

UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO  
NÚCLEO DE PESQUISAS EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Fernanda Oliveira Ferraz

**Efeitos da atorvastatina sobre a infecção experimental por  
*Leishmania major* no camundongo C57BL/6**

Ouro Preto- Minas Gerais  
2008

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO  
NÚCLEO DE PESQUISAS EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Fernanda Oliveira Ferraz

**Efeitos da atorvastatina sobre a infecção experimental por  
*Leishmania major* no camundongo C57BL/6**

Dissertação apresentada ao Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto como requisito parcial à obtenção do grau de mestre  
Imunobiologia de Protozoários

Orientadora: Leda Quercia Vieira  
Co-Orientador: Mauro Martins Teixeira

Ouro Preto- Minas Gerais  
2008

## AGRADECIMENTOS

De escavar cada vez mais fundo vive um pesquisador. De não se cansar, de não se satisfazer com o que já sabe, de acreditar que ainda há um canto não iluminado na habitação das coisas que existem e levar sua tocha até ali vive um cientista. Porque assim é a natureza humana, assim sou eu. Certamente, abaixo do poço mais profundo sempre haverá solo a ser perfurado, sempre haverá algo mais a saber e, sem dúvida, haverá uma sombra desafiadora diante da luz do conhecimento. Porque assim é o mistério da vida, assim é Deus.

“Quando apliquei o meu coração a conhecer a sabedoria, e a ver o trabalho que se faz sobre a terra (pois homens há que nem de dia nem de noite conseguem dar sono aos seus olhos), então contemplei toda obra de Deus, e vi que o homem não pode compreender a obra que se faz debaixo do sol; pois por mais que o homem trabalhe para a descobrir, não a achará; embora o sábio queira conhecê-la, nem por isso a poderá compreender.” Eclesiastes 8:16 e 17

A Deus, quem me concedeu a honra de investigar parte de seus inventos, a Ele, cuja inteligência inescrutável é a razão de existir ciência, minha vida, meu maior bem.

Começo agradecendo ao Dr. Helton da Costa Santiago que, depois de dispensar sua paciente atenção a uma aprendiz ignorante dos conceitos mais básicos de imunologia em suas primeiras lições, tornou-se consolidador da minha dedicação à pesquisa. Ele exerceu sobre mim a liderança pelo exemplo que é sua postura profissional. A motivação que recebi veio de sua contagiante paixão pela ciência, alimento da minha empolgação de iniciante. Entre tantos atributos que o qualificam como exímio pesquisador esforço-me para imitá-lo no seguinte: equilíbrio, regendo com maestria as forças da racionalidade e da sensibilidade. Agradeço a ele por minha inserção no Laboratório de Gnotobiologia e Imunologia, por ter me apresentado à Leda, ao Mauro e a outras pessoas que tiveram importância ímpar em minha introdução na ciência, por ter acreditado, mais que eu, em minha capacidade de assumir o projeto que se transformou em meu trabalho de mestrado. Sou imensamente grata ao Helton pelas inesquecíveis lições de imunologia, de vida e, principalmente, pela bênção de ter sua amizade.

Diante de uma escolha que fiz, em um determinado momento, pensei que todo meu trabalho de iniciação científica poderia ficar registrado apenas em meu caderno de laboratório amarelado. Então, a professora Leda Quercia Vieira propôs orientar-me como aluna de

mestrado pela UFOP. Assim, ela abriu uma porta que já mudou e ampliou os possíveis rumos da minha carreira. Agradeço, sinceramente, por ter enfrentado as dificuldades de me orientar longe de Ouro Preto. Quero expressar minha gratidão também pela acolhida em seu laboratório ao longo destes 6 anos, por corrigir meus erros e por me ensinar, através do seu entusiasmo incansável, que podemos saber e fazer mais com esmero.

Agradeço profundamente ao professor Mauro Martins Teixeira pela elaboração das idéias iniciais deste trabalho, pelas valiosíssimas sugestões e por auxiliar com paciência, destreza e criatividade na condução de cada etapa do projeto desde a época da iniciação científica. Sou grata também por encontrar sempre as portas de seu laboratório abertas para mim, pelo tempo e atenção dispensados nas discussões dos resultados. Admiro extremamente o trabalho desse cientista, sinto-me privilegiada por trabalhar com ele e pela oportunidade de tê-lo como meu co-orientador.

Quero destacar a colaboração dos professores Wagner Luís Tafuri, Rosa Maria Esteves Arantes e Denise Carmona Cara Machado do ICB-UFMG que também contribuíram de forma singular para a realização deste projeto. Agradeço por me receberem tão gentilmente em seu laboratório e por dedicarem seu tempo no planejamento de alguns experimentos e discussão dos resultados das análises histopatológicas e ELISA.

Ao professor Vicente de Paulo C. P. Toledo da Faculdade de Farmácia-UFMG que me socorreu durante o estágio em docência. Obrigada pela atenção, simpatia e descontração que facilitaram a minha primeira experiência didática.

Certamente, a execução desse trabalho seria extremamente árdua sem o apoio das diversas mãos que me ajudaram em incontáveis experimentos e nos intermináveis esquemas de tratamento diários no ICB, à noite, em feriados, dias santos, finais de semana e, por quê não, nas “férias”, em dezenas, ou melhor (e sem exagero), em centenas de camundongos. Por isso e muito mais que isso, pela amizade, agradeço de coração ao Lucas, Carol, Leandro, Marina, Moisés e a quem algum dia fez parte da minha “equipe de gavage”.

O Laboratório de Gnotobiologia e Imunologia, além de meu local de trabalho, foi uma segunda casa pra mim, não apenas pelo tempo que passei ali, mas, principalmente, pelas pessoas fascinantes que conheci naquele lugar. Pessoas que compartilharam seus conhecimentos comigo, que me ensinaram grande parte do que sei sobre a prática da pesquisa e seus bastidores. Amigos que me ouviram, ampararam algumas lágrimas, me fizeram sorrir, me ajudaram a crescer. Não consigo expressar o quanto foi significativo contar com vocês na minha caminhada acadêmica e pessoal. Muito obrigada à Claudinha, Denise, Larita, Juan, Camila, Louisa, Marcelo, Renatinha, Matheus, Lili, Ricardo, Sônia e Taia. Tenho em minha

memória lembranças de atitudes e palavras bondosas de cada um deles que foram especiais e únicas para mim e que, sem dúvida, tornaram os meus dias de trabalho mais alegres e gratificantes. Quero destacar minha gratidão especial à Lara por sua colaboração na finalização do meu projeto, à Louisa, primeira leitora das linhas dessa dissertação, e à Denise pela condução no preparo das apresentações do trabalho.

Conheci pessoas maravilhosas na UFOP que hoje são muito especiais e tornaram minhas idas e vindas de BH a Ouro Preto mais agradáveis. Obrigada aos meus colegas da turma de Bases pelos bons e maus momentos. Amadureci, aprendi com vocês e vencemos desafios juntos. Agradeço especialmente a Raquel e a Jamille que hoje são mais que colegas. Foram muitas madrugadas regadas a café e pilhas de artigos... obrigada por tornarem esses momentos mais leves com sua tranquilidade e bom humor. Muito obrigada também às garotas da República Friends por me aceitarem em seu cantinho como se eu fosse uma velha conhecida.

Agradeço ao professor Luís Carlos Crocco Afonso do ICEB-UFOP pelo apoio durante o período em que cumpri os créditos em Ouro Preto.

À secretaria e à coordenação do curso de pós-graduação do NUPEB.

Aos professores Ana Paula Salles Moura Fernandes e Márcio Matos Coelho da Faculdade de Farmácia-UFMG pelas dicas e conselhos em relação ao meu projeto e à vida acadêmica.

À Tiça do Laboratório de Imunofarmacologia do ICB por me auxiliar na execução dos ensaios de ELISA.

Nos bastidores dessa grande conquista da minha vida estive uma equipe que nada ou muito pouco entendem sobre o que me manteve ocupada a maior parte do tempo durante esses quase dois anos, mas, mesmo assim, me incentivaram, torceram, ajudaram como podiam e, às vezes, mais que isso. Meus amigos, minha segunda família, são pessoas essenciais, indispensáveis e, sem elas, seria extremamente difícil atingir qualquer meta. "...há um amigo mais chegado do que um irmão." Provérbios 18:24 Cada um deles, à sua maneira, foram irmãos e irmãs para mim e quiçá, pais e mães nessa minha aventura baiana em Minas Gerais. Obrigada à Sabrina e à Carol, minhas irmãs de república, por compartilharem suas e minhas "dores" de mestrado. À Renatinha e ao Cláudio pelos conselhos e orações. À minha querida Célula, aos irmãos da IBC e da PIBBVC pelo suporte espiritual. Ao Du pelas caronas e escoltas ao ICB nas noites tenebrosas e chuvosas. Ao Tito pelo puff azul, praticamente um divã terapeuta em cada aula de canto, pelo ouvido, filtro de desabafos e desafinos. Aos meus amados Noemi e Alex pelo carinho que eu tanto precisava nos metros finais dessa maratona...

“Deus escolheu as coisas loucas deste mundo para confundir as sábias...e as que não são para confundir as que são.” I Coríntios 1:27 e 28

Aos meus pais, pessoas tão grandes e com um significado tão profundo em minha vida que fico sem saber como escrever algo que esteja à altura do mérito deles. Pai e mãe, a quem, ainda como uma criança sapeca, chamo carinhosamente de Tio Locas e Tia Dimalva, meus conselheiros, meus espelhos, meus binóculos para ver meus objetivos mais de perto e enxergar o caminho até eles mais curto e plano, meus fãs de carteirinha mesmo quando estou “sem maquiagem” e “fora das paradas de sucesso”, meus primeiros professores. Com eles aprendi o valor do conhecimento. Através deles conheci o “Sábio dos Sábios”. Obrigada por mais esta vitória que conquistamos juntos.

Finalmente, sou grata pelo bem que recebi e igualmente grata pelos obstáculos. “Sabendo que a tribulação produz a paciência e a paciência, a experiência e a experiência, a esperança.” Romanos 5:3 e 4

“E, se alguém cuida saber alguma coisa, ainda não sabe como convém saber.” I Coríntios 8:2

## RESUMO

As estatinas, inibidores da  $\beta$ -hidroxi- $\beta$ -metil-Co A redutase (enzima que catalisa a etapa limitante da síntese de colesterol e isoprenóides), são fármacos de primeira escolha para o tratamento de hipercolesterolemia. Atualmente, estão entre os medicamentos mais prescritos no mundo e seu uso como agentes profiláticos para doenças cardiovasculares tem sido sugerido. A atorvastatina, extremamente difundida, também é capaz de modular a resposta imunológica clinicamente e em modelos experimentais com efeito imunossupressor e antiinflamatório. Diante do potencial de suprimir a resposta pró-inflamatória Th1, nosso trabalho se concentra no estudo do efeito da atorvastatina sobre a infecção experimental por *Leishmania major* no camundongo C57BL/6, modelo de resistência a esse protozoário sensível à resposta Th1 desenvolvida nesse hospedeiro. De acordo com nossos resultados, o tratamento favoreceu a proliferação do parasito. O controle do horário de administração do fármaco promoveu um crescimento significativo da lesão na pata indicando que o efeito da atorvastatina no camundongo é modulado pelo ciclo circadiano. A atorvastatina não foi capaz de inibir a polarização da resposta imunológica para o tipo 1, pois a produção das citocinas IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  e da quimiocina CCL5/RANTES foi aumentada bem como a atividade de NOS II nos animais tratados. Por outro lado, a estatina induziu a ativação de mecanismos regulatórios da resposta imune como as células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> e conseqüente incremento na produção de TGF- $\beta$  e IL-10 e na atividade de arginase I. Nossos resultados revelam que o tratamento a longo prazo com atorvastatina prejudica o controle da infecção por *L. major* no camundongo C57BL/6 e sugerem que a disseminação do uso das estatinas deve ser avaliada com cautela especialmente em populações de áreas endêmicas para parasitoses como a leishmaniose.

## ABSTRACT

Statins are inhibitors of  $\beta$ -hidroxi- $\beta$ -metil-Co A reductase (the rate limiting enzyme of cholesterol synthesis), so they are the first choice drugs for hipercholesterolemia therapy. Nowadays, statins are some of the most prescribed drugs in the world and their use as prophylactic agents for cardiovascular diseases has been widely suggested. Atorvastatin, an extremely diffused statin, can also modulate immune response when applied clinically or in experimental models and presents immunosuppressor and anti-inflammatory actions. Knowing its potential of suppressing Th1 immune response, this work was focused in the study of the effect of atorvastatin in experimental infection with *Leishmania major* in C57BL/6 mice, the resistance model against this parasite. In this model, parasite growth is controlled by a Th1 response developed by the host. Our results showed that atorvastatin treatment favored parasite proliferation. When the time of statin administration was controlled, a significant increase in footpad lesion was observed, indicating that the effect of atorvastatin in mice is modulated by the circadian cycle. Atorvastatin did not inhibited the type 1 immune response polarization, since in treated animals increased IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  and CCL5/RANTES production and NOS II activity were observed. On the other hand, statin activated regulatory mechanisms of the immune response such as CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> cells with an increment in TGF- $\beta$  and IL-10 production and arginase I activity as consequences. According to our findings, long term treatment with atorvastatin compromises the control of *L. major* infection in C57BL/6 mice. Our results also suggest that atorvastatin widespread use must be carefully evaluated, especially in populations that live in endemic areas for parasitic diseases such as leishmaniasis.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

GRÁFICO 1- Efeito do tratamento diário com atorvastatina no curso de infecção por <i>L. major</i> em camundongos C57BL/6 infectados na pata.....	36
GRÁFICO 2- Quantificação de parasitos na lesão por <i>L. major</i> em camundongos C57BL/6 tratados diariamente com atorvastatina ou PBS.....	37
GRÁFICO 3- Efeito do tratamento diário à noite com atorvastatina no curso de infecção por <i>L. major</i> em camundongos C57BL/6 infectados na pata.....	38
GRÁFICO 4- Quantificação de parasitos na lesão por <i>L. major</i> em camundongos C57BL/6 tratados diariamente à noite com atorvastatina ou PBS.....	39
FIGURA 1- Análise histopatológica da lesão por <i>L. major</i> após 4 semanas de infecção de animais tratados diariamente à noite com atorvastatina ou PBS.....	40
FIGURA 2- Análise histopatológica da lesão por <i>L. major</i> após 8 semanas de infecção de animais tratados diariamente à noite com atorvastatina ou PBS.....	41
FIGURA 3- Análise histopatológica da lesão por <i>L. major</i> após 10 semanas de infecção de animais tratados diariamente à noite com atorvastatina ou PBS.....	42
GRÁFICO 5- Efeito do tratamento diário à noite com atorvastatina na produção de citocinas pró-inflamatórias (IFN- $\gamma$ e TNF- $\alpha$ ) no linfonodo poplíteo em camundongos C57BL/6 infectados na pata com <i>L. major</i> .....	43
GRÁFICO 6- Efeito do tratamento diário à noite com atorvastatina na produção de citocinas anti-inflamatórias (TGF- $\beta$ e IL-10) no linfonodo poplíteo em camundongos C57BL/6 infectados na pata com <i>L. major</i> .....	44
GRÁFICO 7- Efeito do tratamento diário à noite com atorvastatina na produção de quimiocinas (RANTES e MCP-1) no linfonodo poplíteo em camundongos C57BL/6 infectados na pata com <i>L. major</i> .....	45
GRÁFICO 8- Efeito do tratamento diário à noite com atorvastatina na expressão de citocinas pró-inflamatórias (IFN- $\gamma$ e TNF- $\alpha$ ) na lesão de camundongos C57BL/6 infectados na pata com <i>L. major</i> .....	46
GRÁFICO 9- Efeito do tratamento diário à noite com atorvastatina na expressão de IL-4 na lesão de camundongos C57BL/6 infectados na pata com <i>L. major</i> .....	47

GRÁFICO 10- Efeito do tratamento diário à noite com atorvastatina na expressão de citocinas anti-inflamatórias (TGF- $\beta$ e IL-10) na lesão de camundongos C57BL/6 infectados na pata com <i>L. major</i> .....	48
GRÁFICO 11 - Efeito do tratamento diário à noite com atorvastatina na população de células T regulatórias CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> no linfonodos de camundongos C57BL/6 infectados na pata com <i>L. major</i> .....	49
GRÁFICO 12 - Cinética da produção de anticorpos IgG1 e IgG2a anti- <i>Leishmania major</i> em camundongos C57BL/6 infectados na pata com <i>L. major</i> .....	50
GRÁFICO 13- Cinética da atividade de arginase em cultura de macrófagos peritoneais de camundongos C57BL/6 infectados na pata com <i>L. major</i> .....	51
GRÁFICO 14- Cinética da produção de nitrito no sobrenadante de cultura de macrófagos peritoneais de camundongos C57BL/6 infectados na pata com <i>L. major</i> .....	52
GRÁFICO 15- Cinética da produção de TNF- $\alpha$ no sobrenadante de cultura de macrófagos peritoneais de camundongos C57BL/6 na pata com <i>L. major</i> .....	53

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACAT	- Acil coenzima A colesterol acil transferase
APC	- Célula apresentadora de antígeno
CCR-7	- Receptor para a citocina IL-7
CD	- Grupo de diferenciação
CIITA	- Transativador do MHC de classe II
ELISA	- <i>Enzyme-linked immunoabsorbent assay</i>
eNOS	- Óxido nítrico sintase endotelial
Fc	- Fragmento cristalizável
Foxp3	- <i>Forkhead Box P3</i>
FPP	- Farnesil pirofosfato
GGPP	- Geranilgeranil pirofosfato
GTPases	- Guanosina trifosfatases
HDL	- Lipoproteína de alta densidade
HMG-CoA	- $\beta$ -hidroxi- $\beta$ -metil coenzima A
ICAM-1	- Molécula de adesão intercelular
IFN- $\gamma$	- Interferon gama
Ig	- Imunoglobulina
IL-	- Interleucina
iNOS (NOS 2)	- Óxido nítrico sintase indutível
Lck	- Tirosina quinase de linfócitos
LDL	- Lipoproteína de baixa densidade
LFA-1	- Antígeno associado à função leucocitária
MAP	- Proteína ativada por mitógeno
MCP-1	- Proteína quimioatraente de monócitos
MHC	- Complexo principal de histocompatibilidade
MIP	- Proteínas inflamatórias de monócitos
MMP	- Metaloproteinases
NF-kB	- Fator nuclear kappa B
NO	- Óxido nítrico
PBS	- Tampão salina fosfato
PMN	- Leucócitos polimorfonucleares

RANTES	- <i>Regulated on Activation, Normal T Expressed and Secreted</i>
RT	- Transcriptase reversa
ROS	- Espécies reativas de oxigênio
PCR	- Reação em Cadeia da Polimerase
STAT	- Transdutores de sinal e ativadores de transcrição
TCR	- Receptor de células T
TGF- $\beta$	- Fator transformador de crescimento beta
TLR	- Receptor tipo Toll
TNF- $\alpha$	- Fator de Necrose Tumoral alfa
VCAM-1	- Molécula de adesão celular vascular
VLA-4	- Integrina de ativação muito tardia
VLDL	- Lipoproteína de muito baixa densidade

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
1.1 COLESTEROL.....	1
1.2 ESTATINAS.....	4
1.2.1 EFEITOS DAS ESTATINAS DA RESPOSTA IMUNOLÓGICA.....	5
1.3 LEISHMANIOSE.....	10
<b>2 OBJETIVOS.....</b>	<b>17</b>
2.1 OBJETIVO GERAL.....	17
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	17
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>18</b>
3.1 ANIMAIS.....	18
3.2 PARASITO.....	18
3.3 INFECÇÃO POR <i>LEISHMANIA MAJOR</i> .....	19
3.4 TRATAMENTO COM ATORVASTATINA.....	20
3.5 QUANTIFICAÇÃO DE PARASITOS NA PATA POR DILUIÇÃO LIMITANTE.....	20
3.6 ANTÍGENO DE <i>LEISHMANIA MAJOR</i> .....	21
3.7 CULTURA DE CÉLULAS DE BAÇO E LINFONODO.....	21
3.8 EXTRAÇÃO DE CITOCINAS E QUIMIOCINAS NO TECIDO DA PATA.....	22
3.9 DOSAGEM DE CITOCINAS E QUIMIOCINAS POR ELISA.....	22
3.10 IMUNOMARCAÇÃO E CITOMETRIA DE FLUXO.....	23
3.11 PREPARO DO SORO PARA DOSAGEM DE ANTICORPOS.....	24
3.12 DOSAGEM DE ANTICORPOS ANTI- <i>LEISHMANIA MAJOR</i> NO SORO.....	24
3.13 OBTENÇÃO E CULTURA DE MACRÓFAGOS PERITONEAIS RESIDENTES.....	25
3.14 DOSAGEM DA PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO.....	26
3.15 ENSAIO DE ATIVIDADE DE ARGINASE.....	26
3.16 DOSAGEM DE TNF- $\alpha$ POR ENSAIO BIOLÓGICO.....	27
3.17 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA.....	28
3.18 DOCUMENTAÇÃO FOTOGRÁFICA.....	28
3.19 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	28
<b>4 RESULTADOS.....</b>	<b>29</b>

4.1 EFEITOS DA ATORVASTATINA SOBRE O CURSO DE INFECÇÃO E PARASITISMO TECIDUAL DOS CAMUNDONGOS INFECTADOS COM <i>Leishmania Major</i> .....	29
4.2 CARACTERÍSTICAS HISTOPATOLÓGICAS DA LESÃO NA PATA PÓS-TRATAMENTO COM ATORVASTATINA OU PBS.....	30
4.3 EFEITO IMUNOMODULADOR DA ATORVASTATINA NOS ANIMAIS INFECTADOS COM <i>Leishmania major</i> .....	31
4.4 EFEITO DO TRATAMENTO COM ATORVASTATINA SOBRE A ATIVIDADE DAS ENZIMAS ARGINASE I E iNOS EM MACRÓFAGOS PERITONEAIS DE ANIMAIS INFECTADOS COM <i>Leishmania major</i> .....	34
4.5 TRATAMENTO IN-VIVO COM ATORVASTATINA ALTERA A PRODUÇÃO DE TNF- $\alpha$ EM CULTURA DE MACRÓFAGOS PERITONEAIS DE CAMUNDONGOS C57BL/6 INFECTADOS COM <i>Leishmania major</i> .....	35
<b>5 DISCUSSÃO.....</b>	<b>54</b>
<b>6 CONCLUSÃO.....</b>	<b>62</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>63</b>

## 1 INTRODUÇÃO:

As estatinas estão entre os fármacos mais prescritos do mundo (FINDLAY, 2007) dada a importância de seu efeito redutor de colesterol atuando na prevenção e controle de doenças cardiovasculares que lideram as causas de morte. Cerca de 17,5 milhões de pessoas morreram de doenças cardiovasculares em 2005, representando 30% do número de mortes total no planeta (WORLD HEALTH ORGANIZATION on-line). A atorvastatina (Lipitor<sup>®</sup>, Pfizer), aprovada para uso clínico em 1999, classificada como uma das estatinas mais eficazes na redução do LDL e aumento do HDL plasmáticos, tem um perfil de segurança extremamente favorável apresentando baixos índices de efeitos colaterais (CLARK, 2003; SCHAEFER *et al.*, 2004). Atualmente, ela é superada pela rosuvastatina, recém-lançada no mercado farmacêutico (WHITE, 2002), mas ainda lidera o número de prescrições de estatinas nos Estados Unidos (FINDLAY, 2007).

Devido à ampla utilização da atorvastatina no mundo e ao crescente somatório de evidências de sua ação imunomoduladora, especialmente a inibição da resposta imunológica do tipo 1, escolhemos esse fármaco e concentramos nosso estudo no sentido de investigar seu efeito sobre a infecção murina experimental por *Leishmania major* que é um excelente modelo para avaliação do paradigma imunológico Th1/Th2 (HEINZEL *et al.*, 1989; LOCKSLEY *et al.*, 1987; SCOTT *et al.*, 1988).

### 1.1 COLESTEROL

Nos últimos anos da década de 50, as etapas da síntese endógena de colesterol foram descobertas e essa extraordinária via biossintética foi identificada pelos pesquisadores Konrad Bloch, Feodor Lynen, John Cornforth, e George Popják (CORNFORTH, 2002; LEHNINGER; NELSON; COX, 2005). O colesterol é um lipídio esteróide característico de células animais. Tal nomenclatura (esterol) se justifica por sua estrutura que apresenta um grupo hidroxila no carbono C-3, portanto, é também um álcool (LEHNINGER; NELSON; COX, 2005). Esse esteróide é sintetizado em todas as células (DIETSCHY; WILSON, 1970a, 1970b, 1970c) e, entre os lipídios, é o mais estudado devido à forte correlação entre os níveis sanguíneos de colesterol e a incidência de doenças cardiovasculares em humanos

(CORNFORTH, 2002). O papel vital do colesterol se estende desde a composição das membranas celulares ao status de precursor essencial de outros compostos com funções orgânicas extremamente importantes como os hormônios esteróides, ácidos graxos e a vitamina D (colecalfiferol) (LEHNINGER; NELSON; COX, 2005). Tal qual outros ácidos graxos, o colesterol é constituído de acetil-CoA e possui uma estrutura complexa, apesar de ser derivado de uma molécula simples, o acetato. A síntese do colesterol ocorre em 4 etapas (SCHROEPFER, Jr., 1982):

- 1) condensação de 3 unidades de acetato para formar um intermediário de seis carbonos, o mevalonato;
- 2) conversão do mevalonato em unidades ativadas de isopreno;
- 3) polimerização de seis unidades de isopreno com 5 carbonos para formar o esqualeno linear com 30 carbonos;
- 4) ciclização do esqualeno para formar os quatro anéis do núcleo esteróide seguida de uma série de modificações (oxidação, remoção ou migração de grupos metil).

Na primeira etapa, ocorre a condensação de 3 moléculas de acetil-CoA, surge, inicialmente, um composto de 6 carbonos,  $\beta$ -hidroxi- $\beta$ -metil-glutaril-CoA (HMG-CoA). O próximo passo, a redução de HMG-CoA, origina o mevalonato. Esse passo é crucial e limitante da biossíntese do colesterol e de seus intermediários. A catálise é mediada por HMG-CoA redutase, proteína integral de membrana do retículo endoplasmático liso, cuja atividade é altamente regulada (BEG; BREWER, Jr., 1981; GOLDSTEIN; BROWN, 1990). Durante a segunda e terceira etapas da via biossintética do colesterol, são produzidos isoprenóides, moléculas derivadas do isopreno isopentenil pirofosfato (intermediário pirofosforilado). Os isoprenóides são unidades intermediárias na via e precursores de outros lipídios naturais que participam da modificação pós-traducional de proteínas. Farnesil pirofosfato (FPP) e geranylgeranyl pirofosfato (GGPP) estão envolvidos na isoprenilação de diversas proteínas e auxiliam no ancoramento dessas moléculas na membrana (GOLDSTEIN; BROWN, 1990).

Os hepatócitos, em comparação às demais células dos vertebrados, produzem colesterol em maior quantidade (DIETSCHY; WILSON, 1970a, 1970b, 1970c). Uma pequena fração desse produto é incorporada à membrana celular e o restante é exportado nas seguintes formas: colesterol biliar, ácidos biliares ou ésteres de colesterol. A catálise mediada pela acil-CoA-colesterol acil transferase (ACAT) converte o colesterol numa forma mais hidrofílica (BROWN; GOLDSTEIN, 1986), os ésteres de colesterol, transportados para outros tecidos em partículas, as lipoproteínas. As apolipoproteínas são as proteínas carreadoras que

compõem os complexos macromoleculares lipoprotéicos juntamente com combinações variadas de fosfolípidos, colesterol, ésteres de colesterol e triacilgliceróis. Diferentes proporções de apoproteínas e moléculas lipofílicas geram partículas de densidades distintas. As classes mais importantes de lipoproteínas humanas conhecidas são, em ordem crescente de densidade: quilomícrons, VLDL (“Very Low Density Lipoprotein”), LDL (“Low Density Lipoprotein”) e HDL (“High Density Lipoprotein”) (BREWER, Jr., 1981).

LDL, partícula rica em colesterol e ésteres de colesterol, carrega essas moléculas para tecidos extra-hepáticos. Os níveis elevados de LDL plasmático, aliados a eventuais lesões do endotélio vascular, são condições favoráveis ao surgimento da aterosclerose. Tal processo patológico acomete as artérias com endotélio lesado e é caracterizado pela deposição de colesterol na íntima vascular e formação do ateroma ou placa ateromatosa, um complexo de macrófagos espumosos (com grande quantidade de LDL oxidada no citoplasma), células inflamatórias, plaquetas, células musculares lisas e matriz celular alterada (STARY, 1992). O ateroma tende a se expandir para a luz do vaso e diminuir o fluxo sanguíneo. Esse quadro compromete a irrigação tecidual e pode culminar na oclusão completa da luz da artéria e infarto de tecidos ou órgãos dependendo da extensão da área suprida pelo vaso (ROSS; GLOMSET, 1976a, 1976b; STARY, 1992). Por esse motivo, o nível plasmático elevado de LDL (>160 mg/dL) (SANTOS, 2001; SPOSITO *et al.*, 2007) foi classificado como um dos fatores de risco mais relevantes para o surgimento da aterosclerose (KANNEL, 2000) e, conseqüentemente, da doença cardiovascular (ROSS; HARKER, 1976).

Por outro lado, o HDL contém em sua composição protéica a enzima lecitina-colesterol acil transferase, que converte o colesterol e a lecitina (fosfatidilcolina) dos quilomícrons e VLDL remanentes em ésteres de colesterol. O HDL passa da forma imatura à madura e carrega esses derivados de colesterol ao fígado onde o colesterol é desempacotado e parte dele convertida em sais biliares. A partícula de HDL, depletada de colesterol, se dissocia e recircula no sangue para extrair mais lipídios dos quilomícrons e do VLDL. O HDL também medeia o transporte reverso do colesterol dos tecidos extra-hepáticos ao fígado. Portanto, o papel do HDL é crucial para a redução dos níveis de colesterol circulantes no sangue, daí a sua ação vital, mesmo que indireta, na proteção vascular (LEHNINGER; NELSON; COX, 2005). Clinicamente, o controle dos níveis plasmáticos de LDL e HDL é uma ação de importância ímpar para a prevenção e intervenção na doença cardiovascular, bem como para o monitoramento de distúrbios lipídicos (SANTOS, 2001; SPOSITO *et al.*, 2007).

## 1.2 ESTATINAS

A etapa limitante na síntese endógena de colesterol, previamente descrita, é controlada pela HMG-CoA redutase. Na década de 70, no Japão, Akira Endo, em sua busca por inibidores da HMG-CoA redutase de origem microbiana com ação antibiótica, detectou a produção de componentes ativos por uma cepa do fungo *Penicillium citrinum* e descreveu a estrutura química da primeira estatina, mevastatina, formalmente denominada de ML-236B (ENDO; KURODA; TSUJITA, 1976). Anos depois, Endo e outros pesquisadores demonstraram que a mevastatina inibia fortemente a síntese de esterol a partir de acetato em diversas culturas de células de mamíferos (ENDO *et al.*, 1979; KANEKO; HAZAMA-SHIMADA; ENDO, 1978; KURODA *et al.*, 1979; TSUJITA *et al.*, 1979) e de células de pacientes com hipercolesterolemia (ENDO, 1976; YAMAMOTO; SUDO; ENDO, 1980).

