG AAC TT 5'		59,9 °C	
<i>uppP</i>	5' GGG TCG TCG AAG GAT TAA CA 3'	154 pb	59,9 °C	Desenhado nesse estudo
	3' GCT GCA AAG ACG GAT CCT AA 5'		60,4 °C	
<i>murG</i>	5' TGG GTG GAA GCT TAG GAA GT 3'	221 pb	58,8 °C	Desenhado nesse estudo
	3' AAT CGC ATT TGA TCC AGC TC 5'		60,2 °C	
<i>vraX</i>	5' ATG AAG GCG CAC CAG TTT AT 3'	174 pb	59,6 °C	Desenhado nesse estudo
	3' AAA TTC TGG ATT ATT GGA ACG A 5'		57,6 °C	
<i>sgtB</i>	5' ACA CGC GAT AAT GTG GAT GA 3'	196 pb	60,0 °C	Desenhado nesse estudo
	3' CAC CTT GCA CAT CTC TGT CG 5'		60,5 °C	
<i>tcaA</i>	5' GCA CCT ACC AAG CAA CCA AT 3'	178 pb	60,0 °C	Desenhado nesse estudo
	3' CTG CAA AAT CAC CGT TCT CA 5'		59,8 °C	

<i>gyrB</i>	5' GGT GCT GGG CAA ATA CAA GT 3'	219 pb	60,0 °C	Desenhado nesse estudo
	3' TGG GAT ACC ACG TCC GTT AT 5'		60,1 °C	

Como gene de referência (controle endógeno), foi selecionado o gene *gyrB* (Sihto et al., 2014). Foi verificado se as condições experimentais não interferiam na expressão desse gene, requisito para que este seja considerado um controle endógeno (Applied Biosystems, 2008).

4.4.3 Extração de RNA e transcrição reversa

Após o crescimento bacteriano, as amostras foram colhidas por centrifugação (5.000g x 10 minutos) utilizando centrífuga de tubos de 15 mL (Hettich®, Kirchlengern, NW, Alemanha). O processo de extração do RNA foi realizado pelo método de coluna em sílica (Pure link RNA mini Kit, Life Technologies®, Carlsbad, CA, EUA), de acordo com as instruções contidas no manual fornecido pelo fabricante, com adição de um passo no processo de lise celular, que foi a utilização de beads de zircônia para ruptura mecânica usando o Mini BeadBeater (Biospec Products, Bartlesville, OK, USA) (dois ciclos de 30 segundos, com intervalo de 1 minutos em gelo entre cada ciclo). A concentração / pureza (A260 / 280) do RNA extraído foi analisada por espectrofotômetro (Nanodrop 2000, Thermo Scientific, Wilmington, DE, EUA). O RNA foi então tratado com DNase (DNase I, Invitrogen®, Waltham, MA, EUA) e sua concentração / pureza (A260 / 280) foi novamente analisada por espectrofotômetro. O valor de pureza considerado satisfatório foi: A260 / 280 ~ 2,0. A transcrição reversa para formação de cDNA foi realizada usando primers randômicos do kit “SuperScript IV First-Strand Synthesis System” (Invitrogen®, Waltham, MA, EUA) e um termociclador (Techne, São Paulo, SP, BR). Controles foram adicionados nos passos de tratamento com DNase e transcrição reversa para avaliar possíveis contaminações.

4.4.4 Análise da expressão gênica

A análise da expressão gênica foi avaliada através de reação em cadeia da polimerase mediada por transcrição reversa em tempo real (RT-qPCR) pelo método do Cq

comparativo ($\Delta\Delta Cq$) (Applied Biosystems, 2008). Para tal, procedimentos prévios para validar o método foram realizados, como a curva-padrão para avaliar a eficiência dos primers de todos os genes testados, bem como do gene de referência. A eficiência (E) dos primers é obtida utilizando o valor da inclinação (*slope*) da reta formada no gráfico obtido pela relação entre as concentrações de cDNA e os respectivos valores de Cq ($E=10^{-1/slope}$) e deve ser próxima entre os genes teste e o gene referência (Applied Biosystems, 2008). Para este estudo, foram considerados os genes com valores de eficiência entre 80% e 120%. A curva-padrão foi realizada com amostras de cDNA do grupo controle nas seguintes concentrações: 2 ng/ μ L, 0,4 ng/ μ L, 0,08 ng/ μ L, 0,016 ng/ μ L e 0,0032 ng/ μ L.

A reação de RT-qPCR foi, então, realizada usando o equipamento StepOne™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA), em placas de 48 poços (MicroAmp™ Fast Optical 48-Well Reaction Plate, Applied Biosystems, Waltham, MA, EUA), usando o kit PowerUp SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems, Waltham, MA, EUA). As condições do ciclo térmico foram: Ativação inicial (95°C - 10 min); 40 ciclos de denaturação (95°C - 15 s) e anelamento/extensão (60°C - 1 min), seguidos da curva de dissociação (curvas de *melting*) (95°C - 15 s; 60 °C - 1 min; 95°C - 15 s), conforme instruções do fabricante do Sybr Green. A concentração de primers usada foi de 300 nM (*forward* e *reverse*) e a concentração de cDNA das amostras foi de 2 ng/ μ L. Cada unidade amostral foi avaliada em triplicata, sendo utilizado como dados os valores finais de Cq (*quantification cycle*). Controles negativos foram inseridos em todas as reações de RT-qPCR. As curvas de *melting* foram utilizadas para avaliar presença de DNA contaminante ou dímeros de primers. Grupos tratados com ½ CIM de sinvastatina e controle (sem tratamento) para um mesmo gene, bem como controle negativo usando água ao invés de cDNA (NTC, *no template control*) e controle RT negativo usando amostras de RNA extraído sem realizar a transcrição reversa para formação de cDNA foram avaliados ao mesmo tempo e em uma mesma placa de 48 poços para reduzir risco de alterações de Cq em virtude de ensaios em tempos diferentes.

A expressão relativa de cada gene alvo foi realizada usando o método do Cq comparativo ($2^{-\Delta\Delta Cq}$) (Applied Biosystems, 2008) e a nomenclatura para os termos utilizados neste ensaio foram padronizados de acordo com o *The MIQE Guidelines* (Bustin et al., 2009).

4.4.5 O método do Cq comparativo

O método do Cq comparativo, ou “método do $\Delta\Delta Cq$ ”, trata-se de uma quantificação relativa na qual é calculada a razão da expressão gênica de uma amostra (grupo

tratamento) em relação ao grupo controle (não tratado), utilizando os valores de Cq. A fórmula para o cálculo é apresentada na figura 5. No presente experimento, o grupo tratamento é o grupo tratado com 1/2xMIC de sinvastatina enquanto o grupo controle é a bactéria sem nenhum tratamento.

Utiliza-se também para esse cálculo a expressão do gene alvo comparada ao gene referência (*gyrB*) (Sihto et al., 2014). Para o grupo controle, durante o cálculo do $\Delta\Delta Cq$, ocorre subtração do ΔCq do grupo controle pelo ΔCq dele mesmo, resultando em um $\Delta\Delta Cq = \text{zero}$. Ao elevar 2 ao número zero, tem-se o resultado de 1. Portanto, o grupo controle sempre é considerado de valor 1 e os valores apresentados pelo grupo teste se relacionam com o valor do controle para mais ou para menos.

$$\text{Expressão gênica} = 2^{-\Delta\Delta Cq}$$

Em que:

$$\Delta\Delta Cq = (\Delta Cq_1 \pm DP) - (\Delta Cq_2 \pm DP)$$

Em que:

$$\Delta Cq_1 = (\bar{x}C_{qa} \pm DP) - (\bar{x}C_{qr1} \pm DP)$$

$$\Delta Cq_2 = (\bar{x}C_{qc} \pm DP) - (\bar{x}C_{qr2} \pm DP)$$

Figura 5: Cálculo para análise de expressão gênica relativa. Legenda: ΔCq_1 = ΔCq do grupo tratado; ΔCq_2 = ΔCq do grupo controle; $\bar{x}C_{qa}$ = média de Cq do gene alvo do grupo tratado; $\bar{x}C_{qr1}$ = média de Cq do gene referência do grupo tratado; $\bar{x}C_{qb}$ = média de Cq do gene alvo do grupo controle; $\bar{x}C_{qr2}$ = média de Cq do gene referência do grupo controle; DP = Desvio-padrão.

4.5 Análise Estatística

Os resultados representam média e desvio padrão de dois experimentos diferentes. Os dados foram avaliados quanto à normalidade (Shapiro-Wilks) e homoscedasticidade (Fisher). ANOVA dois fatores seguida de pós teste de Bonferroni foi aplicada para o ensaio do efeito da adição de mevalonato na inibição bacteriana promovida pela sinvastatina, e Test-t não pareado bicaudal foi aplicado para os resultados da RT-qPCR. A estatística foi realizada no programa GraphPad 5.0 (GraphPad Prim Software, San Diego, CA, USA). O nível de significância adotado foi de 5%.

5. RESULTADOS

5.1 A adição de mevalonato conseguiu reverter de maneira parcial ou total a inibição causada pela sinvastatina em cepas de *S. aureus* ATCC 29213 e ATCC 33591.

Para avaliar o efeito da adição de mevalonato sobre a ação inibitória da sinvastatina, cepas de *S. aureus* ATCC 29213 e 33591 foram concomitantemente expostas à sinvastatina (em concentrações 1xCIM, 2xCIM e 1/2xCIM, com base no estudo de Graziano e colaboradores, 2015) e mevalonato (em concentrações de 25 µM a 1 mM).

