

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
NÚCLEO DE PESQUISAS EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**Efeitos da Sinvastatina na resposta inflamatória cardíaca durante a
doença de Chagas experimental**

Rafael Rodrigues Silva

Orientador: Prof. Dr. André Talvani

Co-orientadora: Profa. Dra. Maria Terezinha Bahia

Laboratório de Doença de Chagas/NUPEB

Ouro Preto, Abril de 2010

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

Universidade Federal de Ouro Preto
Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas
Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas

Efeitos da Sinvastatina na resposta inflamatória cardíaca durante a doença
de Chagas experimental

Autor: Rafael Rodrigues Silva

Orientador: Prof. Dr. André Talvani

Co-orientadora: Prof. Dra. Maria Terezinha Bahia

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas do Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto, como parte integrante dos requisitos para obtenção do grau de Mestre em Ciências Biológicas. **Área de concentração: Imunobiologia de Protozoários.**

Ouro Preto
Abril de 2010

DEDICATÓRIA

**À minha mãe, Lúcia, que nunca mediu esforços para
poder me proporcionar essa e outras conquistas.**

AGRADECIMENTOS

Nesse momento de conclusão de um trabalho, quero aproveitar para agradecer àqueles que de alguma ou de diversas maneiras estiveram no meu caminho para me ajudar ou facilitar a percorrê-lo.

Primeiramente, agradeço a Deus por estar sempre me iluminando e guiando os meus passos, jogando em mim suas bênçãos de fé, esperança e conquista.

À minha mãe, pessoa de bondade inigualável, a quem tive o prazer de ter como mãe, por toda força, confiança e amor, e por estar sempre do meu lado me apoiando em minhas decisões.

À minha família, que sempre confiou em mim e especialmente às minhas irmãs Samara e Thamires, por todo carinho, torcida e amor.

Ao professor André Talvani, um verdadeiro mestre no sentido mais amplo da palavra, a quem devo muito pela realização deste trabalho, tanto pelo apoio intelectual e dedicação, quanto por estar sempre pronto para me ajudar, além de ser sempre compreensivo.

À professora Maria Terezinha Bahia pelo apoio e por ter me dado a oportunidade de ingressar no mundo da ciência.

A todos do laboratório de Doença de Chagas pelos vários momentos de alegria e descontração proporcionados, além de é claro, partilharem comigo do conhecimento adquirido. Agradeço especialmente ao Ivo, Lívia e Régia, por terem sido sempre tão prestativos.

Ao pessoal do Biotério, que de uma forma ou de outra, está sempre envolvido nos trabalhos desenvolvidos por nós estudantes.

À Cida, pela competência profissional e disposição na resolução de nossas questões burocráticas.

À UFOP pelo ensino público, gratuito e de qualidade; e ao NUPEB pelo importante papel de órgão pesquisador.

À República Bastilha e aos meus irmãos Bastilhanos pelo convívio, amizade e companheirismo.

A todos meu muito obrigado!!!

“Há três métodos para ganhar sabedoria: primeiro, por reflexão, que é o mais nobre; segundo, por imitação, que é o mais fácil; e terceiro, por experiência, que é o mais amargo.”

Confúcio

RESUMO

A infecção pelo *Trypanosoma cruzi* leva a uma progressiva inflamação no coração que culmina em miocardite, fibrose e mudanças na arquitetura e funcionalidade desse órgão. Sugere-se que essas alterações, definidas como remodelamento cardíaco, sejam coordenadas por uma resposta inflamatória específica contra o parasito. O objetivo dessa pesquisa foi avaliar os efeitos da Sinvastatina, inibidora da enzima HMG-CoA redutase, na resposta inflamatória cardíaca durante a doença de Chagas experimental. Camundongos C57Bl6 machos foram agrupados em (i) não-infectados e (ii) infectados com 500 formas tripomastigotas de cepa Colombiana do *T. cruzi*. Cada grupo (n=8) foi tratado diariamente com Sinvastatina (20mg/Kg) por 30 dias ou recebeu solução salina, ambos por gavagem. Parâmetros morfométricos (peso coração/peso corporal e histopatologia) e imunológicos (citocinas) foram avaliados na fase aguda (30 dias) da doença de Chagas experimental. Nossos resultados sobre o perfil de citocinas mostraram uma atividade antiinflamatória da Sinvastatina observada pela diminuição das citocinas séricas pró-inflamatórias IFN- γ e TNF- α , e estabilização da síntese de IL-10, sendo esse perfil associado a um aumento dos parasitos circulantes. Corroborando com esses dados, análises histopatológicas mostraram que os animais tratados com Sinvastatina apresentaram um infiltrado inflamatório reduzido no 30º dia após a infecção, em comparação com aqueles animais não-tratados. Nesse trabalho, sugere-se que doses reduzidas de Sinvastatina sejam responsáveis pela resposta antiinflamatória observada durante a infecção aguda pelo *T. cruzi* e que, provavelmente, esse papel exerça um efeito protetor no miocárdio durante a fase crônica da doença experimental.

Palavras-chave: *Trypanosoma cruzi*, miocardite, Sinvastatina, HMG-CoA redutase

ABSTRACT

Trypanosoma cruzi infection leads to a progressive inflammation that culminates in myocarditis, fibrosis and changes in the cardiac architecture and functionality. These alterations, named cardiac remodeling, are possibly driven by an inflammatory response mediated by cytokines and leukocytes activation. Here, we seek to evaluate the effects of simvastatin, the inhibitor of HMGCo-A reductase, in the inflammatory response rate during experimental Chagas' disease. C57Bl6 mice were grouped into (i) non-infected and (ii) infected with 500 trypomastigotes of Colombian strain of *T. cruzi*. Each group (n = 8) was treated daily with simvastatin (20mg/kg) by gavage for 30 days or received vehicle. Morphometric (heart weight and histopathology) and immunological (inflammatory and anti-inflammatory cytokines) parameters were evaluated in the acute phase (30 days) of experimental Chagas disease. Our results suggest that simvastatin exerts anti-inflammatory effects during the acute phase of experimental Chagas disease, controlling negatively the plasma levels of IFN-gamma and TNF-alpha and stabilizing the IL-10 profile. This pattern was coincident with the low detection of blood parasites in all treated mice. In addition, simvastatin was also associated with reduced heart inflammatory infiltration observed on 30th day post-infection. In summary, our data suggest that low doses of simvastatin are able to reduce inflammatory response developed by *T. cruzi* infection and, possibly, this protective heart pattern might be also extensive to the chronic phase of experimental Chagas disease.

Keywords: *Trypanosoma cruzi*, myocarditis, Simvastatin, HMG-CoA reductase

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Estrutura química de algumas estatinas naturais e sintéticas inibidoras da enzima HMG-CoA redutase	24
Figura 2: Via de prenilação dos isoprenóides geranylgeranyl pirofosfato e farnesil pirofosfato	26
Gráfico 1: Teste de toxicidade para diferentes doses de Sinvastatina em animais C57BL/6 não infectados com <i>T. cruzi</i>	37
Gráfico 2: Efeitos de diferentes doses de Sinvastatina sobre as curvas de parasitemia de animais C57BL/6 infectados com <i>T. cruzi</i>	38
Gráfico 3: Curvas de parasitemia de animais C57BL/6 infectados com <i>T. cruzi</i> , tratados ou não com Sinvastatina	39
Gráfico 4: Efeitos do tratamento com Sinvastatina sobre as curvas de mortalidade de animais C57BL/6 infectados com <i>T. cruzi</i>	40
Gráfico 5: Determinação enzimática do colesterol total no soro em mg/dL	41
Gráfico 6: Produção sérica de citocinas pró-inflamatórias TNF- α e IFN- γ , e regulatória IL-10	42
Figura 3: Fotomicrografia de cortes histológicos dos tecidos cardíacos	44
Gráfico 7: Efeitos do tratamento com Sinvastatina sobre o infiltrado inflamatório nos tecidos cardíacos de animais C57BL/6 infectados com <i>T. cruzi</i>	45
Gráfico 8: Efeitos do tratamento com Sinvastatina na relação peso cardíaco/peso corporal	46

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CCL	- Receptor para quimiocina semelhante a CCR
CCR	- Receptor para quimiocina
CD	- <i>Cluster of differentiation</i>
ELISA	- Enzyme-linked immunoabsorbent assay
eNOS	- Óxido nítrico sintase endotelial
Fox-p3	- <i>Forkhead Box P3</i>
GTP	- Guanosina tri-fosfato
HDL	- Lipoproteína de alta densidade
HLA	- Antígeno leucocitário humano
HMG-CoA	- β -hidroxi- β -metil Coenzima A
ICAM-1	- Molécula de adesão intercelular
IFN- γ	- Interferon gama
IL	- Interleucina
LDL	- Lipoproteína de baixa densidade
LFA-1	- Antígeno associado à função leucocitária
MCP-1	- Proteína quimioatraente de monócitos
MHC	- Complexo principal de histocompatibilidade
NK	- Célula <i>Natural killer</i>
NO	- Óxido Nítrico
TGF- β	- Fator transformador de crescimento beta
Th	- Linfócito T <i>helper</i>
TLR	- Receptor tipo <i>Toll</i>
TNF- α	- Fator de necrose tumoral alfa

SUMÁRIO

LISTA DE ILUSTRAÇÕES.....	VIII
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	IX
INTRODUÇÃO	12
1.1. <i>Trypanosoma cruzi</i> e doença de Chagas	13
1.2. Resposta imune na doença de Chagas	15
1.2.1. Cardiopatia Chagásica Crônica	18
1.3. Remodelamento Cardíaco	21
1.4. Estatinas	22
1.4.1. Interferência das Estatinas na resposta inflamatória	25
OBJETIVOS	28
2.1. Objetivo geral	29
2.2. Objetivos específicos	29
ANIMAIS, MATERIAL E MÉTODOS	30
3.1. Animais	31
3.2. Parasitos	31
3.3. Infecção pelo <i>T. cruzi</i>	31
3.4. Tratamento	32
3.5. Ensaio para medida sérica do colesterol total	32
3.6. Ensaio imunoenzimático (ELISA) para citocinas séricas	33
3.7. Análise das lesões cardíacas	34
3.7.1. Processamento histológico	34
3.7.2. Coloração por Hematoxilina-Eosina	34
3.7.3. Análise morfológica qualitativa e quantitativa dos tecidos	35
3.8. Avaliação do tamanho relativo dos corações	35
3.9. Análise estatística.....	35
RESULTADOS	36
5.1. Determinação da dose de Sinvastatina	37
5.2. Determinação da parasitemia e mortalidade dos animais	39
5.3. Avaliação da atividade anti-colesterolêmica da Sinvastatina	40
5.4. Determinação da produção de citocinas pró e antiinflamatórias	41
5.5. Análises histopatológicas	43
5.5.1. Análise histopatológica qualitativa	43

5.5.2. Análise histopatológica quantitativa	45
5.6. Avaliação relativa dos pesos dos corações/pesos corporais dos camundongos	46
DISCUSSÃO	47
CONCLUSÃO	52
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	54

INTRODUÇÃO

1. Introdução

1.1. *Trypanosoma cruzi* e doença de Chagas

O *Trypanosoma cruzi*, protozoário uniflagelado pertencente à ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae, é o agente etiológico da doença de Chagas, uma antroponose freqüente na América Latina, considerada como um dos principais problemas de saúde pública nessa região, afetando aproximadamente 15 milhões de pessoas em todo o continente americano, sendo que 48 milhões de indivíduos permanecem sob risco de infecção (WHO, 2007).

Sob condições naturais, o ciclo de vida do *T. cruzi* se alterna entre hospedeiros invertebrados, mais de 130 hemípteros da família Reduviidae, e hospedeiros vertebrados, mais de 100 espécies de mamíferos de diferentes ordens (Lambrecht, 1965; Zeledón & Rabinovich, 1981).