As estatinas, por um mecanismo de inibição competitiva, impedem a ligação de HMG-CoA à enzima-alvo, HMG-CoA redutase, e bloqueiam cabalmente a produção do mevalonato e dos demais produtos da via de biossíntese de colesterol (ENDO; KURODA; TANZAWA, 1976; GRUNDY, 1988). Outras estatinas naturais são: lovastatina, sinvastatina e pravastatina. Com base na estrutura química das estatinas naturais foram desenvolvidas estatinas sintéticas: fluvastatina, atorvastatina, mais antigas, rosuvastatina e pitavastatina, mais recentes (WEITZ-SCHMIDT, 2002). Em 1987, a lovastatina foi aprovada para uso clínico nos Estados Unidos (ENDO, 2004). Devido ao seu excelente perfil de segurança clínica e sua performance eficaz na redução do nível de LDL e aumento do nível de HDL no plasma, as estatinas são os fármacos de primeira escolha para o tratamento de hipercolesterolemia e também para a prevenção e o controle da doença cardiovascular (SANTOS, 2001; SPOSITO *et al.*, 2007).

Desde que foi demonstrado que a doença cardiovascular tem componentes inflamatórios extremamente relevantes (JORIS; STETZ; MAJNO, 1979) e voltou-se a atenção para esses aspectos na evolução clínica dos pacientes que utilizavam estatinas, foi possível correlacionar alterações no quadro patológico a um provável efeito farmacológico independente da redução dos níveis de colesterol (BROWN *et al.*, 1990; NOVELA; HENNEKENS, 2004). Pesquisas clínicas demonstraram que as estatinas reduzem a morbimortalidade cardiovascular em pacientes normo e hipercolesterolêmicos (MARON; FAZIO; LINTON, 2000; VAUGHAN; MURPHY; BUCKLEY, 1996) com ou sem doença cardíaca (DOWNS *et al.*, 1998; SIMES *et al.*, 2002). A rejeição no transplante cardíaco e a vasculopatia coronária também foram reduzidas com o tratamento (WENKE *et al.*, 1997). A

terapia com estatinas diminuiu o nível de proteína C reativa circulante que é um importante marcador de inflamação (RIDKER *et al.*, 2001). Esses e vários outros eventos clínicos reforçaram a hipótese de que as estatinas teriam efeitos antiinflamatórios independentes do efeito redutor de colesterol. Diversas evidências dessas ações foram acrescentadas a partir de estudos *in vitro* e em modelos animais de aterosclerose (MCKAY *et al.*, 2004; WILLIAMS *et al.*, 1998). A partir daí, a associação dos dados obtidos com os trabalhos seguintes permitiram que alguns mecanismos das ações antiinflamatórias das estatinas fossem elucidados.

Como exposto anteriormente, as estatinas impedem a síntese de colesterol e, conseqüentemente, prejudicam a síntese de metabólitos intermediários (em particular, FPP e GGPP) encarregados da prenilação de proteínas (TAKEMOTO; LIAO, 2001). Essa modificação pós-traducional é essencial para o ancoramento dessas proteínas na membrana celular. Entre as principais proteínas preniladas estão as GTPases, membros das famílias Ras e Rho, importantes nos processos de crescimento, proliferação e sinalização celular e outras funções biológicas (HANCOCK *et al.*, 1989; MCCORMICK, 1990).

A sinalização das proteínas das famílias Rho e Rac está relacionada aos processos de migração celular, portanto, influencia a motilidade e a migração de leucócitos. Tais GTPases regulam a dinâmica dos microtúbulos de actina do citoesqueleto e também controlam o movimento celular permitindo o direcionamento da célula no sentido de um gradiente quimiotático (ALLEN *et al.*, 1997). As estatinas comprometem as vias de sinalização engatilhadas por essas proteínas.

### **1.2.1 EFEITOS DAS ESTATINAS NA RESPOSTA IMUNOLÓGICA**

Já foi demonstrado que as estatinas inibem a expressão dos receptores de quimiocinas induzida por citocinas e mediada pela sinalização por GTPases (HAN *et al.*, 2005; VEILLARD *et al.*, 2006). Além da inibição da expressão dos receptores, as estatinas interferem na produção de quimiocinas CCL5/RANTES (DIOMEDE *et al.*, 2001) e CCL2/MCP-1 (DIOMEDE *et al.*, 2001; FRUSCELLA *et al.*, 2000; XU *et al.*, 2003). A modulação da expressão do NF- $\kappa$ B pela inibição da prenilação de seus ativadores impede a indução da transcrição dos genes dessas quimiocinas (ORTEGO *et al.*, 1999). Dessa forma, a migração de leucócitos induzida por RANTES e de monócitos induzida por MCP-1 é diminuída.

A migração de leucócitos também é prejudicada pelos inibidores da HMG-CoA redutase através do bloqueio da secreção de metaloproteinases (MMP), enzimas que facilitam a passagem das células pela lâmina basal do endotélio e matriz extracelular (BELLOSTA *et al.*, 1998; IKEDA *et al.*, 2000; XU *et al.*, 2003). A expressão das MMPs, especialmente da MMP-9, também depende das vias de sinalização das GTPases. Um mecanismo possível para o bloqueio da secreção de MMP-9 pelas estatinas é a inibição da ativação do fator de transcrição NF- $\kappa$ B (GANNE *et al.*, 2000).

A adesão celular ao endotélio envolve a interação de integrinas nos leucócitos e selectinas na membrana das células endoteliais (KELLY; HWANG; KUBES, 2007). As estatinas inibem a expressão das integrinas LFA-1, Mac-1 e VLA-4 nos leucócitos (NIWA; TOTSUKA; HAYASHI, 1996; WEBER *et al.*, 1997; YOSHIDA *et al.*, 2001) bem como a expressão de ICAM-1, VCAM-1, P-selectina e E-selectina no endotélio (HWANG *et al.*, 2004; NUBEL *et al.*, 2004; PRASAD *et al.*, 2005; TAKEUCHI *et al.*, 2000). VCAM-1 medeia a migração celular gerando sinais para a organização do citoesqueleto do endotélio. Esses sinais levam à ativação de proteínas, entre elas MAP kinases e NF- $\kappa$ B, e ao aumento da atividade da NADPH oxidase que resulta em produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), reorganização da actina e perda da VE-caderina que mantém o contato intercelular no endotélio (VAN *et al.*, 2003). ROS são potentes ativadores de NF- $\kappa$ B que está intimamente associado ao controle da inflamação e das respostas imunes, induzindo a expressão de citocinas e moléculas de adesão (ABBAS; LICHTMAN, 2005). A sinalização desencadeada por VCAM-1 é dependente da ação de GTPases Rac (COOK-MILLS *et al.*, 2004), logo esse processo também é susceptível à inibição por estatinas.

A análise da estrutura química das estatinas levou à identificação da lovastatina como um inibidor extracelular do LFA-1. Foi detectado um domínio de ligação da lovastatina ao LFA-1, posteriormente denominado de sítio da lovastatina (“L-site”) (KALLEN *et al.*, 1999; WEITZ-SCHMIDT *et al.*, 2001). A ligação da lovastatina a esse domínio estabiliza o receptor do ICAM-1 numa conformação inativa. Essa mesma ação foi demonstrada com sinvastatina e mevastatina (WEITZ-SCHMIDT, 2002).

Além de comprometerem a diapedese, as estatinas interferem na formação da sinapse imunológica. Esses fármacos inibem a expressão do MHC de classe II induzida por IFN- $\gamma$  por meio da inibição da expressão do transativador do MHC de classe II (CIITA), dessa forma, impedem a apresentação de antígenos às células T CD4<sup>+</sup>. Em relação à expressão do MHC de classe I, os dados são inconclusivos (KWAK *et al.*, 2000; KWAK *et al.*, 2001).

Para que haja uma resposta T efetiva à apresentação de um antígeno é necessário um segundo sinal gerado pela interação de moléculas co-estimulatórias (ABBAS; LICHTMAN, 2005). A atorvastatina inibe a maturação de células dendríticas e outras apresentadoras de antígenos pelo bloqueio da expressão de altos níveis de CCR7 (receptor para a citocina IL-7) e dos co-estimuladores CD40, CD80 e CD86 (YILMAZ *et al.*, 2004). Assim, essas células dendríticas se tornam ineficazes na indução da proliferação de células T e fica evidente que as estatinas interferem na geração do segundo sinal para ativação celular e produção de uma resposta imune eficaz a um determinado antígeno.

Antes da apresentação de um antígeno, são necessários sua internalização e processamento no interior da célula. Esse processo depende do remodelamento do citoesqueleto (ABBAS; LICHTMAN, 2005). Como já foi abordado, essa reestruturação é uma consequência da ativação de GTPases. Portanto, o processamento de antígenos no citoplasma está sujeito à interferência pela terapia com estatinas.

Outro alvo potencial das estatinas é a estrutura da membrana celular. A organização das proteínas e complexos protéicos de sinalização celular na superfície da membrana depende da formação dos “lipid rafts”, microdomínios de membrana ricos em colesterol e glicolipídios que funcionam comojangadas de ancoramento de proteínas. As proteínas presentes nesses microdomínios têm sua capacidade de difusão na membrana plasmática limitada. A localização de moléculas sinalizadoras nos lipid rafts é essencial para a ativação de células T e B. O ancoramento de tais moléculas nos microdomínios lipídicos de membrana permite a concentração dessas proteínas na sinapse imunológica (PIERCE, 2002; PIZZO; VIOLA, 2003).

O efeito das estatinas na composição lipídica da membrana e na formação dos “lipid rafts” ainda é controverso. Alguns trabalhos mostram que o tratamento com determinadas estatinas leva à perda da arquitetura dos microdomínios lipídicos e ao comprometimento da função de moléculas essenciais na resposta imune (HILLYARD *et al.*, 2004a). Ocorre diminuição da expressão MHC de classe II e da sinalização promovida pelo receptor de Fcγ e alteração da localização da Lck (tirosina quinase específica de linfócitos) essencial para a ativação de células T (HILLYARD *et al.*, 2004b). Determinadas células, especialmente linfócitos T de fenótipo Th1, não respondem às estatinas com alteração da estrutura dos microdomínios lipídicos. Dados de experimentos *in vitro* indicam que o tratamento de camundongos com atorvastatina não tem efeito sobre o conteúdo de colesterol das células T (DUNN *et al.*, 2006).

A ação pleiotrópica das estatinas se estende à interação com a imunidade inata. Foi demonstrado que a expressão do receptor TLR4 em monócitos humanos e a sinalização gerada pela ativação desse receptor foi prejudicada pela inibição da geranilgeranilação e farnesilação provocada por atorvastatina e sinvastatina (METHE *et al.*, 2005; NIESSNER *et al.*, 2006).

O aumento da atividade da enzima óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) pelas estatinas foi extensamente estudada em diversos trabalhos demonstrando o benefício adicional desses fármacos na terapia da doença cardiovascular (ENDRES *et al.*, 1998; LAUFS *et al.*, 1998). As estatinas melhoram a função endotelial, pois o óxido nítrico, além de ser um potente vasodilatador, inibe a adesão, migração e a quimiotaxia dos leucócitos (BATH *et al.*, 1991; TAKAHASHI *et al.*, 1996). Além disso, os inibidores da HMG-CoA redutase diminuem o nível de LDL oxidado no sangue que inibe a transcrição de eNOS e sua síntese protéica. Por outro lado, algumas estatinas, entre elas a atorvastatina, inibem a atividade da enzima óxido nítrico sintase indutível (iNOS) em astrócitos e macrófagos, mas essa ação foi variável a depender da dose utilizada do fármaco (HUANG *et al.*, 2003). Tanto o mecanismo de ativação da eNOS quanto a inibição da iNOS são mediados pela inibição da prenilação de proteínas da família das GTPases com funções distintas sobre as vias de sinalização para a expressão das enzimas produtoras de óxido nítrico (LAUFS; LIAO, 1998).

Em relação ao efeito das estatinas sobre as células T regulatórias, dados recentes demonstraram que a atorvastatina aumentou o número de células T regulatórias com elevada expressão de CD25 e Foxp3. Sinvastatina e pravastatina também aumentaram a população dessas células em pacientes hipercolesterolêmicos (MAUSNER-FAINBERG *et al.*, 2007).

Nos últimos dez anos, diversos estudos revelaram a ação imunomoduladora dos inibidores da HMG-Co A redutase que se manifesta pela alteração na produção de certas citocinas. Desde então, esse efeito tem sido largamente estudado *in vitro* e *in vivo*. As estatinas inibem a produção de citocinas pró-inflamatórias IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6 (GRIP; JANCIAUSKIENE; LINDGREN, 2000; ROSENSON; TANGNEY; CASEY, 1999). Em indivíduos hipercolesterolêmicos tratados com estatinas, houve diminuição dos níveis séricos de TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 e IL-8 (ASCER *et al.*, 2004; REZAIE-MAJD *et al.*, 2002). Em pacientes com hipercolesterolemia familiar heterozigótica sob terapia com atorvastatina, foi detectada a diminuição do nível sérico de IL-12 e nenhuma alteração na expressão do gen de IL-10 (NAOUMOVA *et al.*, 2003). A secreção de MIP-1 $\alpha$  e IL-8 é diminuída em pacientes com doença arterial tratados com atorvastatina (WAEHRE *et al.*, 2003).

Em diversos trabalhos que estudaram o efeito dos inibidores da HMG-CoA redutase em doenças inflamatórias, especialmente enfermidades auto-imunes, as estatinas inibiram a indução da resposta Th1, dessa forma, modularam a progressão da doença (HAKAMADA-TAGUCHI *et al.*, 2003; MCKAY *et al.*, 2004; YOUSSEF *et al.*, 2002). Um possível mecanismo é a mudança no fenótipo das células T. Youssef e colaboradores (2002) demonstraram claramente esse mecanismo em um modelo murino de encefalomielite auto-imune experimental, doença que corresponde à esclerose múltipla em humanos. Nesse trabalho, a atorvastatina induziu a fosforilação de STAT-6, fator de transcrição envolvido na diferenciação celular dependente de IL-4 para o fenótipo Th2. Dessa forma, secreção de citocinas antiinflamatórias (IL-4, IL-5 e IL-10) foi aumentada. Por outro lado, a fosforilação de STAT-4, requerida para a diferenciação celular para o fenótipo Th1, dependente de IL-12 foi inibida. Conseqüentemente, houve inibição da secreção de IL-2, IL12, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ . Dados que corroboraram esses achados revelaram que o tratamento com estatinas promoveu a expressão de GATA-3, um fator de transcrição envolvido na diferenciação Th2, e inibiu a ativação de NF- $\kappa$ B e T-bet, associados à diferenciação Th1 (NATH *et al.*, 2004).

Nem todos os trabalhos mostram que as estatinas atuam polarizando a resposta imune no sentido do fenótipo Th2. Uma explicação possível é a variação nas doses aplicadas dos fármacos e nos tipos de modelos experimentais de doenças inflamatórias estudados em cada trabalho. Fluvastatina reduziu concomitantemente a produção de citocinas Th1 e Th2 em modelo experimental de miocardite auto-imune (AZUMA *et al.*, 2004). Em estudos *in vitro* com células mononucleares sanguíneas de pacientes com esclerose múltipla foram obtidos resultados extremamente interessantes: as estatinas não polarizaram a resposta imune para nenhum dos dois tipos e foi detectado aumento da produção de IFN- $\gamma$  e IL-12 (NEUHAUS *et al.*, 2002).

O mecanismo exato da intervenção das estatinas no balanço Th1/Th2 evidenciada em vários trabalhos ainda não está esclarecido, mas já se sabe que a diferenciação para Th2 induzida pela atorvastatina é revertida pelo mevalonato (YOUSSEF *et al.*, 2002), indicando que os metabólitos da via de síntese de colesterol influenciam a diferenciação para Th1. Estudos recentes demonstraram que a farnesilação e a prenilação de proteínas Ras e Rho é essencial para a modulação desse efeito (DUNN *et al.*, 2006).

Apesar da divergência em alguns dados em relação à ação imunossupressora das estatinas, vários trabalhos se concentram no estudo do potencial terapêutico desses fármacos em doenças auto-imunes (AKTAS *et al.*, 2003; YOUSSEF *et al.*, 2002). Outra característica

que anima os pesquisadores e clínicos é a baixa incidência de reações adversas associadas à terapia com estatinas (CLARK, 2003; SCHAEFER *et al.*, 2004).

Diante do largo espectro de ação dos inibidores da HMG-CoA redutase sobre o sistema imunológico e das evidências contundentes de que esses fármacos possuem ação antiinflamatória com potencial terapêutico, surgiram trabalhos propondo a ampliação do uso das estatinas pela produção polipílulas contendo diversos fármacos de ação cardiovascular e como agentes profiláticos da doença cardíaca em indivíduos normocolesterolêmicos (LAW; WALD; RUDNICKA, 2003; WALD; LAW, 2003).

### 1.3 LEISHMANIOSE

A leishmaniose é uma doença parasitária, cujas manifestações clínicas têm diversas facetas. Essa parasitose está relacionada a agentes etiológicos de diversas espécies do gênero *Leishmania* e a distribuição da doença no planeta é muito ampla. Atualmente, a leishmaniose é prevalente em quatro continentes totalizando 88 países onde é endêmica (22 no Novo Mundo e 66 no Velho Mundo) (DESJEUX, 1996). Clinicamente, são classificados dois grandes grupos: a leishmaniose tegumentar e a leishmaniose visceral. Mais de 90% dos casos de leishmaniose tegumentar ocorre no Afeganistão, Irã, Arábia Saudita e Síria e mais de 90% dos casos de leishmaniose visceral são detectados em Bangladesh, Brasil, Índia e Sudão (DESJEUX, 1996). A forma tegumentar, a depender das manifestações clínicas, pode ser dividida em subgrupos: cutânea simples (aguda e crônica), mucocutânea e cutânea difusa. A forma cutânea se caracteriza pela formação de pápulas eritematosas que evoluem para nódulos indolores. Esses nódulos podem curar, mas normalmente ulceram como crateras na pele atingindo apenas a derme. A lesão pode apresentar cura espontânea após 2 a 6 meses ou ter uma evolução crônica por dois anos ou mais. As espécies que causam essa forma clínica são: *L. major*, *L. tropica* e *L. aethiopica* no Velho Mundo (DOWLATI, 1996); e *L. amazonensis*, *L. panamensis*, *L. peruviansis*, *L. braziliensis*, *L. guyanensis*, *L. laisoni*, *L. mexicana* e *L. pifanoi* no Novo Mundo (WEIGLE; SARAVIA, 1996). A forma mucocutânea, causada pelas espécies *L. braziliensis* e a *L. panamensis*, inicia-se com uma lesão cutânea e depois acomete nariz, faringe e boca e em casos mais graves, laringe e traquéia (PIRMEZ, 1992). A forma cutânea difusa é caracterizada pelo surgimento de um nódulo que inicialmente não ulcera. Em seguida, novos nódulos surgem se difundindo na face e em todo o corpo do

paciente. Os órgãos internos podem ser acometidos. Essas manifestações são provocadas pelas seguintes espécies: *L. aethiopica* no Velho Mundo; e *L. mexicana*, *L. amazonensis* e *L. pifanoi*, no Novo Mundo (DOWLATI, 1996). O segundo grande grupo compreende a leishmaniose visceral em que o parasito se dissemina pelo organismo promovendo uma infecção generalizada crônica acompanhada de febre, hepatoesplenomegalia, culminando em debilidade progressiva e morte muitas vezes associadas a infecções secundárias. No Velho Mundo, é causada por *L. donovani* e *L. infantum* e no Novo Mundo pela *L. chagasi*.

A infecção natural ocorre através da picada da fêmea do flebotômíneo: *Phlebotomus spp.*, no Velho Mundo, e *Lutzomia spp.*, no Novo Mundo (KILLICK-KENDRICK, 1990b). Mamíferos são os reservatórios naturais do parasito e, quando picados, transmitem o protozoário ao vetor. Pela saliva do mosquito, formas promastigotas metacíclicas do parasito (forma com maior potencial infectante) são inoculadas na pele do hospedeiro e engolfadas por células do sistema mononuclear fagocitário, principalmente os macrófagos. No mamífero, *Leishmania* é um parasito intracelular obrigatório que, no interior de vacúolos no citoplasma do fagócito, assume a forma amastigota (sem flagelo) e prolifera (KILLICK-KENDRICK, 1990a).

Ao penetrar no organismo do hospedeiro vertebrado, o protozoário inicia sua interação com o sistema imunológico. Neutrófilos e polimorfonucleares são as primeiras células a migrarem para o tecido infectado e também são as primeiras a fagocitarem o protozoário (CHANG, 1981; PEARSON; STEIGBIGEL, 1981). Elas produzem enzimas proteolíticas e espécies reativas de oxigênio na tentativa de destruir os microorganismos. Neutrófilos secretam MIP-2 e KC (homólogos murinos de IL-8) que atraem mais neutrófilos, e MIP-1 $\alpha$  e MIP-1 $\beta$ , quimioatraentes de monócitos e macrófagos. Os macrófagos, ao fagocitarem as células polimorfonucleares apoptóticas infectadas, não exercem suas atividades microbicidas. Esse é um mecanismo de entrada silenciosa da *Leishmania* nas células do hospedeiro. Antes de entrarem em apoptose, os neutrófilos infectados secretam citocinas que afetam a ativação e a diferenciação das células T (Revisto por AWASTHI; MATHUR; SAHA, 2004).

As células dendríticas são eficientes apresentadoras de antígeno (GUERMONPREZ *et al.*, 2002) e também produzem IL-12, IL-10 e IFN- $\gamma$  (CELLA *et al.*, 1996; QI; DENNING; SOONG, 2003; STOBBER; SCHIRMBECK; REIMANN, 2001). Assim, essas células podem influenciar o desenvolvimento da resposta adaptativa a *Leishmania*. Foi demonstrado que células dendríticas derivadas da pele infectadas com amastigotas produzem IL-12p70 (MCDOWELL *et al.*, 2002), expressam mais moléculas co-estimulatórias e são potentes

adjuvantes na vacinação contra a infecção por *L. major* (GHOSH *et al.*, 2003; SCOTT; HUNTER, 2002).

As células NK também são participantes ativos da resposta imune inata contra *Leishmania*, pois são importantes fontes de IFN- $\gamma$  (SCHARTON; SCOTT, 1993), principalmente sob estímulo de IL-12 (SCHARTON-KERSTEN *et al.*, 1995).

Outros componentes da resposta imune inata que coordenam a resposta inflamatória são os receptores tipo Toll. A sinalização mediada por TLR4 favorece o controle da infecção por *L. major*. Camundongos com deficiência desse receptor apresentam maior parasitismo correlacionado com atividade aumentada de arginase (KROPF *et al.*, 2004), enzima que promove a proliferação do parasito (KROPF *et al.*, 2005).

Antígenos do parasito podem ser apresentados aos linfócitos via MHC de classe II ou classe I. No controle da infecção por *L. major*, alguns trabalhos mostram que o MHC de classe II parece ter um papel mais importante. Camundongos deficientes dessa molécula sucumbem à infecção (LOCKSLEY *et al.*, 1993). Isso sugere que as células CD4<sup>+</sup> são mais importantes que as CD8<sup>+</sup> para o controle de *L. major*, apesar de os linfócitos CD8<sup>+</sup> serem importantes fontes de IFN- $\gamma$  (WANG *et al.*, 1993), principal citocina envolvida no controle do parasitismo.

A infecção experimental por *Leishmania* em camundongos é um modelo tradicional para o estudo da resposta imune na forma cutânea da doença. Na infecção por *L. major*, o camundongo da linhagem C57BL/6 é modelo de resistência e a resposta imune contra o parasito é tipo 1, enquanto, a linhagem BALB/c é susceptível e apresenta uma resposta polarizada em tipo 2 (LOCKSLEY *et al.*, 1987; REINER; LOCKSLEY, 1993).

O passo crucial para a montagem da resposta tipo 1 é a produção duradoura de altos níveis de IL-12. A ligação dessa molécula ao seu receptor estimula a fosforilação do fator de transcrição STAT-4 que leva à diferenciação dos linfócitos T para o fenótipo Th1 (produtores de grandes quantidades de IFN- $\gamma$ ) (GAZZINELLI, 1996; REINER; LOCKSLEY, 1993). IL-12 é produzida por células dendríticas, macrófagos, polimorfonucleares e células B (TRINCHIERI, 1995). A ligação CD40-CD40L entre macrófagos ou células dendríticas e as células T estimula a produção de IL-12 pelas células apresentadoras de antígenos. IFN- $\gamma$  também estimula a produção IL-12 e interfere na responsividade celular a essa citocina. A sinalização de STAT-1 ativada por IFN- $\gamma$  aumenta a expressão de T-bet, fator de transcrição envolvido na expressão de IL-12 $\beta$ 2, uma das cadeias do receptor de IL-12, em células T

CD4<sup>+</sup> (AFKARIAN *et al.*, 2002). IL-12 inibe a produção de IL-4 que levaria à diferenciação dos linfócitos para o fenótipo Th2 (HEINZEL *et al.*, 1993b).

IFN- $\gamma$  é a citocina chave na resistência contra *L. major*. Camundongos deficientes de IFN- $\gamma$  ou do receptor de IFN- $\gamma$  não controlam a proliferação do parasito e sucumbem à infecção (SWIHART *et al.*, 1995; WANG *et al.*, 1993). Essa citocina é um potente ativador da transcrição da enzima óxido nítrico sintase indutível (iNOS) levando à produção de óxido nítrico a partir de L-arginina (GREEN *et al.*, 1990a). A produção de óxido nítrico (NO) nos macrófagos infectados é crucial para o controle da replicação dos parasitos (GREEN *et al.*, 1990c; GREEN *et al.*, 1990b). TNF- $\alpha$  é uma citocina que atua sinergicamente com IFN- $\gamma$  na indução de iNOS (GREEN *et al.*, 1990c; GREEN *et al.*, 1990b). TNF- $\alpha$  tem um papel central no controle da adesão de leucócitos ao endotélio ativado. Em sinergismo com IL-1, TNF- $\alpha$  ativa células endoteliais estimulando a expressão de moléculas de adesão de leucócitos. O receptor p55 de TNF- $\alpha$  medeia a indução da expressão de VCAM-1 e E-selectina por células endoteliais. VCAM-1 se liga a VLA-4 expressa em células T (NEUMANN *et al.*, 1996). O receptor p75 de TNF induz a expressão de ICAM-1 ligante de LFA-1, expressa por linfócitos B e T, granulócitos e timócitos (HYNES, 1992). Os receptores p55 e p75 de TNF estão envolvidos na indução de MMP-9, metaloproteinase que promove a destruição da matriz extracelular favorecendo a migração de células inflamatórias para o tecido (VADAY *et al.*, 2000). Outras citocinas importantes na resposta a *Leishmania* são IL-18, IL-23 e IL-27 que favorecem a produção de IFN- $\gamma$  pelos linfócitos T CD4<sup>+</sup> (GUMY; LOUIS; LAUNOIS, 2004).

Quimiocinas também têm um papel relevante no controle da infecção por *L. major* (SANTIAGO *et al.*, 2004). CCL5/RANTES induz a expressão de IL-12 (ALIBERTI *et al.*, 2001) e IFN- $\gamma$  (MAKINO *et al.*, 2002). Essa quimiocina atrai diversos tipos celulares ao sítio inflamatório. Portanto, neste modelo de infecção, CCL5 é importante para a atração de células Th1, principalmente células T de memória (WEBER *et al.*, 2001). O papel de CCL2/MCP-1 na resistência ou susceptibilidade à infecção por *L. major* ainda não foi bem estabelecido. Já foi demonstrado que a expressão de CCL2 em macrófagos correlaciona-se com o controle do parasito. Contudo, células dendríticas imaturas migram para o sítio de infecção por *L. major* atraídas por CCL2. Dessa forma, o antígeno e o infiltrado inflamatório se mantêm em tecidos periféricos (STEIGERWALD; MOLL, 2005). Em camundongos BALB/c, há expressão de CCL2 por macrófagos (RACOOSIN; BEVERLEY, 1997) e camundongos dessa mesma linhagem deficientes de CCL2 são mais resistentes ao parasito (GU *et al.*, 2000). Por outro lado, a deficiência do receptor de CCL2 está associada à susceptibilidade à *L. major*

(QUINONES *et al.*, 2007; SATO *et al.*, 2000). Em humanos, CCL2 foi relacionado à resistência à leishmaniose (RITTER *et al.*, 1996; RITTER; MOLL, 2000).

A infecção por *L. major* em camundongos BALB/c configura o protótipo de susceptibilidade, pois a resposta imunológica desenvolvida nesses animais não confere proteção contra os parasitas intracelulares. A resposta Th2 se desenvolve a partir da produção de altos níveis da citocina IL-4, estímulo para a ativação de STAT-6 que leva à diferenciação dos linfócitos T para o fenótipo Th2. As células T com TCR V $\beta$ 4/V $\alpha$ 8 são os maiores produtores de IL-4 no camundongo BALB/c infectado com *L. major*. IL-4 inibe a produção de IL-12 e a expressão do seu receptor IL-12R $\beta$ 2 e, assim, prejudica o desenvolvimento da resposta Th1 (Revisto por MCMAHON-PRATT; ALEXANDER, 2004)). A susceptibilidade a *Leishmania* mediada por IL-4 é dependente de outros fatores como IL-2 e IL-10. Camundongos BALB/c tratados com anticorpo anti-IL-2 apresentaram maior resistência à *L. major* (HEINZEL *et al.*, 1993a) e o tratamento de camundongos dessa mesma linhagem com anti-IL-10 ou a deleção do gene desta citocina permitiu a cura da infecção (ANDERSON; MENDEZ; SACKS, 2005; NOBEN-TRAUTH *et al.*, 2003). IL-13 compartilha algumas funções biológicas com IL-4, como a geração de células Th2 (CHOMARAT; BANCHEREAU, 1998), e está envolvida na susceptibilidade à *L. major*. Entretanto, foi demonstrado que o camundongo C57BL/6 é susceptível à linhagem de *L. major* LV39 mesmo desenvolvendo a resposta Th1 e não produzindo IL-4 e IL-13. A resistência observada após inibição de IL-10 neste animal confirmou o papel dessa citocina na permissividade ao parasito (ANDERSON; MENDEZ; SACKS, 2005). IL-10 tem ação supressora e regulatória, inibe as funções de macrófagos e células dendríticas ativadas como a produção de IL-12 e a expressão de moléculas co-estimulatórias e do MHC de classe II (Revisto por O'GARRA, 2007). Além disso, IL-10 suprime as respostas ao IFN- $\gamma$  e desativa os mecanismos leishmanicidas dos macrófagos mediados por IFN- $\gamma$  (MOORE *et al.*, 2001). IL-10 e IL-4 têm a capacidade de regular a ativação dos macrófagos mediada por IFN- $\gamma$  (LIEW *et al.*, 1989). TGF- $\beta$  também é conhecida como uma citocina regulatória que pode atuar favorecendo a manutenção da *Leishmania* no organismo do hospedeiro. O efeito do TGF- $\beta$  tem sido associado à inibição das funções dos macrófagos importantes para a eliminação do parasito como a produção de NO levando à progressão das lesões (LI; HUNTER; FARRELL, 1999). TGF- $\beta$  pode agir também diretamente sobre as células T inibindo a expressão de T-bet bloqueando a diferenciação para o fenótipo Th1 (GORELIK; CONSTANT; FLAVELL, 2002).