Para *S. aureus* ATCC 29213, a concentração de 31,25 µg / mL de SNV inibiu significativamente o crescimento bacteriano durante o período de 24 h em relação ao grupo controle ($p < 0,001$, ANOVA, tempos 8 h, 16 h e 24 h). Para as concentrações de 15,65 µg / mL e 7,8 µg / mL, notou-se uma inibição do crescimento microbiano do grupo SNV ($p < 0,001$, ANOVA, tempos de 8 h, 16 h e 24 h), porém inferior à concentração de 31,25 µg / mL. A figura 6 mostra o padrão de crescimento de *S. aureus* ATCC 29213 nos diferentes grupos teste e controle, bem como a comparação estatística dos grupos suplementados com mevalonato em relação às concentrações de sinvastatina e ao controle.

Para *S. aureus* 33591, a concentração de 62,5 µg / mL de SNV promoveu inibição bacteriana durante todo o período do ensaio (24 h, $p < 0,001$, ANOVA). Para a concentração 31,25 µg / mL, observou-se efeito inibitório mais sutil comparada a 62,5 µg / mL de SNV após 8 h, porém ainda promovendo redução do crescimento bacteriano quando comparada ao controle ($p < 0,001$, ANOVA, tempos 8h, 16h e 24h). Já a concentração de 15,65 µg / mL de SNV inibiu o crescimento bacteriano total apenas até o período de 4 h, apresentando diferença estatística com o grupo controle apenas até o tempo de 8 h ($p < 0,001$, ANOVA), ou seja, nos tempos 4 h, 16 h e 24 h não houve inibição do crescimento bacteriano e consequentemente não houve diferença com o controle ($p > 0,05$, ANOVA). A figura 7 mostra o crescimento de *S. aureus* ATCC 33591 nos diferentes grupos teste e controle, bem como a comparação estatística dos grupos suplementados com mevalonato em relação às concentrações de sinvastatina e ao controle.

Nenhuma contaminação foi observada, a concentração de DMSO não foi capaz de interferir no crescimento bacteriano, bem como a adição de sinvastatina e/ou mevalonato não interferiram no grau de turbidez das amostras (dados não mostrados), o que tornou possível a avaliação do crescimento bacteriano através de espectrofotometria (660 nm).

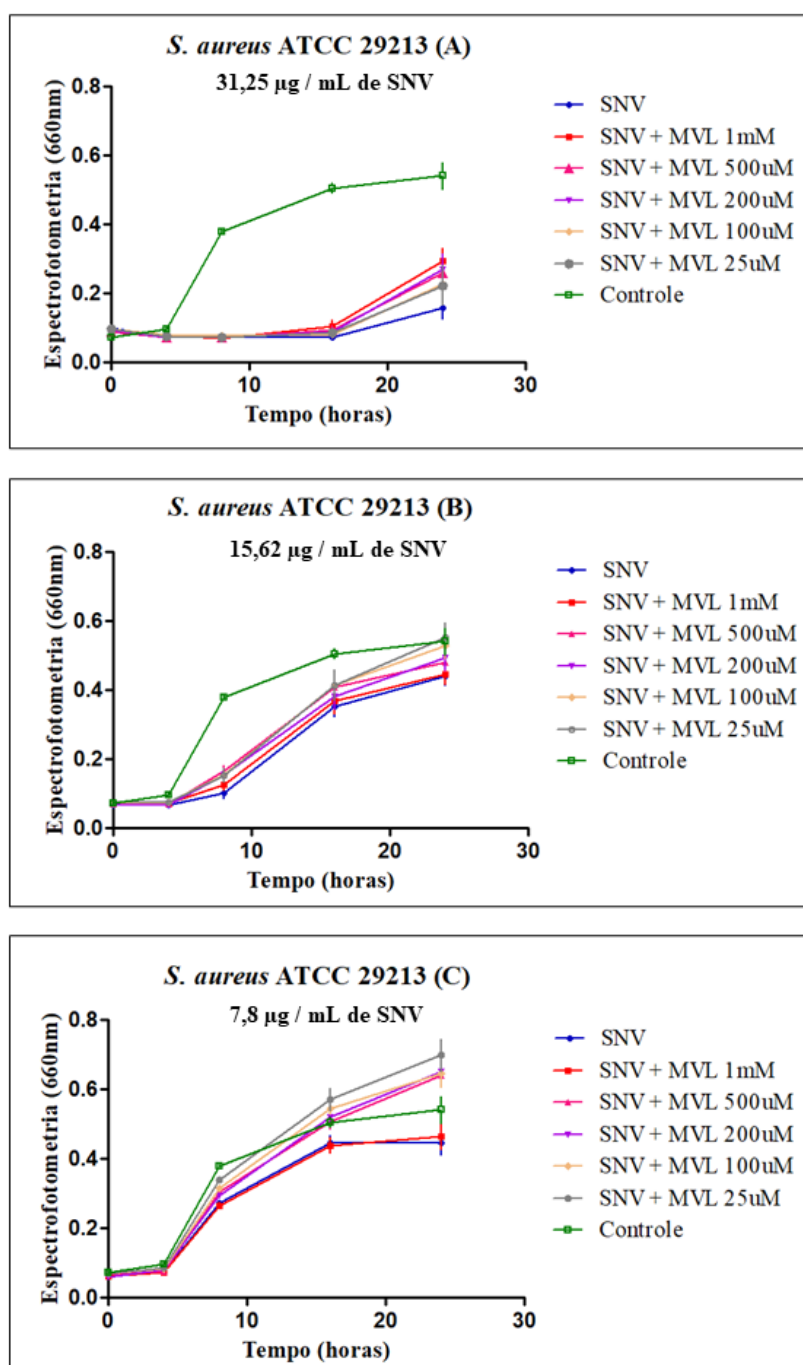


Figura 6: Ensaio de time-kill de *S. aureus* ATCC 29213, com adição de sinvastatina (SNV), sinvastatina + mevalonato (SNV + MLV) e grupo controle. Pontos da curva representam valores médios de absorbâncias e barras verticais representam o desvio padrão. (A) Time-kill para o grupo 31,25 µg / mL de SNV. A adição das maiores concentrações de MLV (1 mM, 500µM e 200 µM) reverteram de forma parcial a inibição provocada pela SNV no tempo 24 h ($p < 0,01$, ANOVA). Todas as concentrações de MLV apresentaram crescimento inferior quando comparadas ao grupo controle nos tempos 8 h, 16 h e 24 h ($p < 0,001$, ANOVA); (B) Time-kill para o grupo 15,62 µg / mL de SNV. Foi observada uma redução da atividade da sinvastatina a partir de

t= 8 h. Somente as menores concentrações de MLV (100 μ M e 25 μ M) foram capazes aumentar o crescimento em relação ao grupo SNV t=24 h ($p < 0,05$, ANOVA), não apresentando diferença em relação ao controle neste mesmo período ($p > 0,05$, ANOVA); (C) Time-kill para o grupo 7,8 μ g / mL de SNV. A adição de mevalonato nas concentrações de 200 μ M, 100 μ M e 25 μ M em 16 h promoveu crescimento superior ao grupo teste da sinvastatina ($p < 0,05$, ANOVA), bem como de 500 μ M, 200 μ M, 100 μ M e 25 μ M no tempo de 24 h ($p < 0,001$, ANOVA). O crescimento observado nestes grupos contendo mevalonato foi capaz de promover um crescimento superior ao grupo controle no tempo 24 h ($p < 0,01$, ANOVA).

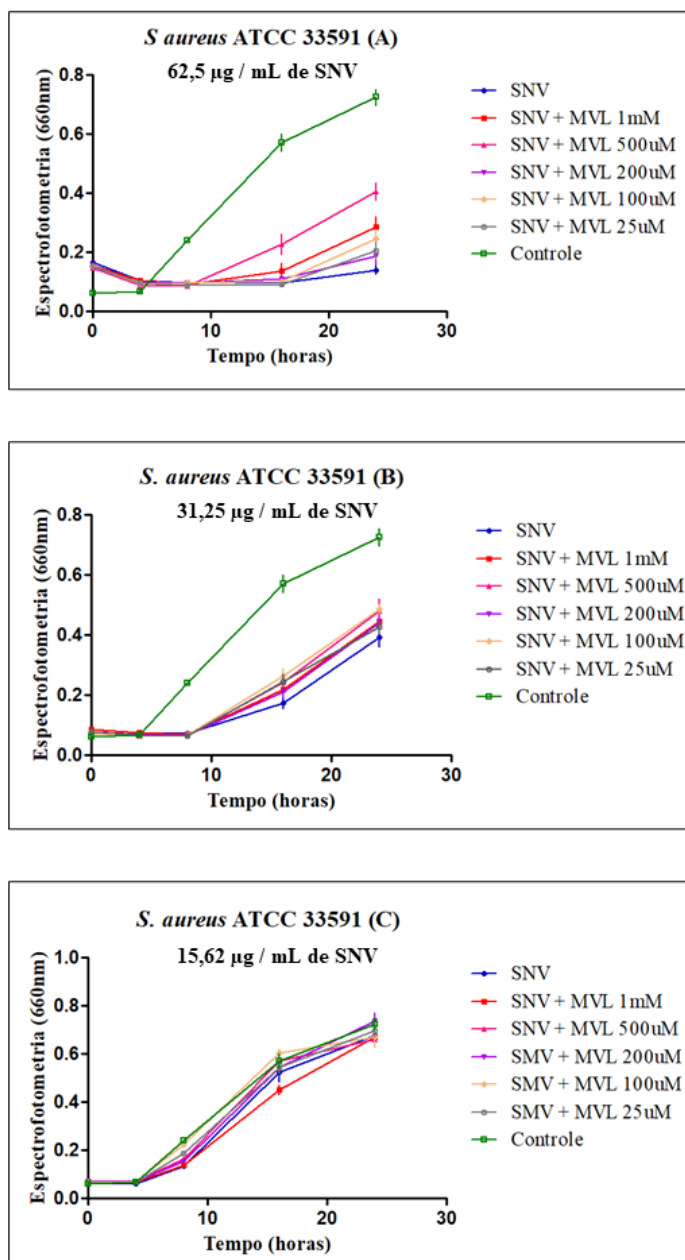


Figura 7: Ensaio de time-kill de *S. aureus* ATCC 33591, com adição de SNV, SNV + MVL) e grupo controle. Pontos da curva representam valores médios de absorbâncias e barras verticais representam o desvio padrão. (A) Time-kill para o grupo 62,5 μ g / mL de SNV. As concentrações de 1 mM, 500 μ M, 100 μ M e