As infecções de mamíferos pelo *T. cruzi* adquiridas naturalmente são iniciadas nas camadas da derme ou na mucosa da conjuntiva por formas tripomastigotas metacíclicas infectivas, que são transmitidas por um vetor triatomíneo hematófago infectado (Burleigh & Woolsey, 2002) as quais se transformam, no interior das células dos mamíferos, em amastigotas com capacidade reprodutiva por divisão binária simples. No homem, além do contágio pelos triatomíneos infectados, a transmissão do parasito pode ocorrer através de transfusões sanguíneas, transplantes de órgãos, transmissão congênita (Brener & Gazzinelli, 1997), acidentes de laboratório e por uma forma crescente ultimamente que é através da ingestão de alimentos contaminados com tripomastigotas de *T. cruzi* (Yoshida, 2008).

A doença de Chagas tem uma apresentação clínica muito variável, e é dividida basicamente em duas formas, determinada ou sintomática, e indeterminada ou assintomática (Dutra & Gollob, 2008). Após a infecção pelo parasito, inicia-se um período de fase aguda que vai de 2 a 4 meses, e a mortalidade nesse período é de aproximadamente 5%, devido basicamente a episódios de miocardite ou meningoencefalite em crianças (Remme *et al*, 2006). Durante a fase aguda, a maioria dos indivíduos infectados desenvolve uma resposta imune humoral e celular responsável pela diminuição ou completa ausência dos parasitos no sangue (parasitemia subpatente) com ausência de sintomas. Após esse período de fase

aguda os pacientes progridem para uma fase crônica indeterminada e podem permanecer assim por toda a vida (Prata, 2001).

Embora a maioria dos pacientes chagásicos apresentem a forma clínica classificada como assintomática, aproximadamente um terço dos indivíduos que passaram pela fase aguda manifesta os sintomas característicos de fase crônica, a qual pode ser silenciosa inicialmente, mas que com o passar dos anos pode evoluir para quadros sintomáticos (Dutra & Gollob, 2008). Esses indivíduos sintomáticos de fase crônica apresentam lesões irreversíveis em órgãos como coração, esôfago e cólon, além de sistema nervoso periférico, responsáveis pelas duas formas características de apresentação da doença nessa fase: as formas cardíaca e digestiva, ou ambas simultaneamente, conhecida como forma mista (Prata, 1994). Dos indivíduos chagásicos crônicos sintomáticos, aproximadamente 2% apresentam a forma mista, 8-10% apresentam a forma digestiva, e de 20 a 30% apresentam a forma cardíaca, a principal causa de morte associada à doença de Chagas.

Como dito anteriormente, a doença de Chagas se manifesta em duas fases, aguda e crônica (Coura, 2007; Kirchhoff, 1993). A fase aguda da doença de Chagas dura aproximadamente 2 a 4 meses e é caracterizada por alto número de parasitos no sangue e nos tecidos. Uma lesão inflamatória local aparece no sítio onde as formas tripomastigotas penetraram e sofreram sua primeira rodada de multiplicação, recebendo o nome de Sinal de Romanã, se a porta de entrada tiver sido a conjuntiva ocular, ou Chagoma de Inoculação, se a porta de entrada do parasito tiver sido a pele. Com a disseminação do *T. cruzi*, os sintomas de insuficiência cardíaca desenvolvem em um pequeno número de pacientes, refletindo a subjacente miocardite severa. Demais mortes na fase aguda da doença de Chagas são devido à falhas cardíacas (Laranja *et al*, 1956). Episódios de meningoencefalite também podem ocorrer, especialmente em pacientes imunossuprimidos (Hoff *et al*, 1978). Claramente, as manifestações mais comuns da doença se desenvolvem na fase crônica, muitos anos após a infecção inicial pelo o *T. cruzi* (Bilate & Cunha-Neto, 2008; Kirchhoff, 1993;). O coração é o órgão mais comumente envolvido e, devido às disritmias cardíacas e disfunções autonômicas, a morte súbita pode inevitavelmente ocorrer. É freqüente, pois, o desenvolvimento de cardiomiopatia, e a falha cardíaca congestiva é uma causa comum de morte nos pacientes acometidos por essa doença. Somado a isso, indivíduos com doença de Chagas cardíaca muitas vezes desenvolvem trombos que embolizam e causam diversas complicações nos

pacientes (Rassi Jr *et al*, 2000; Braga *et al*, 1995). Por fim, a síndrome dos “megas” relacionados ao esôfago e/ou cólon também pode se desenvolver durante a infecção crônica, causando uma série de apresentações clínicas como disfagia e baixa sensibilidade à gastrina (Herbella *et al*, 2004), interferindo na alimentação do paciente.

O porquê das diferentes evoluções clínicas ocorrerem é uma questão intrigante e ainda não resolvida, mas a despeito de muitas incertezas, é reconhecido que a resposta imune do hospedeiro é crítica na determinação dos resultados da doença (Dutra & Gollob, 2008), exercendo papel importante nos efeitos patológicos dessa (Bilate & Cunha-Neto, 2008). Tendo em vista que a doença de Chagas é uma doença infecciosa com lesões de caráter inflamatório, o entendimento da resposta imunológica montada pelo organismo durante a infecção é essencial para se entender os efeitos patológicos causados pela mesma.

1.2. Resposta imune na doença de Chagas

Vários aspectos influenciam de maneira semelhante a evolução clínica da doença de Chagas humana (Dutra & Gollob, 2008; Engman & Leon, 2002). Fatores tais como cepa do parasito e tropismo tecidual, carga parasitária, tempo de infecção, natureza da resposta imune montada e o histórico genético do hospedeiro exercem importantes papéis (Dutra & Gollob, 2008). A disseminação sistêmica do *T. cruzi* é acompanhada por uma intensa resposta imune, a qual permite o controle do parasito, mas também leva a uma massiva infiltração de células mononucleares nos tecidos atingidos, especialmente no miocárdio, levando à produção local e sistêmica de citocinas, quimiocinas e outros mediadores inflamatórios, tais como o óxido nítrico (NO) (Aliberti *et al*, 2001; Gazzinelli *et al*, 1998).

Os mecanismos pelos quais o hospedeiro controla a replicação do parasito durante a fase aguda da infecção pelo *T. cruzi* ainda não estão completamente entendidos. Sabe-se que em modelos murinos, por exemplo, um predomínio de uma resposta imune inicial do tipo Th1 é importante para o controle do parasito, uma vez que nesse tipo de resposta ocorre secreção de TNF- α pelas células TCD4⁺, que estimulam a produção de IFN- γ pelas células NK, TCD4⁺ e TCD8⁺ (Oliveira *et al*, 2007; Torrico *et al*, 1991), citocinas e células que estão envolvidas na destruição das células infectadas pelo *T. cruzi*.

Mas essa forte ativação dos componentes celulares do sistema imune pelo *T. cruzi* pode também resultar em alguns efeitos colaterais (Brener & Gazzinelli, 1997), uma vez que a resposta imune parece grandemente responsável pelo dano tecidual e destruição neuronal no tecido cardíaco observado na fase aguda da doença de Chagas (Talvani *et al*, 2000; Machado *et al*, 1998), contribuindo para uma característica marcante dessa: o processo de remodelamento inflamatório cardíaco, cuja fase inicial apresenta-se caracterizada por uma miocardite rica em células T e macrófagos, ausência virtual de parasitos, hipertrofia cardíaca e fibrose (Cunha-Neto *et al*, 2006). Em humanos, por exemplo, os pacientes que desenvolvem a cardiopatia chagásica crônica (CCC) apresentam um infiltrado inflamatório composto basicamente por macrófagos, células B e T e algumas células NK, tendo as células T uma predominância sobre as células B. O infiltrado inflamatório apresenta um alto número de células granzima-positivas (Higuchi *et al*, 1993) e uma restrita heterogeneidade de transcritos de cadeia alfa variáveis no receptor de célula T (Cunha-Neto *et al*, 1994), indicando um infiltrado inflamatório dirigido especificamente aos antígenos do parasito (Cunha-Neto *et al*, 2009). Além disso, episódios de auto-imunidade também são considerados como fatores para o desenvolvimento de lesões inflamatórias, especialmente pelo fato de que alguns estudos não conseguem correlacionar o grau de parasitismo tecidual e a intensidade da resposta inflamatória, o que leva alguns autores à hipótese de que a CCC é uma doença auto-imune disparada em alguns indivíduos pela infecção com o *T. cruzi* (Soares & Santos, 2009).

Essa relação dos mecanismos imunológicos com a patologia e fisiologia da doença de Chagas tem sido fortemente evidenciada por episódios de reação de hipersensibilidade retardada, ocasionada por infiltrados inflamatórios compostos principalmente por células mononucleares, juntamente com os achados de imunoglobulinas e deposição de moléculas do sistema complemento no tecido miocárdico (Marin-Neto *et al*, 2007).

Além desses danos observados nos tecidos, histiócitos e células endoteliais apresentam aumentada expressão de moléculas de HLA classes I e II, ICAM e E-selectina, enquanto cardiomiócitos expressam maiores níveis de HLA classe I, os quais são marcadores encontrados normalmente nas células em resposta a produção local de citocinas inflamatórias (Cunha-Neto *et al*, 2009).

Em infecções agudas, pouco tempo depois do início da infecção ocorre uma ativação da imunidade inata estimulada por antígenos do *T. cruzi* através de receptores Toll-like, tais como 4 e 9, em macrófagos e células dendríticas (Bafica *et al*, 2006). Com essas células ativadas, ocorre intensa secreção de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias, super-regulação da expressão de receptores co-estimulatórios e aumentada endocitose e morte intracelular de parasitos através da liberação de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio. Os macrófagos e células dendríticas que tenham endocitosado os parasitos induzem subsequentemente uma forte resposta de células T e anticorpos contra antígenos do *T. cruzi*, gerando células T específicas contra o *T. cruzi* e produtoras de IFN- γ que migram juntamente com outros leucócitos sanguíneos para o sítio da inflamação induzida pelo *T. cruzi* em resposta a quimiocinas como CCL2, CCL3, CCL4, CCL5 e CXCL10, e participam da resposta imune contra o parasito (Teixeira *et al*, 2002). Essa resposta inflamatória de anticorpos e células T leva ao controle do parasitismo tecidual e sanguíneo, embora não completamente, uma vez que são encontrados parasitos na fase crônica da infecção.

Já no estágio crônico da infecção, provavelmente devido a uma persistência do parasito, é continuada a produção de citocinas inflamatórias por células mononucleares, levando a níveis aumentados no plasma de TNF- α e IFN- γ , sendo essas citocinas detectadas em indivíduos infectados com as formas indeterminadas da doença de Chagas (Cunha-Neto *et al*, 2009; Talvani *et al*, 2004; Ferreira *et al*, 2003; Abel *et al*, 2001; Ribeirão *et al*, 2000). Os pacientes que desenvolvem a CCC exibem níveis aumentados de TNF- α e CCL2 quando comparados aos indivíduos com a forma indeterminada da doença de Chagas, além de números aumentados de células TCD8⁺ e CD4⁺CCR5⁺CXCR3⁺ produtoras de IFN- γ , em concomitância com uma baixa produção de células T regulatórias FoxP3⁺ e produtoras de IL-10 (Cunha-Neto *et al*, 2009; Araujo *et al*, 2007; Gomes *et al*, 2003; Abel *et al*, 2001.).