Outro fator envolvido na persistência da *Leishmania* nas linhagens de camundongos susceptíveis é a ativação da enzima arginase I nos macrófagos infectados. As citocinas IL-4, IL-10 e TGF- $\beta$  são indutoras dessa enzima (BOUTARD *et al.*, 1995; CORRALIZA *et al.*, 1995). A hidrólise da L-arginina pela arginase gera uréia e ornitina, esta última utilizada para síntese de poliaminas, que podem ser captadas pelo parasito e utilizadas como substratos para crescimento e proliferação (ROBERTS *et al.*, 2004a). Já foi demonstrado que o crescimento de *L. major in vitro* no interior dos macrófagos é aumentado sob a indução de arginase I (INIESTA *et al.*, 2002b), logo a inibição da enzima tem o efeito oposto (INIESTA; GOMEZ-NIETO; CORRALIZA, 2001). A indução da atividade de arginase *in vivo* foi correlacionada à susceptibilidade à infecção. Em camundongos BALB/c, a expressão de arginase foi induzida por IL-4 e associada ao aumento do edema na lesão. Em contraste, no camundongo C57BL/6, o estabelecimento de uma resposta protetora restaura os níveis basais da enzima ao longo do processo de resolução das lesões (INIESTA *et al.*, 2005).

Ao longo dos anos, tornou-se claro que não apenas a resposta Th2 integrava o contexto imunológico responsável pela susceptibilidade a *L. major*. Isso foi possível a partir da percepção do papel das citocinas IL-10 e TGF- $\beta$  e da identificação das células T regulatórias, principais fontes dessas moléculas em camundongos e humanos (BELKAID, 2003). IL-10 não é uma citocina cuja expressão está associada ao fator de transcrição GATA-3, importante para a expressão de IL-4, IL-5 e IL-13 (GLIMCHER; MURPHY, 2000) em células Th2. Assim ela pode ser expressa em outros subtipos de células CD4+ como as células T regulatórias naturais. Tais células apresentam alta expressão do fator de transcrição Foxp3 e de CD25 (cadeia  $\alpha$  do receptor de IL-2). Elas suprimem várias respostas potencialmente patogênicas, especialmente as respostas de células T contra auto-antígenos (SACKS; ANDERSON, 2004). Essas células têm a habilidade de suprimir a resposta Th1 específica contra *Leishmania* e, em camundongos resistentes, impedem a cura estéril pela produção de IL-10 (BELKAID *et al.*, 2002). Na infecção por *L. major* no camundongo C57BL/6, as células CD25+ mantêm a memória imunológica via mecanismos dependentes ou não de IL-10 (BELKAID *et al.*, 2002). O tratamento de camundongos BALB/c com anti-CD25 nas primeiras quatro semanas de infecção com *L. major* os tornou menos susceptíveis (HEINZEL *et al.*, 1993a). Um achado extremamente interessante foi a detecção de grande quantidade de células produtoras de IFN- $\gamma$  e células CD25+ na orelha de camundongos C57BL/6 infectados com *L. major* da linhagem NIH/Seidman que, nesses animais, provocava lesões que não curavam (SACKS; ANDERSON, 2004; ANDERSON *et al.*, 2005). Células T regulatórias

têm a capacidade de suprimir a proliferação de outras populações de células T (SHEVACH, 2002).

Como exposto previamente, a leishmaniose é um problema de saúde pública mundial. Independente desse fato, o uso das estatinas tem se expandido vertiginosamente em todo o mundo. Não se sabe ainda qual impacto da terapia prolongada em pessoas portadoras de doenças infecciosas crônicas como a leishmaniose diante do potencial imunossupressor das estatinas. A maioria dos estudos envolvendo inibidores da HMG-CoA redutase não tem esse foco. Portanto, a pesquisa clínica e experimental que investigue se há interação entre doenças infecciosas, seus agentes etiológicos e estatinas é de extrema importância para assegurar que a expansão do uso desses fármacos não ofereça maiores riscos para os pacientes. Diante disso, nossa hipótese era que a atorvastatina, por meio de algum de seus mecanismos imunomoduladores e imunossupressores, seria capaz de comprometer o controle da infecção experimental por *Leishmania* em um hospedeiro naturalmente resistente.

Em nosso trabalho, estudamos o efeito do tratamento a longo prazo com atorvastatina, fármaco com propriedades antiinflamatórias e imunomoduladoras, em camundongos da linhagem C57BL/6 infectados com *L. major*, parasito ao qual tais animais são naturalmente resistentes. Primeiramente, avaliamos o comportamento do parasito no hospedeiro frente ao tratamento pela quantificação do parasitismo tecidual na lesão. Em seguida, para avaliar se o fármaco interferiu no perfil da resposta imunológica do hospedeiro, analisamos a produção de citocinas no sítio de infecção e no linfonodo drenante, medimos a produção de anticorpos séricos específicos anti-leishmania e investigamos as populações celulares prevalentes no linfonodo drenante pela pesquisa de células T regulatórias, células apresentadoras de antígenos e linfócitos por citometria de fluxo. Finalmente, na tentativa de elucidar possíveis mecanismos pelos quais a atorvastatina poderia interferir no controle do parasito dosamos a atividade das enzimas arginase e iNOS em macrófagos peritoneais.

## **2 OBJETIVOS:**

### **2.1 OBJETIVO GERAL**

Investigar o efeito da atorvastatina sobre o perfil de resistência imunológica do camundongo C57BL/6 contra a infecção por *Leishmania major*.

### **2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:**

Em camundongos C57BL/6:

- 1- Investigar o efeito da atorvastatina sobre o curso de infecção na pata por *Leishmania major*
- 2- Investigar o efeito da atorvastatina na resposta imune a *Leishmania major*
- 3- Investigar possíveis mecanismos relacionados aos efeitos da atorvastatina na infecção e na resposta imune a *Leishmania major*

### **3 MATERIAIS E MÉTODOS:**

#### **3.1 ANIMAIS**

Foram utilizados camundongos C57BL/6, com idade entre 6 e 9 semanas, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Minas Gerais, CEBIO-UFMG. Esses animais foram submetidos a banhos de deltrametrina (TRIATOX® Coopers Brasil Ltda, São Paulo, SP, Brasil) diluído 1:100 em dias alternados, desde a entrada até o décimo dia no biotério experimental do Laboratório de Gnotobiologia e Imunologia (LGI). Os animais também receberam Ricobendazol (Ouro Fino, Ribeirão Preto, SP, Brasil) diluído 1:200 por via oral no primeiro dia e no décimo dia, pelo menos uma semana antes do início dos experimentos. Durante os experimentos, os animais foram mantidos no biotério do LGI. Foram oferecidas ração convencional para camundongos (Labina, Purina, Paulínea, SP, Brasil) e água filtrada *ad libitum*. A temperatura e o fotoperíodo da sala eram controlados. A limpeza das gaiolas foi realizada a cada sete dias. Todos os procedimentos foram avaliados e aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFMG (protocolo 046/05).

#### **3.2 PARASITO**

Foi utilizado um clone de *Leishmania major* de referência da Organização Mundial de Saúde, WHO MHOM/IL/80/Friedlin. O parasito em sua forma promastigota extracelular foi mantido *in vitro* em Grace's Insect Medium (GIBCO BLR Life Technologies, Grand Island, N.Y., EUA) pH 6,2 suplementado com 20% de soro bovino fetal (SBF, Nutricell, Campinas, SP, Brasil), L-glutamina (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA) a 2 mM, penicilina cristalina a 100U/mL e estreptomicina a 100µg/mL (GIBCO BLR Life Technologies). A cultura de *L. major* foi mantida em estufa de 25°C, os repiques foram feitos a cada dois ou três dias de cultivo. Quando necessário, as formas promastigotas em fase logarítmica de crescimento (3 dias de cultura) eram criopreservadas no meio de cultura enriquecido com DMSO (Grupo Química, Penha, RJ, Brasil) a 10% (v/v) a 70° C. A cultura era mantida por até

10 repiques, quando, então, era renovada com parasitos criopreservados ou recém isolados de infecções *in vivo* de camundongos BALB/c.

Em condições estéreis, os inóculos foram preparados de culturas com cinco dias, fase estacionária do crescimento *in vitro*, época em que a cultura está rica de formas promastigotas metacíclicas viáveis, ou seja, formas infectivas. O meio de cultura com *Leishmania* em fase estacionária foi centrifugado a 1500 x g a 4° C por 15 minutos. O sobrenadante foi, então, desprezado e o sedimento recuperado em 2 mL de salina tamponada com 0,01 M de fosfato de sódio pH 7,2 (PBS). Em seguida, as formas promastigotas metacíclicas foram separadas por gradiente de Ficoll (Ficoll® 400, Sigma-Aldrich, Inc., St. Louis, MO, EUA). Em um tubo cônico de 15mL, foram colocados 2 mL de Ficoll 20%, em seguida, 2 mL de Ficoll 10%, escorrendo pela parede do tubo, sem homogeneizar as duas soluções, formando duas fases distintas (gradiente de Ficoll). Finalmente, a suspensão de *Leishmania*, obtida pela recuperação do sedimento em 2 mL de PBS, foi acrescentada escoando com cuidado pela parede do tubo, formando uma terceira fase. Essa mistura trifásica foi centrifugada a 800 x g por 10 min a 4°C. Formou-se um anel branco e todo o sobrenadante acima dele, correspondendo às fases Ficoll 10% e *Leishmania* em PBS, foi coletado com o auxílio de uma pipeta. Em outro tubo, adicionaram-se 10mL de PBS ao sobrenadante coletado e essa suspensão foi centrifugada a 1500 x g por 15 minutos a 4° C. O sobrenadante formado foi desprezado e o sedimento foi recuperado em 2mL de PBS.

Foi retirada uma alíquota, diluída 1:100 em PBS contendo formalina a 4% e o número de parasitos foi contado em Câmara de Neubauer.

### **3.3 INFECCÃO POR *LEISHMANIA MAJOR***

Os camundongos foram inoculados com  $1 \times 10^6$  parasitos num volume total de 40 µL no coxim plantar de ambos os pés. O desenvolvimento da lesão foi acompanhado semanalmente, pela medição das patas com um paquímetro (Digimess, São Paulo, SP, Brasil). A média da medida da pata normal de camundongos não infectados foi subtraída da medida da pata infectada para a obtenção do tamanho da lesão.

### **3.4 TRATAMENTO COM ATORVASTATINA**

Foram utilizados comprimidos de Lipitor<sup>®</sup> (Pfizer, Guarulhos, SP, Brasil) contendo 10 mg de atorvastatina para preparo de uma suspensão. Os comprimidos foram macerados e o pó obtido foi disperso em 10 mL de PBS. A dose utilizada foi 10 mg/kg administrados diariamente por via oral com seringa e agulha de gavagem (Biomedial Needles, Popper & sons, inc. N.Y., EUA). Os animais do grupo controle foram tratados diariamente com PBS.

Inicialmente, foram planejados dois esquemas de tratamento. Em um grupo de animais, o tratamento foi iniciado dois dias antes da infecção com *L. major* na pata traseira. Em outro grupo, o tratamento foi iniciado 14 dias após a infecção. O sacrifício dos animais foi feito após 10 semanas de infecção. Após a avaliação desses esquemas de tratamento, o segundo esquema foi mantido e os animais foram tratados todos os dias no mesmo horário por volta de 7 horas da noite. Nesse terceiro esquema de tratamento, os animais foram sacrificados também na quarta e oitava semanas de infecção. Animais não infectados receberam PBS ou atorvastatina segundo o terceiro protocolo de tratamento e sacrificados após os mesmos períodos de tratamento dos animais infectados.

### **3.5 QUANTIFICAÇÃO DE PARASITOS NA PATA POR DILUIÇÃO LIMITANTE**

O número de parasitos na pata infectada por *L. major* foi determinado por meio da técnica de diluição limitante (VIEIRA *et al.*, 1996) em uma suspensão de células obtidas de lesão. Foi retirado o coxim plantar das patas traseiras dos animais infectados. Esse tecido da lesão foi pesado em microtubos, cujo peso foi previamente mensurado em balança de precisão e registrado. O peso do tecido da pata foi obtido pela subtração do valor do peso do tubo contendo o fragmento da lesão pelo valor do peso do tubo vazio. Em seguida, as amostras foram maceradas em triturador de vidro em PBS. Então, o material macerado foi centrifugado a 50 x g por 1 minuto para separar os fragmentos de tecido da suspensão contendo as amastigotas. O sobrenadante foi transferido para um tubo cônico e centrifugado a 2000 x g a 4°C por 15 minutos. Após esta última centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o sedimento recuperado em Grace's Insect Medium (GIBCO BLR Life Technologies) pH 6,2 suplementado com 20% de SBF (Nutricell), L-glutamina (Sigma Chemical Co.) a 2 mM,

penicilina cristalina a 100U/mL e estreptomicina a 100µg/mL (GIBCO BLR Life Technologies), na proporção de 10 µL/mg de tecido. As amostras foram aplicadas em duplicata em placas de 96 poços e foram diluídas sucessivamente ao longo da placa na proporção de 1:10. A média do log<sub>10</sub> negativo do título de parasitos foi calculada sete dias após o início da cultura a 25°C. O título é a última diluição em que foram visualizados parasitos.

### **3.6 ANTÍGENO DE *LEISHMANIA MAJOR***

O antígeno particulado para estímulo da cultura de células de baço e linfonodo e sensibilização da placa de ELISA para dosagem de anticorpos IgG1 e IgG2a no soro foi obtido a partir de culturas em fase estacionária. As promastigotas foram lavadas em PBS estéril três vezes. O sedimento foi ressuspendido em PBS estéril e o número de parasitos ajustado para 10<sup>8</sup> parasitos/mL. O antígeno foi obtido após uma seqüência de cinco ciclos de congelamento a -70°C e descongelamento em banho-maria a 37°C. A dosagem de proteínas que compõem o extrato antigênico foi realizada pelo método de Lowry (LOWRY *et al.*, 1951) modificado por Johnstone & Thorpe (1982) e o volume ajustado para 1 mg de proteína/mL de suspensão, que foi então estocado em alíquotas de 1 mL, congelado a -20°C e descongelado no momento do uso.

### **3.7 CULTURA DE CÉLULAS DE LINFONODO**

Os animais foram sacrificados por decapitação e o sangue recolhido em tubos cônicos de 15mL para a obtenção do soro. Os linfonodos foram removidos e depositados em 2 mL de PBS, sendo mantidos em gelo. Em seguida, os órgãos foram macerados em triturador de vidro e centrifugados a 700 x g por 10 min a 4°C. O sobrenadante foi desprezado e o sedimento do linfonodo foi ressuspendido em 1 mL de meio RPMI 1640 (GIBCO BLR Life Technologies) suplementado com 10% SBF (Nutricell), L-glutamina (Sigma Chemical Co.) a 2 mM, penicilina cristalina a 100 U/mL, estreptomicina a 100 µg/mL (GIBCO BLR Life

Technologies) e 50 mM de 2-mercaptoetanol (Sigma Chemical Co.). A viabilidade das células foi verificada com azul de tripan em microscópio e a contagem foi realizada utilizando a Câmara de Neubauer. As células foram colocadas em cultura na proporção de  $5 \times 10^6$  células/mL em placas de vinte e quatro poços em presença ou não de antígeno particulado de *L. major* (50 mg/mL de cultura) em um volume total de 1 mL e incubadas por 72 hs.

### **3.8 EXTRAÇÃO DE CITOCINAS E QUIMIOCINAS NO TECIDO DA PATA**

O coxim plantar dos animais infectados e não infectados foi retirado e congelado a  $-70^{\circ}\text{C}$  para posterior dosagem de citocinas e quimiocinas. Após o descongelamento dos tecidos, foi adicionado um volume de PBS acrescido de 0,4 M de NaCl, 0,05% Tween 20, 5% de albumina, 0,1 mM de fluoreto de fenil-metil-sulfonila, 0,1 mM de cloreto de benzetônio, 10 mM de EDTA e 20 KIU (unidade inibitória de calicreína) de aprotinina em 100mL, na relação de 1 mg de tecido por 10 $\mu\text{L}$  de tampão. O tecido foi, então, macerado e centrifugado a 10000 x g por 10 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ . O sobrenadante foi recolhido.

### **3.9 DOSAGEM DE CITOCINAS E QUIMIOCINAS POR ELISA**

As placas de ELISA foram cobertas e incubadas a  $4^{\circ}\text{C}$  durante o período noturno com os anticorpos de captura desenvolvidos em cabra anti-IFN- $\gamma$ , anti-TNF- $\alpha$ , anti-TGF- $\beta$ , anti-IL-10, anti IL-4, anti-CCL2/MCP-1 ou anti-CCL5/RANTES (Duoset, RD Systems, Minneapolis, MN, EUA) diluídos em tampão de revestimento (8,4g/mL de  $\text{NaHCO}_3$ ; 5,8g/mL de NaCl em água destilada; pH 9,6) em um volume total de 100  $\mu\text{L}$ /poço nas concentrações definidas pelo manual do fabricante. Após o período de incubação, as placas foram lavadas 4 vezes com tampão de lavagem (PBS contendo 0,05% de Tween 20) e bloqueadas com albumina bovina 1% (BSA) em PBS por 1 hora em temperatura ambiente num volume de 200  $\mu\text{L}$ /poço. Após um novo ciclo de lavagem, foi feita a diluição das amostras e dos padrões em solução diluente (BSA 0,1% e Tween 20 0,1% em PBS, pH 7,4), num volume total de 100  $\mu\text{L}$ /poço e incubadas durante a noite a  $4^{\circ}\text{C}$ . As amostras foram diluídas nas seguintes

proporções: 1:3 para IL-4, IL-10, TGF- $\beta$  e CCL2; 1:5 para IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e CCL5. Após um novo ciclo de lavagem, anticorpos de captura biotinizados (RD Systems) produzidos em cabra foram usados como segundos anticorpos na concentração definida pelo manual do fabricante em solução diluente e incubados à temperatura ambiente por 2 horas num volume de 100  $\mu$ L/poço. Após esse período de incubação e novo ciclo de lavagem, estreptavidina conjugada com peroxidase foi adicionada à placa na proporção 1:4000 em solução diluente num volume de 100  $\mu$ L/poço e incubada à temperatura ambiente por 30 minutos. A placa foi lavada novamente e adicionou-se a solução do substrato OPD (*o*-fenileno-diamina 1mg/mL, Sigma Chemical Co.) e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 0,005% em tampão citrato-fosfato ( 0,15M, pH 5,0) acompanhando-se a formação da cor. A reação foi interrompida após 15 a 20 minutos de incubação com 50  $\mu$ L/poço de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1 M. A leitura das placas foi feita a 492 nm em espectrofotômetro. A sensibilidade do ensaio para a dosagem de foi 16 pg/mL para TGF- $\beta$ , IL-4 e IFN- $\gamma$ , 32 pg/mL para RANTES e TNF- $\alpha$  e 4 pg/mL para MCP-1.

### 3.10 IMUNOMARCAÇÃO E CITOMETRIA DE FLUXO

Linfonodos poplíteos foram coletados na oitava semana de infecção ou sexta semana de tratamento dos animais não infectados e, posteriormente, macerados para a obtenção de células para imunomarcação. Após o isolamento das células, estas foram transferidas em placas de 96 poços a uma concentração de  $5 \times 10^5$  células/poço num volume final de 50  $\mu$ L em PBS pH 7,2. As células foram lavadas com PBS (centrifugadas por 10 minutos a 400 x *g* a 4°C) e, em seguida, ressuspendidas e incubadas com 30  $\mu$ L/poço de solução de bloqueio (PBS pH 7,2 com 10% de soro normal de camundongo singênico inativado contendo 0,5 % de BSA (Sigma-Aldrich) e 2mM de NaN<sub>3</sub>). Posteriormente, as células foram lavadas com 150 $\mu$ L de PBS e incubadas durante 30 min a 4°C com anticorpos para marcação de moléculas de superfície (Anti-CD4-PerCP, clone RM4-5, Anti-CD4-FITC clone GK1.5, Anti-CD8-PerCP ou FITC clone 53-6.7, Anti-CD25-PE clone PC61, Anti-F4/80-FITC clone CI:A3-1, Anti-CD86-PE clone GL1, BD Biosciences Pharmingen, San Jose, CA, EUA) diluídos de acordo com as orientações do fabricante em uma solução de Wash B (PBS, 0,5% de BSA, 2mM de NaN<sub>3</sub>) e PBS numa proporção de 1:1. Os controles de isotipos usados foram IgG1, IgG2a e IgG2b de rata (Pharmingen). Após esse período, as células foram lavadas duas vezes com

150µL de PBS pH 7,2, ressuspensas e fixadas com 200 µL de formol ao 2% (Sigma-Aldrich). Posteriormente, foram transferidas para tubos de leitura exceto aquelas que seriam submetidas à marcação intracelular. Após 20 min de fixação a temperatura ambiente, essas células foram lavadas duas vezes e permeabilizadas durante 15 min com 150 µL de uma solução contendo saponina (Wash B, 0,5% de saponina, Sigma Chemical Co.). Em seguida, realizou-se um novo ciclo de centrifugação e adicionaram-se 15 µL/poço do anticorpo anti-Foxp3 (clone FJK-16S e-Bioscience, San Diego, CA, EUA) e o controle negativo IgG1-PE diluídos em tampão de permeabilização. As células foram incubadas à temperatura ambiente por 20 a 30 minutos. As células foram submetidas a 3 processos de lavagem: com 150 µL/poço de tampão de permeabilização, Wash B e PBS sucessivamente. Finalmente, foram fixadas com 200 µL de formol 2% e transferidas para tubos de leitura. Os linfócitos foram identificados por tamanho (FSC) e granulidade (SSC) característicos. Vinte mil células foram analisadas para cada amostra. Os dados foram coletados usando o citômetro de fluxo FACSCan (Becton Dickinson, Mountain View, CA, EUA) e analisados pelo software FlowJo (Tree Star, Inc., Ashland, EUA).

### **3.11 PREPARO DO SORO PARA DOSAGEM DE ANTICORPOS**

Os animais foram sacrificados por decaptação, o sangue foi coletado na região cervical, em seguida foi centrifugado a 800 x g por 10 minutos. O soro, sobrenadante, foi coletado e congelado a -20 °C para posterior dosagem de anticorpos IgG1 e IgG2a anti-*Leishmania major*.

### **3.12 DOSAGEM DE ANTICORPOS ANTI-LEISHMANIA MAJOR NO SORO**

As placas foram sensibilizadas com antígeno de *L. major* 10 µg/mL diluído em tampão de carbonato (0,05 M, pH 9,4) num volume de 100 µL/poço e incubadas durante o período noturno a 4°C. No dia seguinte, os poços foram lavados 5 vezes com tampão de lavagem (PBS contendo 0,05 % de Tween 20). Em seguida, foi adicionada a solução de bloqueio (BSA

1 % em PBS) num volume de 200  $\mu$ L/poço. As placas foram incubadas a 37°C por 1 hora. Após um novo ciclo de lavagem, as amostras foram aplicadas na placa na diluição de 1:50 em PBS/BSA 1%. Após 2 horas de incubação a 37°C, executou-se um novo ciclo de lavagem. Então, adicionaram-se os anticorpos anti-IgG de camundongo produzidos em cabra. Anti-IgG1 (Southern Biotechnology Associates, Birmingham, AL, EUA), diluído 1:20000 e anti-IgG2a (Southern Biotechnology Associates), diluído 1:2500 em PBS/BSA 1% e utilizou-se um volume de 100  $\mu$ L/poço. Após a incubação de 1 hora a 37°C, executou-se um novo ciclo de lavagem. Em seguida, adicionou-se anticorpo anti-imunoglobulina de cabra produzido em coelho e conjugado com estreptavidina peroxidase. Após a incubação de 1 hora a 37°C, executou-se o último ciclo de lavagem. As placas foram lavadas 10 vezes. Finalmente, adicionou-se a solução do substrato OPD (1 mg/mL) e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 0,005% em tampão citrato-fosfato (pH 5,0) acompanhando-se a formação da cor. A reação foi interrompida após 15 a 20 minutos de incubação com 30  $\mu$ L/poço de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1 M.

### **3.13 OBTENÇÃO E CULTURA DE MACRÓFAGOS PERITONEAIS RESIDENTES**

Para obtenção de macrófagos da cavidade peritoneal os animais foram sacrificados por decapitação, em seguida, foram-lhe injetados, rapidamente, na cavidade peritoneal, 10 mL de meio RPMI 1640 estéril (Sigma Chemicals Co.), com o auxílio de uma agulha de calibre 0,80 x 25 mm, acoplada a uma seringa. O maior conteúdo possível foi aspirado com a mesma seringa e as células foram centrifugadas a 350 x g, por 10 minutos a 4°C. Após o descarte do sobrenadante, as células foram ressuspensas em meio RPMI 1640, suplementado com 10% de SBF (Nutricell), L-glutamina (Sigma Chemical Co.) a 2 mM, penicilina cristalina a 100 U/mL e estreptomomicina a 100  $\mu$ g/mL (GIBCO BLR Life Technologies) e 0,1% de solução de  $\beta$ -mercaptoetanol (Sigma Chemical Co.). As células foram contadas em câmara de Neubauer, e a concentração final foi ajustada em  $1 \times 10^6$  células/mL para cultura em placa de 24 poços. A incubação foi realizada em estufa com atmosfera umidificada, contendo 5% de CO<sub>2</sub>, a 37°C. Após 24hs, em condições de esterilidade, foi coletada uma alíquota do sobrenadante para a dosagem de TNF- $\alpha$  por ensaio biológico. A cultura foi mantida até 48hs quando foram separados os macrófagos para o ensaio da atividade de arginase e o sobrenadante para a dosagem da produção de óxido nítrico.

### 3.14 DOSAGEM DE PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO

As células peritoneais obtidas de camundongos infectados foram incubadas em placas de 24 poços, por 48hs, na concentração de  $1 \times 10^6$  células por mL na presença de IFN- $\gamma$  50 U/ml, (Sigma-Aldrich, Inc.) ou IL-4 40 U/ml. A produção de óxido nítrico foi dosada como nitrito no sobrenadante usando o reagente de Griess (GREEN *et al.*, 1982).

### 3.15 ENSAIO DE ATIVIDADE DE ARGINASE

A atividade de arginase do lisado de macrófagos peritoneais foi medida como previamente descrita por Corraliza (CORRALIZA *et al.*, 1994), com algumas modificações. Brevemente, os macrófagos peritoneais foram obtidos de camundongos em diferentes tempos de infecção, como descrito anteriormente, e plaqueados, por 48 hs, em placas de 24 poços na concentração de  $1 \times 10^6$  células por mL. Após a remoção do sobrenadante, as células foram incubadas com 100  $\mu$ l de Triton X-100 por 30 min sob agitação. A arginase foi ativada com 100  $\mu$ l de  $MnCl_2$  10 mM e Tris-HCl 50 mM (pH 7,5) a 55°C por 10 min. A seguir a amostra foi diluída 1:5 em outra placa de 24 poços. Para reação da enzima, foram adicionados às amostras 50  $\mu$ l de L-arginina 0,5 mM (pH 9,7) e incubadas a 37°C por 60 min. A reação foi parada com 400  $\mu$ l de uma mistura de ácido  $H_2SO_4:H_3PO_4:H_2O$  (1:3:7). Subseqüentemente, 25  $\mu$ l de uma solução de 1-fenil-1,2-propanodiona-2-oxime 9% em etanol 100% foi adicionada e a placa foi incubada a 95°C por 45 min para o desenvolvimento da cor. Depois de 10 min de incubação no escuro, 200  $\mu$ l de cada amostra foi transferida para uma placa de 96 poços e a leitura foi feita a 540 nm. A curva padrão foi feita usando uma solução de uréia a 1 mg/ml diluída 1:2 sucessivamente.

### 3.16 DOSAGEM DE TNF- $\alpha$ POR ENSAIO BIOLÓGICO

A produção de TNF- $\alpha$  no sobrenadante de cultura de macrófagos peritoneais foi dosada por meio da técnica de ensaio biológico descrita por Lattime et al. (1988) modificada de Mosmann (1983) utilizando células WEHI-164 sensíveis ao TNF- $\alpha$ . Essas células eram mantidas em meio de cultura (meio para células WEHI): RPMI 1640 suplementado com 10% de SBF (Nutricell), L-glutamina (Sigma Chemical Co.) a 2 mM, penicilina cristalina a 100 U/mL e estreptomicina a 100  $\mu$ g/mL (GIBCO BLR Life Technologies), piruvato de sódio a 100 mM (GIBCO-Invitrogen Corporation, Grand Island, NY, EUA) e solução de aminoácidos não essenciais 10 mM (GIBCO-Invitrogen Corp.). Os repiques eram feitos a cada 2 a 3 dias a uma concentração de  $2,5 \times 10^4$  células/ml.

Após 24 horas de incubação, foram recolhidas alíquotas do sobrenadante da cultura dos macrófagos peritoneais em duplicata. Essas amostras ficaram conservadas a  $-70^\circ\text{C}$  em placas de 96 poços. Para a realização do ensaio, o sobrenadante coletado foi diluído na proporção de 1:4 e 1:16 em meio de cultura para células WEHI. O padrão de TNF- $\alpha$  recombinante 250 pg/ $\mu$ L também foi diluído em duplicata 1:4 em série no meio de cultura para células WEHI numa placa de 96 poços. Em alguns poços, foram colocados 150  $\mu$ L de meio (branco-meio). Em seguida, adicionou-se em cada poço 50  $\mu$ L da suspensão contendo células WEHI ( $1 \times 10^6$  células/mL) contendo 0,75  $\mu$ g/mL de actinomicina D (Sigma-Aldrich) (exceto nos poços designados branco-meio). Em alguns poços, foram colocados 100  $\mu$ L de meio e 50  $\mu$ L de suspensão de células (branco-células). As placas foram incubadas a  $37^\circ\text{C}$  em estufa com atmosfera úmida contendo 5% de  $\text{CO}_2$  por 24 horas. Após a incubação, adicionaram-se 20  $\mu$ L de solução de MTT (brometo de 3-[4,5]-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio, Sigma-Aldrich) 2,5 mg/mL em PBS. As placas foram novamente incubadas nas condições descritas acima por 4 horas. Em seguida, foram adicionados 100  $\mu$ L de SDS 10% em HCl 0,01 M por poço, seguiu-se uma nova etapa de incubação por 16 horas. A leitura foi feita em espectrofotômetro para leitura de microplacas (Spectra Max 190-Molecular Devices, Sunnyvale, CA, EUA) a 595 nm. Os poços designados como branco-meio forneceram a leitura mais baixa e os poços designados como branco-células, a leitura mais alta. A curva gerada pelas diluições do padrão foi plotada utilizando a regressão log-logit. O limite de detecção do método é  $6 \times 10^{-5}$  pg/ $\mu$ L de TNF- $\alpha$ .

### **3.17 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA**

Amostras da lesão por *L. major* e do linfonodo poplíteo dos animais infectados foram removidas, fixadas em formaldeído 4% tamponado em PBS pH 7,2, desidratadas em concentrações crescentes de xilol, embebidas e incluídas em parafina. Foram obtidos cortes de 3 a 5  $\mu\text{m}$  de espessura. Foi realizada a coloração por hematoxilina e eosina.