25 μM de MVL na presença de SNV promoveram crescimento bacteriano significativamente maior que o grupo tratado somente com SNV ($p < 0,05$, ANOVA 2 fatores - Bonferroni), porém menores que o grupo controle ($p < 0,001$, ANOVA); (B) Time-kill para o grupo 31,25 $\mu\text{g} / \text{mL}$ de SNV. Apenas as concentrações 500 μM e 100 μM e 25 μM de MVL promoveram crescimento maior que o grupo tratado com SNV em 16h ($p < 0,05$, ANOVA) e 500 μM e 200 μM de MVL em 24 h ($p < 0,001$, ANOVA). Todos os grupos foram diferentes do controle ($p < 0,001$, ANOVA); (C) Time-kill para o grupo 15,62 $\mu\text{g} / \text{mL}$ de SNV. No tempo de 24 h, não houve diferença estatística entre os grupos teste (SNV + MVL) e controle ($p > 0,05$, ANOVA).

5.2 A sinvastatina promoveu alterações na expressão dos genes *vraX* e *murG* em *S. aureus* ATCC 29213.

Para avaliar a expressão de genes de virulência relacionados à resposta de estresse à parede celular de *S. aureus* (*vraX*, *sgtB* e *tcaA*) e de genes relacionados à formação de parede celular a partir de isoprenoides produzidos na via do mevalonato bacteriano (*uppS*, *uppP* e *murG*) em *S. aureus* ATCC 29213, as bactérias foram tratadas com uma concentração subinibitória de sinvastatina (7,8 $\mu\text{g} / \text{mL}$). Durante o período de exposição ao fármaco (6 h), as bactérias tratadas conseguiram crescer até uma absorbância média de 0.2 (660 nm), enquanto o grupo controle atingiu 0.5 de absorbância (660 nm), evidenciando que, apesar do crescimento bacteriano não ter sido completamente interrompido, a concentração de sinvastatina usada interferiu no metabolismo bacteriano.

Para uso do método do Cq comparativo (Applied Biosystems, 2008), os primers confeccionados foram testados quanto à eficiência e apresentaram eficiência entre 81% e 112 %. Os controles negativos introduzidos não amplificaram durante a RT-qPCR ou amplificaram nos últimos ciclos da reação. As curvas de dissociação (*melting*), necessárias quando se utiliza o sistema Sybr Green®, apresentaram um único pico, representando a presença de um único *amplicon*.

A tabela 1 apresenta os resultados da expressão relativa dos genes avaliados, bem como a análise estatística aplicada. Diferenças na expressão gênica foram observadas para os genes *vraX*, ($p < 0,001$, Teste *t de student*, não pareado, bicaudal) e *murG* ($p < 0,05$, Teste *t*). Não houve diferença para os genes *sgtB*, *tcaA*, *uppS* ($p > 0,05$, Teste *t*) e *uppP* ($p > 0,05$, Teste *t*, correção de welch). N.s. = diferença estatística não significativa, $p > 0,05$.

Tabela 1: Expressão relativa dos genes de virulência e genes relacionados à síntese de parede celular de *S. aureus* ATCC 29213.

		Gene	ΔCq	$2^{-\Delta\Delta Cq}$	Test T
Genes de resposta ao estresse de parede celular	<i>vraX</i>	SNV 7,8 μg / mL	0,31	28,18	$p < 0.001$
		Controle	5,13	1	
	<i>sgtB</i>	SNV 7,8 μg / mL	2,41	0,99	n.s
		Controle	2,39	1	
	<i>tcaA</i>	SNV 7,8 μg / mL	4,13	0,90	n.s.
		Controle	3,98	1	
Genes de síntese de parede celular	<i>uppS</i>	SNV 7,8 μg / mL	0,91	2	n.s.
		Controle	1,91	1	
	<i>uppP</i>	SNV 7,8 μg / mL	4,37	1	n.s.
		Controle	4,38	1	
	<i>murG</i>	SNV 7,8 μg / mL	3,13	0,73	$p < 0,05$
		Controle	2,67	1	

6. DISCUSSÃO

Nos últimos anos, muitos estudos têm reportado o efeito antibacteriano das estatinas, em especial da sinvastatina (Jerwood e Cohen, 2008; Bergman et al., 2011; Emani et al., 2014; Thangamani et al., 2015; Graziano et al., 2015; Ko et al., 2017; Kaminska et al., 2019). No entanto, seu mecanismo de ação antimicrobiano permanece desconhecido e as razões pelas quais algumas bactérias são sensíveis à sinvastatina, enquanto outras são resistentes, ainda representam uma lacuna na literatura. Neste estudo, mostramos evidências de que a sinvastatina possui efeito na via do mevalonato bacteriana e na expressão de genes de síntese de peptidoglicano e de virulência em resposta ao estresse de parede celular, dados até então não reportados na literatura e que podem contribuir para o entendimento do mecanismo de ação antimicrobiano da sinvastatina e para estudos futuros acerca do reposicionamento deste fármaco.

Nos humanos, as estatinas atuam inibindo a enzima HMG-CoA Redutase, enzima-chave para produção de colesterol, presente na via do mevalonato humana (Endo et al., 1976; Goldstein e Brown, 1990; Corsini et al., 1995; Endo, 2004). Espécies bacterianas, como *S. aureus*, também possuem a via do mevalonato, porém resultando na síntese de isoprenoides, como o isopentenil difosfato, precursor do undecaprenil fosfato, relacionado à síntese de peptidoglicano de parede celular (Balibar et al., 2009; Heuston et al., 2012; Matsumoto et al., 2016; Kawakami e Fujisaki, 2018). Partindo da hipótese de que a sinvastatina pudesse interferir na via do mevalonato bacteriano, reduzindo a síntese de mevalonato necessário para produção de peptidoglicano em *S. aureus* e, assim, desempenhar seu efeito bacteriostático, mostramos que a adição de mevalonato às culturas bacterianas tratadas com diferentes concentrações inibitórias de sinvastatina conseguiu reverter total ou parcialmente o crescimento bacteriano no período de 24 h.

Para ambas as cepas *S. aureus* testadas, observou-se uma variação de 1 concentração para inibição total de crescimento durante o período de 24 h quando comparada com os valores de CIM do estudo de Graziano e colaboradores (2015). No nosso estudo, a concentração inibitória mínima (CIM) foi na faixa de 31,25 µg/mL para *S. aureus* ATCC 29213 e de 62,5 µg/mL para *S. aureus* ATCC 33591. Isto pode ser devido à variabilidade de ensaios, bem como pelo fato de que a concentração inibitória mínima pelo método da microdiluição em caldo (CLSI, 2012) representa, na verdade, uma faixa de concentração inibitória e não um valor único. Por esta razão, foi testada uma ampla faixa de concentrações de 2xCIM, 1xCIM e

1/2xCIM, com base nas concentrações encontradas no estudo de Graziano e colaboradores (2015).

Para as concentrações inibitórias de sinvastatina, as maiores concentrações de mevalonato promoveram reversão parcial do crescimento bacteriano. No entanto, para as concentrações subinibitórias, apenas as menores concentrações de mevalonato foram capazes de reverter total ou parcialmente o crescimento das bactérias.

Sabendo que a via do mevalonato humana responde ao aumento ou diminuição de produtos desta via, como o mevalonato, por mecanismos de *feedback* (Brown e Goldstein, 1980; Goldstein e Brown, 1990; Thurnher et al., 2013), hipotetizamos que em bactérias tratadas com concentrações subinibitórias de sinvastatina possa ter ocorrido acúmulo de mevalonato quando adicionado em concentrações mais elevadas, interferindo de maneira negativa no crescimento bacteriano. Isso pode justificar o porquê da maior concentração de mevalonato adicionada (1 mM) promover uma redução no crescimento bacteriano, enquanto menores concentrações foram responsáveis por aumento significativo no crescimento de *S. aureus* quando comparado com o grupo que foi tratado somente com a sinvastatina. Porém, esta hipótese necessita de comprovação.