Essa forte resposta inflamatória observada pela medida das citocinas no sangue periférico tem correspondência ao se analisar a natureza do infiltrado inflamatório encontrado no miocárdio de pacientes com a CCC (Cunha-Neto *et al*, 2005), uma vez que o infiltrado de células mononucleares nos tecidos cardíacos desses pacientes expressam IFN- γ , TNF- α and IL-6 e baixos níveis de IL-2, IL-4 e IL-10 (Abel *et al*, 2001). Um estudo analisando a expressão gênica de mediadores inflamatórios através de real-time PCR observou um significativo aumento dos receptores de

quimiocinas CCR5, CXCR3 e CCR7 no miocárdio de pacientes com a CCC, bem como de seus ligantes, em comparação com amostras de doadores de coração e pacientes com cardiomiopatias não-inflamatórias (Cunha-Neto *et al*, 2005). Esse mesmo estudo encontrou que genes expressos por células T regulatórias (TGF- β e Foxp3) ou células Th2 (IL-4 e IL-13) estavam reduzidos ou sua expressão não era detectada no tecido cardíaco dos pacientes com CCC, sugerindo que a intensa resposta inflamatória Th1 no miocárdio de pacientes com essa forma da doença ocorre na ausência de mecanismos regulatórios.

Vários são os motivos que levam os pacientes chagásicos ao desenvolvimento da CCC, e no tópico a seguir discutiremos alguns deles.

1.2.1. Cardiopatia Chagásica Crônica

A cardiopatia chagásica crônica (CCC), que se estabelece durante a fase crônica da doença de Chagas, é a mais expressiva manifestação dessa doença, tanto devido à sua frequência quanto à sua severidade (Coura, 2007; Prata, 2001). A CCC é responsável pelas principais causas de morbidade e mortalidade associadas à mesma, como o resultado de uma intensa agressão ao tecido cardíaco, causada tanto pelo *T. cruzi* quanto pelo sistema imune do hospedeiro, na intenção de combater a infecção causada pelo protozoário parasito.

Apesar dos intensos estudos focando a CCC, ainda não existe um consenso entre os pesquisadores sobre quais são as reais causas desse processo inflamatório e como ele se processa (Cunha-Neto *et al*, 2009; Tarleton, 2003).

Estudos em modelos animais e em seres humanos apontam a ocorrência de 4 mecanismos patogênicos principais que em conjunto levam os pacientes chagásicos ao desenvolvimento da CCC (Marin-Neto *et al.*, 2007), são eles: disautonomia cardíaca, distúrbios microvasculares, lesão miocárdica dependente do parasito e lesão miocárdica mediada pelo sistema imune.

- Disautonomia cardíaca: evidências desse processo começaram a ser apontadas desde os anos 50, quando o patologista alemão Fritz Köberle, começou a estudar o sistema nervoso intrínseco em órgãos que exibiam as alterações patológicas causadas pela doença de Chagas (Köberle, 1968). Os estudos desse e de outros pesquisadores foram consensuais em concluir que os órgãos alterados em pacientes

chagásicos apresentavam dano gangliônico e anormalidades degenerativas nas células de Schwann e fibras nervosas (De Souza *et al*, 1996). Outra importante conclusão desses trabalhos é que a redução neuronal ocorre predominantemente durante a fase aguda da doença, ocasionada por 3 fatores principais, a saber o parasitismo neuronal, a degeneração causada por inflamação perigangliônica e reações autoimunes antineuronais (Santos & Hudson, 1981). Além desses estudos patológicos, outros estudos, fisiológicos e farmacológicos, também foram hábeis em demonstrar uma prejudicada regulação da função cardíaca, onde através da aplicação de estímulos aos nervos parassimpáticos, esses não provocavam alterações no tônus cardíaco consistentes com suas funções (Marin-Neto *et al*, 2007).

- Distúrbios microvasculares: esses distúrbios consistem nos primeiros registros patológicos da fase aguda da cardiopatia chagásica, sendo causados por inflamação perivascular, um dos mecanismos para degeneração miocárdica. Necrópsias de pacientes crônicos mostraram colapso difuso de arteríolas intramiocárdicas, onde proliferação íntima causou constrição do lúmen. Corroborando com essas evidências, outros autores sugerem que vasodilatação e vasoconstrição anormal ao nível microcirculatório são causadores de dano miocárdico em pacientes chagásicos (Higuchi *et al*, 1998), o que leva à hipótese de que distúrbios isquêmicos de baixa intensidade e curta duração são importantes mecanismos de cardiomiopatia chagásica. Em suma, anormalidades estruturais e funcionais microvasculares, que de certa forma são o resultado de processos inflamatórios, amplificam e potencializam os efeitos das agressões inflamatórias ao tecido miocárdico (Marin-Neto *et al*, 1992; Hagar & Rahintoola, 1991; Vianna, 1911).

- Lesão miocárdica dependente do parasito: embora alguns estudos apontem a quase ausência de parasitos em tecidos cardíacos severamente inflamados, a presença dos antígenos e do DNA do parasito, mesmo que escassos, são importantes fontes de manutenção da resposta imune específica do hospedeiro durante a fase crônica da doença de Chagas (Bilate & Cunha-Neto, 2008). De acordo com esse raciocínio, células T CD8+ *T. cruzi*-específicas têm sido isoladas de pacientes apresentando CCC, o que provê evidências do recrutamento e expansão dessas células no miocárdio, provavelmente relacionados à presença de antígenos do parasito (Fonseca *et al.*, 2005). De fato, estudos experimentais utilizando-se de um

alto inóculo ou com alta reprodução parasitária na fase aguda, apresentaram uma maior agressão ao tecido cardíaco dos animais infectados, sugerindo uma relação entre carga parasitária e severidade da doença em modelos animais (Bilate & Cunha-Neto, 2008); o que é reforçado por Coura 2007, que diz que a maioria dos casos de forma aguda da doença de Chagas no Brasil apresenta pouco ou nenhum sintoma, possivelmente devido a um inóculo pequeno.

Além desses fatores ligados à resposta imune contra o parasito, as características biológicas das cepas utilizadas nos experimentos ou em infecções naturais e particularmente seu tropismo, como citado aqui anteriormente, têm importante função como determinantes da doença e de suas formas clínicas (Coura, 2007).

- Lesão miocárdica mediada por resposta auto-imune: A ocorrência de forte resposta inflamatória em lesões cardíacas com escassez de parasitos sugere uma possível ocorrência de resposta auto-imune na doença de Chagas (Hyland & Engman, 2006; Tarleton, 2003; Engman & Leon, 2002). Apesar de a resposta auto-imune ainda não estar bem esclarecida entre os pesquisadores, é consenso geral que processos como mimetismo molecular, (ocorrência de moléculas do agente infeccioso semelhantes às do hospedeiro) e ativação *by stander* (contínua produção de células T citotóxicas mediada por citocina) provocam resposta inflamatória a antígenos próprios (Gironés *et al*, 2007).

Em estudos experimentais de fase aguda e crônica, camundongos infectados com o *T. cruzi* mostraram auto-anticorpos específicos contra auto-antígenos contidos em tecidos cardíacos, nervosos e outros, sendo que proteínas estruturais como a miosina cardíaca, desmina e actina são alvos comuns (Leon *et al*, 2001; Rizzo *et al*, 1989); além disso, no soro de pacientes chagásicos crônicos foram encontrados auto-anticorpos com reatividade cruzada contra proteínas humanas e do *T. cruzi* (Marin-Neto *et al*, 2007).

A falta de correlação entre a presença do parasito e a CCC em humanos leva os pesquisadores a suspeita de que outros fatores operam no desenvolvimento dessa doença inflamatória. Nesse sentido, a hipótese mais bem aceita é a de que ocorre uma quebra na tolerância imunológica com dano ao tecido cardíaco secundariamente a uma resposta originalmente protetora dirigida aos antígenos do *T. cruzi* que são estruturalmente semelhantes a componentes específicos do tecido cardíaco do hospedeiro (Bilate & Cunha-Neto, 2008). Os estudos sugerem que

respostas autoimunes e específicas ao *T. cruzi* ocorram em sinergia na doença de Chagas secundariamente à infecção, e provavelmente essa combinação está envolvida no estabelecimento das lesões do tecido cardíaco.

Os eventos inflamatórios no tecido cardíaco e suas conseqüências clínicas induzem uma readaptação do coração aos novos padrões de funcionamento e ativam, concomitantemente ao processo inflamatório, uma série de mediadores como neurohormônios (endotelina, angiotensina II, aldosterona, BNP) e citocinas regulatórias, pró- e anti-inflamatórias (TNF- α , TGF- β , IL-10, IL-17), além de quimiocinas (Zhang *et al*, 2007, Morimoto *et al*, 2007, Yin *et al*, 2008). Em conjunto, esses mediadores potencializam alterações moleculares e celulares nas células miocárdicas conduzindo-as às alterações morfo-funcionais conhecidas como remodelamento cardíaco (RC).

1.3. Remodelamento Cardíaco

Remodelamento cardíaco é um termo designado para descrever o conjunto de alterações genéticas, moleculares, neurohumorais, celulares e intersticiais cardíacas que se manifestam, conjuntamente, a uma série de eventos clínicos como alterações no tamanho, massa, geometria e função cardíacas, geralmente em resposta a um episódio de injúria ou sobrecarga no coração (Pontes & Leães, 2004).

As mudanças ocorridas com o processo de remodelamento propiciam ao coração se adaptar a um novo modo de funcionamento, ativando mediadores importantes como neurohormônios e citocinas, os quais se potencializam mutuamente, de maneira inter-relacionada. Esse novo padrão de funcionamento leva o tecido cardíaco a sofrer algumas modificações moleculares e celulares, como hipertrofia do miócito, necrose e apoptose, fibrose intersticial, degeneração e deslizamento de fibras de colágeno, sendo essa última um processo conhecido como “*Slippage*” (Pontes & Leães, 2004). Em conjunto, essas modificações buscam compensar a demanda aumentada hipertrofiando os miócitos ainda viáveis e aumentando a massa ventricular, o que permite uma normalização inicial do funcionamento cardíaco após um episódio de injúria.

Porém, quando o remodelamento tornar-se insuficiente ou a sobrecarga ultrapassar a capacidade do coração em hipertrofiar-se, ocorre um evidente descontrole pós-carga. Assim, a hipertrofia torna-se insuficiente para normalizar o

estresse parietal, criando-se um círculo vicioso que conduz a uma dilatação do coração, alterações em sua geometria e contratilidade/relaxamento, além de afetar os volumes sistólicos e diastólicos do órgão.

Em suma, estas alterações tornam-se progressivas e deletérias, apresentando um prognóstico favorável ao desenvolvimento de insuficiências cardíacas (Remme, 2003; Zornoff *et al*, 2002).

Como dito anteriormente, embora o remodelamento inicial possa ser adaptativo e permita manter a função miocárdica, o remodelamento patológico progressivo, inevitavelmente, conduzirá a uma piora das funções miocárdicas e, conseqüentemente, ao pior prognóstico clínico.

Nesse cenário, alguns pesquisadores têm concentrado esforços para melhor entenderem como ocorrem os mecanismos inflamatórios visando encontrar possíveis inibidores desses mecanismos, e conseqüentemente, de seus efeitos prejudiciais aos órgãos acometidos. Com isso, um acúmulo de evidências, providas especialmente dos avanços em biologia molecular, tem mostrado o envolvimento de vias de sinalização celular mediadas por proteínas G tais como as proteínas da família Rho, em uma série de funções celulares, que vão desde a contração de células do músculo liso, como também organização do citoesqueleto de actina, adesão celular e motilidade, citocinese e expressão gênica; funções essas que podem estar envolvidas em processos patogênicos de doenças cardiovasculares.

É importante, pois, a descoberta de fármacos capazes de inibir essas vias responsáveis por potencializarem os efeitos inflamatórios. Nesse sentido, a Sinvastatina, uma droga do grupo das estatinas, por ter apresentado vários efeitos pleiotrópicos especialmente aqueles relacionados à diminuição da resposta imune inflamatória, se apresenta como possível candidato.