### **3.18 DOCUMENTAÇÃO FOTOGRÁFICA**

As imagens obtidas ao microscópio Olympus BX51 (Olympus UK, Hertfordshire, Reino Unido) foram transferidas por meio de vídeo câmera colorida Cool SNAP-Procf Color (Media Cybernetics, Bethesda, MD, EUA) para um sistema de vídeo acoplado ao computador através do programa Image-Pro Express versão 4,0 para Windows (Media Cybernetics, Bethesda, MD, EUA). As imagens gravadas foram selecionadas e transferidas para o programa Power Point (Microsoft Corporation, Redmond, WA, EUA), onde as pranchas foram montadas.

### **3.19 ANÁLISE ESTATÍSTICA**

Diferenças entre os resultados dos parâmetros analisados para cada grupo experimental foram determinadas por meio do test *t* de Student, duas caudas, para amostras independentes. O limite crítico de significância foi estabelecido em  $p < 0,05$ .

## 4 RESULTADOS:

### 4.1 EFEITOS DA ATORVASTATINA SOBRE O CURSO DE INFECÇÃO E PARASITISMO TECIDUAL DOS CAMUNDONGOS INFECTADOS COM *Leishmania. major*

Como já foi claramente demonstrado em muitos trabalhos, as estatinas comprometem a função de vários componentes do sistema imunológico (ARNAUD; BRAUNERSREUTHER; MACH, 2005; DIOMEDE *et al.*, 2001; GREENWOOD; STEINMAN; ZAMVIL, 2006; VAUGHAN; MURPHY; BUCKLEY, 1996). Decidimos, então, avaliar o efeito do tratamento diário a longo prazo com atorvastatina sobre a evolução da lesão por *L. major* em camundongos C57BL/6 infectados na pata. O GRAF. 1 ilustra o curso de infecção dos animais tratados segundo os dois primeiros protocolos descritos na seção Material e Métodos. Observamos que a introdução do tratamento antes da inoculação com *L. major* não interferiu de maneira significativa no curso de infecção sendo verificado (GRAF. 1A). Após o estabelecimento da infecção e montagem da resposta imune efetora contra o parasito, o tratamento com atorvastatina provocou um pequeno aumento da lesão observado entre a terceira e quinta semanas de infecção e, em seguida, o perfil da lesão continuou semelhante ao observado no grupo controle (GRAF. 1B). A partir da oitava semana de infecção, as patas em todos os grupos apresentaram características de evolução para resolução da lesão.

Após a avaliação do efeito do tratamento com a atorvastatina no curso de infecção, verificamos se esse tratamento poderia interferir no controle do crescimento parasitário na pata. Para isso, os animais foram sacrificados na décima semana de infecção e o tecido da lesão foi removido para a quantificação de parasitos por diluição limitante. Esse experimento revelou que a atorvastatina compromete o controle parasitário no camundongo C57BL/6.

Os animais tratados com a estatina seguindo os dois esquemas de tratamento apresentaram quantidade de parasitos cerca de 100 vezes maior que os animais do grupo controle (GRAF. 2).

Após a análise desses resultados à luz de dados da literatura que afirmam existir uma correlação entre o ciclo circadiano e a atividade da enzima  $\beta$ -hidroxi- $\beta$ -metil-glutaril

coenzima A redutase (DUPONT *et al.*, 1988; EDWARDS; MUROYA; GOULD, 1972; JONES; SCHOELLER, 1990), questionamos se o horário de administração da atorvastatina poderia interferir em seu efeito sobre a infecção por *L. major*. Para responder a essa indagação, escolhemos o protocolo em que o tratamento com a atorvastatina iniciou 14 dias após a infecção, pois esse esquema provocou uma alteração mais significativa no curso de infecção (GRAF. 1B), e estabelecemos o horário de tratamento dos animais por volta de 7 horas da noite.

Um achado bastante interessante foi que o tratamento com a atorvastatina com controle de horário provocou aumento no tamanho da lesão na pata ao longo do curso de infecção (GRAF. 3). A partir da quarta semana de infecção, os animais tratados com atorvastatina apresentaram lesões maiores que os animais do grupo controle e essa diferença persistiu até a décima semana. No grupo tratado, o tamanho da lesão decaiu a partir da sétima semana de infecção. Como esperado, o grupo controle apresentou características de evolução para cura espontânea da lesão. Os animais tratados com controle de horário foram sacrificados com 4, 8 e 10 semanas de infecção para uma avaliação cinética dos parâmetros que seriam analisados em seguida.

Nestes três pontos do curso de infecção, também foi feita a quantificação de parasitos por diluição limitante. Observamos que na quarta e oitava semanas de infecção os animais tratados com atorvastatina apresentavam títulos de parasitos maiores que os títulos dos animais do grupo controle (GRAF. 4). Entretanto, na décima semana os dois grupos apresentavam parasitismo semelhante, apesar da diferença no tamanho da lesão entre os dois grupos ainda persistir neste período (GRAF. 3).

## **4.2 CARACTERÍSTICAS HISTOPATOLÓGICAS DA LESÃO NA PATA PÓS-TRATAMENTO COM ATORVASTATINA OU PBS**

Com o objetivo de demonstrar as características microscópicas da lesão e do infiltrado inflamatório nesse tecido foi feita a análise histopatológica dessas amostras. Tal análise revelou achados concordantes com dados da quantificação de parasitos. Na quarta semana de infecção, o aspecto da lesão e do infiltrado inflamatório, no aumento de 4 vezes, era semelhante para os dois grupos de animais (FIG. 1A e B), mas no aumento maior (40 vezes), foi possível observar um infiltrado contendo grande número de linfócitos e outras células

mononucleares, especialmente macrófagos densamente parasitados (FIG. 1C). No grupo controle, nesse mesmo período, foi detectada a presença mais acentuada de eosinófilos e o infiltrado continha grande número de linfócitos e outras células mononucleares. O parasitismo não foi tão acentuado quanto o do grupo tratado com atorvastatina (FIG. 1D). Na oitava semana de infecção, no menor aumento, o aspecto da lesão foi semelhante entre os grupos (FIG. 2A e B), já no aumento de 40 vezes, o achado mais interessante foi, ainda, o parasitismo bastante acentuado no grupo tratado com atorvastatina além do aspecto granulomatoso da lesão contendo macrófagos multinucleares (FIG. 2D). No grupo controle, o infiltrado já não apresentou tantos eosinófilos, o parasitismo foi visivelmente menos intenso e foram observadas também características de regeneração tecidual (FIG. 2C). Com 10 semanas de infecção, verificou-se a regeneração tecidual nos dois grupos e o infiltrado inflamatório também regrediu (FIG. 3). Raros parasitos foram detectados ao maior aumento (FIG. 3C e D).

#### **4.3 EFEITO IMUNOMODULADOR DA ATORVASTATINA NOS ANIMAIS INFECTADOS COM *Leishmania major*.**

A partir desses dados, nos propusemos a elucidar os mecanismos pelos quais a atorvastatina estaria prejudicando o controle da lesão e do parasitismo. Nos concentramos no estudo do provável efeito imunomodulador da estatina sobre a resposta imunológica do camundongo C57BL/6 à infecção por *Leishmania major* que estaria comprometendo a eficácia dos mecanismos de proteção característicos desse hospedeiro.

A resposta imune no camundongo C57BL/6 à infecção por *L. major* é do tipo Th1. Tal resposta é, entre outras características, marcada pela produção de níveis elevados de citocinas pró-inflamatórias como IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  que atuam, sinergicamente, na ativação de mecanismos leishmanicidas dos macrófagos (GREEN *et al.*, 1990a). Portanto, o estudo da resposta imune no camundongo infectado com *L. major* e tratado com atorvastatina foi iniciado pela avaliação da produção dessas citocinas em culturas de células do linfonodo que drenava a lesão (linfonodo poplíteo). Algumas dessas culturas receberam estímulo com antígeno particulado de *L. major*.

A produção das citocinas foi medida por ELISA no sobrenadante de cultura. Detectamos a produção um pouco mais acentuada de IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  nas culturas estimuladas com antígeno de *L. major* dos animais tratados com atorvastatina (GRAF. 5).

Nesse grupo, um resultado extremamente interessante foi a permanência da produção elevada dessas citocinas nas fases mais tardias da infecção, especialmente na décima semana. Também neste período, nas culturas sem estímulo, a produção dessas citocinas foi maior no grupo tratado (GRAF. 5).

A presença de citocinas características da resposta tipo 2 pode comprometer a eficácia de uma resposta imune potencialmente protetora contra a *Leishmania major*. Por isso, avaliamos se a atorvastatina alteraria a produção de IL-4, TGF- $\beta$  e IL-10. Em um dos experimentos, a produção de IL-4 foi detectável com 4 e 8 semanas nas culturas estimuladas com antígeno de *L. major*, sem haver diferença entre os grupos (dados não mostrados). Esse resultado não se repetiu e, nos demais experimentos, essa citocina foi indetectável. Em relação à produção de TGF- $\beta$ , foi observado, na oitava semana de infecção, um aumento no nível dessa citocina na cultura de células não estimuladas dos animais tratados e, na décima semana, na cultura de células estimuladas com o antígeno de *L. major* (GRAF. 6). A produção de IL-10 foi bastante expressiva no grupo tratado com atorvastatina especialmente na oitava e décima semanas de infecção tanto nas culturas estimuladas, quanto nas culturas que não receberam estímulo com antígeno de *Leishmania*. Na quarta semana, não houve um padrão para a produção de IL-10 no grupo tratado, essa produção é maior que a do grupo controle na cultura sem estímulo, mas é menor na cultura estimulada (GRAF. 6).

Após o delineamento do perfil das citocinas, avaliamos a produção das quimiocinas CCL5/RANTES e CCL2/MCP-1. Observamos que a produção de RANTES também aumentou com o tratamento com a atorvastatina na oitava e décima semanas de infecção nas culturas estimuladas e, na décima semana, a produção dessa quimiocina pelo grupo tratado também foi elevada na cultura sem estímulo (GRAF. 7). Entre todas as proteínas analisadas nas culturas de linfonodos, apenas MCP-1 teve sua produção reduzida de maneira significativa pelo tratamento com a estatina na oitava e décima semanas de infecção (GRAF. 7).

Todos esses resultados descortinaram parte do quadro da resposta imune no modelo experimental escolhido. Para obtermos uma visão mais clara desse quadro, dosamos também a produção de citocinas no sítio de infecção para demonstrar o microambiente imunológico mais próximo aos parasitos.

Em relação às citocinas pró-inflamatórias, um resultado bastante relevante foi a detecção de menor produção de IFN- $\gamma$ , com 10 semanas de infecção, na pata dos animais tratados com atorvastatina e nenhuma diferença na produção dessa citocina nos demais

tempos avaliados (GRAF. 8). A produção de TNF- $\alpha$ , com 4 e 8 semanas de infecção, foi maior nos animais tratados e, na décima semana, os níveis dessa citocina se tornam semelhantes entre os grupos, quando também não há diferença em relação ao parasitismo (GRAF. 8).

Quanto ao grupo de citocinas anti-inflamatórias avaliadas, houve um decréscimo na produção de IL-4 na lesão ao longo do curso de infecção, mas não houve diferença entre os grupos (GRAF. 9). Na oitava semana de infecção, houve uma diferença expressiva na produção de TGF- $\beta$  no grupo tratado (maior produção) em relação ao grupo controle (GRAF. 10). Não houve diferença na produção de IL-10 nos dois primeiros tempos avaliados e na décima semana o grupo tratado produziu menor quantidade dessa citocina (GRAF. 10).

No sítio de infecção, não observamos diferença em relação à produção das quimiocinas RANTES e MCP-1 entre os grupos estudados (Dados não mostrados).

Nas culturas de células de linfonodo e no tecido da pata dos animais não infectados, não detectamos diferenças entre os grupos PBS e atorvastatina nos níveis das citocinas e quimiocinas analisadas (Dados não mostrados).

Avaliamos a expressão de diversos marcadores para a caracterização das populações celulares predominante no linfonodo nos animais tratados com atorvastatina. Não foram obtidos resultados reprodutíveis quanto ao percentual de células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> (linfócitos T auxiliares), CD8<sup>+</sup> (linfócitos T citotóxicos) e à expressão dos marcadores F4/80 (macrófagos), CD86 (molécula co-estimuladora presente em células apresentadoras de antígenos) e CD11c (presente em células NK, células dendríticas e monócitos) e Foxp3 (células T regulatórias). Entretanto, um resultado extremamente interessante foi a detecção de um maior percentual de células T regulatórias CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> entre as células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> no linfonodo nos animais tratados e sacrificados na oitava semana de infecção, período em que o parasitismo na pata é maior (GRAF. 11A). Esse resultado também foi demonstrado pela análise da intensidade média de fluorescência obtida para o anticorpo anti-CD25 dentro da população CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> (GRAF. 11B). Esse dado confirma que as células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> dos animais tratados com atorvastatina expressavam maior quantidade de CD25 e eram, portanto, células T regulatórias.

Além da avaliação da produção de citocinas, utilizamos outro parâmetro para ilustrar o perfil da resposta imunológica pela dosagem do nível de anticorpos séricos anti-*Leishmania major* dos subtipos: IgG1, predominantes na resposta Th2, e anticorpos IgG2a, predominantes na resposta Th1 (MORRIS *et al.*, 1993; SNAPPER; PAUL, 1987), nos animais tratados com atorvastatina ou PBS. Não houve diferença entre os grupos quanto à produção desses anticorpos (GRAF. 12). Entre a quarta e oitava semanas, há um crescimento no nível dos dois

anticorpos nos dois grupos. Até a décima semana, a produção de IgG1 é constante e de IgG2a continua crescente em ambos os grupos.

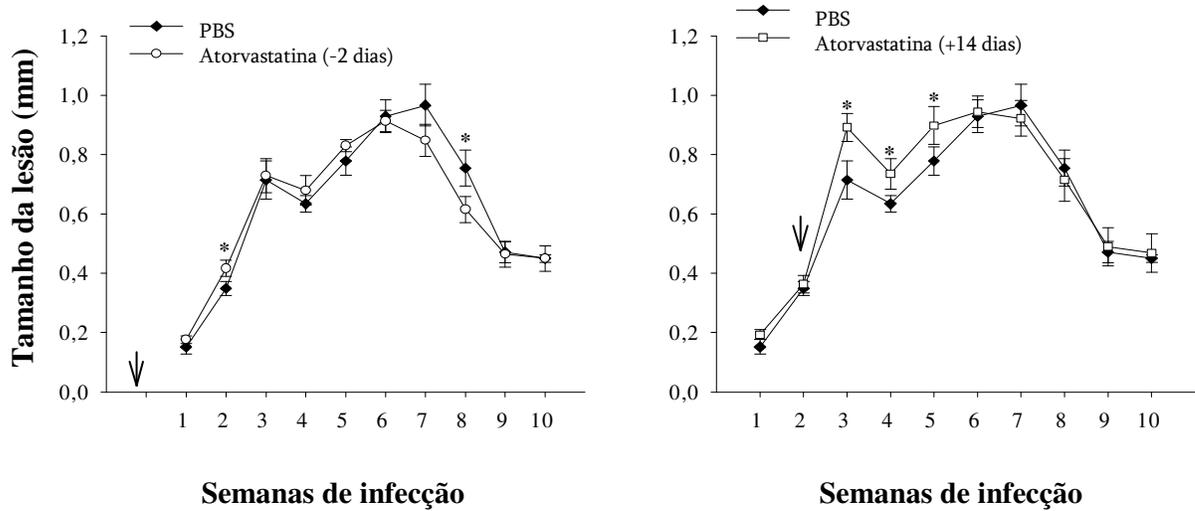
#### **4.4 EFEITO DO TRATAMENTO COM ATORVASTATINA SOBRE A ATIVIDADE DAS ENZIMAS ARGINASE I E iNOS EM MACRÓFAGOS PERITONEAIS DE ANIMAIS INFECTADOS COM *Leishmania major*.**

Aprofundamos nosso estudo no sentido de revelar outros mecanismos através dos quais a atorvastatina estaria favorecendo o escape da resposta protetora e a proliferação do microorganismo no sítio de infecção pela dosagem da atividade de arginase I e NOS II (iNOS). As duas enzimas, arginase I e iNOS, competem pelo mesmo substrato, arginina, e geram, respectivamente, os seguintes produtos: ornitina, favorável ao parasito, e óxido nítrico, letal ao parasito (GREEN *et al.*, 1990c; INIESTA *et al.*, 2002a; ROBERTS *et al.*, 2004a). Avaliamos a atividade da arginase em culturas de macrófagos peritoneais obtidos dos camundongos infectados com *L. major* e tratados ou não com atorvastatina. Um resultado surpreendente foi a elevada atividade de arginase na quarta e na oitava semanas de infecção nos animais tratados com atorvastatina quando comparados ao grupo controle (GRAF. 13). Esse aumento de atividade foi observado tanto em culturas de macrófagos não estimuladas (GRAF. 13A) quando em culturas que receberam estímulo com IL-4 (GRAF. 13B), citocina abundante na resposta Th2 ou com IFN- $\gamma$  (GRAF. 13C), abundante na resposta Th1. A presença do IFN- $\gamma$  na cultura diminuiu um pouco a atividade da enzima, mas não foi suficiente para eliminar a diferença entre os grupos. Na décima semana, os níveis da atividade de arginase tendem a se equalizar e há uma inversão entre os grupos especialmente quando a cultura foi estimulada com IFN- $\gamma$ . A atividade da enzima óxido nítrico sintase foi medida indiretamente pela produção de nitrito no sobrenadante da cultura de macrófagos. Assim, quanto maior a produção de nitrito, maior a atividade da óxido nítrico sintase. Observamos que a atividade dessa enzima diminuiu ao longo do curso de infecção de maneira mais marcante no grupo tratado com a atorvastatina que apresentou uma diferença mais expressiva em relação ao grupo controle na quarta semana de infecção, produzindo maiores níveis de nitrito (GRAF. 14). Na oitava semana, nas culturas sem estímulo (GRAF. 14A) e estimuladas com IL-4 (GRAF. 14B), a produção de nitrito pelos dois grupos foi bastante semelhante,

entretanto, no grupo tratado com atorvastatina a atividade da óxido nítrico sintase ainda era um pouco maior até se igualar à do grupo controle na décima semana. O estímulo com IFN- $\gamma$  provocou um considerável aumento na atividade de óxido nítrico sintase nas culturas de macrófagos do grupo tratado com atorvastatina com 4 e 8 semanas de infecção (GRAF. 14C). Na décima semana, ainda persistia uma pequena diferença entre os grupos.

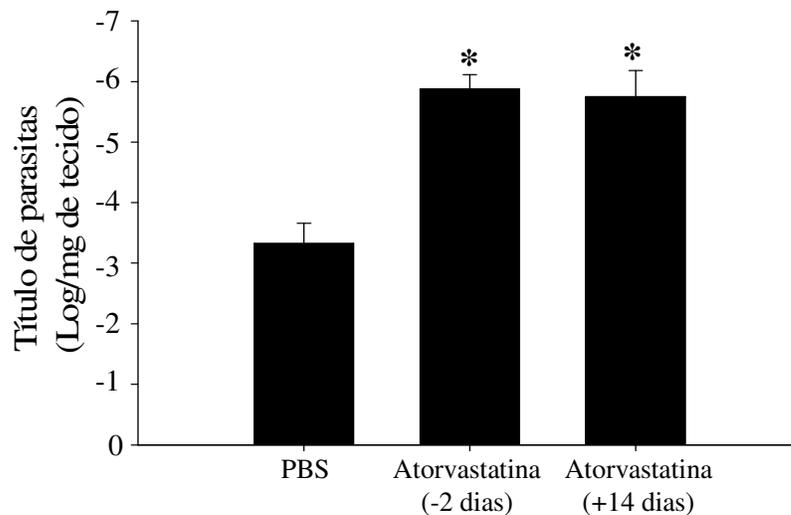
#### **4.5 TRATAMENTO IN-VIVO COM ATORVASTATINA ALTERA A PRODUÇÃO DE TNF- $\alpha$ EM CULTURA DE MACRÓFAGOS PERITONEAIS DE CAMUNDONGOS C57BL/6 INFECTADOS COM *Leishmania major***

Finalmente, analisamos também a produção de TNF- $\alpha$  no sobrenadante de cultura dos macrófagos peritoneais e observamos pequenas oscilações nos níveis dessa citocina ao longo do curso de infecção (GRAF. 15). Foi observada uma diminuição mais marcante na produção de TNF- $\alpha$  pelos macrófagos dos animais infectados dos dois grupos experimentais na oitava semana de infecção nas culturas não estimuladas (GRAF. 15A) e nas culturas com adição de IL-4 (GRAF. 15B). Entretanto, nas culturas estimuladas com IFN- $\gamma$  a produção de TNF- $\alpha$  teve um aumento mais importante na oitava semana no grupo que recebeu PBS (GRAF. 15C). Esse tempo coincidiu com o período em que foi detectado parasitismo mais acentuado no grupo tratado com atorvastatina. Nas culturas de macrófagos dos animais não infectados não foi detectada diferença na produção de TNF- $\alpha$  entre os grupos estudados (Dados não mostrados).



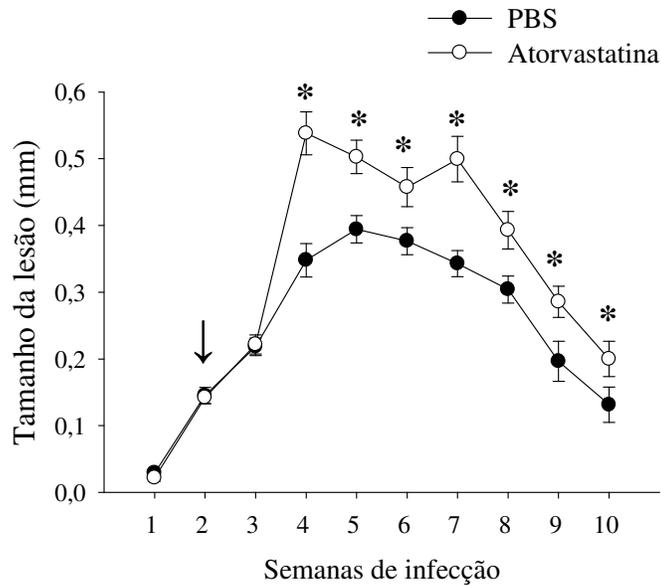
**GRÁFICO 1- Efeito do tratamento diário com atorvastatina no curso de infecção por *L. major* em camundongos C57BL/6 infectados na pata.**

Os camundongos foram infectados com  $1 \times 10^6$  *L. major* na forma estacionária metacíclica na pata traseira e tratados diariamente com 10 mg/kg de atorvastatina por via oral. PBS foi utilizado como controle. (A) O tratamento iniciou dois dias antes da infecção. (B) O tratamento iniciou 14 dias depois da infecção. A medida das patas foi aferida semanalmente com paquímetro. O tamanho da lesão foi obtido subtraindo-se a medida da pata infectada pela média da medida de patas de animais não infectados. Cada ponto representa a média de 4 a 8 animais  $\pm$  erro padrão. As setas indicam o início do tratamento. O asterisco indica  $p < 0,05$ . Experimento repetido com resultados similares.



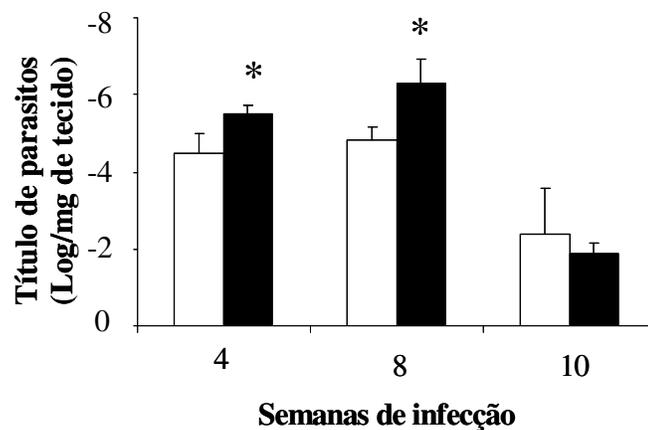
**GRÁFICO 2 - Quantificação de parasitos na lesão por *L. major* em camundongos C57BL/6 tratados diariamente com atorvastatina ou PBS.**

Os camundongos foram infectados com  $1 \times 10^6$  *L. major* na forma estacionária metacíclica na pata traseira e tratados diariamente com 10 mg/kg de atorvastatina por via oral. PBS foi utilizado como controle. O tratamento iniciou 2 dias antes ou 14 dias depois da infecção. Os animais foram sacrificados com **10 semanas** de infecção. As patas foram removidas para a determinação da carga parasitária. A quantificação de parasitos foi determinada individualmente e as médias das diluições máximas de cada grupo foram expressas pelo logaritmo negativo do título (última diluição positiva). Barras representam a média  $\pm$  desvio padrão de 4 animais por grupo. \*  $p < 0,05$ . Experimento repetido com resultados similares.



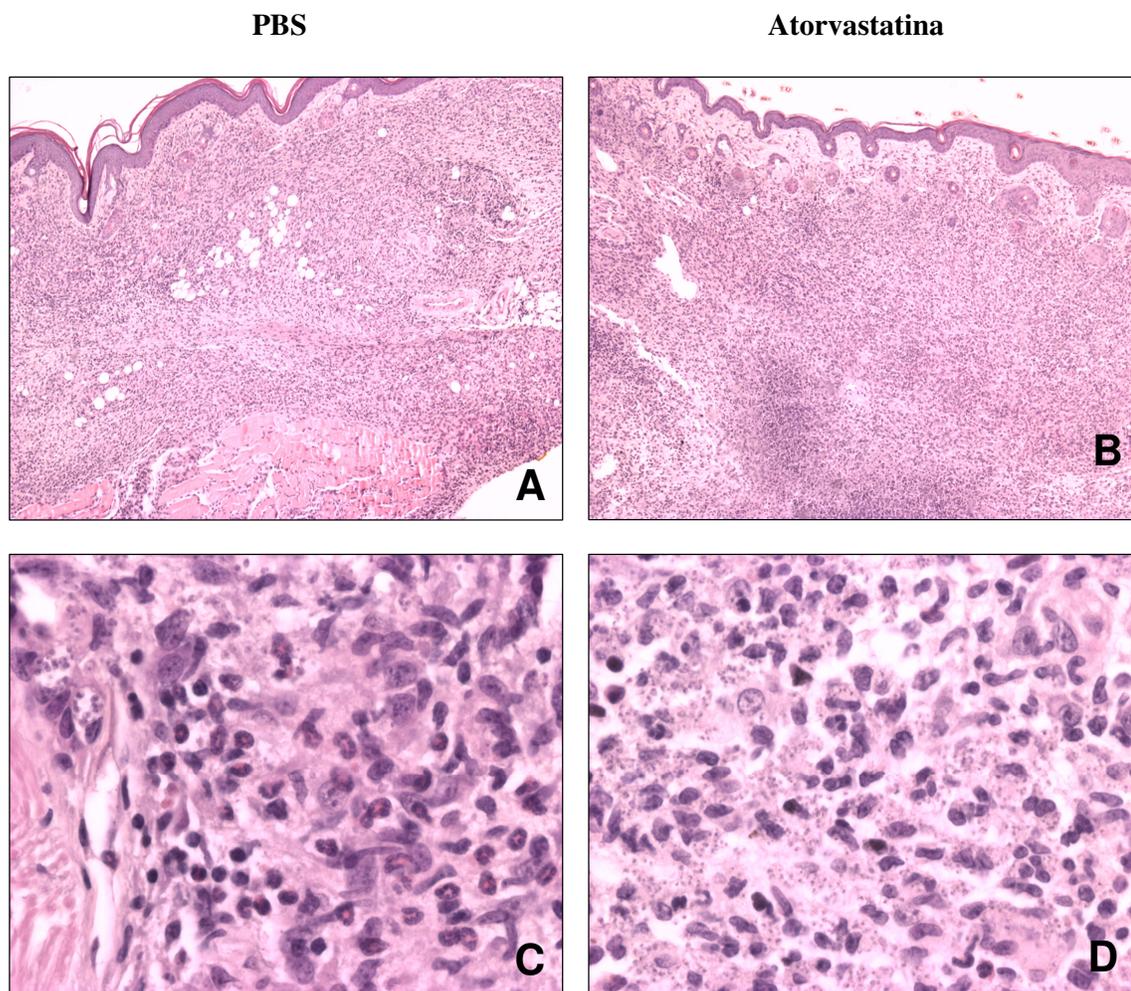
**GRÁFICO 3 - Efeito do tratamento diário à 7hs da noite com atorvastatina no curso de infecção por *L. major* em camundongos C57BL/6 infectados na pata.**

Os camundongos foram infectados com  $1 \times 10^6$  *L. major* na forma estacionária metacíclica na pata traseira e tratados diariamente às 7 hs da noite com 10 mg/kg de atorvastatina por via oral. PBS foi utilizado como controle. O tratamento iniciou 14 dias depois da infecção. A medida das patas foi aferida semanalmente com paquímetro. O tamanho da lesão foi obtido subtraindo-se a medida da pata infectada pela média da medida de patas de animais não infectados. Cada ponto representa a média de 4 a 8 animais  $\pm$  erro padrão. As setas indicam o início do tratamento. \*  $p < 0,05$ . Experimento repetido com resultados similares.