Outros estudos também avaliaram os efeitos da adição de mevalonato na inibição bacteriana causada pela sinvastatina, porém com resultados diferentes dos obtidos neste estudo (Bergman et al., 2011; Thangamani et al., 2015). Bergman e colaboradores (2011) testaram o efeito da adição de mevalonato (ácido mevalônico) em *Streptococcus pneumoniae*, bactéria Gram-positiva que possui a via do mevalonato (Wilding et al., 2000; Heuston et al., 2012), quando submetida a um tratamento com sinvastatina. Neste estudo, nenhuma das concentrações de mevalonato testadas (0,6 mM - 10 mM) foi capaz de promover reversão do crescimento bacteriano (Bergman et al., 2011). No entanto, o tempo de tratamento dos microrganismos com as substâncias testadas foi de apenas 4 h. No nosso estudo, o crescimento de *S. aureus* foi acompanhado por 24 h, sendo que durante o período de 4 h também não foram observados efeitos benéficos da adição de mevalonato. Já o estudo de Thangamani e colaboradores (2015) observou que a adição de mevalonato (0,1 mM e 1 mM) em *S. aureus* tratados com sinvastatina não reduziu a inibição bacteriana. No entanto, os dados não foram mostrados para que fosse possível avaliar se diferenças metodológicas poderiam justificar os diferentes resultados.

Além dos efeitos da adição de mevalonato, buscamos avaliar possíveis alterações nos genes envolvidos na síntese de peptidoglicano de *S. aureus* a partir da formação dos

primeiros isoprenoides da via. Foram avaliados os genes *uppS*, *uppP* e *murG*, sendo observada alteração significativa apenas na expressão do gene *murG* (uma redução de aproximadamente 30%). Para os genes *uppP* e *uppS* não foi observada alteração significativa na expressão). Em relação aos genes de estresse de parede celular, foi observado um aumento significativo na expressão do gene *vraX* (razão de 28 vezes), além de uma redução de 10% na expressão de *tcaA*, porém este sem diferença estatística observada. Para o gene *sgtB*, no entanto, não foi observada alteração em sua expressão.

Tais resultados corroboram, em parte, com o estudo de Balibar e colaboradores (2009) que mostrou que alterações na via do mevalonato de *S. aureus* resultavam em regulação positiva de fatores de virulência, como observado para o gene *vraX*, porém com pouca expressão compensatória nos genes relacionados à biossíntese de isoprenoides, como observado para o *uppS* e *uppP* (Balibar et al., 2009).

Diferente dos dados encontrados em nosso estudo, Balibar e colaboradores (2009) encontraram aumento de 7-11 vezes para o fator de virulência *sgtB* e de 6-9 vezes para o *tcaA* em resposta a interferências na via do mevalonato de *S. aureus* (ausência de genes codificadores de enzimas-chave para a síntese de isoprenoides (*mvaS*, *mvaA* e *mvaK1*)). No entanto, no estudo de Balibar e colaboradores (2009) houve interrupção completa da produção de mevalonato e outros substratos presentes na via do mevalonato, enquanto no nosso estudo as bactérias foram tratadas com concentrações subinibitórias de sinvastatina, permitindo ainda crescimento bacteriano, o que pode significar que não houve interrupção completa de vias metabólicas necessárias ao crescimento e formação de parede celular. Tais diferenças metodológicas podem estar associadas às diferenças na expressão dos genes *tcaA* e *sgtB* encontradas em nosso estudo.

Em *S. aureus*, a exposição a antibióticos que atuam na parede celular ou que causam depleção de enzimas essenciais para a síntese de parede celular, bem como da via do mevalonato, desencadeia uma série de reações que visa a manutenção da viabilidade bacteriana, tais como a indução de genes e produção de proteínas de estresse (Gardete et al., 2006; Sobral et al., 2007; Balibar et al., 2009; Blake et al., 2009; Dengler et al, 2011). Um dos principais sistemas de resposta ao estresse de parede celular é o sistema sensor-transdutor de dois componentes VraSR (Belcheva e Golemi-Kotra, 2008), ou de três componentes VraTSR, segundo alguns autores (Dengler et al, 2016), que controla a transcrição de até 50 genes, conhecidos coletivamente como genes de resposta a “estímulos de estresse da parede celular” (do inglês, *Cell Wall Stress Stimulon*, CWSS) (Utaida et al, 2003; Dengler et al, 2011). Um dos mais sensíveis indicadores de alterações na parede celular em *S. aureus* é o gene *vraX*,

porém com funções ainda não completamente esclarecidas (Dengler et al, 2012). Sabe-se, no entanto, que codifica uma proteína de 55 aminoácidos, sendo regulado positivamente diante de alterações ou danos em parede celular (Sherl et al., 2006; McCallum et al., 2011; Malin et al., 2017). Este gene é resultado da ativação de sistemas reguladores (VraS e VraR) (Belcheva e Golemi-Kotra, 2008; Eldholm et al., 2010; Belcheva et al., 2012; Tajbakhsh e Golemi-Kotra, 2019) e tem sido altamente expresso em resposta ao tratamento com antibióticos que atuam em parede celular (Scherl et al 2006; McCallum et al, 2011; Malin et al 2017).

Apesar dos resultados deste estudo mostrarem a influência da sinvastatina na via do mevalonato e na parede celular de *S. aureus*, as evidências ainda não são suficientes para determinar precisamente seu mecanismo de ação antibacteriano. Estudos como o de Thangamani e colaboradores (2015) mostraram possíveis influências do tratamento de concentrações subinibitórias de sinvastatina na inibição da síntese de DNA, RNA, proteínas e lipídeos, além de inibição da síntese de parede celular na CIM, através da avaliação da incorporação de precursores de parede celular radiomarcados. Ainda, alterações no proteoma relacionadas à resposta bacteriana ao estresse, não necessariamente ao estresse de parede celular, somadas à inibição de toxinas e de citocinas inflamatórias pelo tratamento com sinvastatina, sugerem que a sinvastatina atue em diversas vias celulares, resultando em diminuição ou perda da homeostasia celular, levando à inibição bacteriana (Thangamani et al., 2015).

Porém, existem evidências de que alterações na via do mevalonato em *S. aureus* não afetem apenas a síntese de isoprenoides para produção de peptidoglicano de parede celular, mas também outras funções na célula, tais como a capacidade metabólica da bactéria e alterações em sua capacidade fermentativa, tudo isso sendo resultado de complexos mecanismos de *feedback* (Balibar et al., 2009). Portanto, é possível que alterações na via do mevalonato possam contribuir para as alterações globais observadas em *S. aureus*, resultando em ativação e/ou inibição de diversas vias bacterianas.

Muitas hipóteses foram formuladas para explicar, além do mecanismo de ação antimicrobiano, a seletividade das estatinas aos microrganismos. Apesar de suposições de que as estatinas, incluindo a sinvastatina, atuassem apenas em bactérias Gram-positivas e que a composição da parede celular bacteriana Gram-negativa pudesse oferecer resistência à inibição das estatinas (Thangamani et al., 2015), estudos mostraram que bactérias Gram-negativas como *Porphyromonas gingivalis*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* e *Enterobacter aerogenes* apresentaram-se susceptíveis (Emani et al., 2014; Ko et al., 2017; Kaminska et al., 2019,

Carvalho, 2019). No entanto, foi observado que contra bactérias Gram-positivas a sinvastatina tem demonstrado maior atividade inibitória e para as Gram-negativas a atorvastatina tem tido atividade similar ou até mesmo superior à sinvastatina (Ko et al., 2017).

Do ponto de vista de estrutura-atividade, tem sido proposto que a estrutura química das estatinas, como a presença de grupos metil arranjados em uma geometria molecular tetraédrica, poderia estar relacionada com a ligação do fármaco a estruturas na parede celular de bactérias Gram-positivas e negativas e interferir diretamente na parede celular bacteriana (Ko et al., 2017). Com base nessas informações quanto ao tipo de parede celular e da atividade antimicrobiana de diferentes estatinas, é improvável associar somente a constituição da parede celular bacteriana ou a origem da estatina (natural, sintética ou semi-sintética) à sua atividade antimicrobiana, bem como é difícil determinar ainda quais características estruturais podem contribuir para o efeito bactericida ou bacteriostático (Carvalho, 2019).

Outro ponto a ser considerado no entendimento do mecanismo de ação da sinvastatina é que nas células humanas a sinvastatina precisa ser metabolizada para tornar-se ativa (Endo, 2004; Sirtori, 2014). No entanto a atividade antimicrobiana observada no nosso estudo acontece mesmo sem metabolismo prévio, ou seja, com a possível estrutura de ligação da sinvastatina à HMG-CoA Redutase na forma de anel lactona.

Foi demonstrado, inclusive, que estatinas com estrutura de anel lactona foram mais eficazes na inibição de *S. aureus* do que estatinas já na forma ácida (Graziano et al., 2015). Para *S. pneumoniae*, a forma lactona da sinvastatina promoveu inibição, enquanto a forma ácida deste mesmo fármaco não teve nenhuma atividade inibitória em concentrações equimolares (Bergman et al., 2011). Isso sugere que, ou a atividade antimicrobiana da sinvastatina acontece por outra via, diferente da via do mevalonato, ou a estrutura química da enzima HMG-CoA Redutase seja diferente, permitindo sua inibição mesmo com a forma lactona da sinvastatina.

Existem evidências de que a enzima HMG-CoA Redutase I (humana) e II (bacteriana) sejam diferentes, tendo a enzima bacteriana menor afinidade com a estrutura das estatinas (Wilding et al., 2000; Friesen e Rodwell, 2004), sendo sugerido que o mecanismo de ação das estatinas não esteja relacionado à ação conhecida para redução do colesterol humano (Jerwood e Cohen, 2008). No entanto, apesar de uma reduzida afinidade (Wilding et al., 2000; Friesen e Rodwell, 2004), a capacidade de inibição da HMG-CoA Redutase pelas estatinas, a depender da bactéria e da estatina utilizada, ainda deve ser considerada parte importante no

entendimento do mecanismo de ação antimicrobiano e investigada com mais detalhes em *S. aureus*.