1.4. Estatinas

As estatinas, que tem como característica comum a capacidade de inibir a HMG-CoA redutase, são os fármacos mais prescritos no mundo, dada sua importância sobre o efeito redutor do colesterol, e conseqüentemente, por atuarem na prevenção e controle de doenças cardiovasculares (Sposito *et al*, 2007). A administração das estatinas alcança melhores resultados no período noturno, uma vez que a enzima redutase do colesterol acompanha o ritmo funcional circadiano, provavelmente pelo mecanismo de ação dessa enzima ser dependente dos corticóides adrenais (Jones &

Schoeller, 1990), ou seja, sua maior atividade ocorre a noite. A primeira estatina natural foi descoberta ainda na década de 70, por um pesquisador japonês chamado Akira Endo, o qual pesquisando antibióticos de origem microbiana encontrou em uma cepa do fungo *Penicillium citrinum* um componente ativo denominando-o mevastatina, o qual mais tarde se mostrou fortemente eficiente na inibição da via de biossíntese do colesterol, por bloquear a produção do mevalonato, primeiro produto dessa via.

Posteriormente outros pesquisadores descobriram outras estatinas naturais, as quais através de modificações estruturais deram origem às estatinas sintéticas, como é o caso da Atorvastatina e da Sinvastatina.

- Estrutura química das estatinas: As estatinas são compreendidas por um grupo de anéis de hexaidronaftaleno apresentando dois anexos, sendo um formado por éster de metilbutirato e o outro por um hidróxi-ácido, os quais possuem a propriedade de formar um anel lactônico (figura 1). É justamente esse hidróxi-ácido o análogo estrutural da HMG-CoA redutase, o qual compete com essa enzima pelo mevalonato, reduzindo assim a ação da mesma.

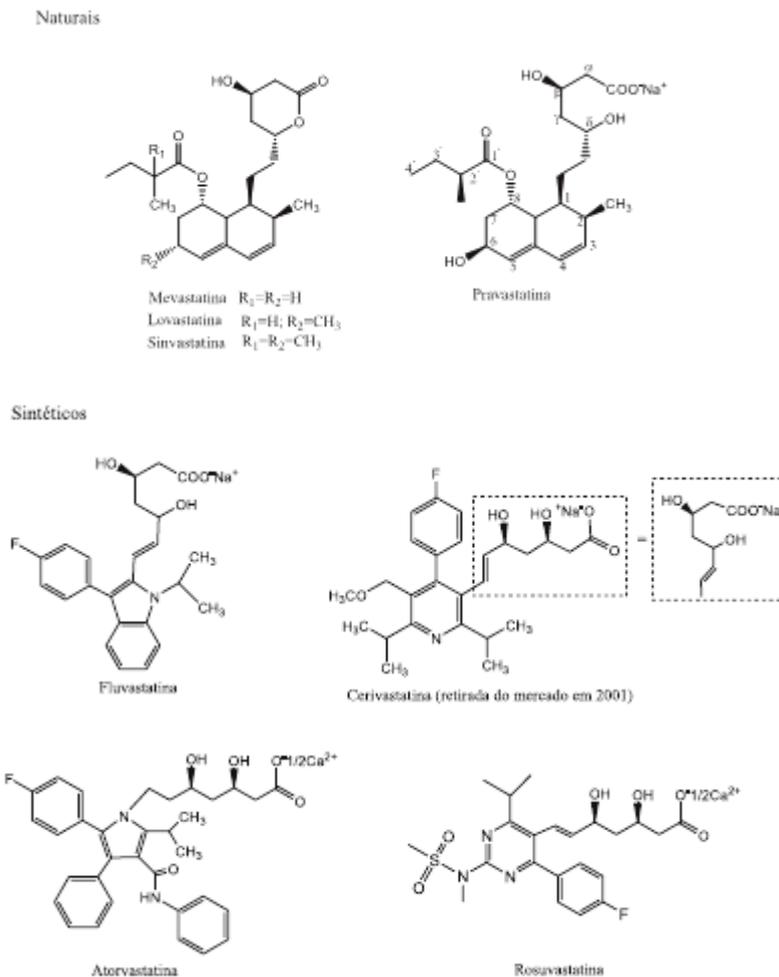


Figura 1: Estrutura química de algumas estatinas naturais e sintéticas inibidoras da enzima HMG-CoA redutase. A figura apresenta estatinas clássicas como a Mevastatina, além da semi-sintética Sinvastatina e da primeira totalmente sintética, a Fluvastatina. Atorvastatina e Rosuvastatina representam a nova geração de estatinas sintéticas. (modificado de Campo & Carvalho, 2006).

- Mecanismo de ação das estatinas: As estatinas agem através da inibição competitiva da ligação entre a enzima b-hidroxi-b-metil-glutaril-CoA (HMG-CoA) à sua enzima alvo, a HMG-CoA redutase, bloqueando de forma eficiente a produção do mevalonato e demais produtos da via de biossíntese do colesterol (Endo *et al*, 2004).

Com uma síntese de colesterol reduzida nos hepatócitos, ocorre uma supra-regulação de receptores de lipoproteína de baixa densidade (Rader *et al*, 2007), ocasionando maior captação de partículas de LDL, reduzindo assim os níveis de colesterol sérico.

Claramente, a redução nos níveis de colesterol sérico por si só já representa uma importante contribuição das estatinas na prevenção de doenças cardiovasculares, como por exemplo, reduzindo o risco de formação de placas de ateroma, ocasionadas especialmente pela alta de colesterol sérico. Mas nos últimos anos, têm-se verificado através de alguns trabalhos que as estatinas, além do efeito redutor do colesterol, apresentam alguns outros efeitos pleiotrópicos, a saber: diminuição da ativação imune e da inflamação, alteração da atividade de metaloproteinases, diminuição do estresse oxidativo, diminuição de trombos, dentre outros (Castro *et al.*, 2008; Schönbeck & Libby, 2008; Shanes *et al.*, 2007).

Nesses trabalhos, realizados *in vitro* e *in vivo*, têm-se observado que os efeitos pleiotrópicos associados ao uso das estatinas, especialmente os antiinflamatórios, não estão associados à diminuição do colesterol sérico (Weitz-Schmidt, 2002), o que indica uma ação direta das estatinas na regulação da resposta imune, embora tais mecanismos ainda não estejam totalmente esclarecidos.

1.4.1. Interferência das estatinas na resposta inflamatória

Como dito anteriormente, além de sua ação preventiva na hipercolesterolemia, as estatinas têm apresentado, nos últimos anos, evidências de sua função antiinflamatória relatada através da (i) redução dos níveis de proteínas C reativas (Ridker *et al.*, 2001), (ii) redução de níveis séricos de TNF- α , IL-6, IL-1, IL-8, IL-12 (Ascer *et al.* 2004, Naoumova *et al.* 2003) e quimiocinas (Waehre *et al.*, 2003), (iii) inibição da expressão de receptores de quimiocinas induzidas por citocinas (Veillard *et al.*, 2006, Han *et al.*, 2005), (iv) bloqueio de proteínas ancoradas à membrana como as proteínas Rho-A, relacionadas aos processos de migração celular e sinalização leucocitária (Zhang & Casey, 1996), dentre outras.

Nesse sentido, as estatinas agem no sistema imune independente de seus efeitos inibitórios da HMG-CoA redutase. Algumas evidências corroboram com isso, como um estudo mostrando que as estatinas inibem a expressão do MHC de classe II induzida por IFN- γ , além de bloquear a estimulação das células T dependentes de LFA-1 (*lymphocyte function-associated antigen-1*) (Hakamada-Taguchi *et al.*, 2003), o que pode resultar na supressão da ativação de células Th1 pró-inflamatórias, já que a ligação da estatina ao sítio de ligação do LFA-1 estabiliza o receptor do ICAM-1 numa conformação inativa, impedindo a adesão endotelial e a migração

transendotelial dos leucócitos no sítio da infecção, e por consequência, a apresentação de antígenos e ativação de linfócitos.

Em outro estudo analisando a polarização Th em pacientes tratados com a droga Atorvastatina (um tipo de estatina sintética produzida pelo laboratório Pfizer), após terem sofrido infarto agudo do miocárdio, foi observado que no soro desses pacientes, em testes *in vitro*, ocorreu menor produção de IFN- γ pelas células T, em comparação com os pacientes que também sofreram infarto, mas que não se submeteram ao tratamento com estatina (Cheng *et al*, 2005).

Apesar do modo de ação das estatinas atuarem diminuindo a resposta imune inflamatória não ser ainda bem compreendido, algumas de suas vias de ação começam a ser bem estabelecidas. Inibindo a HMG-CoA redutase, as estatinas além de reduzirem o colesterol, reduzem também os níveis de isoprenóides intracelulares, tais como farnesil pirofosfato e geranylgeranyl pirofosfato (figura 2), os quais são necessários para a modificação lipídica pós-traducional (prenilação) de uma variedade de proteínas e ancoragem dessas na membrana celular (Zhang & Casey, 1996; Weitz-Schmidt, 2002).

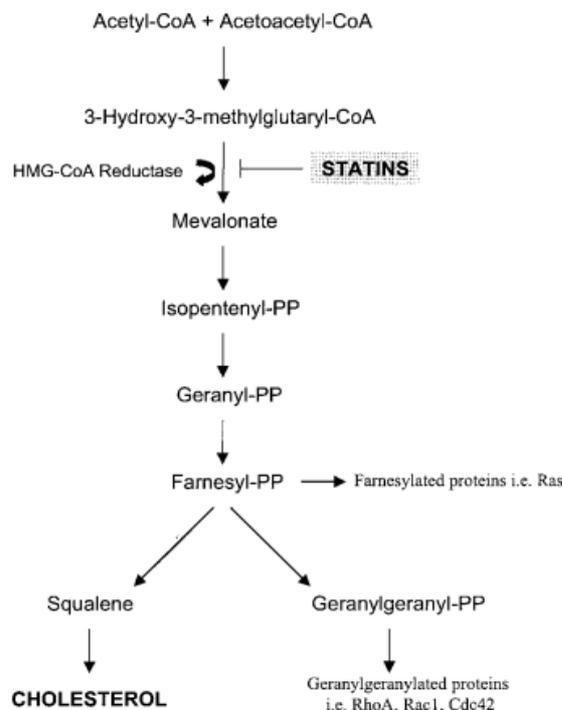


Figura 2: Via de prenilação dos isoprenóides geranylgeranyl pirofosfato e farnesil pirofosfato. As estatinas exercem sua função competindo com o substrato 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA pelo sítio funcional da enzima HMG-CoA redutase, inibindo a produção do mevalonato, primeiro produto na via de biossíntese do colesterol. (Modificado de Weitz-Schmidt, 2002).

Dentre as proteínas que estão incluídas nesse processo, estão presentes as proteínas ligadas ao GTP, e que exercem importante papel nas vias de transdução de sinais, como é o caso das proteínas da família Rho.

Trabalhos em modelos experimentais têm mostrado que doses moderadas de estatinas propiciam uma melhora na função ventricular esquerda em animais com infarto agudo do miocárdio, além de promover uma sobrevida maior nesses animais (Greer *et al*, 2006, Linthout *et al*, 2007). Parte desses múltiplos efeitos das estatinas parece estar associado a uma dependência direta da ativação da óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) e, reforçado pela inibição direta das proteínas Rho e Rho-quinases nas doenças cardiovasculares de origem inflamatória e de outras etiologias (Shimokawa & Takeshita, 2005). Torna-se importante explicitar que estes benefícios cardiovasculares foram observados de forma independente à redução do colesterol, função primária deste grupo farmacológico.