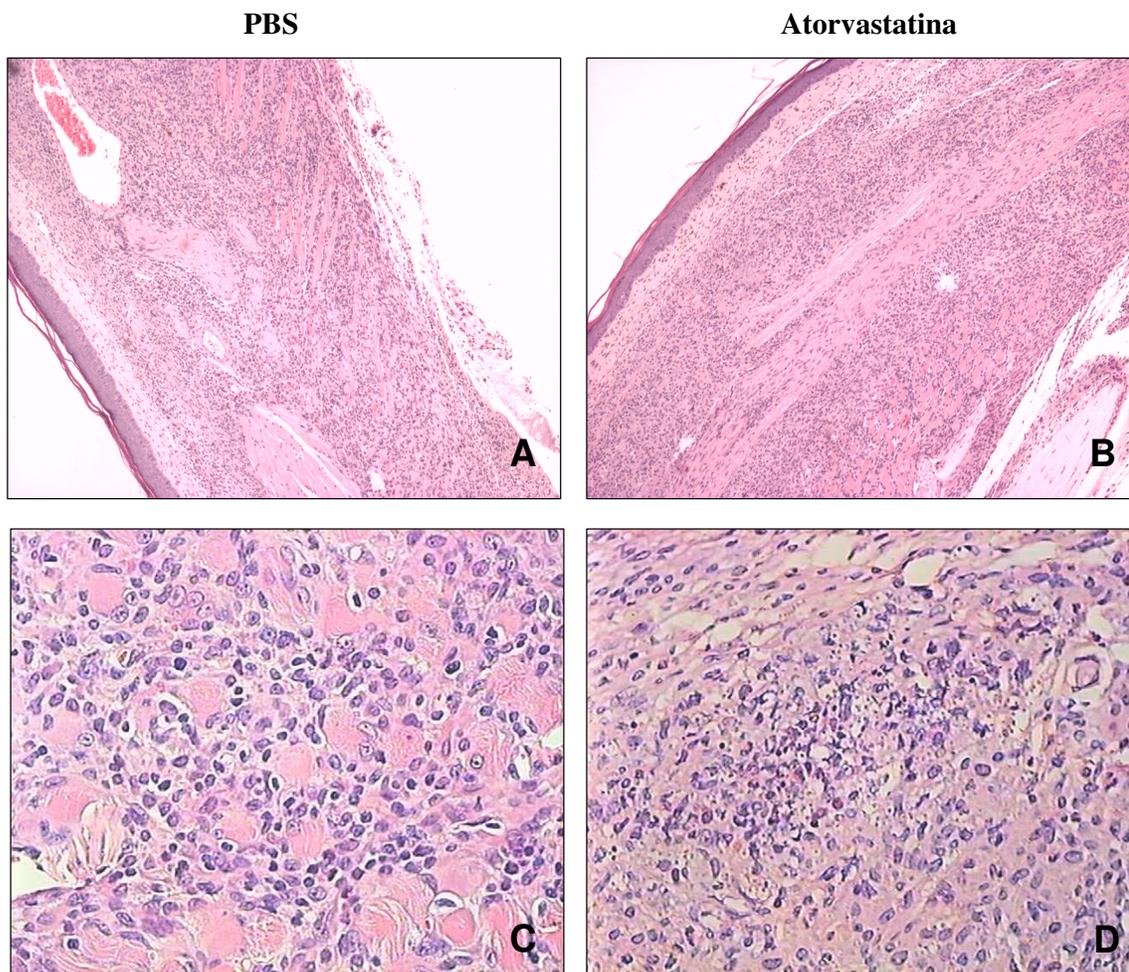
**GRÁFICO 4: Quantificação de parasitos na lesão por *L. major* em camundongos C57BL/6 tratados diariamente à noite com atorvastatina ou PBS.**

Os camundongos foram infectados com  $1 \times 10^6$  *L. major* na forma estacionária metacíclica na pata traseira e tratados diariamente à noite com 10 mg/kg de atorvastatina por via oral. PBS foi utilizado como controle. O tratamento iniciou 14 dias depois da infecção. Os animais foram sacrificados com 4, 8 e 10 semanas de infecção. As patas foram removidas para a determinação da carga parasitária. A quantificação de parasitos foi determinada individualmente e as médias das diluições máximas de cada grupo foram expressas pelo logaritmo negativo do título (última diluição positiva). Barras representam a média  $\pm$  desvio padrão de 4 animais por grupo. As barras pretas representam os resultados dos camundongos tratados com PBS. As barras brancas representam os resultados dos camundongos tratados com atorvastatina\*  $p < 0,05$ . Experimento repetido com resultados similares.



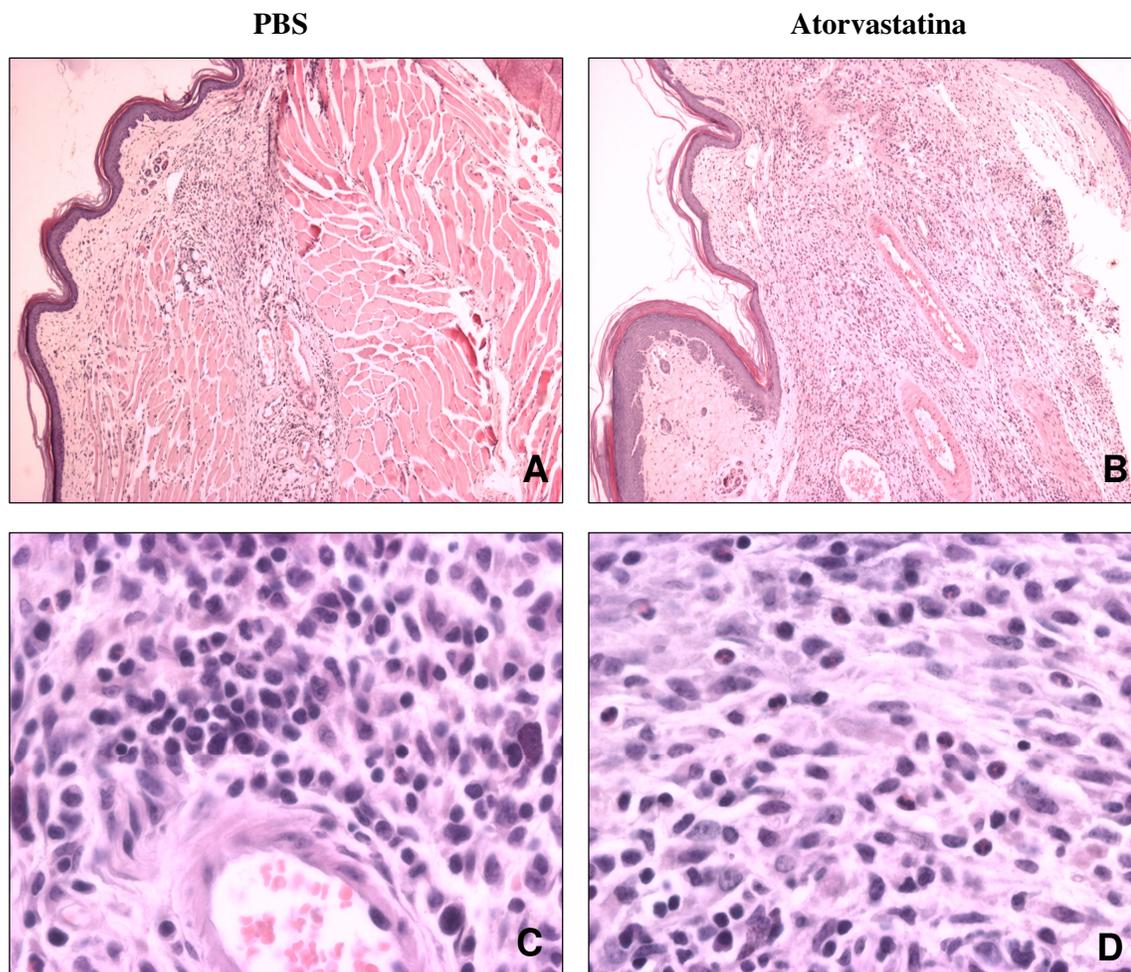
**FIGURA 1 - Análise histopatológica da lesão por *L. major* após 4 semanas de infecção de animais tratados diariamente à noite com atorvastatina ou PBS.**

Os camundongos foram infectados *L. major* na pata traseira e tratados diariamente à noite com 10 mg/kg de atorvastatina ou PBS por via oral. O tratamento iniciou 14 dias depois da infecção. Os animais foram sacrificados com **4 semanas** de infecção. As patas foram removidas para a análise histopatológica após inclusão em parafina e coloração por Hematoxilina e Eosina. (A e C) Lesão em camundongos tratados com PBS. (B e D) Lesão em camundongos tratados com atorvastatina. (A e B) Aumento de 4 vezes. (C e D) Aumento de 40 vezes.



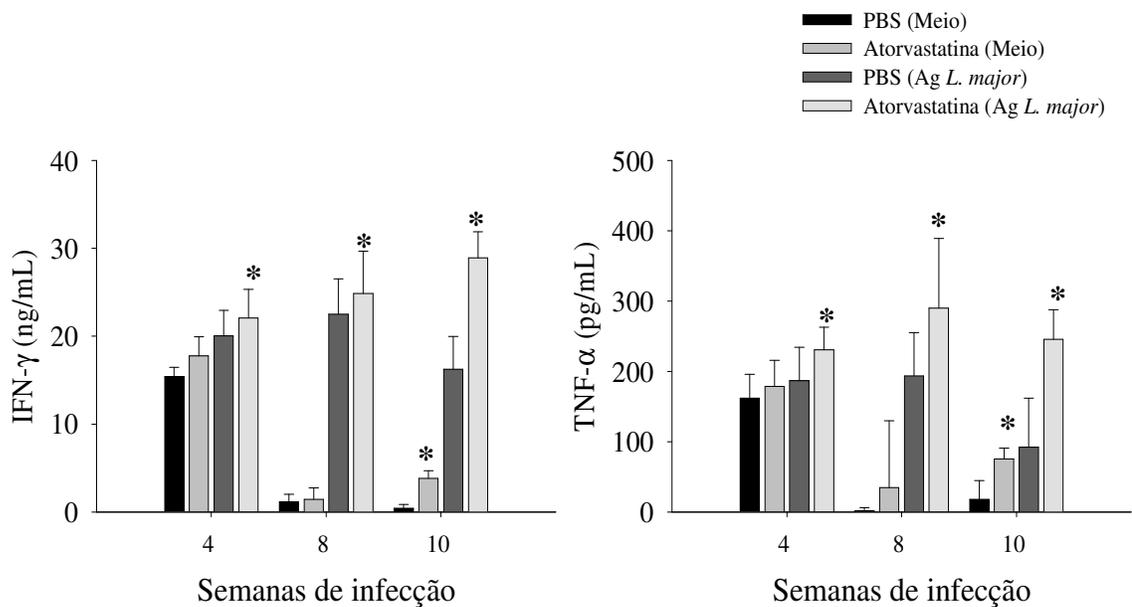
**FIGURA 2 - Análise histopatológica da lesão por *L. major* após 8 semanas de infecção de animais tratados diariamente à noite com atorvastatina ou PBS.**

Os camundongos foram infectados *L. major* na pata traseira e tratados diariamente à noite com 10 mg/kg de atorvastatina ou PBS por via oral. O tratamento iniciou 14 dias depois da infecção. Os animais foram sacrificados com **8 semanas** de infecção. As patas foram removidas para a análise histopatológica após inclusão em parafina e coloração por Hematoxilina e Eosina. (A e C) Lesão em camundongos tratados com PBS. (B e D) Lesão em camundongos tratados com atorvastatina. (A e B) Aumento de 4 vezes. (C e D) Aumento de 40 vezes.



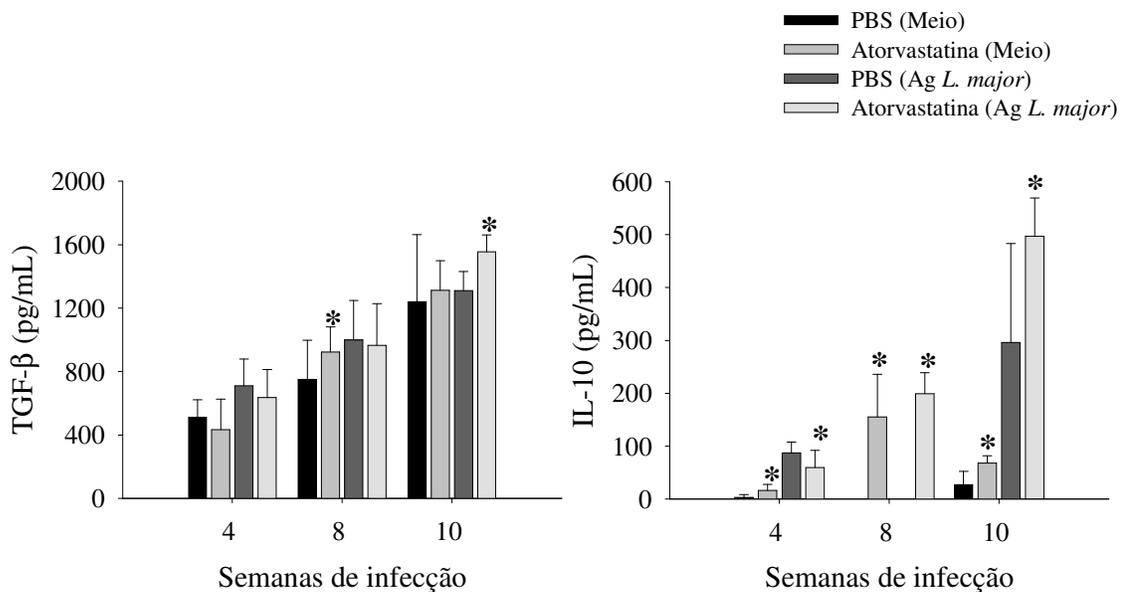
**FIGURA 3 - Análise histopatológica da lesão por *L. major* após 10 semanas de infecção de animais tratados diariamente à noite com atorvastatina ou PBS.**

Os camundongos foram infectados *L. major* na pata traseira e tratados diariamente à noite com 10 mg/kg de atorvastatina ou PBS por via oral. O tratamento iniciou 14 dias depois da infecção. Os animais foram sacrificados com **10 semanas** de infecção. As patas foram removidas para a análise histopatológica após inclusão em parafina e coloração por Hematoxilina e Eosina. (A e C) Lesão em camundongos tratados com PBS. (B e D) Lesão em camundongos tratados com atorvastatina. (A e B) Aumento de 4 vezes. (C e D) Aumento de 40 vezes.



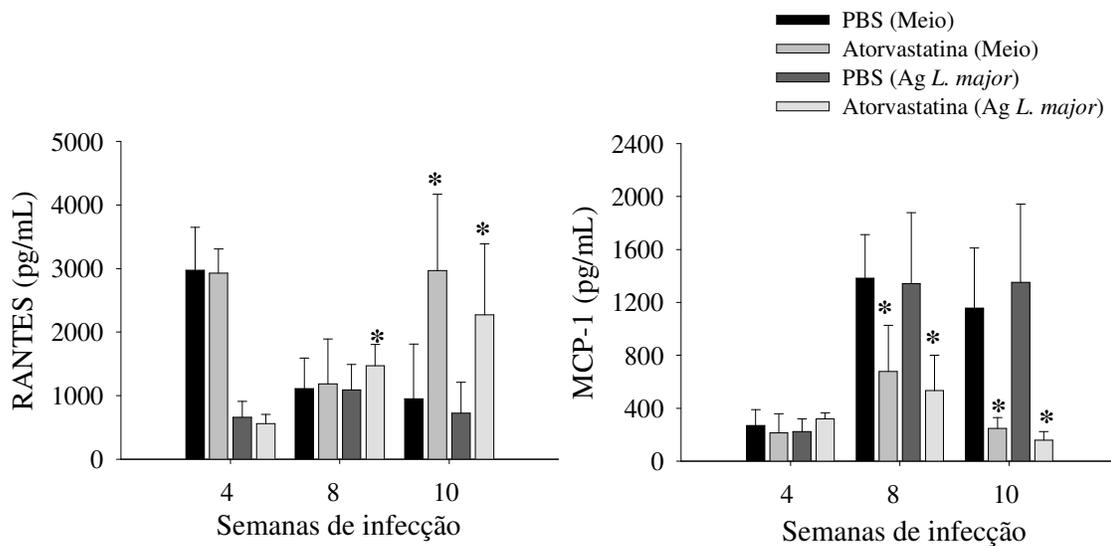
**GRÁFICO 5 - Efeito do tratamento diário à noite com atorvastatina na produção de citocinas pró-inflamatórias (IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ ) no linfonodo poplíteo em camundongos C57BL/6 infectados na pata com *L. major*.**

Os camundongos foram infectados com  $1 \times 10^6$  *L. major* na forma estacionária metacíclica na pata traseira e tratados diariamente à noite com 10 mg/kg de atorvastatina ou PBS por via oral. O tratamento iniciou 14 dias depois da infecção. Os animais foram sacrificados com 4, 8 e 10 semanas de infecção e foi realizada a cultura do linfonodo poplíteo. A produção das citocinas foi dosada por ELISA no sobrenadante de cultura com 72 horas de incubação. Cada ponto representa a média  $\pm$  desvio padrão de 4 animais.\*  $p < 0,05$ . Experimento repetido com resultados similares.



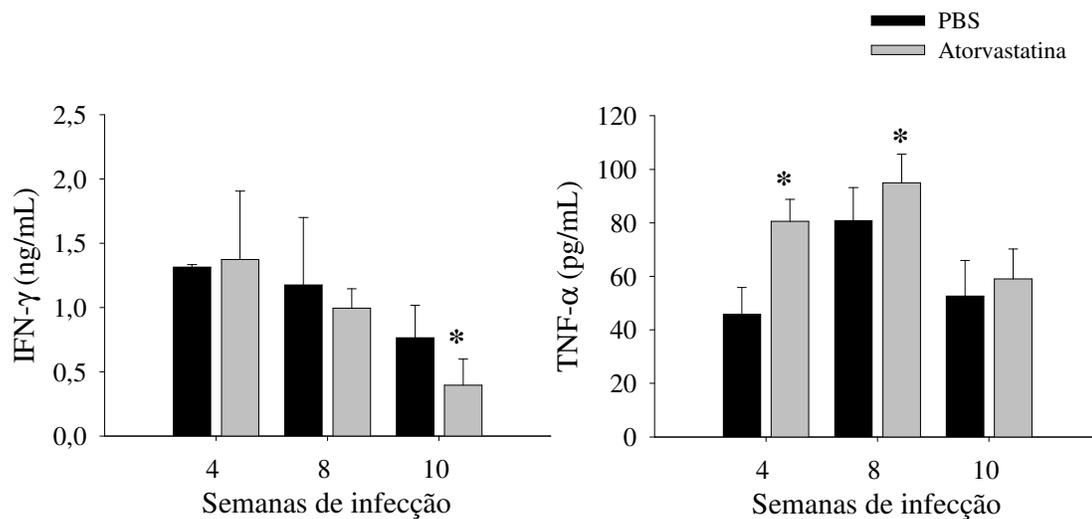
**GRÁFICO 6 - Efeito do tratamento diário à noite com atorvastatina na produção de citocinas anti-inflamatórias (TGF- $\beta$  e IL-10) no linfonodo poplíteo em camundongos C57BL/6 infectados na pata com *L. major*.**

Os camundongos foram infectados com  $1 \times 10^6$  *L. major* na forma estacionária metacíclica na pata traseira e tratados diariamente à noite com 10 mg/kg de atorvastatina ou PBS por via oral. O tratamento iniciou 14 dias depois da infecção. Os animais foram sacrificados com 4, 8 e 10 semanas de infecção e foi realizada a cultura do linfonodo poplíteo. A produção das citocinas foi dosada por ELISA no sobrenadante de cultura com 72 horas de incubação. Cada ponto representa a média  $\pm$  desvio padrão de 4 animais.\*  $p < 0,05$ . Experimento repetido com resultados similares.



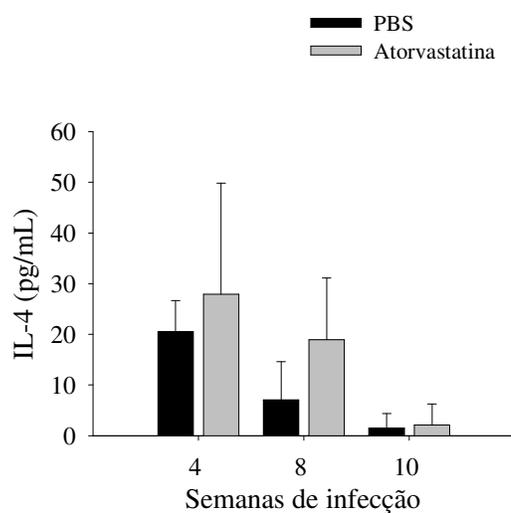
**GRÁFICO 7 - Efeito do tratamento diário à noite com atorvastatina na produção de quimiocinas (RANTES e MCP-1) no linfonodo poplíteo em camundongos C57BL/6 infectados na pata com *L. major*.**

Os camundongos foram infectados com  $1 \times 10^6$  *L. major* na forma estacionária metacíclica na pata traseira e tratados diariamente à noite com 10 mg/kg de atorvastatina ou PBS por via oral. O tratamento iniciou 14 dias depois da infecção. Os animais foram sacrificados com 4, 8 e 10 semanas de infecção e foi realizada a cultura do linfonodo poplíteo. A produção das quimiocinas foi dosada por ELISA no sobrenadante de cultura com 72 horas de incubação. Cada ponto representa a média  $\pm$  desvio padrão de 4 animais.\*  $p < 0,05$ . Experimento repetido com resultados similares.



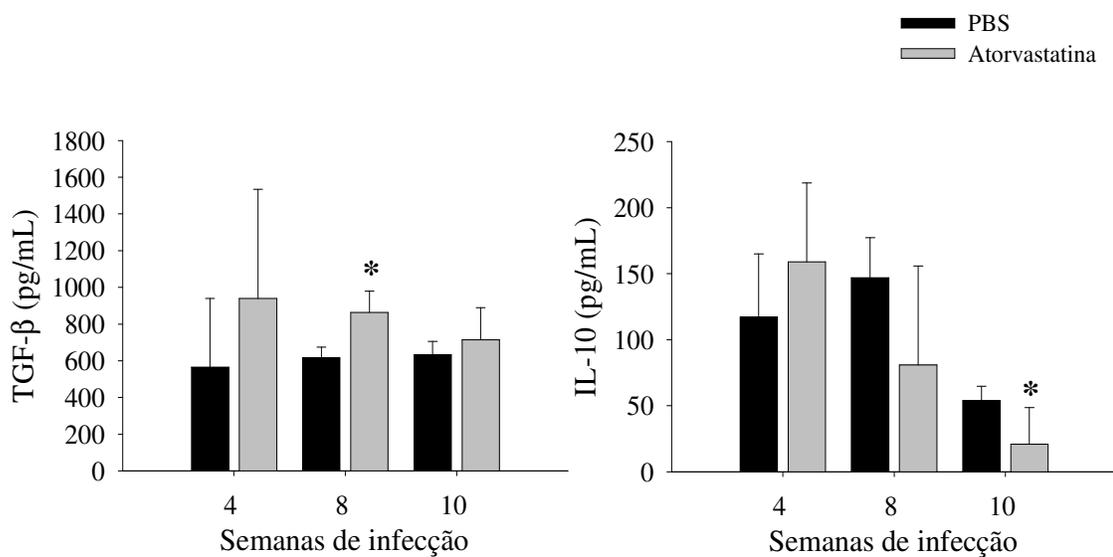
**GRÁFICO 8 - Efeito do tratamento diário à noite com atorvastatina na expressão de citocinas pró-inflamatórias (IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ ) na lesão de camundongos C57BL/6 infectados na pata com *L. major*.**

Os camundongos foram infectados com  $1 \times 10^6$  *L. major* na forma estacionária metacíclica na pata traseira e tratados diariamente à noite com 10 mg/kg de atorvastatina ou PBS por via oral. O tratamento iniciou 14 dias depois da infecção. Os animais foram sacrificados com 4, 8 e 10 semanas de infecção e o coxim plantar foi removido para extração de proteínas. A expressão das citocinas foi dosada por ELISA no extrato de proteínas. Cada ponto representa a média  $\pm$  desvio padrão de 4 animais. \*  $p < 0,05$ . Experimento repetido com resultados similares.



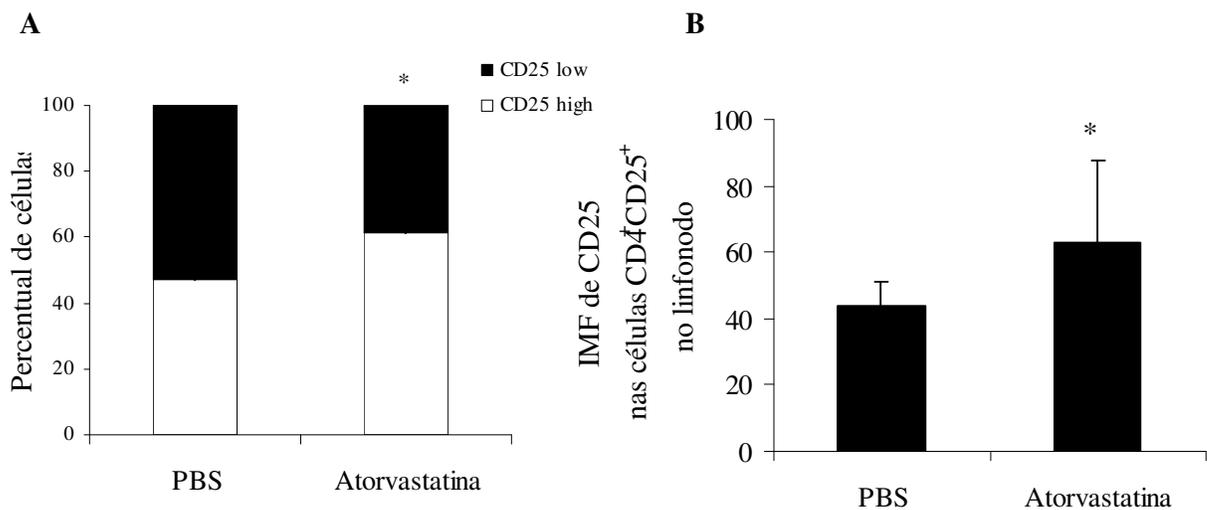
**GRÁFICO 9 - Efeito do tratamento diário à noite com atorvastatina na expressão de IL-4 na lesão de camundongos C57BL/6 infectados na pata com *L. major*.**

Os camundongos foram infectados com  $1 \times 10^6$  *L. major* na forma estacionária metacíclica na pata traseira e tratados diariamente à noite com 10 mg/kg de atorvastatina ou PBS por via oral. O tratamento iniciou 14 dias depois da infecção. Os animais foram sacrificados com 4, 8 e 10 semanas de infecção e o coxim plantar foi removido para extração de proteínas. A expressão da citocina foi dosada por ELISA no extrato de proteínas. Cada ponto representa a média  $\pm$  SE de 4 animais.\*  $p < 0,05$ . Experimento repetido com resultados similares.



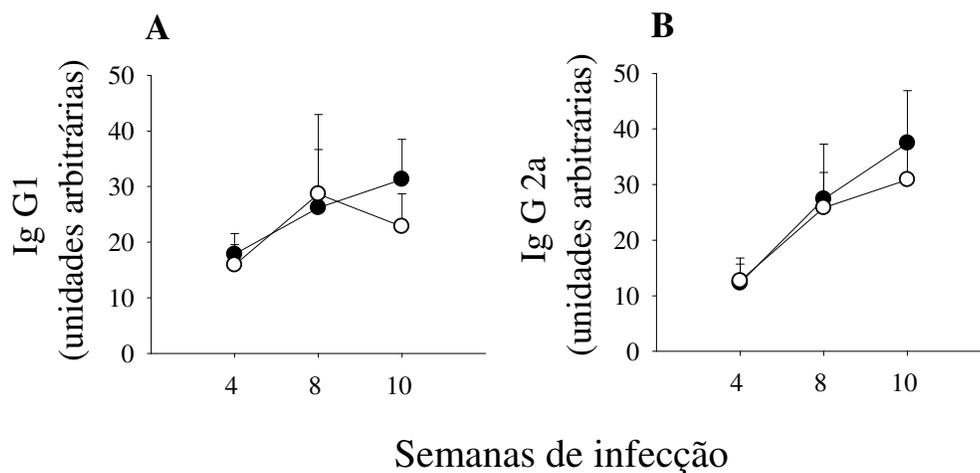
**GRÁFICO 10 - Efeito do tratamento diário à noite com atorvastatina na expressão de citocinas anti-inflamatórias (TGF- $\beta$  e IL-10) na lesão de camundongos C57BL/6 infectados na pata com *L. major*.**

Os camundongos foram infectados com  $1 \times 10^6$  *L. major* na forma estacionária metacíclica na pata traseira e tratados diariamente à noite com 10 mg/kg de atorvastatina ou PBS por via oral. O tratamento iniciou 14 dias depois da infecção. Os animais foram sacrificados com 4, 8 e 10 semanas de infecção e o coxim plantar foi removido para extração de proteínas. A expressão das citocinas foi dosada por ELISA no extrato de proteínas. Cada ponto representa a média  $\pm$  desvio padrão de 4 animais. \*  $p < 0,05$ . Experimento repetido com resultados similares.

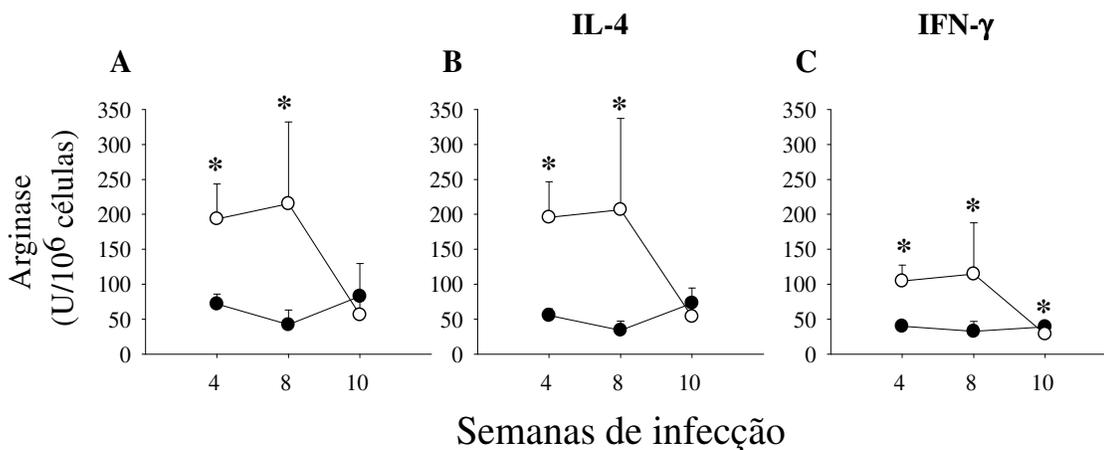


**GRÁFICO 11 - Efeito do tratamento diário à noite com atorvastatina na população de células T regulatórias CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> no linfonodos de camundongos C57BL/6 infectados na pata com *L. major*.**

Os camundongos foram infectados com  $1 \times 10^6$  *L. major* na forma estacionária metacíclica na pata traseira e tratados diariamente à noite com 10 mg/kg de atorvastatina ou PBS por via oral. O tratamento iniciou 14 dias depois da infecção. Os animais foram sacrificados com 8 semanas de infecção linfonodo foi removido para análise das células por citometria de fluxo. (A) Percentual de células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>low</sup> e CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> na população de células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>. (B) Intensidade média de fluorescência (IMF) de CD25 na população de células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> do linfonodo. As barras representam a média + desvio padrão de 4 animais.\* p < 0,05. Experimento repetido com resultados similares.