Como perspectivas futuras, a sinvastatina tem demonstrado potencial para seu reposicionamento devido sua atividade antimicrobiana. No entanto, algumas questões ainda precisam ser discutidas e estudadas, como a via de administração do fármaco para o tratamento de infecções. O uso oral da sinvastatina para esta finalidade não parece ser o mais adequado pois as concentrações nas quais se observa atividade antimicrobiana *in vitro* (Graziano et al., 2015; Thangamani et al., 2015) são bem superiores às concentrações sanguíneas encontradas pelo uso de sinvastatina (Pentikainen et al., 1992; Björkhem-Bergman et al., 2011; Sirtori, 2014). Apesar das evidências quanto aos níveis sanguíneos da sinvastatina e de outras estatinas serem, em sua maioria, obtidas de ensaios em indivíduos saudáveis e após poucas doses do fármaco, a dose por via oral para alcançar os níveis sanguíneos necessários para a atividade antimicrobiana seria demasiada alta, podendo resultar em aumento de efeitos colaterais.

Com base nessas informações, foi postulado que o efeito protetor do ponto de vista microbiano observado pelo uso de estatinas (Liappis et al., 2001; Kruger et al., 2006; Thomsen et al., 2006; Janda et al., 2010; McDowell et al., 2011; Nseir et al., 2012; López-Cortés et al., 2013; Khan et al., 2013) possa estar relacionado ao acúmulo do fármaco no organismo de indivíduos em uso contínuo das estatinas, pacientes idosos (devido a alterações no metabolismo do fármaco) ou a outros efeitos pleiotrópicos, como atividade imunomoduladora (Jerwood e Cohen, 2008). No entanto, é real a capacidade da sinvastatina de promover inibição e morte bacteriana mesmo sem a influência do sistema imune do hospedeiro, o que torna seu uso tópico viável e promissor.

Como limitações deste estudo, destacam-se a ausência de investigações na expressão de genes de *S. aureus* ATCC 33591. Por se tratar de uma cepa resistente à meticilina (fármaco beta-lactâmico), é possível que expresse mais funções de manutenção da homeostase de parede celular. Uma vez que o próprio sistema *VraSR* está associado ao aumento da resistência de *S. aureus* à beta-lactâmicos e à vancomicina (Kuroda et al., 2003), investigações adicionais em espécies resistentes podem contribuir para uma maior compreensão do mecanismo de ação da sinvastatina. Ainda, alterações nas concentrações de sinvastatina usadas para as análises de expressão gênica, como a utilização de concentrações mais altas (inibitórias e suprainibitórias), poderiam evidenciar alterações maiores na expressão dos genes testados.

Importante ressaltar que este é ainda um estudo inicial para o entendimento do mecanismo de ação antimicrobiano da sinvastatina. Outros ensaios, como avaliação da integridade de parede celular e análise da capacidade inibitória da sinvastatina sobre a HMG-CoA Redutase de *S. aureus*, ainda são necessários.

7. CONCLUSÃO

Em conclusão, os resultados do presente estudo demonstram que a sinvastatina parece inibir a via do mevalonato bacteriana, além de interferir na expressão de genes relacionados à produção e estresse de parede celular. Esses achados fornecem indícios de que a sinvastatina possa desempenhar seu efeito antimicrobiano através de alterações na parede celular de *S. aureus* associados à via do mevalonato. Entretanto, estudos adicionais são necessários para confirmar esta hipótese.

REFERÊNCIAS *

Agência Nacional de vigilância sanitária. Consultas. Ministério da Saúde. 2021; [Acesso 2021 Mai 15]. Disponível em: <https://consultas.anvisa.gov.br/>.

Applied Biosystems. Guide to Performing Relative Quantitation of Gene Expression Using Real-Time Quantitative PCR. Applied Biosystems. 2008.

Ashburn TT, Thor KB. Drug repositioning: identifying and developing new uses for existing drugs. *Nat Rev Drug Discov*. 2004 Aug;3(8):673-83. doi: 10.1038/nrd1468.

Balibar CJ, Shen X, Tao J. The mevalonate pathway of *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol*. 2009 Feb;191(3):851-61. doi: 10.1128/JB.01357-08.

Belcheva A, Golemi-Kotra D. A close-up view of the VraSR two-component system. A mediator of *Staphylococcus aureus* response to cell wall damage. *J Biol Chem*. 2008 May 2;283(18):12354-64. doi: 10.1074/jbc.M710010200.

Belcheva A, Verma V, Korenevsky A, Fridman M, Kumar K, Golemi-Kotra D. Roles of DNA sequence and sigma A factor in transcription of the *vraSR* operon. *J Bacteriol*. 2012 Jan;194(1):61-71. doi: 10.1128/JB.06143-11.

Bergman P, Linde C, Pütsep K, Pohanka A, Normark S, Henriques-Normark B, et al. Studies on the antibacterial effects of statins--in vitro and in vivo. *PLoS One*. 2011;6(8):e24394. doi: 10.1371/journal.pone.0024394.

* De acordo com as normas da UNICAMP/FOP, baseadas na padronização do International Committee of Medical Journal Editors - Vancouver Group. Abreviatura dos periódicos em conformidade com o PubMed.

Bersot TP. Terapia farmacológica para a hipercolesterolemia e a dislipidemia. In: Brunton LL, organizador. As bases farmacológicas da terapêutica de Goodman & Gilman. 12ª ed. São Paulo: AMGH Editora; 2012. p. 876-908.

Bilheimer DW, Grundy SM, Brown MS, Goldstein JL. Mevinolin and colestipol stimulate receptor-mediated clearance of low density lipoprotein from plasma in familial hypercholesterolemia heterozygotes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1983 Jul;80(13):4124-8. doi: 10.1073/pnas.80.13.4124.

Björkhem-Bergman L, Lindh JD, Bergman P. What is a relevant statin concentration in cell experiments claiming pleiotropic effects? *Br J Clin Pharmacol*. 2011 Jul;72(1):164-5. doi: 10.1111/j.1365-2125.2011.03907.x.

Blake KL, O'Neill AJ, Mengin-Lecreulx D, Henderson PJ, Bostock JM, Dunsmore CJ, et al. The nature of *Staphylococcus aureus* MurA and MurZ and approaches for detection of peptidoglycan biosynthesis inhibitors. *Mol Microbiol*. 2009 Apr;72(2):335-43. doi: 10.1111/j.1365-2958.2009.06648.x.

Bochar DA, Stauffacher CV, Rodwell VW. Sequence comparisons reveal two classes of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase. *Mol Genet Metab*. 1999 Feb;66(2):122-7. doi: 10.1006/mgme.1998.2786.

Boucher HW, Corey GR. Epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Clin Infect Dis*. 2008 Jun;46 Suppl 5:S344-9. doi: 10.1086/533590.

Brown MS, Goldstein JL. Multivalent feedback regulation of HMG CoA reductase, a control mechanism coordinating isoprenoid synthesis and cell growth. *J Lipid Res*. 1980 Jul;21(5):505-17.

Bugg TD, Lloyd AJ, Roper DI. Phospho-MurNAc-pentapeptide translocase (MraY) as a target for antibacterial agents and antibacterial proteins. *Infect Disord Drug Targets*. 2006 Jun;6(2):85-106. doi: 10.2174/187152606784112128.

Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, et al. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem*. 2009 Apr;55(4):611-22. doi: 10.1373/clinchem.2008.112797.

Cameron DR, Howden BP, Peleg AY. The interface between antibiotic resistance and virulence in *Staphylococcus aureus* and its impact upon clinical outcomes. *Clin Infect Dis*. 2011 Sep;53(6):576-82. doi: 10.1093/cid/cir473.

Capra EJ, Laub MT. Evolution of two-component signal transduction systems. *Annu Rev Microbiol*. 2012;66:325-47. doi: 10.1146/annurev-micro-092611-150039.

Carvalho RDP. Atividade antimicrobiana das estatinas contra bactérias da microbiota oral [dissertação]. Piracicaba: Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas; 2019.

Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Twenty-second informational supplement. CLSI document M100-S22. 2012; 32(3). 188 p.

Corsini A, Maggi FM, Catapano AL. Pharmacology of competitive inhibitors of HMG-CoA reductase. *Pharmacol Res*. 1995 Jan;31(1):9-27. doi: 10.1016/1043-6618(95)80042-5.

Cowan ST, Shaw C, Williams RE. Type strain for *Staphylococcus aureus* Rosenbach. *J Gen Microbiol*. 1954 Feb;10(1):174-6. doi: 10.1099/00221287-10-1-174.

Cziraky MJ, Watson KE, Talbert RL. Targeting low HDL-cholesterol to decrease residual cardiovascular risk in the managed care setting. *J Manag Care Pharm.* 2008; 14(8 Suppl A):S3-28;

Davidson MH; National cholesterol Education Program (NCEP) Adult Treatment Panel (ATP)--ATP III Guidelines. A look to the future: new treatment guidelines and a perspective on statins. *Am J Med.* 2002 Jun 3;112 Suppl 8A:34S-41S. doi: 10.1016/s0002-9343(02)01088-4.

Dengler V, McCallum N. Luciferase Reporter Gene System to Detect Cell Wall Stress Stimulon Induction in *Staphylococcus aureus*. *Methods Mol Biol.* 2016; 1440:139-50. doi: 10.1007/978-1-4939-3676-2_11.

Dengler V, Meier PS, Heusser R, Berger-Bächi B, McCallum N. Induction kinetics of the *Staphylococcus aureus* cell wall stress stimulon in response to different cell wall active antibiotics. *BMC Microbiol.* 2011 Jan 20;11:16. doi: 10.1186/1471-2180-11-16.