Em consonância com os dados acima, as análises de um estudo retrospectivo em pacientes com infarto agudo do miocárdio com uso iniciado ou contínuo de estatinas, dentro das primeiras 24 horas pós-evento, mostraram uma redução significativa da morbidade e mortalidade nesses indivíduos (Fonarow *et al*, 2005). Além disso, as estatinas têm mostrado, em modelos animais, uma melhora da função endotelial, aumento da biodisponibilidade sistêmica de óxido nítrico e inibição da ativação de plaquetas, bem como propiciado um atenuado remodelamento ventricular nos períodos iniciais após IAM (Hayashidani *et al*, 2002).

Face ao exposto até aqui, e analisando a doença de Chagas como uma doença com características inflamatórias, o nosso trabalho se justifica pelas propriedades das estatinas (ex. Sinvastatina) atuando como agente antiinflamatório em doenças cardíacas de diferentes etiologias. Além disso, até o presente momento, não há registro de trabalhos científicos publicados apresentando tais efeitos da Sinvastatina no modelo experimental da doença de Chagas.

OBJETIVOS

2. Objetivos

2.1. Objetivo geral

Avaliar a ação do uso diário de Sinvastatina no processo inflamatório cardíaco durante a fase aguda da doença de Chagas experimental.

2.2. Objetivos específicos

- 1.** Padronizar a dose-resposta do fármaco a ser utilizado no modelo murino, utilizando-se doses previamente estabelecidas na literatura;
- 2.** Avaliar os efeitos do uso diário de Sinvastatina sobre os parasitos sanguíneos e a sobrevivência dos animais;
- 3.** Avaliar o teor de colesterol sérico dos animais dos grupos tratados com a Sinvastatina;
- 4.** Quantificar a produção das citocinas IL-10, IFN- γ e TNF- α no soro dos diversos grupos de camundongos;
- 5.** Determinar, no tecido cardíaco dos grupos infectados, o infiltrado inflamatório e a presença de ninhos de amastigotas de *T. cruzi* após o tratamento com Sinvastatina;
- 6.** Avaliar o tamanho relativo dos corações (relação do peso do coração/peso corporal) dos camundongos infectados pelo *T. cruzi* sob ação da Sinvastatina;

ANIMAIS, MATERIAL E MÉTODOS

3. Animais, material e métodos

3.1. Animais

Neste estudo foram utilizados camundongos da linhagem C57Bl/6 machos com idades entre 6-8 semanas, provenientes de uma mesma ninhada e pesando aproximadamente 30g. Todos esses animais foram obtidos e mantidos no biotério da Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP). Esses animais foram alimentados com ração comercial para camundongos e água *ad libitum*.

Todos os procedimentos realizados nesse experimento estão de acordo com os princípios éticos de experimentação animal, pré-estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovados pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), com o protocolo nº 2009/20.

3.2. Parasitos

Foram utilizados parasitos da cepa Colombiana do *Trypanosoma cruzi*, sendo os mesmos mantidos por passagens sucessivas em camundongos Swiss no biotério da Universidade Federal de Ouro Preto.

3.3. Infecção pelo *T. cruzi*

Camundongos C57Bl6 foram infectados com uma dose de 500 formas tripomastigotas sanguíneas por via intraperitoneal, e a confirmação da infecção foi feita a partir do 3º dia após a infecção, através de coleta diária de sangue da veia marginal da cauda dos animais, e observação do mesmo ao microscópio entre lâmina e lamínula. Após a confirmação, a parasitemia foi avaliada diariamente, contando-se o número de parasitos por 5µL de sangue, de acordo com a técnica descrita por Brener (1962).

3.4. Tratamento

Primeiramente, a fim de obtermos a dose ideal do fármaco (capacidade efetora e não tóxica), foi realizado um esquema de tratamento com 5 grupos, sendo 1 não tratado e 4 tratados com diferentes doses de Sinvastatina obtidas a partir de trabalhos da literatura com estatinas (Hakamada-Taguchi *et al*, 2003; Rezaie-Majd *et al*, 2002). Assim, grupos de 8 animais foram tratados com 2, 20, 40 e 80mg/Kg de peso corporal por um período de 30 dias. Optamos pela dose de 20mg/kg de peso corporal, tanto pelos resultados obtidos em nossos experimentos quanto pelos resultados apresentados por essa dose em outros trabalhos experimentais e em humanos (Zhao *et al*, 2010; Castro *et al*, 2008; Mora & Ridker, 2006)

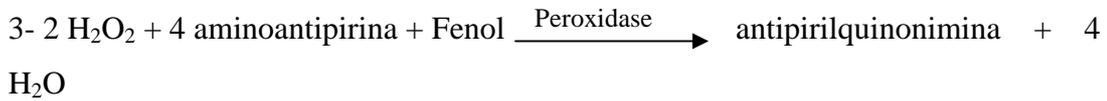
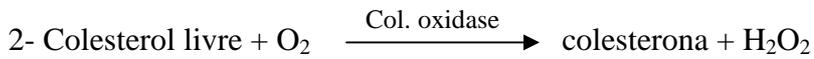
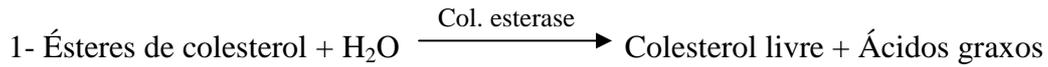
Feito isso, realizamos um novo esquema de tratamento com 4 grupos, contendo 8 animais cada, a saber: Infectado Tratado (IT), Infectado Não-tratado (INT), Não-infectado Tratado (NIT) e Não-infectado Não-tratado (NINT). Os grupos tratados, IT e NIT, receberam 20mg/Kg de peso de Sinvastatina, por via oral pelo método de gavagem, a partir do 3º dia de infecção. Os grupos não tratados receberam uma quantidade de água semelhante ao volume de líquido recebido pelos grupos tratados, como forma de induzir nesses animais, o mesmo estresse causado nos grupos tratados.

O tratamento com a Sinvastatina, feito por via oral pelo método de gavagem, foi realizado sempre no final da tarde, por volta das 17h, aproximando-se do horário recomendado para a administração das estatinas, como descrito no item 1.4 da introdução.

3.5. Ensaio para medida sérica do colesterol total

Como forma de determinar a atividade hipocolesterolêmica da droga utilizada foi realizada uma medida do colesterol total presente no sangue dos animais. A medida do colesterol foi realizada utilizando-se o kit disponibilizado comercialmente denominado *Kit de Colesterol Enzimático Líquido Doles* (Doles Reagentes e Equipamentos para Laboratórios Ltda, Goiânia, Brasil), para a determinação enzimática do colesterol total no soro ou plasma.

O kit usado tem como princípio a quantificação do colesterol no soro através das seguintes reações químicas:



O produto formado pela oxidação da 4-aminoantipirina (4-antipirilquinonimina) é de coloração avermelhada e sua intensidade diretamente proporcional à concentração de colesterol no soro. A cor vermelha, formada pela reação, é medida em espectrofotômetro ou fotocolorímetro com absorção máxima em 510nm ou filtro verde.

3.6. Ensaio imunoenzimático (ELISA) para citocinas séricas

No momento da necropsia, foram coletados aproximadamente 2mL de sangue dos camundongos, através do plexo retro orbital. Essas amostras foram então centrifugadas a 3000rpm durante 10 minutos a uma temperatura de 4°C. O sobrenadante foi então coletado e armazenado em tubos *ependorf* de 0,5mL à -80°C, para análises posteriores.

Foram realizados testes imunoenzimáticos para as citocinas IFN- γ , TNF- α e IL-10 utilizando-se o soro de todos os grupos de animais. Utilizando-se de placas de 96 poços, foram adicionados 100uL de anticorpo monoclonal contra a proteína (citocina) a ser dosada, diluídos em PBS contendo 0,1% de albumina de soro bovino – BSA (SIGMA). Após incubação por 12 horas à temperatura ambiente, os anticorpos não adsorvidos foram descartados e as placas bloqueadas com 300uL/poço de uma solução contendo PBS-BSA 1%, durante 1 hora a 37°C. As amostras de soro, previamente padronizadas por nosso grupo, foram aplicadas em um volume de 100uL para cada poço. Paralelamente, a proteína investigada foi diluída em várias concentrações para o estabelecimento da curva padrão e, a seguir, realizada a incubação por 12 horas à temperatura ambiente. Posteriormente, os anticorpos secundários foram diluídos em PBS-BSA 0,1% e incubados por 2 horas à temperatura ambiente. Finalmente, 100uL de estreptoavidina ligada à peroxidase na

diluição de 1:4000 em PBS-BSA 0,1% foram adicionados à placa e a mesma foi mantida a sob agitação por 30 minutos. O cromógeno escolhido para revelação foi o OPD (θ -phenylenediamine – SIGMA), diluído em tampão citrato de acordo com recomendação do fabricante. No momento da aplicação de 100uL desta solução nos poços, foi ainda adicionado 2uL/placa de H_2O_2 30 volumes, como catalisador da reação. Após 20 minutos de incubação em ausência de luz, a reação foi bloqueada adicionando-se 50uL de H_2SO_4 3M por poço. A leitura da intensidade de marcação foi realizada em leitor de ELISA utilizando-se o comprimento de onda de 490nm. Para a realização desses testes foram utilizados kits disponibilizados comercialmente.

3.7. Análise das lesões cardíacas

3.7.1. Processamento histológico

Os corações foram fixados em solução de formol a 10% em PBS, desidratados em álcoois de concentrações crescentes (70%, 80%, 90%, 95% e 100%), diafanizados em xilol e incluídos em parafina. Os blocos de parafina foram cortados em micrótomo, corados pela técnica de hematoxilina e eosina (HE), descrita abaixo, e montados em lâminas.

3.7.2. Coloração por Hematoxilina-Eosina

Essa coloração foi realizada com a finalidade de analisar o infiltrado inflamatório nos cortes do tecido cardíaco dos animais supracitados. Para isso, foram realizados cortes seccionais com 4 μ m de espessura do átrio e ventrículo esquerdos, os quais foram desparafinizados em dois banhos de xilol, 15 minutos cada, hidratados em soluções alcoólicas de concentrações decrescentes de álcool (100%, 90%, 80% e 70%), 10 minutos em cada, lavados em água corrente por 10 minutos e em tampão fosfato (PBS) pH 7,2 por 5 minutos. Em seguida, os cortes foram corados pela Hematoxilina por 10 minutos, lavados em água corrente e diferenciados rapidamente em álcool acidulado, e logo após lavados novamente em água corrente. Depois, foram corados pela Eosina durante 1 minuto. Após o último processo de lavagem em água corrente, as lâminas com os cortes foram colocadas na

estufa à 56° C para secagem. Ao final, as lâminas foram montadas com lamínulas e *Etellan* e submetidas à análise em microscopia óptica.

3.7.3. Análise morfológica qualitativa e quantitativa dos tecidos

Aspectos qualitativos dos miocárdios dos animais dos diversos grupos foram analisados e documentados. Para quantificação de celularidade do miocárdio, 15 imagens de cada coração foram obtidas com a objetiva de 40 X através do programa de captura de imagens *Leica Application Suite* do Laboratório multiusuário do NUPEB/UFOP. As imagens obtidas foram então analisadas automaticamente pelo programa *Leica Qwin*, no mesmo laboratório, através da seleção de pixels com coloração característica para núcleos celulares corados por hematoxilina. O número de células quantificadas por imagem do mesmo coração foi somado e a média do número de células para cada grupo foi obtida.

3.8. Avaliação do tamanho relativo dos corações

Os corações foram removidos para as análises macro e microscópica após o sacrifício dos animais. Para isso, o peso do órgão foi determinado e relacionado com o peso de cada animal, obtendo-se um índice de peso (IP) [(IP=Peso do órgão (mg)÷Peso do camundongos(mg)].

3.9. Análise estatística

Os resultados foram expressos como uma média +/- SEM. As análises foram realizadas através do programa PRISMA 4.0, usando Anova simples (teste de Tukey). Valores $p < 0.05$ foram considerados significantes.