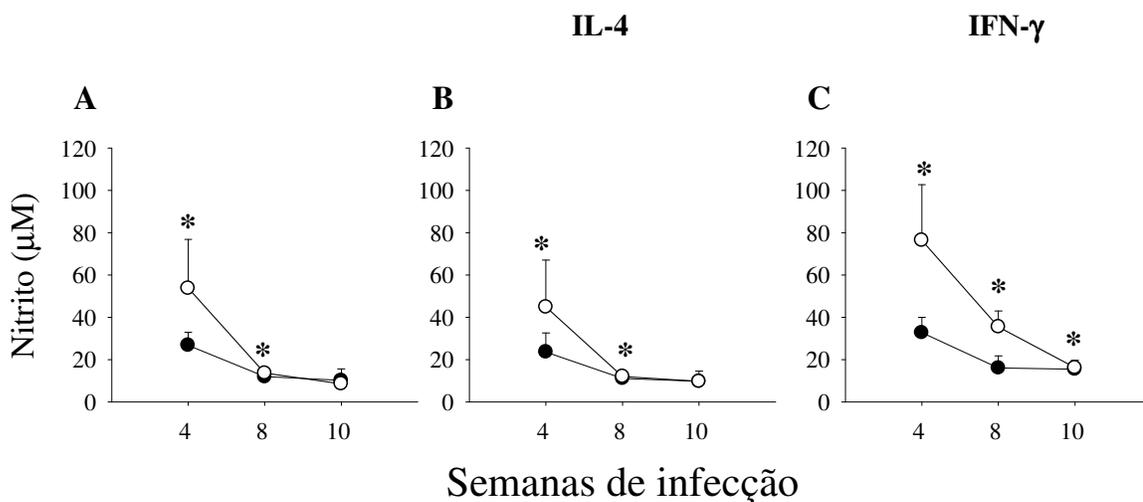
**GRÁFICO 12 - Cinética da produção de anticorpos IgG1 e IgG2a anti-*Leishmania major* em camundongos C57BL/6 infectados na pata com *L. major*.** Os camundongos foram infectados com  $1 \times 10^6$  *L. major* na forma estacionária metacíclica na pata traseira e tratados diariamente à noite com 10 mg/kg de atorvastatina ou PBS por via oral. O tratamento iniciou 14 dias depois da infecção. Os animais foram sacrificados com 4, 8 e 10 semanas de infecção e foi coletado soro desses animais para dosagem de anticorpos antileishmania por ELISA. (A) Nível de IgG1 anti *L. major*. (B) Nível de IgG2a anti *L. major*. Os círculos fechados representam os resultados dos animais que receberam PBS. Os círculos abertos representam os resultados dos animais tratados com atorvastatina. Cada ponto representa a média  $\pm$  desvio padrão de 3 experimentos diferentes com 4 animais por grupo.



**GRÁFICO 13 - Cinética da atividade de arginase em cultura de macrófagos peritoneais de camundongos C57BL/6 infectados na pata com *L. major*.**

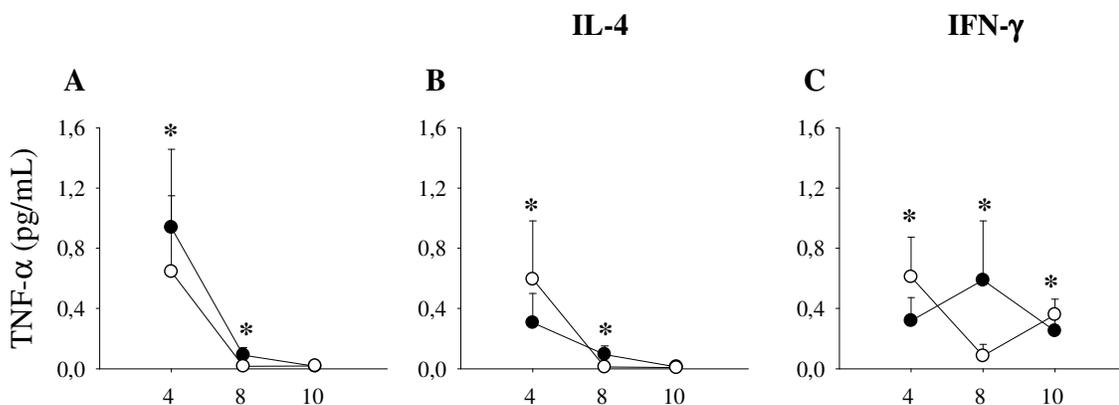
Os camundongos foram infectados com  $1 \times 10^6$  *L. major* na forma estacionária metacíclica na pata traseira e tratados diariamente à noite com 10 mg/kg de atorvastatina ou PBS por via oral. O tratamento iniciou 14 dias depois da infecção. Os animais foram sacrificados com 4, 8 e 10 semanas de infecção e foi realizada cultura de macrófagos peritoneais. A atividade de arginase foi dosada indiretamente pela produção de uréia por ensaio colorimétrico. (A) Cultura de macrófagos não estimulados. (B) Cultura de macrófagos estimulados com IL-4. (C) Cultura de macrófagos estimulados com IFN- $\gamma$ . Os círculos fechados representam os resultados dos animais que receberam PBS. Os círculos abertos representam os resultados dos animais tratados com atorvastatina. Cada ponto representa a média  $\pm$  desvio padrão de 4 animais.

\*  $p < 0,05$ . Experimento repetido com resultados similares.



**GRÁFICO 14 - Cinética da produção de nitrito no sobrenadante de cultura de macrófagos peritoneais de camundongos C57BL/6 infectados na pata com *L. major*.**

Os camundongos foram infectados com  $1 \times 10^6$  *L. major* na forma estacionária metacíclica na pata traseira e tratados diariamente à noite com 10 mg/kg de atorvastatina ou PBS por via oral. O tratamento iniciou 14 dias depois da infecção. Os animais foram sacrificados com 4, 8 e 10 semanas de infecção e foi realizada cultura de macrófagos peritoneais. A produção de nitrito foi dosada pela reação Griess. (A) Cultura de macrófagos não estimulados. (B) Cultura de macrófagos estimulados com IL-4. (C) Cultura de macrófagos estimulados com IFN- $\gamma$ . Os círculos fechados representam os resultados dos animais que receberam PBS. Os círculos abertos representam os resultados dos animais tratados com atorvastatina. Cada ponto representa a média  $\pm$  desvio padrão de 4 animais.\*  $p < 0,05$ . Experimento repetido com resultados similares.



**GRÁFICO 15 - Cinética da produção de TNF- $\alpha$  no sobrenadante de cultura de macrófagos peritoneais de camundongos C57BL/6 infectados na pata com *L. major*.**

Os camundongos foram infectados com  $1 \times 10^6$  *L. major* na forma estacionária metacíclica na pata traseira e tratados diariamente à noite com 10 mg/kg de atorvastatina ou PBS por via oral. O tratamento iniciou 14 dias depois da infecção. Os animais foram sacrificados com 4, 8 e 10 semanas de infecção e foi realizada cultura de macrófagos peritoneais. A produção TNF- $\alpha$  foi dosada por ensaio biológico. (A) Cultura de macrófagos não estimulados. (B) Cultura de macrófagos estimulados com IL-4. (C) Cultura de macrófagos estimulados com IFN- $\gamma$ . Os círculos fechados representam os resultados dos animais que receberam PBS. Os círculos abertos representam os resultados dos animais tratados com atorvastatina. Cada ponto representa a média  $\pm$  desvio padrão de 4 animais.\*  $p < 0,05$ . Experimento repetido com resultados similares.

## 5 DISCUSSÃO:

Em nosso trabalho, avaliamos a ação da atorvastatina sobre aspectos imunopatológicos da infecção por *L. major*, logo foi necessário considerarmos, inicialmente, variáveis farmacocinéticas que poderiam interferir nos resultados. A atividade da HMG-Co A redutase, enzima-alvo das estatinas, é maior durante a noite em humanos (JONES; SCHOELLER, 1990). Em espécies noturnas como ratos, o pico da atividade dessa enzima ocorre à meia-noite (EDWARDS; MUROYA; GOULD, 1972). Um estudo em camundongos demonstrou que esses animais apresentaram os mesmos perfis de atividade da HMG-CoA redutase hepática observados em ratos considerando os seguintes parâmetros: ciclo de claro e escuro, padrão de alimentação e diferença sexual (DUPONT *et al.*, 1988).

Recentemente, tentou-se correlacionar a intensidade do efeito redutor de colesterol das estatinas com o horário de administração do medicamento (pela manhã ou ao anoitecer) a partir de uma revisão das pesquisas clínicas nas últimas três décadas envolvendo diversos inibidores da HMG-CoA redutase. Os autores concluíram que existem dados suficientes para assegurar a maior probabilidade de obtenção de menores níveis de LDL plasmáticos com a administração de sinvastatina ao anoitecer. Contudo, os dados existentes até hoje são insuficientes para chegar-se à mesma conclusão em relação a lovastatina, pravastatina, rosuvastatina, fluvastatina e atorvastatina (PLAKOGIANNIS; COHEN, 2007). O acompanhamento da evolução da lesão dos animais submetidos aos diferentes esquemas de tratamento utilizados em nosso trabalho demonstrou que o efeito da atorvastatina é modulado pelo ciclo circadiano do organismo do camundongo. A administração do fármaco diariamente no mesmo horário provocou uma alteração importante no tamanho da lesão ao longo do curso de infecção (GRAF. 3). Além do horário de administração, a dose do fármaco é uma variável extremamente relevante para a análise dos resultados e comparação com dados obtidos em outros trabalhos. Em humanos, a dose diária máxima recomendada de atorvastatina é 80 mg para o tratamento de hipercolesterolemia (BERNINI; POLI; PAOLETTI, 2001) que, em um indivíduo de 70 kg, corresponde a 1,1 mg/kg. Em roedores, estudos farmacocinéticos indicam que maiores doses de atorvastatina são necessárias para alcançar concentrações efetivas similares (CILLA, Jr. *et al.*, 1996; DOSTAL; WHITFIELD; ANDERSON, 1996). Portanto, utilizamos a dose de 10 mg/kg, aplicada em diversos trabalhos com modelos murinos.

As propriedades imunossupressoras da atorvastatina sobre doenças autoimunes como artrite reumatóide (MCCAREY *et al.*, 2004), encefalomielite autoimune experimental

(modelo experimental de esclerose múltipla) (AKTAS *et al.*, 2003; YOUSSEF *et al.*, 2002) e diabetes mellitus tipo I (BRUMEANU; GOLDSTEIN; CASARES, 2006) têm sido amplamente estudadas em humanos e animais com o propósito de comprovar seu potencial terapêutico sobre tais doenças. Sua ação antiinflamatória é principal foco de investigação dos trabalhos que propõem o uso profilático da atorvastatina para doença cardiovascular (ASCER *et al.*, 2004; CHENG *et al.*, 2005; RIDKER *et al.*, 2001; VAUGHAN; GOTTO, Jr.; BASSON, 2000). Contudo, o risco potencial associado a essas ações sobre o sistema imune e à possível intervenção nos mecanismos imunológicos naturais de controle de infecções parasitárias não tem sido investigado a fundo.

Algumas publicações destacam a ação imunomoduladora da atorvastatina no tocante à intervenção no perfil da resposta imune (COWARD; CHOW, 2006; WAICZIES *et al.*, 2005; YOUSSEF *et al.*, 2002). Com base nesses dados, nossa proposta principal foi estudar o efeito do tratamento prolongado com atorvastatina num modelo experimental murino (camundongo C57BL/6) infectado com o protozoário *Leishmania major*. Esse camundongo desenvolve naturalmente uma resposta imune polarizada do tipo 1 e, por esse motivo, cura espontaneamente a infecção pelo parasito, principal agente etiológico da leishmaniose tegumentar no Velho Mundo (DOWLATI, 1996).

Esperávamos que o momento de introdução do tratamento com atorvastatina (antes ou depois da infecção) produziria resultados diferentes em relação ao comportamento do parasito e da lesão. Entretanto, aparentemente, a possível ação da atorvastatina sobre mecanismos da imunidade inata no período inicial da infecção não existiu ou foi incapaz induzir maior susceptibilidade nos animais em que o tratamento iniciou antes da infecção. Assim, nesses animais, foi detectado parasitismo semelhante ao do grupo cujo tratamento iniciou 14 dias após a infecção (GRAF. 2). As curvas da lesão em ambos os grupos também não foram discrepantes (GRAF. 1). O segundo grupo apresentou um pequeno crescimento na lesão apenas entre a terceira e quinta semanas de infecção (GRAF. 1B). É possível que se o tratamento fosse realizado no mesmo horário no grupo tratado a partir dos dois dias anteriores à infecção alguma diferença no curso de infecção ou talvez um parasitismo ainda maior seriam observados. No terceiro esquema de tratamento (doses diárias administradas no mesmo horário após 14 dias de infecção), o parasitismo nos animais tratados com atorvastatina foi mais acentuado durante quase todo o curso de infecção (GRAF. 4). Na décima semana, esses animais ainda apresentavam maior lesão apesar de terem controlado a *Leishmania* como o grupo que recebeu salina (GRAF. 3 e 4). Ainda assim, podemos afirmar que os animais tratados com a estatina apresentaram parasitismo tecidual (GRAF. 2 e 4) e

lesões consideravelmente maiores que os animais do grupo controle (GRAF. 3). O parasitismo tecidual visualizado através da análise histopatológica das lesões foi congruente com o resultado da titulação de parasitos. A quantidade de parasitos no interior dos macrófagos foi nitidamente maior no tecido da pata dos animais tratados com atorvastatina (FIG. 1D e 2D). No infiltrado inflamatório dos animais do grupo controle, os eosinófilos eram mais frequentes (FIG. 1C). A migração de eosinófilos para o tecido com *Leishmania* é um evento comum no início da infecção (PEARSON *et al.*, 1987). Os eosinófilos colaboram para o controle do parasitismo, pois exercem atividades microbicidas mediadas por óxido nítrico, cuja produção é induzida por IL-5, IL-8, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  e RANTES (OLIVEIRA *et al.*, 1998). Já foi demonstrado que os eosinófilos possuem atividade microbicida sobre *L. major* (OLIVEIRA *et al.*, 1997; OLIVEIRA *et al.*, 1998). É possível que a atorvastatina possa ter comprometido a migração de eosinófilos para o sítio de infecção. Esse pode ser mais um dos motivos pelos quais os animais tratados com a estatina foram incapazes de controlar a proliferação do parasito especialmente até a quarta semana de infecção.

Esses achados confirmaram a nossa hipótese de que a ação moduladora da atorvastatina sobre o sistema imunológico tornaria o hospedeiro mais permissivo ao parasito. Alguns resultados em camundongos mostram que essa estatina inibe mecanismos pró-inflamatórios (característicos da resposta Th1) e favorece os componentes antiinflamatórios (característicos da resposta Th2) e reguladores do sistema imune (DUNN *et al.*, 2006; YOUSSEF *et al.*, 2002).

A proteção contra *Leishmania* requer a atuação preponderante da resposta imune celular (tipo 1) capaz de exterminar parasitos intracelulares (REINER; LOCKSLEY, 1993). Partimos, então, para o delineamento da resposta imunológica nesse hospedeiro. A resposta contra *L. major* produzida em camundongos da linhagem C57BL/6 é caracterizada pela produção de altos níveis de IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e CCL5/RANTES. Essas moléculas atuam na orquestração das células do sistema imune e no comando de seus mecanismos leishmanicidas. TNF- $\alpha$  medeia sinais para a indução da expressão de selectinas (VCAM-1 e E-selectina) na superfície do endotélio, atua no remodelamento da membrana basal endotelial e também sinaliza para a indução de MMP-9 que destrói a matriz extracelular (LOCKSLEY; KILLEEN; LENARDO, 2001). Dessa maneira, o extravasamento das células, mediante um estímulo quimiotático vindo do tecido infectado, é facilitado. CCL5/RANTES atrai diversos tipos celulares ao sítio inflamatório e tem sua expressão induzida durante a infecção por *Leishmania* (SANTIAGO *et al.*, 2004). Tal quimiocina participa na proteção contra *L. major*

no camundongo C57BL/6, possivelmente por atrair para o sítio inflamatório linfócitos Th1 (KUNKEL *et al.*, 2002), fontes importantes de IFN- $\gamma$ . IFN- $\gamma$  é a citocina-padrão da resposta Th1, responsável pela ativação do principal mecanismo de controle da *Leishmania* (GREEN *et al.*, 1990a). Em sinergismo com TNF- $\alpha$ , ela estimula a expressão e ativação da iNOS, enzima que catalisa a conversão de arginina em citrulina e óxido nítrico, este último responsável pela morte do parasito (GREEN *et al.*, 1990a, 1990b, 1990c). De acordo com nossos resultados, verificamos que a atorvastatina, como em outros trabalhos, não foi capaz de impedir a polarização da resposta imunológica para o tipo 1 no modelo estudado, já que nos linfonodos dos animais tratados foi detectada uma produção acentuada de IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e CCL5/RANTES (GRAF. 5 e 7). O intenso parasitismo observado nesses animais pode ser uma explicação para esses achados. O parasito pode estimular a produção dessas citocinas e quimiocina (ARNOLDI; MOLL, 1998; OLIVEIRA *et al.*, 2005; SANTIAGO *et al.*, 2004). A análise da produção desses marcadores no microambiente da lesão revelou maior quantidade de TNF- $\alpha$  nos animais tratados (GRAF. 8), níveis semelhantes CCL-5/ RANTES entre os grupos e um decréscimo mais marcante na produção de IFN- $\gamma$  na décima semana de infecção no grupo que recebeu a estatina (GRAF. 8). Isso indica que, mediante o tratamento com atorvastatina, o estímulo gerado pelos parasitos para a produção de IFN- $\gamma$  e CCL5/RANTES não é eficaz no sítio de infecção.

Diante desses resultados intrigantes, ficou claro que, de alguma forma, o organismo do hospedeiro estava favorecendo a permanência e proliferação do parasito mesmo produzindo uma resposta imune tipo 1 fortemente polarizada e duradoura. Resultados bastante semelhantes foram publicados por Anderson, Mendez e Sacks (ANDERSON; MENDEZ; SACKS, 2005). Uma linhagem de *L. major* derivada de um paciente com lesões crônicas que não curavam produzia essas mesmas características patológicas no camundongo C57BL/6. Foram detectados níveis elevados de IFN- $\gamma$  no linfonodo drenante e na lesão, ausência de IL-4 e IL-13 e indução intensa de iNOS na lesão. A infecção de camundongos deficientes de IL-10 com mesmo fundo genético, bloqueio do receptor de IL-10 ou depleção de células CD25<sup>+</sup> promoveram a eliminação do parasito indicando que IL-10 e células T regulatórias contribuíram para tornar a resposta Th1 ineficaz no controle da infecção na pele (ANDERSON; MENDEZ; SACKS, 2005). Em concordância com esses dados, nosso modelo de estudo não gerou polarização da resposta imune para Th2 e foi detectada a produção de citocinas regulatórias nos animais tratados com atorvastatina. A produção de IL-4 entre os grupos foi semelhante (GRAF. 7). Nossos resultados evidenciaram uma produção elevada de

IL-10 no linfonodo (GRAF. 6) e TGF- $\beta$  no linfonodo e na pata (GRAF. 6 e 10) dos animais tratados com atorvastatina. IL-10 e TGF- $\beta$  são citocinas produzidas principalmente por células T regulatórias (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>). IL-10 reprime as respostas ao IFN- $\gamma$  e inativa macrófagos para a eliminação do parasito mediada por IFN- $\gamma$  (MOORE *et al.*, 2001), TGF- $\beta$  inibe a produção de óxido nítrico nos macrófagos. O camundongo BALB/c deficiente de IL-10 infectado com *L. major* apresentou maior resistência apesar de manter um intenso parasitismo (KANE; MOSSER, 2001). As duas citocinas regulatórias (IL-10 e TGF- $\beta$ ) estão associadas ao aumento da atividade de arginase 1 nos macrófagos, enzima que fornece substratos para a proliferação da *Leishmania* (BOUTARD *et al.*, 1995; CORRALIZA *et al.*, 1995). No âmbito experimental, ao invés da polaridade Th2, as células T regulatórias e seus produtos têm sido apontados como responsáveis pela indução de susceptibilidade em linhagens de camundongos resistentes (ANDERSON; MENDEZ; SACKS, 2005) e pela persistência do parasito em lesões curadas (BELKAID *et al.*, 2001). Clinicamente, não foi possível associar claramente a polaridade Th2 às formas mais graves de leishmaniose humana: formas sistêmicas, formas que reativam e que não curam. A citocina mais comumente encontrada nesses casos não é IL-4 e sim IL-10 (GHALIB *et al.*, 1993; MELBY *et al.*, 1994; RIBEIRO-DE-JESUS *et al.*, 1998).

Em relação aos níveis de CCL2/MCP-1 no linfonodo, observamos que a terapia com atorvastatina diminuiu a produção desta quimiocina nos animais tratados (GRAF. 7), resultados concordantes com alguns dados da literatura (KOWALSKI *et al.*, 2003; MARTINEZ-GONZALEZ *et al.*, 2001; XU *et al.*, 2003; YAMADA *et al.*, 2007). Contudo, de acordo com diversos trabalhos e com resultados publicados por nosso grupo de pesquisa, a expressão de CCL2/MCP-1 parece não estar correlacionada com resistência ou susceptibilidade à infecção por *L. major* em modelos murinos que não o BALB/c (GU *et al.*, 2000; RITTER *et al.*, 1996; RITTER; MOLL, 2000; SANTIAGO *et al.*, 2004).

Outro parâmetro que utilizamos para investigar se houve polarização da resposta imune foi a dosagem de anticorpos específicos contra *Leishmania*. Em camundongos BALB/c, o título de IgG1 foi correlacionado ao tamanho da lesão (MORRIS *et al.*, 1993), um achado congruente com o papel de IL-4 na permissividade à proliferação do parasito e na indução da produção de IgG1 (SNAPPER; PAUL, 1987). A produção de IgG2a é promovida por IFN- $\gamma$  (SNAPPER; PAUL, 1987), porém não foi correlacionada ao tamanho da lesão (MORRIS *et al.*, 1993). Como mostra o GRAF. 12, o tratamento com atorvastatina não provocou alteração na produção dos anticorpos séricos IgG1 e IgG2a. A produção de IL-4,

quando detectada, foi semelhante entre os grupos (GRAF. 9), portanto foi incapaz de incrementar a produção de IgG1. Nos grupos tratado e controle, o acréscimo na produção de IgG2a, ao longo do curso de infecção, acompanhou o aumento da produção de IFN- $\gamma$  no linfonodo (GRAF. 12B). A ausência de correlação entre o título desse anticorpo e a lesão justifica a semelhança no nível dessa proteína no soro do grupo controle no soro dos animais tratados (que apresentaram maior lesão a partir da quarta semana de infecção, GRAF. 3).

O camundongo C57BL/6 é um bom modelo para o estudo da leishmaniose cutânea, pois seu padrão de infecção mimetiza a doença humana. Após a inoculação de *L. major* nesse camundongo, a expansão dos parasitos é controlada por mecanismos imunológicos que medeiam o desenvolvimento de lesões cutâneas pequenas com evolução espontânea para cura após algumas semanas (DOWLATI, 1996; SCOTT *et al.*, 1988). Entretanto, a cura da lesão não implica em cura parasitária. O acúmulo de células T regulatórias no sítio de infecção suprime a capacidade da resposta imune de eliminar completamente o parasito (BELKAID *et al.*, 2002). A persistência de um pequeno número de parasitos na lesão é essencial para a manutenção de uma imunidade duradoura. Contudo, o controle dessa infecção latente depende de um equilíbrio finamente ajustado entre a resposta regulatória que favorece o parasito e a resposta inflamatória celular que protege o hospedeiro. A reativação da lesão está associada ao aumento no número de células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> (MENDEZ *et al.* 2004). Nossos resultados mostram que o tratamento com atorvastatina comprometeu a eficácia dos mecanismos de controle tradicionais do hospedeiro. Observamos que nos animais tratados há um aumento no percentual de células T regulatórias CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> dentro da população de células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> (GRAF. 11A). Como esperado, esse dado concorda com o aumento da expressão de CD25 na superfície dos linfócitos CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> mediante a terapia com atorvastatina como mostra o GRAF. 11B. Esse resultado é coincidente com os demais detectados também na oitava semana de infecção: parasitismo bem mais acentuado nos animais que receberam atorvastatina (GRAF. 4); maiores níveis de TGF- $\beta$  na lesão (GRAF. 10) e no linfonodo (GRAF. 6) e de IL-10 no linfonodo (GRAF. 6) nos animais tratados. Dados publicados recentemente revelaram que a atorvastatina e outras estatinas aumentaram o número de células T regulatórias com alta expressão de CD25<sup>+</sup> em pacientes hipercolesterolêmicos. Neste trabalho, também foi observado um pequeno aumento no percentual de células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> entre as CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> no timo e no baço de camundongos C57BL/6, mas esse efeito não foi significativo. Os autores concluíram que a atorvastatina não altera o percentual de células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> murinas *in vivo* e *in vitro* (mediante tratamento em cultura) (MAUSNER-FAINBERG *et al.*, 2007). Entretanto, a via de administração do fármaco

utilizada nos experimentos *in vivo* foi intraperitoneal e o trabalho não mencionou o horário de tratamento dos animais. Portanto, nossos resultados não podem ser comparados a esses dados diante das possíveis variações na biodisponibilidade e na atividade da droga já que, em nossos experimentos, os animais receberam o tratamento por via oral e o horário de administração do fármaco foi controlado. O aumento na expressão de CD25<sup>+</sup> pode estar associado à maior produção de TGF- $\beta$  nos animais tratados. Essa citocina induz o aumento da expressão de CD25 e estimula a atividade supressora das células T regulatórias (YAMAGIWA *et al.*, 2001).

Assim como em outros modelos experimentais, em nosso estudo o tratamento com atorvastatina não agiu alterando a polarização da resposta imunológica ou inibindo a montagem da resposta imune efetora celular. Ao contrário, observamos um aumento na produção de citocinas Th1 (IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ ), por outro lado, a intervenção farmacológica da estatina foi predominantemente imunossupressora.

Finalmente, avaliamos os mecanismos regulados pelas citocinas, mas que exercem efeitos mais diretos na permanência ou extermínio dos parasitos: a atividade das enzimas arginase I e NOS II (ou iNOS). Ambas as enzimas são produzidas nos macrófagos que albergam a *Leishmania* e atuam sobre o mesmo substrato, a arginina. Contudo, os produtos gerados têm ações opostas sobre o parasito. Arginase I produz ornitina e uréia. A ornitina é necessária para a síntese de poliaminas, essenciais para a proliferação do protozoário (ROBERTS *et al.*, 2004b). A atividade elevada de arginase I está associada à susceptibilidade a *L. major* e as citocinas TGF- $\beta$  e IL-10 são potentes indutores dessa enzima (INIESTA *et al.*, 2002b; INIESTA; GOMEZ-NIETO; CORRALIZA, 2001). iNOS, por sua vez, gera citrulina e NO a partir de arginina e é crucial para o controle de parasitos intracelulares. Radicais derivados de NO são potentes agentes leishmanicidas (GREEN *et al.*, 1990c; GREEN *et al.*, 1990b). A atividade de iNOS é fortemente induzida por IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  (GREEN *et al.*, 1990a; GREEN *et al.*, 1990b). A atividade das duas enzimas nos animais tratados com a atorvastatina refletiu o quadro da resposta imunológica e o comportamento do parasito na lesão. A atividade de arginase nos macrófagos peritoneais dos animais tratados foi bastante elevada na quarta e oitava semanas de infecção (GRAF. 13). Nesses dois períodos, também observamos grande número de parasitos (GRAF. 4). Na quarta semana, a atividade de iNOS foi maior nos animais tratados seguida de uma queda intensa na oitava semana (GRAF. 14) quando a discrepância no parasitismo tecidual entre os grupos é mais marcante (maior quantidade de parasitos no grupo tratado) e os níveis de TGF- $\beta$  no sítio de infecção são mais

elevados (GRAF. 10). Na décima semana, o nível de IL-10 no sítio de infecção é menor no grupo tratado e os dois grupos apresentam atividade de arginase semelhante com uma tendência a maior atividade no grupo controle. Esse achado coincide com o título de parasitos que também é semelhante entre os grupos nesse período. A atividade de iNOS, medida indiretamente pela produção de nitrito, se iguala entre os grupos na décima semana (exceto na cultura estimulada com IFN- $\gamma$ ) um reflexo do controle do parasitismo, portanto, diminuição do estímulo de reatividade dos macrófagos.

Esses últimos resultados sugerem a construção de uma espécie de balança no sistema imunológico do camundongo C57BL/6 infectado com *L. major* e submetido à terapia com atorvastatina. De um lado estão os componentes pró-inflamatórios, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  induzindo iNOS, e do outro lado, as citocinas regulatórias TGF- $\beta$  e IL-10 induzindo arginase. Quando o braço regulador pesa mais, a catálise mediada por arginase é favorecida e o controle do parasito diminui. Essa situação é claramente ilustrada pelos dados obtidos na oitava semana de infecção. Por outro lado, quando o braço pró-inflamatório supera o regulador, a atividade de iNOS é suficiente para inibir a proliferação do parasito da mesma maneira que no animal não tratado com a estatina. Essa descrição é representada pelos dados obtidos na décima semana de infecção. É importante enfatizar que apesar do controle parasitário observado nos animais tratados, a lesão ainda permaneceu maior. Não fizemos um acompanhamento mais prolongado do curso de infecção, assim, não se sabe qual seria o comportamento da lesão e do parasito mediante a continuidade do tratamento.

Nossos dados são os primeiros a demonstrar a ação de uma estatina sobre a infecção por *Leishmania* e são também os primeiros a revelar que esse fármaco pode gerar um desequilíbrio na resposta imunológica do hospedeiro de modo a favorecer o parasito. Nossos dados mostram que a atorvastatina atua sobre componentes regulatórios da resposta imunológica tornando maior o percentual de células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> e a produção de IL-10 e TGF- $\beta$  com conseqüente aumento da atividade de arginase I nos animais tratados tornando-os menos resistentes à infecção. Portanto, a maior contribuição deste trabalho foi demonstrar as implicações da imunossupressão induzida pela atorvastatina no camundongo C57BL/6 diante da infecção por *Leishmania major*. Esses achados sugerem que as estatinas podem comprometer de maneira significativa o controle de certas infecções. Nosso trabalho pode ser uma contribuição extremamente relevante no estudo da ação das estatinas sobre o sistema imunológico e do risco potencial do uso indiscriminado e em larga escala desses fármacos em populações que vivem em áreas endêmicas para doenças parasitárias como a leishmaniose.

## 6 CONCLUSÃO

Nossos resultados revelam que a atorvastatina prejudica o controle da infecção experimental por *Leishmania major* no camundongo C57BL/6, modelo de resistência a esse parasito. Os achados mais relevantes demonstraram que:

- o tratamento tornou o hospedeiro mais permissivo ao microorganismo com conseqüente alteração do desenvolvimento da lesão;

- apesar de ter ocorrido uma indução da produção das citocinas IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ , houve um comprometimento da eficácia da resposta imunológica pró-inflamatória protetora (Th1);

- a atorvastatina não inibiu a produção de óxido nítrico, principal mecanismo de extermínio da *Leishmania*, por outro lado, aumentou a atividade de arginase que fornece substratos essenciais para o crescimento e proliferação do microrganismo;

- o tratamento induziu o desenvolvimento de componentes reguladores do sistema imunológico tais como células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> e produção de citocinas antiinflamatórias TGF- $\beta$  e IL-10, cuja ação prevaleceu durante grande parte do curso de infecção.

Tais resultados tornaram evidente a ação imunomoduladora da atorvastatina no modelo experimental de infecção parasitária estudado.

Finalmente, nossos dados sugerem que a disseminação do uso das estatinas como agentes profiláticos na prevenção de doença cardiovascular deve ser avaliada com cautela, especialmente em populações que vivem em áreas endêmicas para determinadas doenças infecciosas e parasitárias como a leishmaniose.

## 7 BIBLIOGRAFIA

ABBAS, Abul K.; LICHTMAN, Andrew H. *Cellular and molecular immunology*: 5 ed. Philadelphia, PA: Saunders, 2005. 564 p.

AFKARIAN, M.; SEDY, J. R.; YANG, J.; JACOBSON, N. G.; CEREB, N.; YANG, S. Y.; MURPHY, T. L.; MURPHY, K. M. T-bet is a STAT1-induced regulator of IL-12R expression in naive CD4<sup>+</sup> T cells. *Nat.Immunol.*, v. 3, n. 6, p. 549-557, 2002.