Dengler V, Meier PS, Heusser R, Kupferschmied P, Fazekas J, Friebe S, et al. Deletion of hypothetical wall teichoic acid ligases in *Staphylococcus aureus* activates the cell wall stress response. *FEMS Microbiol Lett.* 2012 Aug;333(2):109-20. doi: 10.1111/j.1574-6968.2012.02603.x.

Diekema DJ, Pfaller MA, Schmitz FJ, Smayevsky J, Bell J, Jones RN, et al. Survey of infections due to *Staphylococcus* species: frequency of occurrence and antimicrobial susceptibility of isolates collected in the United States, Canada, Latin America, Europe, and the Western Pacific region for the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 1997-1999. *Clin Infect Dis.* 2001 May 15;32 Suppl 2:S114-32. doi: 10.1086/320184.

Eldholm V, Gutt B, Johnsborg O, Brückner R, Maurer P, Hakenbeck R, et al. The pneumococcal cell envelope stress-sensing system LiaFSR is activated by murein hydrolases and lipid II-interacting antibiotics. *J Bacteriol.* 2010 Apr;192(7):1761-73. doi: 10.1128/JB.01489-09.

Emani S, Gunjiganur GV, Mehta DS. Determination of the antibacterial activity of simvastatin against periodontal pathogens, *Porphyromonas gingivalis* and *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*: An in vitro study. *Contemp Clin Dent.* 2014 Jul;5(3):377-82. doi: 10.4103/0976-237X.137959.

Endo A, Kuroda M, Tanzawa K. Competitive inhibition of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase by ML-236A and ML-236B fungal metabolites, having hypocholesterolemic activity. *FEBS Lett.* 1976 Dec 31;72(2):323-6. doi: 10.1016/0014-5793(76)80996-9.

Endo A. The origin of the statins. 2004. *Atheroscler Suppl.* 2004 Oct;5(3):125-30. doi: 10.1016/j.atherosclerosissup.2004.08.033

Fan X, Liu Y, Smith D, Konermann L, Siu KW, Golemi-Kotra D. Diversity of penicillin-binding proteins. Resistance factor FmtA of *Staphylococcus aureus*. *J Biol Chem.* 2007; 282(48): 35143–35152.

Farmer AR, Murray CK, Mende K, Akers KS, Zera WC, Beckius ML, et al. Effect of HMG-CoA reductase inhibitors on antimicrobial susceptibilities for gram-negative rods. *J Basic Microbiol.* 2013 Apr;53(4):336-9. doi: 10.1002/jobm.201100614.

Feng L, Zhou L, Sun Y, Gui J, Wang X, Wu P, et al. Specific inhibitions of annonaceous acetogenins on class II 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase from

Streptococcus pneumoniae. *Bioorg Med Chem*. 2011 Jun 1;19(11):3512-9. doi: 10.1016/j.bmc.2011.04.019.

Forcadell-Peris MJ, de Diego-Cabanes C. Rhabdomyolysis secundaria a simvastatina y fenofibrato [Rhabdomyolysis secondary to simvastatin and phenofibrate]. *Semergen*. 2014 May-Jun;40(4):e91-4. Spanish. doi: 10.1016/j.semerg.2014.01.007.

Fortuin-de Smidt MC, Singh-Moodley A, Badat R, Quan V, Kularatne R, Nana T, et al. *Staphylococcus aureus* bacteraemia in Gauteng academic hospitals, South Africa. *Int J Infect Dis*. 2015 Jan;30:41-8. doi: 10.1016/j.ijid.2014.10.011.

Friesen JA, Rodwell VW. The 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme-A (HMG-CoA) reductases. *Genome Biol*. 2004;5(11):248. doi: 10.1186/gb-2004-5-11-248.

Galar A, Weil AA, Dudzinski DM, Muñoz P, Siedner MJ. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Prosthetic Valve Endocarditis: Pathophysiology, Epidemiology, Clinical Presentation, Diagnosis, and Management. *Clin Microbiol Rev*. 2019 Feb 13;32(2):e00041-18. doi: 10.1128/CMR.00041-18.

Gao R, Mack TR, Stock AM. Bacterial response regulators: versatile regulatory strategies from common domains. *Trends Biochem Sci*. 2007 May;32(5):225-34. doi: 10.1016/j.tibs.2007.03.002.

Gao R, Stock AM. Biological insights from structures of two-component proteins. *Annu Rev Microbiol*. 2009;63:133-54. doi: 10.1146/annurev.micro.091208.073214.

Gardete S, Wu SW, Gill S, Tomasz A. Role of VraSR in antibiotic resistance and antibiotic-induced stress response in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2006 Oct;50(10):3424-34. doi: 10.1128/AAC.00356-06.

Giurgea AG, Margeta C, Maca T, Rezaie-Majd A, Bucek RA, Manavi M, et al. Simvastatin reduces serum level of vascular endothelial growth factor in hypercholesterolemic patients. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2006 Jan;47(1):30-6. doi: 10.1097/01.fjc.0000191970.65998.7a.

Gould D, Chamberlaine A. *Staphylococcus aureus*: a review of the literature. *J Clin Nurs*. 1995 Jan;4(1):5-12. doi: 10.1111/j.1365-2702.1995.tb00004.x.

Goldstein JL, Brown MS. Regulation of the mevalonate pathway. *Nature*. 1990 Feb 1;343(6257):425-30. doi: 10.1038/343425a0.

Graziano TS, Cuzzullin MC, Franco GC, Schwartz-Filho HO, de Andrade ED, Groppo FC, et al. Statins and Antimicrobial Effects: Simvastatin as a Potential Drug against *Staphylococcus aureus* Biofilm. *PLoS One*. 2015 May 28;10(5):e0128098. doi: 10.1371/journal.pone.0128098.

Groisman EA. Feedback Control of Two-Component Regulatory Systems. *Annu Rev Microbiol*. 2016 Sep 8;70:103-24. doi: 10.1146/annurev-micro-102215-095331.

Guven GS, Atalar E, Yavuz B, Beyazit Y, Kekilli M, Kilicarslan A, et al. Simvastatin treatment improves endothelial function and increases fibrinolysis in patients with hypercholesterolemia. *J Natl Med Assoc*. 2006 Apr;98(4):627-30.

Guyton AC, Hall JE. *Tratado de fisiologia médica*. 12ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2011. p.861-873.

Hammond RK, White DC. Carotenoid formation by *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol.* 1970 Jul;103(1):191-8. doi: 10.1128/jb.103.1.191-198.1970

He H, Wunderink RG. *Staphylococcus aureus* Pneumonia in the Community. *Semin Respir Crit Care Med.* 2020 Aug;41(4):470-479. doi: 10.1055/s-0040-1709992.

Hennessy E, Adams C, Reen FJ, O'Gara F. Is There Potential for Repurposing Statins as Novel Antimicrobials? *Antimicrob Agents Chemother.* 2016 Aug 22;60(9):5111-21. doi: 10.1128/AAC.00192-16.

Heuston S, Begley M, Gahan CGM, Hill C. Isoprenoid biosynthesis in bacterial pathogens. *Microbiology (Reading).* 2012 Jun;158(Pt 6):1389-1401. doi: 10.1099/mic.0.051599-0.

Horino T, Hori S. Metastatic infection during *Staphylococcus aureus* bacteremia. *J Infect Chemother.* 2020 Feb;26(2):162-169. doi: 10.1016/j.jiac.2019.10.003.

Iannelli F, Lombardi R, Milone MR, Pucci B, De Rienzo S, Budillon A, et al. Targeting Mevalonate Pathway in Cancer Treatment: Repurposing of Statins. *Recent Pat Anticancer Drug Discov.* 2018;13(2):184-200. doi: 10.2174/1574892812666171129141211.

Isley WL, Harris WS, Miles JM. The effect of high-dose simvastatin on free fatty acid metabolism in patients with type 2 diabetes mellitus. *Metabolism.* 2006 Jun;55(6):758-62. doi: 10.1016/j.metabol.2006.01.013.

Iwamoto K, Moriwaki M, Miyake R, Hide M. *Staphylococcus aureus* in atopic dermatitis: Strain-specific cell wall proteins and skin immunity. *Allergol Int.* 2019 Jul;68(3):309-315. doi: 10.1016/j.alit.2019.02.006.

Janda S, Young A, Fitzgerald JM, Etminan M, Swiston J. The effect of statins on mortality from severe infections and sepsis: a systematic review and meta-analysis. *J Crit Care*. 2010 Dec;25(4):656.e7-22. doi: 10.1016/j.jcrc.2010.02.013.

Jandhyala SM, Talukdar R, Subramanyam C, Vuyyuru H, Sasikala M, Nageshwar Reddy D. Role of the normal gut microbiota. *World J Gastroenterol*. 2015 Aug 7;21(29):8787-803. doi: 10.3748/wjg.v21.i29.8787.

Jensen LO, Thayssen P, Pedersen KE, Haghfelt T. Short- and long-term influence of diet and simvastatin on brachial artery endothelial function. *Int J Cardiol*. 2006 Feb 8;107(1):101-6. doi: 10.1016/j.ijcard.2005.02.041.

Jerwood S, Cohen J. Unexpected antimicrobial effect of statins. *J Antimicrob Chemother*. 2008 Feb;61(2):362-4. doi: 10.1093/jac/dkm496.

Jones PH, Davidson MH. Reporting rate of rhabdomyolysis with fenofibrate + statin versus gemfibrozil + any statin. *Am J Cardiol*. 2005 Jan 1;95(1):120-2. doi: 10.1016/j.amjcard.2004.08.076.