RESULTADOS

5. Resultados

5.1. Determinação da dose de Sinvastatina

Para o estabelecimento da curva dose-resposta da Sinvastatina, optou-se por utilizar doses previamente descritas na literatura para modelos experimentais (20mg/Kg de peso corporal), uma vez que essa dose também foi descrita em avaliação clínica em humanos apresentando efeitos cardioprotetores desejáveis. Assim, testou-se uma dose inferior (2mg) a 20mg e duas outras doses superiores (40 e 80mg), para que fossem avaliados critérios de parasitemia e mortalidade.

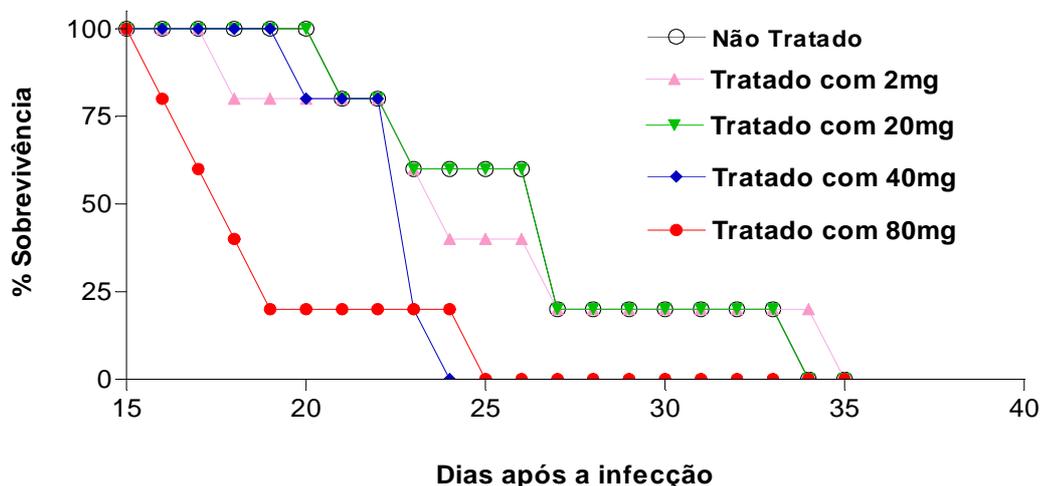


Gráfico 1: Teste de toxicidade para diferentes doses de Sinvastatina em animais C57BL/6 infectados com *T. cruzi*. Os animais foram divididos em 5 grupos com 8 animais cada, sendo que 1 grupo não recebeu tratamento, e os outros 4 grupos receberam diferentes doses, a saber, 2, 20, 40 e 80mg/Kg de peso corporal. Os animais foram infectados com uma dose de 500 formas tripomastigotas de *T. cruzi* por via intraperitoneal.

Observando o gráfico 1, podemos notar que as doses de 40 e 80mg/kg de peso corporal mostraram-se tóxicas aos animais, uma vez que no 25º dia já não existiam mais animais vivos nos grupos submetidos a essas doses. Para os grupos tratados com 2 e 20mg/kg de peso corporal, as taxas de sobrevivência foram similares e maiores do que as exibidas pelos dois grupos anteriores. O grupo não tratado

apresentou uma curva de sobrevivência rigorosamente igual ao grupo tratado com 20mg/kg de peso corporal, como também pode ser verificado no gráfico 1.

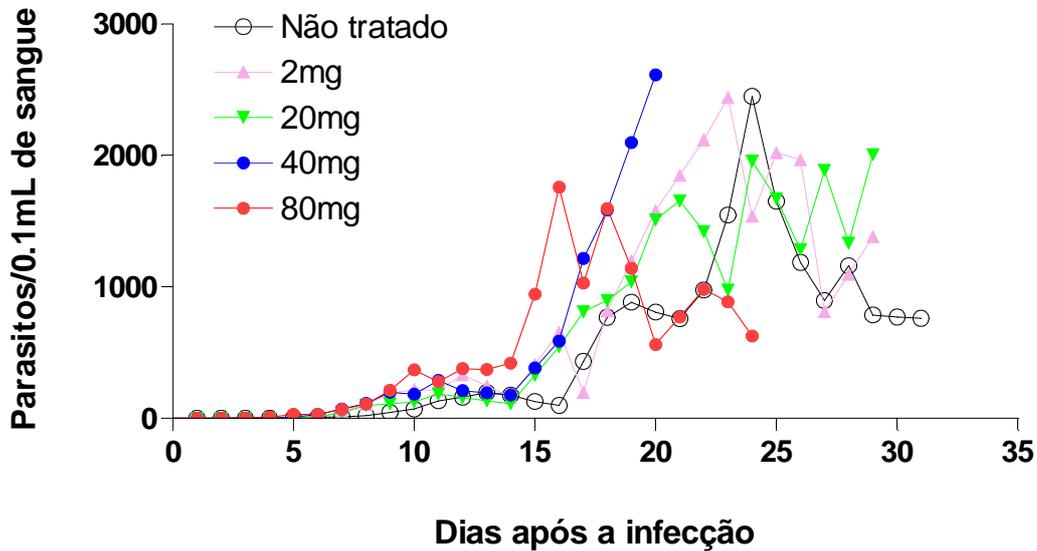


Gráfico 2: Efeitos de diferentes doses de Sinvastatina sobre as curvas de parasitemia de animais C57BL/6 infectados com *T. cruzi*. Os animais foram infectados com uma dose de 500 formas tripomastigotas de *T. cruzi* por via intraperitoneal e tratados, diariamente com 2, 20, 40 e 80mg/Kg de Sinvastatina/peso corporal.

Analisando o gráfico 2, notamos que o grupo que apresentou o mais alto pico de parasitemia, por volta do 20º dia, foi o grupo tratado com 40mg/kg de peso corporal, uma dose relativamente alta de Sinvastatina. O grupo tratado com 2mg/kg de peso corporal retardou o pico de parasitemia, que ocorreu por volta do 24º dia, mas por outro lado manteve a parasitemia num nível consideravelmente alto até o 30º dia pós-infecção. O grupo tratado com 20mg/kg de peso corporal não apresentou um pico de parasitemia definido, uma vez que apresentou picos em dias alternados desde o 21º dpi até o momento do sacrifício, que ocorreu no 30º dpi. Já o grupo tratado com 80mg/kg de peso corporal apresentou o mais rápido pico de parasitemia, mas um nível de parasitos menor do que a maioria dos outros grupos, embora os animais desse grupo não tenham sobrevivido a um período superior a 25 dpi. O grupo não tratado eliminou os parasitos por volta do 30º dia pós-infecção e apresentou uma parasitemia semelhante aos grupos tratados com 2 e 20mg/kg de peso corporal.

Após essa triagem inicial, optamos por continuar nosso trabalho utilizando a dose de 20mg/kg de peso corporal, tanto pelos resultados satisfatórios obtidos com essa dosagem nesses experimentos iniciais, quanto por ser essa dose a usualmente utilizada em trabalhos na literatura; além dessa dose também já ter sido utilizada em outro trabalho de nosso laboratório em modelo canino, o que facilitaria futuras comparações.

5.2. Determinação da parasitemia e mortalidade dos animais

Analisando as curvas de parasitemia dos dois grupos infectados de nosso experimento (IT e INT) no gráfico 3, percebemos que os dois grupos em questão apresentaram uma curva semelhante. Os parasitos no sangue começaram a ser detectados no 10º dia de infecção e os picos de parasitemia ocorreram nos mesmos dias (23º e 26º dpi); esses dados mostram que não houve diferenças entre os dois grupos infectados, tratados ou não com Sinvastatina.

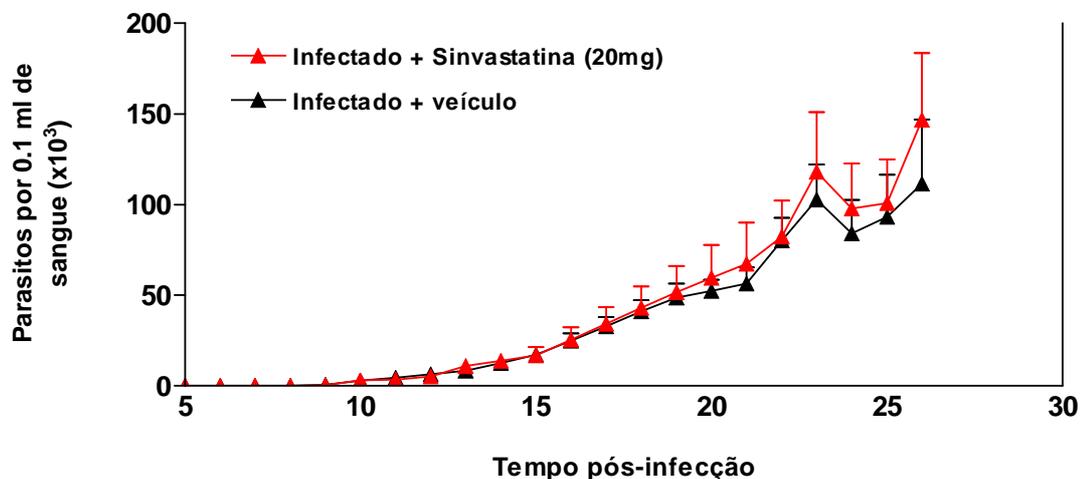


Gráfico 3: Curvas de parasitemia de animais C57BL/6 infectados com *T. cruzi*, tratados ou não com Sinvastatina. Os animais (n=8) foram infectados com uma dose de 500 formas tripomastigotas de *T. cruzi* por via intraperitoneal. O grupo IT recebeu uma dose diária de 20mg/Kg de peso corporal, enquanto o grupo INT recebeu o veículo.

No gráfico 4 são apresentadas as curvas de mortalidade dos 4 grupos avaliados nesse experimento.

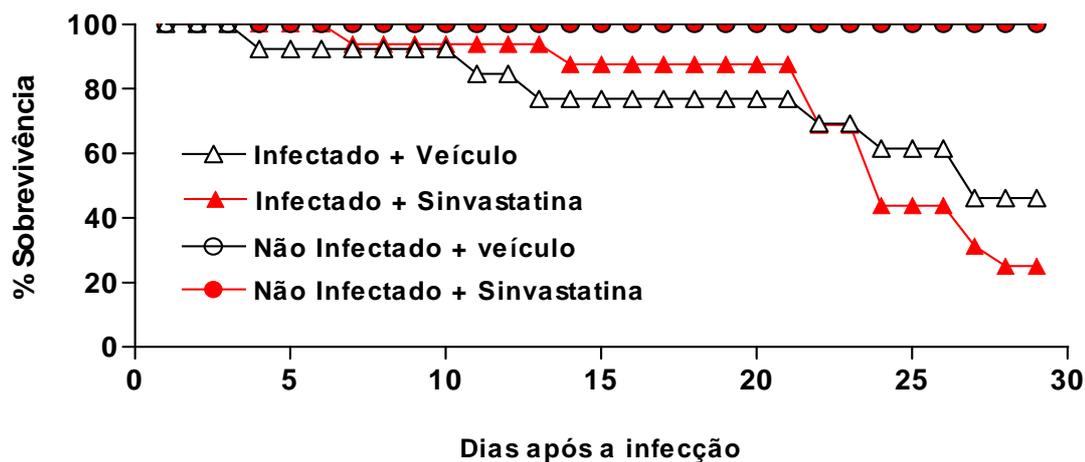


Gráfico 4: Efeitos do tratamento com Sinvastatina sobre as curvas de mortalidade de animais C57BL/6 infectados com *T. cruzi*. Os animais foram infectados com uma dose de 500 formas tripomastigotas de *T. cruzi* por via intraperitoneal, e tratados diariamente com Sinvastatina com uma dose de 20mg/Kg de peso corporal.