AKTAS, O.; WAICZIES, S.; SMORODCHENKO, A.; DORR, J.; SEEGER, B.; PROZOROVSKI, T.; SALLACH, S.; ENDRES, M.; BROCKE, S.; NITSCH, R.; ZIPP, F. Treatment of relapsing paralysis in experimental encephalomyelitis by targeting Th1 cells through atorvastatin. *J.Exp.Med.*, v. 197, n. 6, p. 725-733, 2003.

ALIBERTI, J. C.; SOUTO, J. T.; MARINO, A. P.; LANNES-VIEIRA, J.; TEIXEIRA, M. M.; FARBER, J.; GAZZINELLI, R. T.; SILVA, J. S. Modulation of chemokine production and inflammatory responses in interferon-gamma and tumor necrosis factor-R1-deficient mice during *Trypanosoma cruzi* infection. *Am.J.Pathol.*, v. 158, n. 4, p. 1433-1440, 2001.

ALLEN, W. E.; JONES, G. E.; POLLARD, J. W.; RIDLEY, A. J. Rho, Rac and Cdc42 regulate actin organization and cell adhesion in macrophages. *J.Cell Sci.*, v. 110 ( Pt 6), n. 707-720, 1997.

ANDERSON, C. F.; MENDEZ, S.; SACKS, D. L. Nonhealing infection despite Th1 polarization produced by a strain of *Leishmania major* in C57BL/6 mice. *J.Immunol.*, v. 174, n. 5, p. 2934-2941, 2005.

ARNAUD, C.; BRAUNERSREUTHER, V.; MACH, F. Toward immunomodulatory and anti-inflammatory properties of statins. *Trends Cardiovasc.Med.*, v. 15, n. 6, p. 202-206, 2005.

ARNOLDI, J.; MOLL, H. Langerhans cell migration in murine cutaneous leishmaniasis: regulation by tumor necrosis factor alpha, interleukin-1 beta, and macrophage inflammatory protein-1 alpha. *Dev.Immunol.*, v. 6, n. 1-2, p. 3-11, 1998.

ASCER, E.; BERTOLAMI, M. C.; VENTURINELLI, M. L.; BUCCHERI, V.; SOUZA, J.; NICOLAU, J. C.; RAMIRES, J. A.; SERRANO, C. V., Jr. Atorvastatin reduces proinflammatory markers in hypercholesterolemic patients. *Atherosclerosis*, v. 177, n. 1, p. 161-166, 2004.

AWASTHI, A.; MATHUR, R. K.; SAHA, B. Immune response to *Leishmania* infection. *Indian J.Med.Res.*, v. 119, n. 6, p. 238-258, 2004.

AZUMA, R. W.; SUZUKI, J.; OGAWA, M.; FUTAMATSU, H.; KOGA, N.; ONAI, Y.; KOSUGE, H.; ISOBE, M. HMG-CoA reductase inhibitor attenuates experimental autoimmune myocarditis through inhibition of T cell activation. *Cardiovasc.Res.*, v. 64, n. 3, p. 412-420, 2004.

BATH, P. M.; HASSALL, D. G.; GLADWIN, A. M.; PALMER, R. M.; MARTIN, J. F. Nitric oxide and prostacyclin. Divergence of inhibitory effects on monocyte chemotaxis and adhesion to endothelium *in vitro*. *Arterioscler.Thromb.*, v. 11, n. 2, p. 254-260, 1991.

BEG, Z. H.; BREWER, H. B., Jr. Regulation of liver 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase. *Curr.Top.Cell Regul.*, v. 20, n. 139-184, 1981.

BELKAID, Y. The role of CD4(+)CD25(+) regulatory T cells in *Leishmania* infection. *Expert.Opin.Biol.Ther.*, v. 3, n. 6, p. 875-885, 2003.

BELKAID, Y.; HOFFMANN, K. F.; MENDEZ, S.; KAMHAWI, S.; UDEY, M. C.; WYNN, T. A.; SACKS, D. L. The role of interleukin (IL)-10 in the persistence of *Leishmania major* in the skin after healing and the therapeutic potential of anti-IL-10 receptor antibody for sterile cure. *J.Exp.Med.*, v. 194, n. 10, p. 1497-1506, 2001.

BELKAID, Y.; PICCIRILLO, C. A.; MENDEZ, S.; SHEVACH, E. M.; SACKS, D. L. CD4+CD25+ regulatory T cells control *Leishmania major* persistence and immunity. *Nature*, v. 420, n. 6915, p. 502-507, 2002.

BELLOSTA, S.; VIA, D.; CANAVESI, M.; PFISTER, P.; FUMAGALLI, R.; PAOLETTI, R.; BERNINI, F. HMG-CoA reductase inhibitors reduce MMP-9 secretion by macrophages. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.*, v. 18, n. 11, p. 1671-1678, 1998.

BERNINI, F.; POLI, A.; PAOLETTI, R. Safety of HMG-CoA reductase inhibitors: focus on atorvastatin. *Cardiovasc.Drugs Ther.*, v. 15, n. 3, p. 211-218, 2001.

BOUTARD, V.; HAVOUI, R.; FOUQUERAY, B.; PHILIPPE, C.; MOULINOX, J. P.; BAUD, L. Transforming growth factor-beta stimulates arginase activity in macrophages. Implications for the regulation of macrophage cytotoxicity. *J.Immunol.*, v. 155, n. 4, p. 2077-2084, 1995.

BREWER, H. B., Jr. Current concepts of the molecular structure and metabolism of human apolipoproteins and lipoproteins. *Klin.Wochenschr.*, v. 59, n. 18, p. 1023-1035, 1981.

BROWN, G.; ALBERS, J. J.; FISHER, L. D.; SCHAEFER, S. M.; LIN, J. T.; KAPLAN, C.; ZHAO, X. Q.; BISSON, B. D.; FITZPATRICK, V. F.; DODGE, H. T. Regression of coronary artery disease as a result of intensive lipid-lowering therapy in men with high levels of apolipoprotein B. *N.Engl.J.Med.*, v. 323, n. 19, p. 1289-1298, 1990.

BROWN, M. S.; GOLDSTEIN, J. L. A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science*, v. 232, n. 4746, p. 34-47, 1986.

BRUMEANU, T. D.; GOLDSTEIN, R.; CASARES, S. Down-regulation of autoreactive T-cells by HMG CoA reductase inhibitors. *Clin.Immunol.*, v. 119, n. 1, p. 1-12, 2006.

CELLA, M.; SCHEIDEGGER, D.; PALMER-LEHMANN, K.; LANE, P.; LANZAVECCHIA, A.; ALBER, G. Ligation of CD40 on dendritic cells triggers production of high levels of interleukin-12 and enhances T cell stimulatory capacity: T-T help via APC activation. *J.Exp.Med.*, v. 184, n. 2, p. 747-752, 1996.

CHANG, K. P. Leishmanicidal mechanisms of human polymorphonuclear phagocytes. *Am.J.Trop.Med.Hyg.*, v. 30, n. 2, p. 322-333, 1981.

CHENG, X.; LIAO, Y. H.; ZHANG, J.; LI, B.; GE, H.; YUAN, J.; WANG, M.; LU, B.; LIU, Y.; CHENG, Y. Effects of Atorvastatin on Th polarization in patients with acute myocardial infarction. *Eur.J.Heart Fail.*, v. 7, n. 7, p. 1099-1104, 2005.

CHOMARAT, P.; BANCHEREAU, J. Interleukin-4 and interleukin-13: their similarities and discrepancies. *Int.Rev.Immunol.*, v. 17, n. 1-4, p. 1-52, 1998.

CILLA, D. D., Jr.; WHITFIELD, L. R.; GIBSON, D. M.; SEDMAN, A. J.; POSVAR, E. L. Multiple-dose pharmacokinetics, pharmacodynamics, and safety of atorvastatin, an inhibitor of HMG-CoA reductase, in healthy subjects. *Clin.Pharmacol.Ther.*, v. 60, n. 6, p. 687-695, 1996.

CLARK, L. T. Treating dyslipidemia with statins: the risk-benefit profile. *Am.Heart J.*, v. 145, n. 3, p. 387-396, 2003.

COOK-MILLS, J. M.; JOHNSON, J. D.; DEEM, T. L.; OCHI, A.; WANG, L.; ZHENG, Y. Calcium mobilization and Rac1 activation are required for VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule-1) stimulation of NADPH oxidase activity. *Biochem.J.*, v. 378, n. Pt 2, p. 539-547, 2004.

CORNFORTH, J. W. Sterol biosynthesis: the early days. *Biochem.Biophys.Res.Commun.*, v. 292, n. 5, p. 1129-1138, 2002.

CORRALIZA, I. M.; CAMPO, M. L.; SOLER, G.; MODOLELL, M. Determination of arginase activity in macrophages: a micromethod. *J.Immunol.Methods*, v. 174, n. 1-2, p. 231-235, 1994.

CORRALIZA, I. M.; SOLER, G.; EICHMANN, K.; MODOLELL, M. Arginase induction by suppressors of nitric oxide synthesis (IL-4, IL-10 and PGE2) in murine bone-marrow-derived macrophages. *Biochem.Biophys.Res.Commun.*, v. 206, n. 2, p. 667-673, 1995.

COWARD, W.; CHOW, S. C. Effect of atorvastatin on TH1 and TH2 cytokine secreting cells during T cell activation and differentiation. *Atherosclerosis*, v. 186, n. 2, p. 302-309, 2006.

DESJEUX, P. Leishmaniasis. Public health aspects and control. *Clin.Dermatol.*, v. 14, n. 5, p. 417-423, 1996.

DIETSCHY, J. M.; WILSON, J. D. Regulation of cholesterol metabolism. I. *N.Engl.J.Med.*, v. 282, n. 20, p. 1128-1138, 1970a.

DIETSCHY, J. M.; WILSON, J. D. Regulation of cholesterol metabolism. *N.Engl.J.Med.*, v. 282, n. 21, p. 1179-1183, 1970b.

DIETSCHY, J. M.; WILSON, J. D. Regulation of cholesterol metabolism. 3. *N.Engl.J.Med.*, v. 282, n. 22, p. 1241-1249, 1970c.

DIOMEDE, L.; ALBANI, D.; SOTTOCORNO, M.; DONATI, M. B.; BIANCHI, M.; FRUSCELLA, P.; SALMONA, M. *In vivo* anti-inflammatory effect of statins is mediated by nonsterol mevalonate products. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.*, v. 21, n. 8, p. 1327-1332, 2001.

DOSTAL, L. A.; WHITFIELD, L. R.; ANDERSON, J. A. Fertility and general reproduction studies in rats with the HMG-CoA reductase inhibitor, atorvastatin. *Fundam.Appl.Toxicol.*, v. 32, n. 2, p. 285-292, 1996.

DOWLATI, Y. Cutaneous leishmaniasis: clinical aspect. *Clin.Dermatol.*, v. 14, n. 5, p. 425-431, 1996.

DOWNS, J. R.; CLEARFIELD, M.; WEIS, S.; WHITNEY, E.; SHAPIRO, D. R.; BEERE, P. A.; LANGENDORFER, A.; STEIN, E. A.; KRUYER, W.; GOTTO, A. M., Jr. Primary prevention of acute coronary events with lovastatin in men and women with average cholesterol levels: results of AFCAPS/TexCAPS. Air Force/Texas Coronary Atherosclerosis Prevention Study. *JAMA*, v. 279, n. 20, p. 1615-1622, 1998.

DUNN, S. E.; YOUSSEF, S.; GOLDSTEIN, M. J.; PROD'HOMME, T.; WEBER, M. S.; ZAMVIL, S. S.; STEINMAN, L. Isoprenoids determine Th1/Th2 fate in pathogenic T cells, providing a mechanism of modulation of autoimmunity by atorvastatin. *J.Exp.Med.*, v. 203, n. 2, p. 401-412, 2006.

DUPONT, J.; AUBERT, R.; KUAN, S. I.; WARNER, D. A.; CAMUS, M. C.; HERZOG, J. Hepatic hydroxymethylglutaryl coenzyme A reductase activity in inbred strains of mice. *Enzyme*, v. 40, n. 4, p. 198-203, 1988.

EDWARDS, P. A.; MUROYA, H.; GOULD, R. G. *In vivo* demonstration of the circadian rhythm of cholesterol biosynthesis in the liver and intestine of the rat. *J.Lipid Res.*, v. 13, n. 3, p. 396-401, 1972.

ENDO, A. [Regulation of cholesterol metabolism in cultured human cells]. *Seikagaku*, v. 48, n. 6, p. 301-307, 1976.

ENDO, A. The origin of the statins. 2004. *Atheroscler.Suppl*, v. 5, n. 3, p. 125-130, 2004.

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.*, v. 72, n. 2, p. 323-326, 1976.

ENDO, A.; KURODA, M.; TSUJITA, Y. ML-236A, ML-236B, and ML-236C, new inhibitors of cholesterologenesis produced by *Penicillium citrinium*. *J.Antibiot.(Tokyo)*, v. 29, n. 12, p. 1346-1348, 1976.

ENDO, A.; TSUJITA, Y.; KURODA, M.; TANZAWA, K. Effects of ML-236B on cholesterol metabolism in mice and rats: lack of hypocholesterolemic activity in normal animals. *Biochim.Biophys.Acta*, v. 575, n. 2, p. 266-276, 1979.

ENDRES, M.; LAUFS, U.; HUANG, Z.; NAKAMURA, T.; HUANG, P.; MOSKOWITZ, M. A.; LIAO, J. K. Stroke protection by 3-hydroxy-3-methylglutaryl (HMG)-CoA reductase inhibitors mediated by endothelial nitric oxide synthase. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, v. 95, n. 15, p. 8880-8885, 1998.

FINDLAY, S. The statin drugs. Prescription and Price Trends: October 2005 to December 2006. *Consumer Reports*, fev. 2007. Disponível em:  
<<http://www.CRBESTBUYDRUGS.ORG/PDFs/STATINANALYSIS.PDF>> Acesso em: 5 de novembro de 2007.

FRUSCELLA, P.; ROMANO, M.; ALBANI, D.; BERNASCONI, S.; LUINI, W.; BRUNO, A.; SALMONA, M.; DIOMEDE, L. Inhibition of HMG-CoA reductase activity by hypercholesterolaemia reduces leukocyte recruitment and MCP-1 production. *Cytokine*, v. 12, n. 7, p. 1100-1103, 2000.

GANNE, F.; VASSE, M.; BEAUDEUX, J. L.; PEYNET, J.; FRANCOIS, A.; MISHAL, Z.; CHARTIER, A.; TOBELEM, G.; VANNIER, J. P.; SORIA, J.; SORIA, C. Cerivastatin, an inhibitor of HMG-CoA reductase, inhibits urokinase/urokinase-receptor expression and MMP-9 secretion by peripheral blood monocytes--a possible protective mechanism against atherothrombosis. *Thromb.Haemost.*, v. 84, n. 4, p. 680-688, 2000.

GAZZINELLI, R. T. Molecular and cellular basis of interleukin 12 activity in prophylaxis and therapy against infectious diseases. *Mol.Med.Today*, v. 2, n. 6, p. 258-267, 1996.

GHALIB, H. W.; PIUVEZAM, M. R.; SKEIKY, Y. A.; SIDDIG, M.; HASHIM, F. A.; EL-HASSAN, A. M.; RUSSO, D. M.; REED, S. G. Interleukin 10 production correlates with pathology in human *Leishmania donovani* infections. *J.Clin.Invest*, v. 92, n. 1, p. 324-329, 1993.

GHOSH, M.; PAL, C.; RAY, M.; MAITRA, S.; MANDAL, L.; BANDYOPADHYAY, S. Dendritic cell-based immunotherapy combined with antimony-based chemotherapy cures established murine visceral leishmaniasis. *J.Immunol.*, v. 170, n. 11, p. 5625-5629, 2003

GLIMCHER, L. H.; MURPHY, K. M. Lineage commitment in the immune system: the T helper lymphocyte grows up. *Genes Dev.*, v. 14, n. 14, p. 1693-1711, 2000.

GOLDSTEIN, J. L.; BROWN, M. S. Regulation of the mevalonate pathway. *Nature*, v. 343, n. 6257, p. 425-430, 1990.

GORELIK, L.; CONSTANT, S.; FLAVELL, R. A. Mechanism of transforming growth factor beta-induced inhibition of T helper type 1 differentiation. *J.Exp.Med.*, v. 195, n. 11, p. 1499-1505, 2002.

GREEN, L. C.; WAGNER, D. A.; GLOGOWSKI, J.; SKIPPER, P. L.; WISHNOK, J. S.; TANNENBAUM, S. R. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids 4. *Anal.Biochem.*, v. 126, n. 1, p. 131-138, 1982.

GREEN, S. J.; CRAWFORD, R. M.; HOCKMEYER, J. T.; MELTZER, M. S.; NACY, C. A. *Leishmania major* amastigotes initiate the L-arginine-dependent killing mechanism in IFN-gamma-stimulated macrophages by induction of tumor necrosis factor-alpha. *J.Immunol.*, v. 145, n. 12, p. 4290-4297, 1990a.

GREEN, S. J.; MELLOUK, S.; HOFFMAN, S. L.; MELTZER, M. S.; NACY, C. A. Cellular mechanisms of nonspecific immunity to intracellular infection: cytokine-induced synthesis of toxic nitrogen oxides from L-arginine by macrophages and hepatocytes. *Immunol.Lett.*, v. 25, n. 1-3, p. 15-19, 1990b.

GREEN, S. J.; MELTZER, M. S.; HIBBS, J. B., Jr.; NACY, C. A. Activated macrophages destroy intracellular *Leishmania major* amastigotes by an L-arginine-dependent killing mechanism. *J.Immunol.*, v. 144, n. 1, p. 278-283, 1990c.

GREENWOOD, J.; STEINMAN, L.; ZAMVIL, S. S. Statin therapy and autoimmune disease: from protein prenylation to immunomodulation. *Nat.Rev.Immunol.*, v. 6, n. 5, p. 358-370, 2006.

GRIP, O.; JANCIAUSKIENE, S.; LINDGREN, S. Pravastatin down-regulates inflammatory mediators in human monocytes *in vitro*. *Eur.J.Pharmacol.*, v. 410, n. 1, p. 83-92, 2000.

GRUNDY, S. M. HMG-CoA reductase inhibitors for treatment of hypercholesterolemia. *N.Engl.J.Med.*, v. 319, n. 1, p. 24-33, 1988.

GU, L.; TSENG, S.; HORNER, R. M.; TAM, C.; LODA, M.; ROLLINS, B. J. Control of TH2 polarization by the chemokine monocyte chemoattractant protein-1. *Nature*, v. 404, n. 6776, p. 407-411, 2000.

GUERMONPREZ, P.; VALLADEAU, J.; ZITVOGEL, L.; THERY, C.; AMIGORENA, S. Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells. *Annu.Rev.Immunol.*, v. 20, n. 621-667, 2002.

GUMY, A.; LOUIS, J. A.; LAUNOIS, P. The murine model of infection with *Leishmania major* and its importance for the deciphering of mechanisms underlying differences in Th cell differentiation in mice from different genetic backgrounds. *Int.J.Parasitol.*, v. 34, n. 4, p. 433-444, 2004.

HAKAMADA-TAGUCHI, R.; UEHARA, Y.; KURIBAYASHI, K.; NUMABE, A.; SAITO, K.; NEGORO, H.; FUJITA, T.; TOYO-OKA, T.; KATO, T. Inhibition of hydroxymethylglutaryl-coenzyme a reductase reduces Th1 development and promotes Th2 development. *Circ.Res.*, v. 93, n. 10, p. 948-956, 2003.

HAN, K. H.; RYU, J.; HONG, K. H.; KO, J.; PAK, Y. K.; KIM, J. B.; PARK, S. W.; KIM, J. J. HMG-CoA reductase inhibition reduces monocyte CC chemokine receptor 2 expression and monocyte chemoattractant protein-1-mediated monocyte recruitment *in vivo*. *Circulation*, v. 111, n. 11, p. 1439-1447, 2005.

HANCOCK, J. F.; MAGEE, A. I.; CHILDS, J. E.; MARSHALL, C. J. All ras proteins are polyisoprenylated but only some are palmitoylated. *Cell*, v. 57, n. 7, p. 1167-1177, 1989.

HEINZEL, F. P.; RERKO, R. M.; HATAM, F.; LOCKSLEY, R. M. IL-2 is necessary for the progression of leishmaniasis in susceptible murine hosts. *J.Immunol.*, v. 150, n. 9, p. 3924-3931, 1993a.

HEINZEL, F. P.; SADICK, M. D.; HOLADAY, B. J.; COFFMAN, R. L.; LOCKSLEY, R. M. Reciprocal expression of interferon gamma or interleukin 4 during the resolution or progression of murine leishmaniasis. Evidence for expansion of distinct helper T cell subsets. *J.Exp.Med.*, v. 169, n. 1, p. 59-72, 1989.

HEINZEL, F. P.; SCHOENHAUT, D. S.; RERKO, R. M.; ROSSER, L. E.; GATELY, M. K. Recombinant interleukin 12 cures mice infected with *Leishmania major*. *J.Exp.Med.*, v. 177, n. 5, p. 1505-1509, 1993b.

HILLYARD, D. Z.; CAMERON, A. J.; MCDONALD, K. J.; THOMSON, J.; MACINTYRE, A.; SHIELS, P. G.; PANARELLI, M.; JARDINE, A. G. Simvastatin inhibits lymphocyte function in normal subjects and patients with cardiovascular disease. *Atherosclerosis*, v. 175, n. 2, p. 305-313, 2004a.

HILLYARD, D. Z.; JARDINE, A. G.; MCDONALD, K. J.; CAMERON, A. J. Fluvastatin inhibits raft dependent Fcgamma receptor signalling in human monocytes. *Atherosclerosis*, v. 172, n. 2, p. 219-228, 2004b.

HUANG, K. C.; CHEN, C. W.; CHEN, J. C.; LIN, W. W. HMG-CoA reductase inhibitors inhibit inducible nitric oxide synthase gene expression in macrophages. *J.Biomed.Sci.*, v. 10, n. 4, p. 396-405, 2003.

HWANG, Y. S.; TSAI, W. C.; LU, Y. H.; LIN, C. C.; CHEN, Y. F. Effect of atorvastatin on the expression of CD40 ligand and P-selectin on platelets in patients with hypercholesterolemia. *Am.J.Cardiol.*, v. 94, n. 3, p. 364-366, 2004.

HYNES, R. O. Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell*, v. 69, n. 1, p. 11-25, 1992.

IKEDA, U.; SHIMPO, M.; OHKI, R.; INABA, H.; TAKAHASHI, M.; YAMAMOTO, K.; SHIMADA, K. Fluvastatin inhibits matrix metalloproteinase-1 expression in human vascular endothelial cells. *Hypertension*, v. 36, n. 3, p. 325-329, 2000.

INIESTA, V.; CARCELEN, J.; MOLANO, I.; PEIXOTO, P. M.; REDONDO, E.; PARRA, P.; MANGAS, M.; MONROY, I.; CAMPO, M. L.; NIETO, C. G.; CORRALIZA, I. Arginase I induction during *Leishmania major* infection mediates the development of disease. *Infect.Immun.*, v. 73, n. 9, p. 6085-6090, 2005.

INIESTA, V.; GOMEZ-NIETO, L. C.; CORRALIZA, I. The inhibition of arginase by N(omega)-hydroxy-L-arginine controls the growth of *Leishmania* inside macrophages. *J.Exp.Med.*, v. 193, n. 6, p. 777-784, 2001.

INIESTA, V.; GOMEZ-NIETO, L. C.; MOLANO, I.; MOHEDANO, A.; CARCELEN, J.; MIRON, C.; ALONSO, C.; CORRALIZA, I. Arginase I induction in macrophages, triggered by Th2-type cytokines, supports the growth of intracellular *Leishmania* parasites. *Parasite Immunol.*, v. 24, n. 3, p. 113-118, 2002.

JOHNSTONE, A.; THORPE, R. *Immunochemistry in Practice*: 1 ed. Blackwell Scientific Publications, Oxford, Reino Unido, 1982. 298 p.

JONES, P. J.; SCHOELLER, D. A. Evidence for diurnal periodicity in human cholesterol synthesis. *J.Lipid Res.*, v. 31, n. 4, p. 667-673, 1990.

JORIS, I.; STETZ, E.; MAJNO, G. Lymphocytes and monocytes in the aortic intima--An electron-microscopic study in the rat. *Atherosclerosis*, v. 34, n. 3, p. 221-231, 1979.

KALLEN, J.; WELZENBACH, K.; RAMAGE, P.; GEYL, D.; KRIWACKI, R.; LEGGE, G.; COTTENS, S.; WEITZ-SCHMIDT, G.; HOMMEL, U. Structural basis for LFA-1 inhibition upon lovastatin binding to the CD11a I-domain. *J.Mol.Biol.*, v. 292, n. 1, p. 1-9, 1999.

KANE, M. M.; MOSSER, D. M. The role of IL-10 in promoting disease progression in leishmaniasis. *J.Immunol.*, v. 166, n. 2, p. 1141-1147, 2001.

KANEKO, I.; HAZAMA-SHIMADA, Y.; ENDO, A. Inhibitory effects on lipid metabolism in cultured cells of ML-236B, a potent inhibitor of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme-A reductase. *Eur.J.Biochem.*, v. 87, n. 2, p. 313-321, 1978.

KANNEL, W. B. The Framingham Study: ITS 50-year legacy and future promise. *J.Atheroscler.Thromb.*, v. 6, n. 2, p. 60-66, 2000.

KELLY, M.; HWANG, J. M.; KUBES, P. Modulating leukocyte recruitment in inflammation. *J.Allergy Clin.Immunol.*, v. 120, n. 1, p. 3-10, 2007.

KILLICK-KENDRICK, R. Phlebotomine vectors of the leishmaniases: a review. *Med.Vet.Entomol.*, v. 4, n. 1, p. 1-24, 1990b. KILLICK-KENDRICK, R. The life-cycle of *Leishmania* in the sandfly with special reference to the form infective to the vertebrate host. *Ann.Parasitol.Hum.Comp.*, v. 65 Suppl 1, n. 37-42, 1990a.

KOWALSKI, J.; OKOPIEN, B.; MADEJ, A.; ZIELINSKI, M.; BELOWSKI, D.; KALINA, Z.; HERMAN, Z. S. Effects of atorvastatin, simvastatin, and fenofibrate therapy on monocyte chemoattractant protein-1 secretion in patients with hyperlipidemia. *Eur.J.Clin.Pharmacol.*, v. 59, n. 3, p. 189-193, 2003.

KROPF, P.; FREUDENBERG, M. A.; MODOLELL, M.; PRICE, H. P.; HERATH, S.; ANTONIAZI, S.; GALANOS, C.; SMITH, D. F.; MULLER, I. Toll-like receptor 4 contributes to efficient control of infection with the protozoan parasite *Leishmania major*. *Infect.Immun.*, v. 72, n. 4, p. 1920-1928, 2004.

KROPF, P.; FUENTES, J. M.; FAHNRICH, E.; ARPA, L.; HERATH, S.; WEBER, V.; SOLER, G.; CELADA, A.; MODOLELL, M.; MULLER, I. Arginase and polyamine synthesis are key factors in the regulation of experimental leishmaniasis *in vivo*. *FASEB J.*, v. 19, n. 8, p. 1000-1002, 2005.

KUNKEL, E. J.; BOISVERT, J.; MURPHY, K.; VIERRA, M. A.; GENOVESE, M. C.; WARDLAW, A. J.; GREENBERG, H. B.; HODGE, M. R.; WU, L.; BUTCHER, E. C.; CAMPBELL, J. J. Expression of the chemokine receptors CCR4, CCR5, and CXCR3 by human tissue-infiltrating lymphocytes. *Am.J.Pathol.*, v. 160, n. 1, p. 347-355, 2002.

KURODA, M.; TSUJITA, Y.; TANZAWA, K.; ENDO, A. Hypolipidemic effects in monkeys of ML-236B, a competitive inhibitor of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase. *Lipids*, v. 14, n. 6, p. 585-589, 1979.

KWAK, B.; MULHAUPT, F.; MYIT, S.; MACH, F. Statins as a newly recognized type of immunomodulator. *Nat.Med.*, v. 6, n. 12, p. 1399-1402, 2000.

KWAK, B.; MULHAUPT, F.; VEILLARD, N.; PELLI, G.; MACH, F. The HMG-CoA reductase inhibitor simvastatin inhibits IFN-gamma induced MHC class II expression in human vascular endothelial cells. *Swiss.Med.Wkly.*, v. 131, n. 3-4, p. 41-46, 2001.

LATTIME, E. C.; STOPPACCIARO, A.; STUTMAN, O. Limiting dilution analysis of TNF producing cells in C3H/HeJ mice. *J.Immunol.*, v. 141, n. 10, p. 3422-3428, 1988.

LAUFS, U.; LA, Fata, V.; PLUTZKY, J.; LIAO, J. K. Upregulation of endothelial nitric oxide synthase by HMG CoA reductase inhibitors. *Circulation*, v. 97, n. 12, p. 1129-1135, 1998.

LAUFS, U.; LIAO, J. K. Post-transcriptional regulation of endothelial nitric oxide synthase mRNA stability by Rho GTPase. *J.Biol.Chem.*, v. 273, n. 37, p. 24266-24271, 1998.

LAW, M. R.; WALD, N. J.; RUDNICKA, A. R. Quantifying effect of statins on low density lipoprotein cholesterol, ischaemic heart disease, and stroke: systematic review and meta-analysis. *BMJ*, v. 326, n. 7404, p. 1423, 2003.

LEHNINGER, Albert L.; NELSON, David L.; COX, Michael M. *Lehninger principles of biochemistry*: 4 ed. New York: W.H. Freeman, 2005.

LI, J.; HUNTER, C. A.; FARRELL, J. P. Anti-TGF-beta treatment promotes rapid healing of *Leishmania major* infection in mice by enhancing *in vivo* nitric oxide production. *J.Immunol.*, v. 162, n. 2, p. 974-979, 1999.

LIEW, F. Y.; MILLOTT, S.; LI, Y.; LELCHUK, R.; CHAN, W. L.; ZILTENER, H. Macrophage activation by interferon-gamma from host-protective T cells is inhibited by IL-3 and IL-4 produced by disease-promoting T cells in leishmaniasis. *Eur.J.Immunol.*, v. 19, n. 7, p. 1227-1232, 1989.

LOCKSLEY, R. M.; HEINZEL, F. P.; SADICK, M. D.; HOLADAY, B. J.; GARDNER, K. D., Jr. Murine cutaneous leishmaniasis: susceptibility correlates with differential expansion of helper T-cell subsets. *Ann.Inst.Pasteur Immunol.*, v. 138, n. 5, p. 744-749, 1987.

LOCKSLEY, R. M.; KILLEEN, N.; LENARDO, M. J. The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell*, v. 104, n. 4, p. 487-501, 2001.

LOCKSLEY, R. M.; REINER, S. L.; HATAM, F.; LITTMAN, D. R.; KILLEEN, N. Helper T cells without CD4: control of leishmaniasis in CD4-deficient mice. *Science*, v. 261, n. 5127, p. 1448-1451, 1993.

LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J.Biol.Chem.* v. 193, n. 1, p. 265-275, 1951.