Kamińska M, Aliko A, Hellvard A, Bielecka E, Binder V, Marczyk A, et al. Effects of statins on multispecies oral biofilm identify simvastatin as a drug candidate targeting *Porphyromonas gingivalis*. *J Periodontol*. 2019 Jun;90(6):637-646. doi: 10.1002/JPER.18-0179.

Kawakami N, Fujisaki S. Undecaprenyl phosphate metabolism in Gram-negative and Gram-positive bacteria. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2018 Jun;82(6):940-946. doi: 10.1080/09168451.2017.1401915.

Khan AR, Riaz M, Bin Abdulhak AA, Al-Tannir MA, Garbati MA, Erwin PJ, et al. The role of statins in prevention and treatment of community acquired pneumonia: a systematic review and meta-analysis. *PLoS One*. 2013;8(1):e52929. doi: 10.1371/journal.pone.0052929.

Kirby WM. Extraction of a highly potent penicillin inactivator from penicillin resistant staphylococci. *Science*. 1944 Jun 2;99(2579):452-3. doi: 10.1126/science.99.2579.452.

Ko HHT, Lareu RR, Dix BR, Hughes JD. Statins: antimicrobial resistance breakers or makers? *PeerJ*. 2017 Oct 24;5:e3952. doi: 10.7717/peerj.3952.

Koh KK, Son JW, Ahn JY, Jin DK, Kim HS, Choi YM, et al. Comparative effects of diet and statin on NO bioactivity and matrix metalloproteinases in hypercholesterolemic patients with coronary artery disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2002 Sep 1;22(9):e19-23. doi: 10.1161/01.atv.0000030997.02059.bb.

Konreddy AK, Rani GU, Lee K, Choi Y. Recent Drug-Repurposing-Driven Advances in the Discovery of Novel Antibiotics. *Curr Med Chem*. 2019;26(28):5363-5388. doi: 10.2174/0929867325666180706101404.

Koyama T. Molecular analysis of prenyl chain elongating enzymes. *Biosci Biotechnol Biochem*. 1999 Oct;63(10):1671-6. doi: 10.1271/bbb.63.1671.

Krishna S, Miller LS. Host-pathogen interactions between the skin and *Staphylococcus aureus*. *Curr Opin Microbiol*. 2012 Feb;15(1):28-35. doi: 10.1016/j.mib.2011.11.003.

Kruger P, Fitzsimmons K, Cook D, Jones M, Nimmo G. Statin therapy is associated with fewer deaths in patients with bacteraemia. *Intensive Care Med*. 2006 Jan;32(1):75-9. doi: 10.1007/s00134-005-2859-y.

Kuroda M, Kuroda H, Oshima T, Takeuchi F, Mori H, Hiramatsu K. Two-component system *VraSR* positively modulates the regulation of cell-wall biosynthesis pathway in *Staphylococcus aureus*. *Mol Microbiol*. 2003 Aug;49(3):807-21. doi: 10.1046/j.1365-2958.2003.03599.x.

Landmesser U, Engberding N, Bahlmann FH, Schaefer A, Wiencke A, Heineke A, et al. Statin-induced improvement of endothelial progenitor cell mobilization, myocardial neovascularization, left ventricular function, and survival after experimental myocardial infarction requires endothelial nitric oxide synthase. *Circulation*. 2004 Oct 5;110(14):1933-9. doi: 10.1161/01.CIR.0000143232.67642.7A.

Lakhundi S, Zhang K. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: Molecular Characterization, Evolution, and Epidemiology. *Clin Microbiol Rev*. 2018 Sep 12;31(4):e00020-18. doi: 10.1128/CMR.00020-18.

Leonard PG, Golemi-Kotra D, Stock AM. Phosphorylation-dependent conformational changes and domain rearrangements in *Staphylococcus aureus* *VraR* activation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;110(21):8525–30

Liappis AP, Kan VL, Rochester CG, Simon GL. The effect of statins on mortality in patients with bacteremia. *Clin Infect Dis*. 2001 Oct 15;33(8):1352-7. doi: 10.1086/323334.

Lindsay JA, Holden MT. *Staphylococcus aureus*: superbug, super genome? *Trends Microbiol*. 2004 Aug;12(8):378-85. doi: 10.1016/j.tim.2004.06.004.

Lombard J, Moreira D. Origins and early evolution of the mevalonate pathway of isoprenoid biosynthesis in the three domains of life. *Mol Biol Evol*. 2011 Jan;28(1):87-99. doi: 10.1093/molbev/msq177.

López-Cortés LE, Gálvez-Acebal J, Del Toro MD, Velasco C, de Cueto M, Caballero FJ, et al. Effect of statin therapy in the outcome of bloodstream infections due to *Staphylococcus aureus*: a prospective cohort study. *PLoS One*. 2013 Dec 23;8(12):e82958. doi: 10.1371/journal.pone.0082958.

Magalhães LBNC. Drogas para uso em dislipidemias. In: Silva P. *Farmacologia*. 8ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2010. p.675-681.

Malin J, Shetty AC, Daugherty SC, de Leeuw EP. Effect of a small molecule Lipid II binder on bacterial cell wall stress. *Infect Drug Resist*. 2017 Feb 28;10:69-73. doi: 10.2147/IDR.S126254.

Matalka II, Mhaidat NM, Fatlawi LA. Antioxidant activity of simvastatin prevents L-arginine-induced acute toxicity of pancreas. *Int J Physiol Pathophysiol Pharmacol*. 2013 May 27;5(2):102-8.

Matsumoto Y, Yasukawa J, Ishii M, Hayashi Y, Miyazaki S, Sekimizu K. A critical role of mevalonate for peptidoglycan synthesis in *Staphylococcus aureus*. *Sci Rep*. 2016 Mar 10;6:22894. doi: 10.1038/srep22894.

McCallum N, Meier PS, Heusser R, Berger-Bächi B. Mutational analyses of open reading frames within the *vraSR* operon and their roles in the cell wall stress response of *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011 Apr;55(4):1391-402. doi: 10.1128/AAC.01213-10.

McDowell SA, Ma Y, Kusano R, Akinbi HT. Simvastatin is protective during *Staphylococcus aureus* pneumonia. *Curr Pharm Biotechnol*. 2011 Sep;12(9):1455-62. doi: 10.2174/138920111798281027.

Mengin-Lecreux D, Texier L, Rousseau M, van Heijenoort J. The murG gene of *Escherichia coli* codes for the UDP-N-acetylglucosamine: N-acetylmuramyl-(pentapeptide) pyrophosphoryl-undecaprenol N-acetylglucosamine transferase involved in the membrane steps of peptidoglycan synthesis. *J Bacteriol*. 1991 Aug;173(15):4625-36. doi: 10.1128/jb.173.15.4625-4636.1991.

Miller M, Dobs A, Yuan Z, Battisti WP, Palmisano J. The effect of simvastatin on triglyceride-rich lipoproteins in patients with type 2 diabetic dyslipidemia: a SILHOUETTE trial sub-study. *Curr Med Res Opin*. 2006 Feb;22(2):343-50. doi: 10.1185/030079906X80521.

Nseir W, Mograbi J, Abu-Elheja O, Bishara J, Assy N. The impact of prior long-term versus short-term statin use on the mortality of bacteraemic patients. *Infection*. 2012 Feb;40(1):41-8. doi: 10.1007/s15010-011-0190-9. Erratum in: *Infection*. 2012 Feb;40(1):109. Khateeb, J [corrected to Mograbi, J]; Jihad, B [corrected to Bishara, J].

Ogston A. Micrococcus Poisoning. *J Anat Physiol*. 1882 Jul;16(Pt 4):526-67.

Ogston A. Report upon Micro-Organisms in Surgical Diseases. *Br Med J*. 1881 Mar 12;1(1054):369.b2-375. doi: 10.1136/bmj.1.1054.369.

Park YH, Seo SY, Lee E, Ku JH, Kim HH, Kwak C. Simvastatin induces apoptosis in castrate resistant prostate cancer cells by deregulating nuclear factor- κ B pathway. *J Urol*. 2013 Apr;189(4):1547-52. doi: 10.1016/j.juro.2012.10.030

Pentikainen PJ, Saraheimo M, Schwartz JI, Amin RD, Schwartz MS, Brunner-Ferber F, et al. Comparative pharmacokinetics of lovastatin, simvastatin and pravastatin in humans. *J Clin Pharmacol*. 1992 Feb;32(2):136-40. doi: 10.1002/j.1552-4604.1992.tb03818.x.

Pérez-Gil J, Rodríguez-Concepción M. Metabolic plasticity for isoprenoid biosynthesis in bacteria. *Biochem J*. 2013 May 15;452(1):19-25. doi: 10.1042/BJ20121899.

Pinho MG, de Lencastre H, Tomasz A. An acquired and a native penicillin-binding protein cooperate in building the cell wall of drug-resistant staphylococci. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001; 98(19):10886–10891

Pourmand A, Mazer-Amirshahi M, Jasani G, May L. Emerging trends in antibiotic resistance: Implications for emergency medicine. *Am J Emerg Med*. 2017 Aug;35(8):1172-1176. doi: 10.1016/j.ajem.2017.03.010.

Pushpakom S, Iorio F, Eyers PA, Escott KJ, Hopper S, Wells A, Doig A, Williams T, Latimer J, McNamee C, Norris A, Sanseau P, Cavalla D, Pirmohamed M. Drug repurposing: progress, challenges and recommendations. *Nat Rev Drug Discov*. 2019 Jan;18(1):41-58. doi: 10.1038/nrd.2018.168.