Podemos observar no gráfico 4 que como esperado o grupo NINT não apresentou nenhuma morte durante o período do experimento, que foi de 30 dias, reforçando a ausência de possíveis interferências externas como patógenos que não o *T. cruzi*. Outra confirmação é a de que a droga não foi tóxica aos camundongos, uma vez que o grupo NIT apresentou curva de mortalidade semelhante ao grupo NINT, ou seja, não houve morte de camundongos durante o período do experimento; esses dois grupos anteriores apresentam suas curvas de sobrevivência sobrepostas no gráfico. O grupo INT apresentou aproximadamente 40% de seus animais vivos até o 30º dia de infecção (dia da necrópsia), e justamente o grupo IT foi o que apresentou o menor número de animais ao final de 30 dias, com aproximadamente 20% de sobrevivência ao final do período de 30 dias.

5.3. Avaliação da atividade anti-colesterolêmica da Sinvastatina

Os animais dos grupos tratados apresentaram um menor teor de colesterol no soro em comparação com os respectivos grupos não tratados, gráfico 5. O teor de colesterol no grupo NIT foi um pouco menor do que no grupo NINT, embora essa diferença não tenha sido significativa. Da mesma maneira, dentre os grupos infectados, o grupo IT teve menos colesterol do que o grupo INT, mas essa diferença também não foi significativa. Resultados significativos foram encontrados quando comparados os grupos NINT com IT (com um valor $p < 0,001$) e INT (com um valor $p < 0,05$). Em suma, a droga foi eficaz na redução do colesterol total no soro, uma vez que em todos os grupos tratados o teor de colesterol foi menor quando comparados aos grupos não tratados. É interessante observar que dentre os animais que foram tratados com Sinvastatina, os que eram infectados apresentaram uma maior redução no colesterol sérico do que aqueles que não eram infectados.

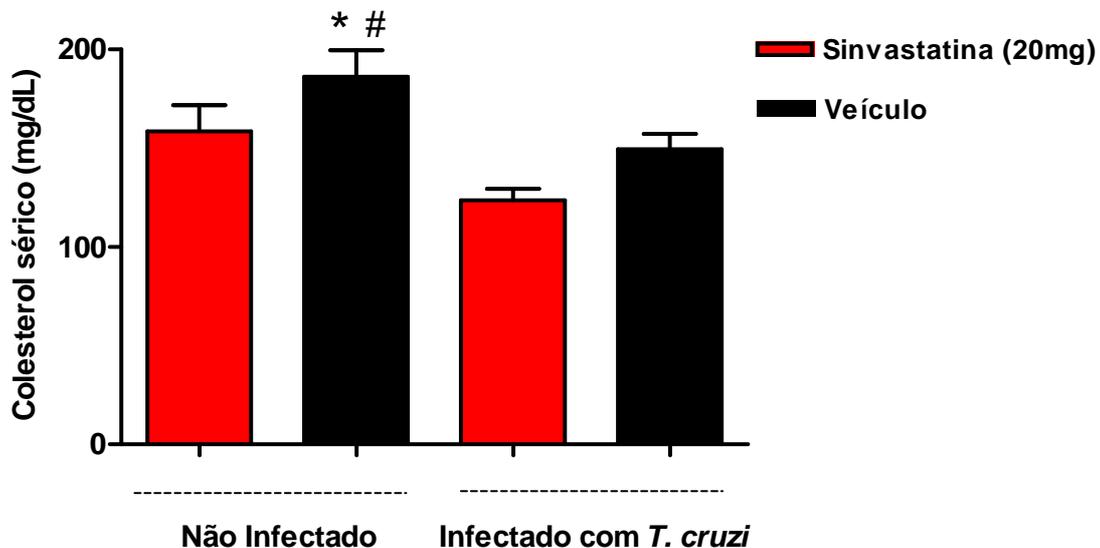


Gráfico 5: Determinação enzimática do colesterol total no soro em mg/dL. O colesterol total no soro dos animais foi quantificado seguindo o protocolo do *Kit de Colesterol Enzimático Líquido Doles* (Doles Reagentes e Equipamentos para Laboratórios Ltda, Goiânia, Brasil). Os animais foram tratados diariamente com Sinvastatina com uma dose de 20mg/Kg de peso corporal. (* $p < 0.001$, quando comparado ao grupo IT; # $p < 0.05$, quando comparado ao grupo INT).

5.4. Determinação da produção de citocinas pró e antiinflamatórias

O gráfico 6A mostra que no grupo IT a produção da citocina pró-inflamatória TNF- α foi significativamente menor do que no grupo INT. Da mesma maneira, podemos observar no gráfico 6B que a produção de IFN- γ , uma outra citocina pró-inflamatória, também é significativamente menor no grupo IT do que no grupo INT. Já no gráfico 6C, em que temos os resultados para a citocina regulatória IL-10, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos infectados tratados e não tratados.

Quanto aos grupos não infectados nesses experimentos, é possível notar pelos gráficos 6A, 6B e 6C que os mesmos não apresentaram diferenças significativas quando tratados ou não.

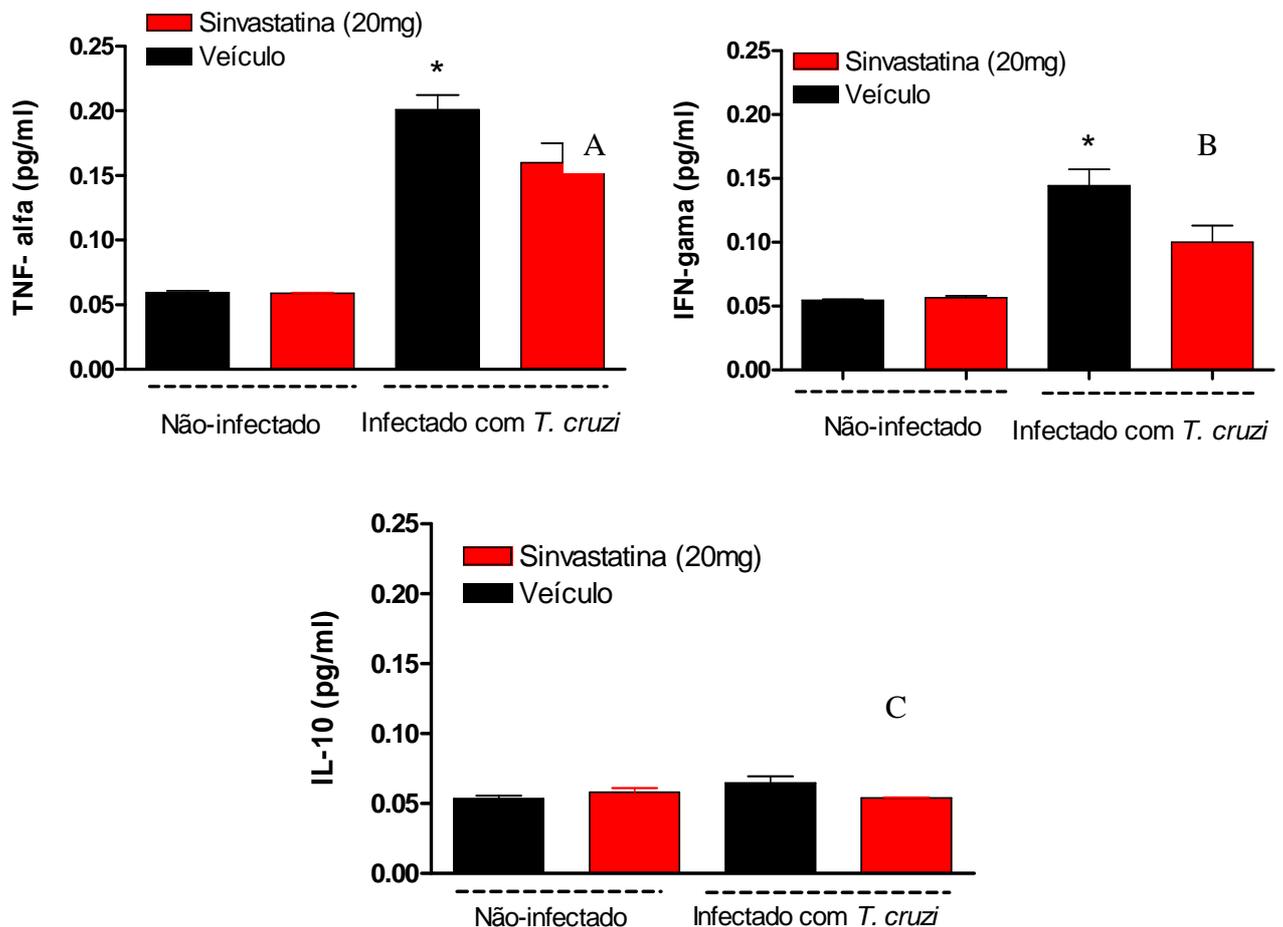


Gráfico 6: Produção sérica de citocinas pró-inflamatórias TNF- α e IFN- γ , e regulatória IL-10. Os animais foram infectados ou não pelo *T. cruzi* e o soro coletado, após 30 dias, da terapia com Sinvastatina (20mg) para avaliação das citocinas TNF- α (A), IFN- γ (B) e IL-10 (C). Os resultados são apresentados como uma média \pm SEM. (* $p < 0.05$, quando comparado ao grupo infectado tratado, tanto para o gráfico A quanto para o gráfico B).

5.5. Análises histopatológicas

5.5.1. Análise histopatológica qualitativa

A análise histopatológica do miocárdio dos animais não infectados, tratados (NIT) ou não (NINT), aos 30 dias pós-infecção, revelou um miocárdio relativamente preservado com cardiomiócitos ramificados e anastomosados com núcleo central (Figura 3, A e B). Os miocárdios dos animais infectados pelo *T.cruzi* e não tratados (INT) apresentaram um intenso infiltrado inflamatório, com predomínio de células mononucleares e ninhos de amastigotas (Figura 3C). Os animais infectados por *T.cruzi* e tratados (IT) apresentaram infiltrado inflamatório em seu miocárdio, porém em menor intensidade que nos animais infectados e não tratados (INT) (Figura 3D).