MAKINO, Y.; COOK, D. N.; SMITHIES, O.; HWANG, O. Y.; NEILSON, E. G.; TURKA, L. A.; SATO, H.; WELLS, A. D.; DANOFF, T. M. Impaired T cell function in RANTES-deficient mice. *Clin.Immunol.*, v. 102, n. 3, p. 302-309, 2002.

MARON, D. J.; FAZIO, S.; LINTON, M. F. Current perspectives on statins. *Circulation*, v. 101, n. 2, p. 207-213, 2000.

MARTINEZ-GONZALEZ, J.; ALFON, J.; BERROZPE, M.; BADIMON, L. HMG-CoA reductase inhibitors reduce vascular monocyte chemoattractant protein-1 expression in early lesions from hypercholesterolemic swine independently of their effect on plasma cholesterol levels. *Atherosclerosis*, v. 159, n. 1, p. 27-33, 2001.

MAUSNER-FAINBERG, K.; LUBOSHITS, G.; MOR, A.; MAYSEL-AUSLENDER, S.; RUBINSTEIN, A.; KEREN, G.; GEORGE, J. The effect of HMG-CoA reductase inhibitors on naturally occurring CD4(+)CD25(+) T cells. *Atherosclerosis*, v. 2007.

MCCAREY, D. W.; MCINNES, I. B.; MADHOK, R.; HAMPSON, R.; SCHERBAKOV, O.; FORD, I.; CAPELL, H. A.; SATTAR, N. Trial of Atorvastatin in Rheumatoid Arthritis (TARA): double-blind, randomised placebo-controlled trial. *Lancet*, v. 363, n. 9426, p. 2015-2021, 2004.

MCCORMICK, F. GTP binding and growth control. *Curr.Opin.Cell Biol.*, v. 2, n. 2, p. 181-184, 1990.

MCDOWELL, M. A.; MAROVICH, M.; LIRA, R.; BRAUN, M.; SACKS, D. *Leishmania* priming of human dendritic cells for CD40 ligand-induced interleukin-12p70 secretion is strain and species dependent. *Infect.Immun.*, v. 70, n. 8, p. 3994-4001, 2002.

MCKAY, A.; LEUNG, B. P.; MCINNES, I. B.; THOMSON, N. C.; LIEW, F. Y. A novel anti-inflammatory role of simvastatin in a murine model of allergic asthma. *J.Immunol.*, v. 172, n. 5, p. 2903-2908, 2004.

MCMAHON-PRATT, D.; ALEXANDER, J. Does the *Leishmania major* paradigm of pathogenesis and protection hold for New World cutaneous leishmaniases or the visceral disease? *Immunol.Rev.*, v. 201, n. 206-224, 2004.

MELBY, P. C.; NDRADE-NARVAEZ, F. J.; DARNELL, B. J.; VALENCIA-PACHECO, G.; TRYON, V. V.; PALOMO-CETINA, A. Increased expression of proinflammatory cytokines in chronic lesions of human cutaneous leishmaniasis. *Infect.Immun.*, v. 62, n. 3, p. 837-842, 1994.

MENDEZ S.; RECKLING, S.K.; PICCIRILLO, C.A.; SACKS, D.; BELKAID, Y. Role for CD4(+) CD25(+) regulatory T cells in reactivation of persistent leishmaniasis and control of concomitant immunity. *J Exp Med.*, v. 200, n. 2, p. 201-10, 2004.

METHE, H.; KIM, J. O.; KOFLER, S.; NABAUER, M.; WEIS, M. Statins decrease Toll-like receptor 4 expression and downstream signaling in human CD14+ monocytes. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.*, v. 25, n. 7, p. 1439-1445, 2005.

MOORE, K. W.; DE WAAL, Malefyt R.; COFFMAN, R. L.; O'GARRA, A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu.Rev.Immunol.*, v. 19, n. 683-765, 2001.

MORRIS, L.; TROUTT, A. B.; MCLEOD, K. S.; KELSO, A.; HANDMAN, E.; AEBISCHER, T. Interleukin-4 but not gamma interferon production correlates with the severity of murine cutaneous leishmaniasis. *Infect.Immun.*, v. 61, n. 8, p. 3459-3465, 1993.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J.Immunol.Methods*, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983.

NAOUMOVA, R. P.; PATEL, D. D.; O'NEILL, F. H.; THOMPSON, G. R.; KNIGHT, B. L. Treatment with atorvastatin alters the ratio of interleukin-12/interleukin-10 gene expression [corrected]. *Eur.J.Clin.Invest*, v. 33, n. 1, p. 88-91, 2003.

NATH, N.; GIRI, S.; PRASAD, R.; SINGH, A. K.; SINGH, I. Potential targets of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitor for multiple sclerosis therapy. *J.Immunol.*, v. 172, n. 2, p. 1273-1286, 2004.

NEUHAUS, O.; STRASSER-FUCHS, S.; FAZEKAS, F.; KIESEIER, B. C.; NIEDERWIESER, G.; HARTUNG, H. P.; ARCHELOS, J. J. Statins as immunomodulators: comparison with interferon-beta 1b in MS. *Neurology*, v. 59, n. 7, p. 990-997, 2002.

NEUMANN, B.; MACHLEIDT, T.; LIFKA, A.; PFEFFER, K.; VESTWEBER, D.; MAK, T. W.; HOLZMANN, B.; KRONKE, M. Crucial role of 55-kilodalton TNF receptor in TNF-induced adhesion molecule expression and leukocyte organ infiltration. *J.Immunol.*, v. 156, n. 4, p. 1587-1593, 1996.

NIESSNER, A.; STEINER, S.; SPEIDL, W. S.; PLEINER, J.; SEIDINGER, D.; MAURER, G.; GORONZY, J. J.; WEYAND, C. M.; KOPP, C. W.; HUBER, K.; WOLZT, M.; WOJTA, J. Simvastatin suppresses endotoxin-induced upregulation of toll-like receptors 4 and 2 *in vivo*. *Atherosclerosis*, v. 189, n. 2, p. 408-413, 2006.

NIWA, S.; TOTSUKA, T.; HAYASHI, S. Inhibitory effect of fluvastatin, an HMG-CoA reductase inhibitor, on the expression of adhesion molecules on human monocyte cell line. *Int.J.Immunopharmacol.*, v. 18, n. 11, p. 669-675, 1996.

NOBEN-TRAUTH, N.; LIRA, R.; NAGASE, H.; PAUL, W. E.; SACKS, D. L. The relative contribution of IL-4 receptor signaling and IL-10 to susceptibility to *Leishmania major*. *J.Immunol.*, v. 170, n. 10, p. 5152-5158, 2003.

NOVELA, C.; HENNEKENS, C. H. Hypothesis: atorvastatin has pleiotropic effects that translate into early clinical benefits on cardiovascular disease. *J.Cardiovasc.Pharmacol.Ther.*, v. 9, n. 1, p. 61-63, 2004.

NUBEL, T.; DIPPOLD, W.; KLEINERT, H.; KAINA, B.; FRITZ, G. Lovastatin inhibits Rho-regulated expression of E-selectin by TNFalpha and attenuates tumor cell adhesion. *FASEB J.*, v. 18, n. 1, p. 140-142, 2004.

O'GARRA, A.; VIEIRA, P. T(H)1 cells control themselves by producing interleukin-10. *Nat.Rev.Immunol.*, v. 7, n. 6, p. 425-428, 2007.

OLIVEIRA, M. R.; TAFURI, W. L.; AFONSO, L. C.; OLIVEIRA, M. A.; NICOLI, J. R.; VIEIRA, E. C.; SCOTT, P.; MELO, M. N.; VIEIRA, L. Q. Germ-free mice produce high levels of interferon-gamma in response to infection with *Leishmania major* but fail to heal lesions. *Parasitology*, v. 131, n. Pt 4, p. 477-488, 2005.

OLIVEIRA, S. H.; FONSECA, S. G.; ROMAO, P. R.; FERREIRA, S. H.; CUNHA, F. Q. Nitric oxide mediates the microbicidal activity of eosinophils. *Mem.Inst.Oswaldo Cruz*, v. 92 Suppl 2, n. 233-235, 1997.

OLIVEIRA, S. H.; FONSECA, S. G.; ROMAO, P. R.; FIGUEIREDO, F.; FERREIRA, S. H.; CUNHA, F. Q. Microbicidal activity of eosinophils is associated with activation of the arginine-NO pathway. *Parasite Immunol.*, v. 20, n. 9, p. 405-412, 1998.

ORTEGO, M.; BUSTOS, C.; HERNANDEZ-PRESA, M. A.; TUNON, J.; DIAZ, C.; HERNANDEZ, G.; EGIDO, J. Atorvastatin reduces NF-kappaB activation and chemokine expression in vascular smooth muscle cells and mononuclear cells. *Atherosclerosis*, v. 147, n. 2, p. 253-261, 1999.

PEARSON, R. D.; STEIGBIGEL, R. T. Phagocytosis and killing of the protozoan *Leishmania donovani* by human polymorphonuclear leukocytes. *J.Immunol.*, v. 127, n. 4, p. 1438-1443, 1981.

PEARSON, R. D.; UYDESS, I. L.; CHAPMAN, S. W.; STEIGBIGEL, R. T. Interaction of human eosinophils with *Leishmania donovani*. *Ann.Trop.Med.Parasitol.*, v. 81, n. 6, p. 735-739, 1987.

PIERCE, S. K. Lipid rafts and B-cell activation. *Nat.Rev.Immunol.*, v. 2, n. 2, p. 96-105, 2002.

PIRMEZ, C. Immunopathology of American cutaneous leishmaniasis. *Mem.Inst.Oswaldo Cruz*, v. 87 Suppl 5, n. 105-109, 1992.

PIZZO, P.; VIOLA, A. Lymphocyte lipid rafts: structure and function. *Curr.Opin.Immunol.*, v. 15, n. 3, p. 255-260, 2003.

PLAKOGIANNIS, R.; COHEN, H. Optimal low-density lipoprotein cholesterol lowering--morning versus evening statin administration. *Ann.Pharmacother.*, v. 41, n. 1, p. 106-110, 2007.

PRASAD, R.; GIRI, S.; NATH, N.; SINGH, I.; SINGH, A. K. Inhibition of phosphoinositide 3 kinase-Akt (protein kinase B)-nuclear factor-kappa B pathway by lovastatin limits endothelial-monocyte cell interaction. *J.Neurochem.*, v. 94, n. 1, p. 204-214, 2005.

QI, H.; DENNING, T. L.; SOONG, L. Differential induction of interleukin-10 and interleukin-12 in dendritic cells by microbial toll-like receptor activators and skewing of T-cell cytokine profiles. *Infect.Immun.*, v. 71, n. 6, p. 3337-3342, 2003.

QUINONES, M. P.; ESTRADA, C. A.; JIMENEZ, F.; MARTINEZ, H.; WILLMON, O.; KUZIEL, W. A.; AHUJA, S. K.; AHUJA, S. S. CCL2-independent role of CCR2 in immune responses against *Leishmania major*. *Parasite Immunol.*, v. 29, n. 4, p. 211-217, 2007.

RACOOSIN, E. L.; BEVERLEY, S. M. *Leishmania major*: promastigotes induce expression of a subset of chemokine genes in murine macrophages. *Exp.Parasitol.*, v. 85, n. 3, p. 283-295, 1997.

REINER, S. L.; LOCKSLEY, R. M. Cytokines in the differentiation of Th1/Th2 CD4+ subsets in leishmaniasis. *J.Cell Biochem.*, v. 53, n. 4, p. 323-328, 1993.

REZAIIE-MAJD, A.; MACA, T.; BUCEK, R. A.; VALENT, P.; MULLER, M. R.; HUSSLEIN, P.; KASHANIPOUR, A.; MINAR, E.; BAGHESTANIAN, M. Simvastatin reduces expression of cytokines interleukin-6, interleukin-8, and monocyte chemoattractant protein-1 in circulating monocytes from hypercholesterolemic patients. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.*, v. 22, n. 7, p. 1194-1199, 2002.

RIBEIRO-DE-JESUS, A.; ALMEIDA, R. P.; LESSA, H.; BACELLAR, O.; CARVALHO, E. M. Cytokine profile and pathology in human leishmaniasis. *Braz.J.Med.Biol.Res.*, v. 31, n. 1, p. 143-148, 1998.

RIDKER, P. M.; RIFAI, N.; CLEARFIELD, M.; DOWNS, J. R.; WEIS, S. E.; MILES, J. S.; GOTTO, A. M., Jr. Measurement of C-reactive protein for the targeting of statin therapy in the primary prevention of acute coronary events. *N.Engl.J.Med.*, v. 344, n. 26, p. 1959-1965, 2001.

RITTER, U.; MOLL, H. Monocyte chemotactic protein-1 stimulates the killing of *Leishmania major* by human monocytes, acts synergistically with IFN-gamma and is antagonized by IL-4. *Eur.J.Immunol.*, v. 30, n. 11, p. 3111-3120, 2000.

RITTER, U.; MOLL, H.; LASKAY, T.; BROCKER, E.; VELAZCO, O.; BECKER, I.; GILLITZER, R. Differential expression of chemokines in patients with localized and diffuse cutaneous American leishmaniasis. *J.Infect.Dis.*, v. 173, n. 3, p. 699-709, 1996.

ROBERTS, S. C.; TANCER, M. J.; POLINSKY, M. R.; GIBSON, K. M.; HEBY, O.; ULLMAN, B. Arginase plays a pivotal role in polyamine precursor metabolism in *Leishmania*. Characterization of gene deletion mutants. *J.Biol.Chem.*, v. 279, n. 22, p. 23668-23678, 2004b.

ROBERTS, S. C.; TANCER, M. J.; POLINSKY, M. R.; GIBSON, K. M.; HEBY, O.; ULLMAN, B. Arginase plays a pivotal role in polyamine precursor metabolism in *Leishmania*. Characterization of gene deletion mutants. *J.Biol.Chem.*, v. 279, n. 22, p. 23668-23678, 2004a.

ROSENSON, R. S.; TANGNEY, C. C.; CASEY, L. C. Inhibition of proinflammatory cytokine production by pravastatin. *Lancet*, v. 353, n. 9157, p. 983-984, 1999.

ROSS, R.; GLOMSET, J. A. The pathogenesis of atherosclerosis (first of two parts). *N.Engl.J.Med.*, v. 295, n. 7, p. 369-377, 1976a.

ROSS, R.; GLOMSET, J. A. The pathogenesis of atherosclerosis (second of two parts). *N.Engl.J.Med.*, v. 295, n. 8, p. 420-425, 1976b.

ROSS, R.; HARKER, L. Hyperlipidemia and atherosclerosis. *Science*, v. 193, n. 4258, p. 1094-1100, 1976.

SACKS, D.; ANDERSON, C. Re-examination of the immunosuppressive mechanisms mediating non-cure of *Leishmania* infection in mice. *Immunol.Rev.*, v. 201, n. 225-238, 2004.

SANTIAGO, H. C.; OLIVEIRA, C. F.; SANTIAGO, L.; FERRAZ, F. O.; DE SOUZA, D. G.; DE-FREITAS, L. A.; AFONSO, L. C.; TEIXEIRA, M. M.; GAZZINELLI, R. T.; VIEIRA, L. Q. Involvement of the chemokine RANTES (CCL5) in resistance to experimental infection with *Leishmania major*. *Infect.Immun.*, v. 72, n. 8, p. 4918-4923, 2004.

SANTOS, R. D. [III Brazilian Guidelines on Dyslipidemias and Guideline of Atherosclerosis Prevention from Atherosclerosis Department of Sociedade Brasileira de Cardiologia]. *Arg Bras.Cardiol.*, v. 77 Suppl 3, n. 1-48, 2001.

SATO, N.; AHUJA, S. K.; QUINONES, M.; KOSTECKI, V.; REDDICK, R. L.; MELBY, P. C.; KUZIEL, W. A.; AHUJA, S. S. CC chemokine receptor (CCR)2 is required for langerhans cell migration and localization of T helper cell type 1 (Th1)-inducing dendritic cells. Absence of CCR2 shifts the *Leishmania major*-resistant phenotype to a susceptible state dominated by Th2 cytokines, b cell outgrowth, and sustained neutrophilic inflammation. *J.Exp.Med.*, v. 192, n. 2, p. 205-218, 2000.

SCHAEFER, E. J.; MCNAMARA, J. R.; TAYLER, T.; DALY, J. A.; GLEASON, J. L.; SEMAN, L. J.; FERRARI, A.; RUBENSTEIN, J. J. Comparisons of effects of statins (atorvastatin, fluvastatin, lovastatin, pravastatin, and simvastatin) on fasting and postprandial lipoproteins in patients with coronary heart disease versus control subjects. *Am.J.Cardiol.*, v. 93, n. 1, p. 31-39, 2004.

SCHARTON, T. M.; SCOTT, P. Natural killer cells are a source of interferon gamma that drives differentiation of CD4+ T cell subsets and induces early resistance to *Leishmania major* in mice. *J.Exp.Med.*, v. 178, n. 2, p. 567-577, 1993.

SCHARTON-KERSTEN, T.; AFONSO, L. C.; WYSOCKA, M.; TRINCHIERI, G.; SCOTT, P. IL-12 is required for natural killer cell activation and subsequent T helper 1 cell development in experimental leishmaniasis. *J.Immunol.*, v. 154, n. 10, p. 5320-5330, 1995.

SCHROEPFER, G. J., Jr. Sterol biosynthesis. *Annu.Rev.Biochem.*, v. 51, n. 555-585, 1982.

SCOTT, P.; HUNTER, C. A. Dendritic cells and immunity to leishmaniasis and toxoplasmosis. *Curr.Opin.Immunol.*, v. 14, n. 4, p. 466-470, 2002.

SCOTT, P.; NATOVITZ, P.; COFFMAN, R. L.; PEARCE, E.; SHER, A. Immunoregulation of cutaneous leishmaniasis. T cell lines that transfer protective immunity or exacerbation belong to different T helper subsets and respond to distinct parasite antigens. *J.Exp.Med.*, v. 168, n. 5, p. 1675-1684, 1988.

SHEVACH, E. M. CD4+ CD25+ suppressor T cells: more questions than answers. *Nat.Rev.Immunol.*, v. 2, n. 6, p. 389-400, 2002.

SIMES, J.; FURBERG, C. D.; BRAUNWALD, E.; DAVIS, B. R.; FORD, I.; TONKIN, A.; SHEPHERD, J. Effects of pravastatin on mortality in patients with and without coronary heart disease across a broad range of cholesterol levels. The Prospective Pravastatin Pooling project. *Eur.Heart J.*, v. 23, n. 3, p. 207-215, 2002.

SNAPPER, C. M.; PAUL, W. E. Interferon-gamma and B cell stimulatory factor-1 reciprocally regulate Ig isotype production. *Science*, v. 236, n. 4804, p. 944-947, 1987.

SPOSITO, A. C.; CAMELLI, B.; FONSECA, F. A.; BERTOLAMI, M. C.; AFIUNE, Neto A.; SOUZA, A. D.; LOTTENBERG, A. M.; CHACRA, A. P.; FALUDI, A. A.; LOURES-VALE, A. A.; CARVALHO, A. C.; DUNCAN, B.; GELONESE, B.; POLANCZYK, C.; RODRIGUES SOBRINHO, C. R.; SCHERR, C.; KARLA, C.; ARMAGANIJAN, D.; MORIGUCHI, E.; SARAIVA, F.; PICHETTI, G.; XAVIER, H. T.; CHAVES, H.; BORGES, J. L.; DIAMENT, J.; GUIMARAES, J. I.; NICOLAU, J. C.; DOS SANTOS, J. E.; DE LIMA, J. J.; VIEIRA, J. L.; NOVAZZI, J. P.; FARIA, Neto, Jr.; TORRES, K. P.; PINTO, Lde A.; BRICARELLO, L.; BODANESE, L. C.; INTROCASO, L.; MALACHIAS, M. V.; IZAR, M. C.; MAGALHAES, M. E.; SCHMIDT, M. I.; SCARTEZINI, M.; NOBRE, M.; FOPPA, M.; FORTI, N. A.; BERWANGER, O.; GEBARA, O. C.; COELHO, O. R.; MARANHAO, R. C.; DOS SANTOS, R. D.; COSTA, R. P.; BARRETO, S.; KAISER, S.; IHARA, S.; CARVALHO, T.; MARTINEZ, T. L.; RELVAS, W. G.; SALGADO, W. [IV Brazilian Guideline for Dyslipidemia and Atherosclerosis prevention: Department of Atherosclerosis of Brazilian Society of Cardiology]. *Arq Bras.Cardiol.*, v. 88 Suppl 1, n. 2-19, 2007.

STARY, H. C. Composition and classification of human atherosclerotic lesions. *Virchows Arch.A Pathol.Anat.Histopathol.*, v. 421, n. 4, p. 277-290, 1992.

STEIGERWALD, M.; MOLL, H. *Leishmania major* modulates chemokine and chemokine receptor expression by dendritic cells and affects their migratory capacity. *Infect.Immun.*, v. 73, n. 4, p. 2564-2567, 2005.

STOBER, D.; SCHIRMBECK, R.; REIMANN, J. IL-12/IL-18-dependent IFN-gamma release by murine dendritic cells. *J.Immunol.*, v. 167, n. 2, p. 957-965, 2001.

SWIHART, K.; FRUTH, U.; MESSMER, N.; HUG, K.; BEHIN, R.; HUANG, S.; DEL Giudice G.; AGUET, M.; LOUIS, J. A. Mice from a genetically resistant background lacking the interferon gamma receptor are susceptible to infection with *Leishmania major* but mount a polarized T helper cell 1-type CD4+ T cell response. *J.Exp.Med.*, v. 181, n. 3, p. 961-971, 1995.

TAKAHASHI, M.; IKEDA, U.; MASUYAMA, J.; FUNAYAMA, H.; KANO, S.; SHIMADA, K. Nitric oxide attenuates adhesion molecule expression in human endothelial cells. *Cytokine*, v. 8, n. 11, p. 817-821, 1996.

TAKEMOTO, M.; LIAO, J. K. Pleiotropic effects of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a reductase inhibitors. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.*, v. 21, n. 11, p. 1712-1719, 2001.

TAKEUCHI, S.; KAWASHIMA, S.; RIKITAKE, Y.; UHEYAMA, T.; INOUE, N.; HIRATA, K.; YOKOYAMA, M. Cerivastatin suppresses lipopolysaccharide-induced ICAM-1 expression through inhibition of Rho GTPase in BAEC. *Biochem.Biophys.Res.Commun.*, v. 269, n. 1, p. 97-102, 2000.

TRINCHIERI, G. The two faces of interleukin 12: a pro-inflammatory cytokine and a key immunoregulatory molecule produced by antigen-presenting cells. *Ciba Found.Symp.*, v. 195, n. 203-214, 1995.

TSUJITA, Y.; KURODA, M.; TANZAWA, K.; KITANO, N.; ENDO, A. Hypolipidemic effects in dogs of ML-236B, a competitive inhibitor of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase. *Atherosclerosis*, v. 32, n. 3, p. 307-313, 1979.

VADAY, G. G.; BARAM, D.; SALAMON, P.; DRUCKER, I.; HERSHKOVIZ, R.; MEKORI, Y. A. Cytokine production and matrix metalloproteinase (MMP)-9 release by human mast cells following cell-to-cell contact with activated T cells. *Isr.Med.Assoc.J.*, v. 2 Suppl, n. 26-2000.

VAN, Wetering S.; VAN DEN, Berk N.; VAN BUUL, J. D.; MUL, F. P.; LOMMERSE, I.; MOUS, R.; TEN KLOOSTER, J. P.; ZWAGINGA, J. J.; HORDIJK, P. L. VCAM-1-mediated Rac signaling controls endothelial cell-cell contacts and leukocyte transmigration. *Am.J.Physiol Cell Physiol*, v. 285, n. 2, p. C343-C352, 2003.

VAUGHAN, C. J.; GOTTO, A. M., Jr.; BASSON, C. T. The evolving role of statins in the management of atherosclerosis. *J.Am.Coll.Cardiol.*, v. 35, n. 1, p. 1-10, 2000.

VAUGHAN, C. J.; MURPHY, M. B.; BUCKLEY, B. M. Statins do more than just lower cholesterol. *Lancet*, v. 348, n. 9034, p. 1079-1082, 1996.

VEILLARD, N. R.; BRAUNERSREUTHER, V.; ARNAUD, C.; BURGER, F.; PELLI, G.; STEFFENS, S.; MACH, F. Simvastatin modulates chemokine and chemokine receptor expression by geranylgeranyl isoprenoid pathway in human endothelial cells and macrophages. *Atherosclerosis*, v. 188, n. 1, p. 51-58, 2006.

VIEIRA, L. Q; GOLDSCHMIDT, M.; NASHLEANAS, M.; PEFFER, K.; MAK, T.; SCOTT, P. Mice lacking the TNF receptor p55 fail to resolve lesions caused by infection with *Leishmania major*, but control parasite replication. *J.Immunol.* v. 157, n. 2, p. 827-835, 1996.

WAEHRE, T.; DAMAS, J. K.; GULLESTAD, L.; HOLM, A. M.; PEDERSEN, T. R.; ARNESEN, K. E.; TORSVIK, H.; FROLAND, S. S.; SEMB, A. G.; AUKRUST, P. Hydroxymethylglutaryl coenzyme a reductase inhibitors down-regulate chemokines and chemokine receptors in patients with coronary artery disease. *J.Am.Coll.Cardiol.*, v. 41, n. 9, p. 1460-1467, 2003.

WAICZIES, S.; PROZOROVSKI, T.; INFANTE-DUARTE, C.; HAHNER, A.; AKTAS, O.; ULLRICH, O.; ZIPP, F. Atorvastatin induces T cell anergy via phosphorylation of ERK1. *J.Immunol.*, v. 174, n. 9, p. 5630-5635, 2005.

WALD, N. J.; LAW, M. R. A strategy to reduce cardiovascular disease by more than 80%. *BMJ*, v. 326, n. 7404, p. 1419-2003.

WANG, Z. E.; REINER, S. L.; HATAM, F.; HEINZEL, F. P.; BOUVIER, J.; TURCK, C. W.; LOCKSLEY, R. M. Targeted activation of CD8 cells and infection of beta 2-microglobulin-deficient mice fail to confirm a primary protective role for CD8 cells in experimental leishmaniasis. *J.Immunol.*, v. 151, n. 4, p. 2077-2086, 1993.

WEBER, C.; ERL, W.; WEBER, K. S.; WEBER, P. C. HMG-CoA reductase inhibitors decrease CD11b expression and CD11b-dependent adhesion of monocytes to endothelium and reduce increased adhesiveness of monocytes isolated from patients with hypercholesterolemia. *J.Am.Coll.Cardiol.*, v. 30, n. 5, p. 1212-1217, 1997.

WEBER, C.; WEBER, K. S.; KLIER, C.; GU, S.; WANK, R.; HORUK, R.; NELSON, P. J. Specialized roles of the chemokine receptors CCR1 and CCR5 in the recruitment of monocytes and T(H)1-like/CD45RO(+) T cells. *Blood*, v. 97, n. 4, p. 1144-1146, 2001.

WEIGLE, K.; SARAVIA, N. G. Natural history, clinical evolution, and the host-parasite interaction in New World cutaneous Leishmaniasis. *Clin.Dermatol.*, v. 14, n. 5, p. 433-450, 1996.

WEITZ-SCHMIDT, G. Statins as anti-inflammatory agents. *Trends Pharmacol.Sci.*, v. 23, n. 10, p. 482-486, 2002.

WEITZ-SCHMIDT, G.; WELZENBACH, K.; BRINKMANN, V.; KAMATA, T.; KALLEN, J.; BRUNS, C.; COTTENS, S.; TAKADA, Y.; HOMMEL, U. Statins selectively inhibit leukocyte function antigen-1 by binding to a novel regulatory integrin site. *Nat.Med.*, v. 7, n. 6, p. 687-692, 2001.

WENKE, K.; MEISER, B.; THIERY, J.; NAGEL, D.; VON, Scheidt W.; STEINBECK, G.; SEIDEL, D.; REICHART, B. Simvastatin reduces graft vessel disease and mortality after heart transplantation: a four-year randomized trial. *Circulation*, v. 96, n. 5, p. 1398-1402, 1997.

WHITE, C. M. A review of the pharmacologic and pharmacokinetic aspects of rosuvastatin. *J.Clin.Pharmacol.*, v. 42, n. 9, p. 963-970, 2002.

WILLIAMS, J. K.; SUKHOVA, G. K.; HERRINGTON, D. M.; LIBBY, P. Pravastatin has cholesterol-lowering independent effects on the artery wall of atherosclerotic monkeys. *J.Am.Coll.Cardiol.*, v. 31, n. 3, p. 684-691, 1998.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Disponível em:  
<<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/en/>>, Acesso em: 5 de novembro de 2007.

XU, Z. M.; ZHAO, S. P.; LI, Q. Z.; NIE, S.; ZHOU, H. N. Atorvastatin reduces plasma MCP-1 in patients with acute coronary syndrome. *Clin.Chim.Acta*, v. 338, n. 1-2, p. 17-24, 2003.

YAMADA, K.; SAKURAI, E.; ITAYA, M.; YAMASAKI, S.; OGURA, Y. Inhibition of laser-induced choroidal neovascularization by atorvastatin by downregulation of monocyte chemotactic protein-1 synthesis in mice. *Invest Ophthalmol.Vis.Sci.*, v. 48, n. 4, p. 1839-1843, 2007.

YAMAGIWA, S.; GRAY, J. D.; HASHIMOTO, S.; HORWITZ, D. A. A role for TGF-beta in the generation and expansion of CD4+CD25+ regulatory T cells from human peripheral blood. *J.Immunol.*, v. 166, n. 12, p. 7282-7289, 2001.

YAMAMOTO, A.; SUDO, H.; ENDO, A. Therapeutic effects of ML-236B in primary hypercholesterolemia. *Atherosclerosis*, v. 35, n. 3, p. 259-266, 1980.

YILMAZ, A.; REISS, C.; TANTAWI, O.; WENG, A.; STUMPF, C.; RAAZ, D.; LUDWIG, J.; BERGER, T.; STEINKASSERER, A.; DANIEL, W. G.; GARLICH, C. D. HMG-CoA reductase inhibitors suppress maturation of human dendritic cells: new implications for atherosclerosis. *Atherosclerosis*, v. 172, n. 1, p. 85-93, 2004.

YOSHIDA, M.; SAWADA, T.; ISHII, H.; GERSZTEN, R. E.; ROSENZWEIG, A.; GIMBRONE, M. A., Jr.; YASUKOCHI, Y.; NUMANO, F. Hmg-CoA reductase inhibitor modulates monocyte-endothelial cell interaction under physiological flow conditions *in vitro*: involvement of Rho GTPase-dependent mechanism. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.*, v. 21, n. 7, p. 1165-1171, 2001.

YOUSSEF, S.; STUVE, O.; PATARROYO, J. C.; RUIZ, P. J.; RADOSEVICH, J. L.; HUR, E. M.; BRAVO, M.; MITCHELL, D. J.; SOBEL, R. A.; STEINMAN, L.; ZAMVIL, S. S. The HMG-CoA reductase inhibitor, atorvastatin, promotes a Th2 bias and reverses paralysis in central nervous system autoimmune disease. *Nature*, v. 420, n. 6911, p. 78-84, 2002.

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)