Rammelkamp CH, Maxon T. Resistance of *Staphylococcus aureus* to the action of penicillin. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1942; 51:386–389. doi.org/10.3181/00379727-51-13986.

Reichert S, Ebner P, Bonetti EJ, Luqman A, Nega M, Schrenzel J, et al. Genetic Adaptation of a Mevalonate Pathway Deficient Mutant in *Staphylococcus aureus*. *Front Microbiol*. 2018 Jul 12;9:1539. doi: 10.3389/fmicb.2018.01539.

Rung E, Friberg PA, Bergh C, Billig H. Depletion of substrates for protein prenylation increases apoptosis in human periovulatory granulosa cells. *Mol Reprod Dev.* 2006 Oct;73(10):1277-83. doi: 10.1002/mrd.20551.

Schade J, Weidenmaier C. Cell wall glycopolymers of Firmicutes and their role as nonprotein adhesins. *FEBS Lett.* 2016 Nov;590(21):3758-3771. doi: 10.1002/1873-3468.12288.

Scherl A, François P, Charbonnier Y, Deshusses JM, Koessler T, Huyghe A, et al. Exploring glycopeptide-resistance in *Staphylococcus aureus*: a combined proteomics and transcriptomics approach for the identification of resistance-related markers. *BMC Genomics.* 2006 Nov 22;7:296. doi: 10.1186/1471-2164-7-296.

Schito GC. The importance of the development of antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*. *Clin Microbiol Infect.* 2006 Mar;12 Suppl 1:3-8. doi: 10.1111/j.1469-0691.2006.01343.x.

Seong CN, Kang JW, Lee JH, Seo SY, Woo JJ, Park C, Bae KS, Kim MS. Taxonomic hierarchy of the phylum Firmicutes and novel Firmicutes species originated from various environments in Korea. *J Microbiol.* 2018 Jan;56(1):1-10. doi: 10.1007/s12275-018-7318-x.

Sengupta M, Jain V, Wilkinson BJ, Jayaswal RK (2012) Chromatin immunoprecipitation identifies genes under direct *VraSR* regulation in *Staphylococcus aureus*. *Can J Microbiol* 58(6):703–708. doi: 10.1139/w2012-043.

Shimizu N, Koyama T, Ogura K. Molecular cloning, expression, and purification of undecaprenyl diphosphate synthase. No sequence similarity between E- and Z-prenyl diphosphate synthases. *J Biol Chem.* 1998 Jul 31;273(31):19476-81. doi: 10.1074/jbc.273.31.19476.

Sihto HM, Tasara T, Stephan R, Johler S. Validation of reference genes for normalization of qPCR mRNA expression levels in *Staphylococcus aureus* exposed to osmotic and lactic acid stress conditions encountered during food production and preservation. *FEMS Microbiol Lett*. 2014 Jul;356(1):134-40. doi: 10.1111/1574-6968.12491.

Sirtori CR. Pharmacology and mechanism of action of the new HMG-CoA reductase inhibitors. *Pharmacol Res*. 1990 Sep-Oct;22(5):555-63. doi: 10.1016/s1043-6618(05)80047-7.

Sirtori CR. The pharmacology of statins. *Pharmacol Res*. 2014 Oct;88:3-11. doi: 10.1016/j.phrs.2014.03.002

Sobral RG, Jones AE, Des Etages SG, Dougherty TJ, Peitzsch RM, Gaasterland T, et al. Extensive and genome-wide changes in the transcription profile of *Staphylococcus aureus* induced by modulating the transcription of the cell wall synthesis gene *murF*. *J Bacteriol*. 2007 Mar;189(6):2376-91. doi: 10.1128/JB.01439-06.

Sociedade Brasileira de Cardiologia. Atualização da diretriz brasileira de dislipidemias e prevenção da aterosclerose. *Arq Bras Cardiol*. 2017; 109 (2 Suppl 1): 92p.

Stock AM, Robinson VL, Goudreau PN. Two-component signal transduction. *Annu Rev Biochem*. 2000;69:183-215. doi: 10.1146/annurev.biochem.69.1.183.

Tajbakhsh G, Golemi-Kotra D. The dimerization interface in VraR is essential for induction of the cell wall stress response in *Staphylococcus aureus*: a potential druggable target. *BMC Microbiol*. 2019 Jul 5;19(1):153. doi: 10.1186/s12866-019-1529-0.

Talreja O, Kerndt CC, Cassagnol M. Simvastatin. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2021 Jan. [Acesso em 2021 Jun 12]. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK532919/>.

Thangamani S, Mohammad H, Abushahba MF, Hamed MI, Sobreira TJ, Hedrick VE, et al. Exploring simvastatin, an antihyperlipidemic drug, as a potential topical antibacterial agent. *Sci Rep*. 2015 Nov 10;5:16407. doi: 10.1038/srep16407

Thomsen RW, Hundborg HH, Johnsen SP, Pedersen L, Sørensen HT, Schønheyder HC, et al. Statin use and mortality within 180 days after bacteremia: a population-based cohort study. *Crit Care Med*. 2006 Apr;34(4):1080-6. doi: 10.1097/01.CCM.0000207345.92928.E4.

Thurnher M, Gruenbacher G, Nussbaumer O. Regulation of mevalonate metabolism in cancer and immune cells. *Biochim Biophys Acta*. 2013 Jun;1831(6):1009-15. doi: 10.1016/j.bbailip.2013.03.003.

United States Food and Drug Administration. Cholesterol-lowering drugs get labeling changes. 2021; [Acesso 2021 Mai 11]. Disponível em: <https://www.fda.gov/drugs/special-features/cholesterol-lowering-drugs-get-labeling-changes>.

Utaida S, Dunman PM, Macapagal D, Murphy E, Projan SJ, Singh VK, et al. Genome-wide transcriptional profiling of the response of *Staphylococcus aureus* to cell-wall-active antibiotics reveals a cell-wall-stress stimulon. *Microbiology (Reading)*. 2003 Oct;149(Pt 10):2719-2732. doi: 10.1099/mic.0.26426-0.

Vieira-Silva S, Falony G, Belda E, Nielsen T, Aron-Wisnewsky J, Chakaroun R, et al. Statin therapy is associated with lower prevalence of gut microbiota dysbiosis. *Nature*. 2020 May;581(7808):310-315. doi: 10.1038/s41586-020-2269-x.

Wang QM, Peery RB, Johnson RB, Alborn WE, Yeh WK, Skatrud PL (2001) Identification and characterization of a monofunctional glycosyltransferase from *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* 183(16):4779–4785. doi: 10.1128/JB.183.16.4779-4785.2001.

Wertheim HF, Melles DC, Vos MC, van Leeuwen W, van Belkum A, Verbrugh HA, et al. The role of nasal carriage in *Staphylococcus aureus* infections. *Lancet Infect Dis*. 2005 Dec;5(12):751-62. doi: 10.1016/S1473-3099(05)70295-4.

Wilding EI, Brown JR, Bryant AP, Chalker AF, Holmes DJ, Ingraham KA, et al. Identification, evolution, and essentiality of the mevalonate pathway for isopentenyl diphosphate biosynthesis in gram-positive cocci. *J Bacteriol*. 2000 Aug;182(15):4319-27. doi: 10.1128/JB.182.15.4319-4327.2000.

Yu X, Pan Y, Ma H, Li W. Simvastatin inhibits proliferation and induces apoptosis in human lung cancer cells. *Oncol Res*. 2013;20(8):351-7. doi: 10.3727/096504013X13657689382897.

Yu W, Leibig M, Schäfer T, Bertram R, Ohlsen K, Götz F. The mevalonate auxotrophic mutant of *Staphylococcus aureus* can adapt to mevalonate depletion. *Antimicrob Agents Chemother*. 2013 Nov;57(11):5710-3. doi: 10.1128/AAC.00726-13.

Zimmermann F, Roessler J, Schmidt D, Jasina A, Schumann P, Gast M, Poller W, Leistner D, Giral H, Kränkel N, Kratzer A, Schuchardt S, Heimesaat MM, Landmesser U, Haghighi A. Impact of the Gut Microbiota on Atorvastatin Mediated Effects on Blood Lipids. *J Clin Med*. 2020 May 25;9(5):1596. doi: 10.3390/jcm9051596.

Zhang S, Li H, Yuan L, Zhang J, Han L, Liu R, Wu R, Shi Y, Mushtaq N, Ullah S, Xu J. Molecular characterization of gut microbiota in high-lipid diet-induced hyperlipidemic rats treated with simvastatin. *Int J Mol Med*. 2020 May;45(5):1601-1615. doi: 10.3892/ijmm.2020.4516.

ANEXO 1 – RELATÓRIO DE SIMILARIDADE

Efeitos da sinvastatina na via do mevalonato e na expressão de genes da síntese e da resposta ao estresse de parede celular em *Staphylococcus aureus*

RELATÓRIO DE ORIGINALIDADE

13%

ÍNDICE DE SEMELHANÇA

11%

FONTES DA INTERNET

8%

PUBLICAÇÕES

%

DOCUMENTOS DOS ALUNOS

FONTES PRIMÁRIAS

1

repositorio.unicamp.br

Fonte da Internet

4%

2

idoc.pub

Fonte da Internet

1%

3

doc.rero.ch

Fonte da Internet

1%

4

repositorio.unesp.br

Fonte da Internet

<1%

5

Advances in Photosynthesis and Respiration, 2012.

Publicação

<1%

6

repositorio.ufpe.br

Fonte da Internet

<1%

7

teses.usp.br

Fonte da Internet

<1%

8

www.pure.ed.ac.uk

Fonte da Internet

<1%