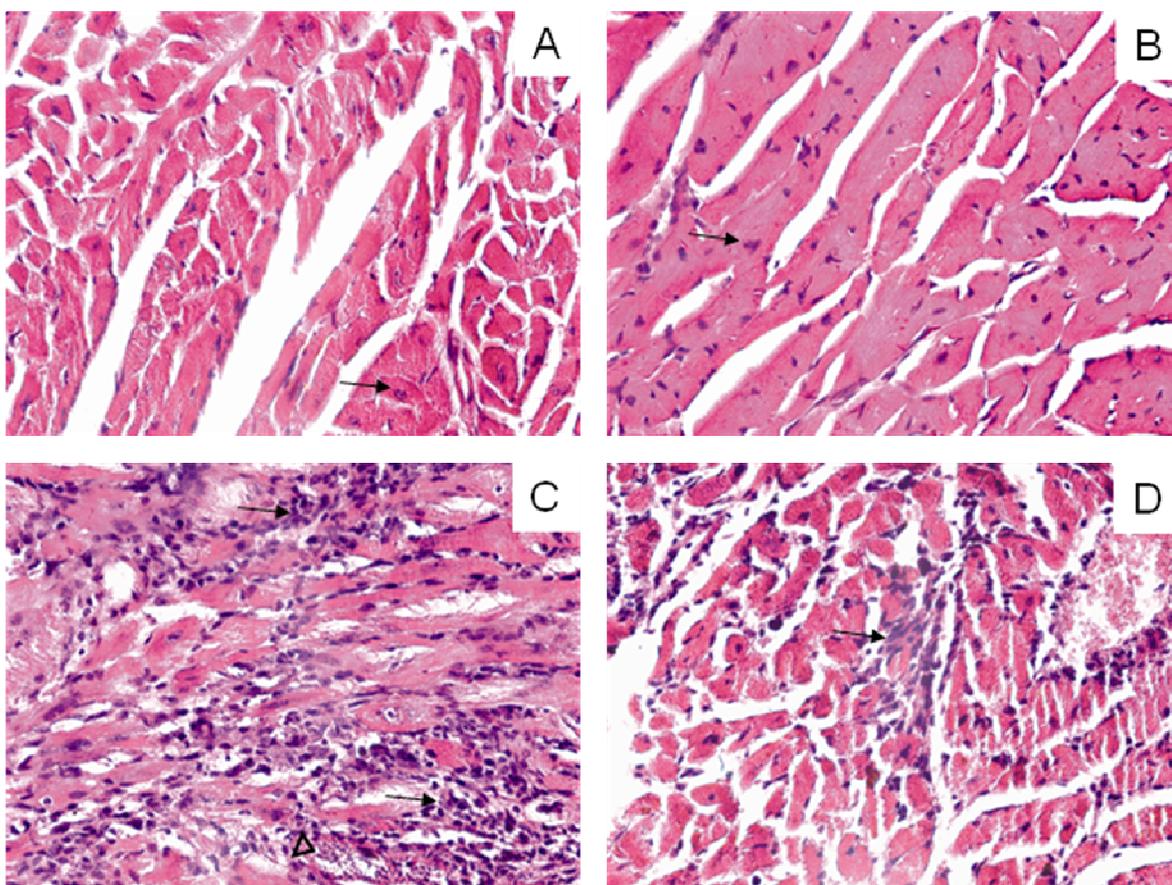


Figura 3: Fotomicrografia de cortes histológicos dos tecidos cardíacos. Os camundongos dos grupos não infectados e não tratados (A) e não infectados tratados (B) aos 30 dias pós-infecção, na fase aguda da infecção pelo *T. cruzi*, apresentaram miocárdio relativamente preservado com cardiomiócitos ramificados e anastomosados com núcleo central (setas). Camundongos infectados e não tratados (C) e infectados tratados (D), aos 30 dias pós-infecção, na fase aguda da infecção pelo *T. cruzi*. Miocardite com presença de infiltrado inflamatório predominantemente mononuclear (setas), apresentando-se de maior intensidade nos animais infectados e não tratados (C) em comparação aos animais infectados tratados (D). Presença de ninhos de amastigotas (C, cabeça de seta). Objetiva: 40X, HE.

5.5.2. Análise histopatológica quantitativa

A análise morfométrica da celularidade do miocárdio dos animais C57/BL6 revelou que o tratamento por 30 dias com Sinvastatina foi capaz de reduzir significativamente o número de células inflamatórias no grupo de animais infectados pelo *T. cruzi* em comparação àqueles que não receberam o fármaco. Vale ressaltar que o gráfico 7 representa o número total de células, englobando tanto células miocárdicas quanto células inflamatórias. Nesse sentido, o efeito antiinflamatório da Sinvastatina pode ser melhor visualizado comparando os grupos infectados com aquele não infectado e não tratado. De forma interessante, o tratamento com a Sinvastatina também foi capaz de reduzir o número de células miocárdicas de forma representativa.

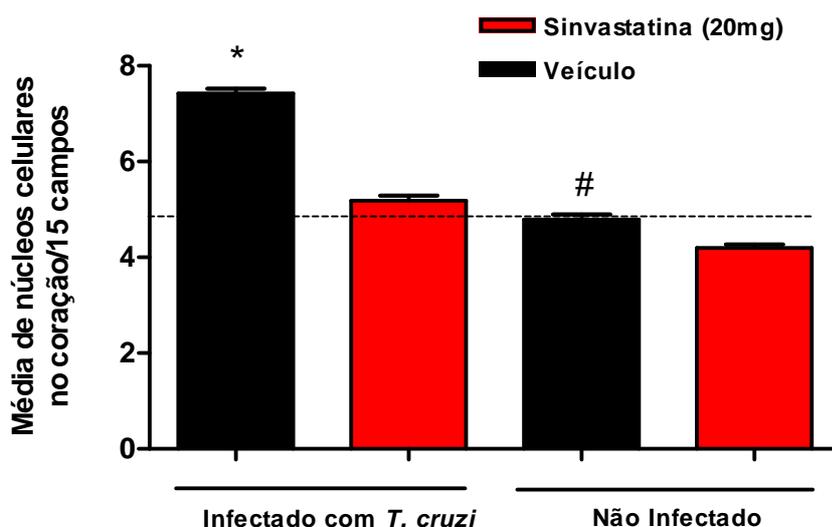


Gráfico 7: Efeitos do tratamento com Sinvastatina sobre o infiltrado inflamatório nos tecidos cardíacos de animais C57BL/6 infectados com *T. cruzi*. Os animais foram infectados com uma dose de 500 formas tripomastigotas de *T. cruzi* por via intraperitoneal e tratados diariamente com Sinvastatina 20mg/Kg. Os núcleos celulares foram usados como parâmetros de análise inflamatória (15 campos em cada amostra de coração analisados no programa *Leica QWin*). Os dados foram apresentados como uma média +/- SEM usando Anova simples (teste de Tukey). (* $p < 0,05$, quando comparado aos demais grupos; # $p < 0,05$, quando comparado ao grupo não infectado tratado).

5.6. Avaliação relativa dos pesos dos corações/pesos corporais dos camundongos

Conforme mostrado no gráfico 8, os animais infectados pelo *Trypanosoma cruzi* apresentaram aumento da relação peso coração/corporal se comparado com os animais não infectados pelo parasito, independentes da terapêutica farmacológica. Por outro lado, não houve diferenças entre aqueles camundongos infectados pelo *T. cruzi* tratados ou não com baixas doses diárias de Sinvastatina.

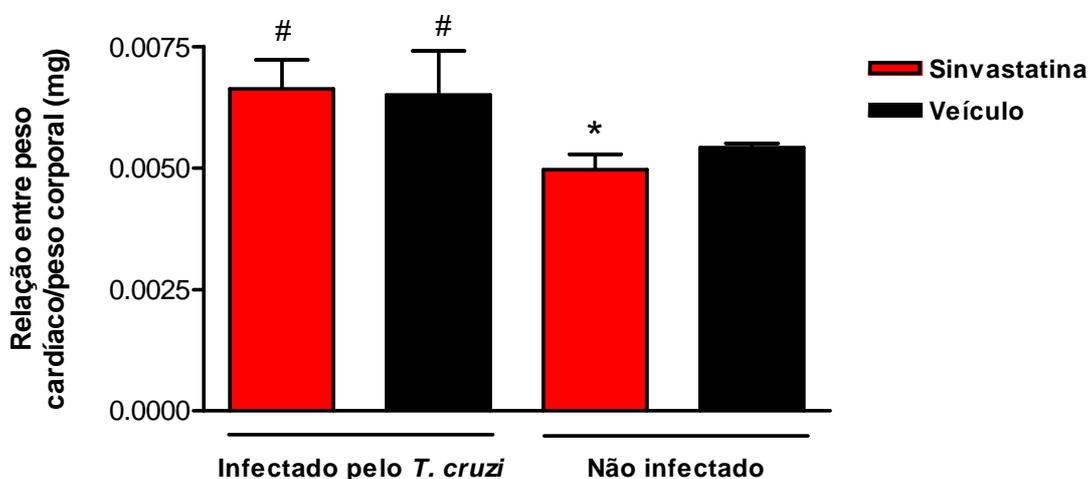


Gráfico 8: Efeitos do tratamento com Sinvastatina na relação peso cardíaco/peso corporal. Camundongos C57BL6 infectados pelo *T. cruzi* foram tratados diariamente com Sinvastatina com uma dose de 20mg/Kg por 30 dias e sacrificados, posteriormente. O animal foi pesado, juntamente com seu órgão cardíaco (isoladamente) e a relação entre ambos estabelecida para cada grupo. Os dados foram mostrados como média do grupo +/- SEM sendo (* $p < 0.05$, quando comparado aos demais grupos; # $p < 0,05$, quando comparado ao grupo não infectado tratado).

DISCUSSÃO

6. Discussão

As estatinas têm ganhado destaque na última década não apenas por suas ações anti-colesterolêmicas, mas também pelos efeitos pleiotrópicos observados principalmente na regulação da resposta imune (Yoshida, 2003; Weitz-Schmidt, 2002). Nenhum trabalho foi publicado avaliando-se os efeitos pleiotrópicos das estatinas sobre a resposta inflamatória cardíaca e sistêmica desencadeadas pela presença do *Trypanosoma cruzi* ou de seus antígenos, em modelos experimentais da doença de Chagas.

Os efeitos moduladores ou antiinflamatórios das estatinas em doenças inflamatórias cardíacas de diferentes etiologias têm sido testados em diferentes dosagens, tendo as doses reduzidas (10 a 40mg/dia) apresentado resultados satisfatórios em humanos (Castro *et al*, 2008; Cheng *et al*, 2005; Ascer *et al*, 2004). Nesse sentido, em nosso trabalho a dose de 20mg/kg de peso corporal foi a dose escolhida, tanto pelos resultados apresentados durante a padronização de nossos experimentos, quanto por aqueles demonstrados na literatura para seres humanos e animais experimentais (Foody *et al*, 2010; Ose *et al*, 2009). Ainda no que diz respeito à dosagem, altas doses de Sinvastatina podem ser tóxicas aos animais, uma vez que em nossos experimentos os camundongos submetidos às doses de 40 e 80mg/kg de peso corporal foram aqueles que mais rapidamente sucumbiram à infecção pelo *T. cruzi*. Esse possível efeito tóxico já foi demonstrado em uma recente revisão indicando que a Sinvastatina poderia, em altas doses, causar miotoxicidade em humanos (Backes *et al*, 2009); além de outro trabalho que concluiu que as estatinas deveriam ter suas doses estabelecidas de acordo com o perfil genético do paciente (Niemi, 2010), ou seja, doses ajustadas para cada paciente.

Pelo fato das estatinas interferirem com a resposta imune, mudando um perfil de resposta do tipo Th1 para o tipo Th2 (Cheng *et al*, 2005), um efeito hipotético para altas doses desse fármaco no modelo experimental da doença de Chagas seria uma exacerbada supressão do sistema imune. Dessa forma, ocasionaria uma morte mais rápida dos animais devido ao alto número de parasitos, o que poderia inviabilizar sua utilização em nosso modelo.

Em relação à doença de Chagas, existe apenas um trabalho mostrando o uso de estatinas (lovastatina) como agente antiproliferativo do *T. cruzi* na associação

quimioterápica entre cetoconazol e terbinafina (Urbina *et al*, 1993). Esses resultados confirmaram a ação sinérgica dessa associação entre a lovastatina e os demais agentes quimioterápicos contra os estágios proliferativos do *T. cruzi* *in vivo* e *in vitro*. Em nossos experimentos não observamos uma ação da Sinvastatina na capacidade replicativa do *T. cruzi*, ao contrário disso, os camundongos tratados apresentaram maior carga parasitária em comparação com os animais não tratados. Esse fato poderia ser explicado pela diminuição da resposta inflamatória ocasionada pelos efeitos pleiotrópicos da Sinvastatina, o que estaria facilitando a sobrevivência dos parasitos nos animais submetidos ao tratamento.

Dados recentes de nosso grupo, desenvolvidos em modelo canino, comprovam essa relação direta entre estatinas e o favorecimento da capacidade replicativa do *T. cruzi* (Melo, 2009). Uma possível hipótese para esses achados de nosso grupo seria a ação imunossupressora desse fármaco que, no modelo estudado, promoveria a sobrevivência dos parasitos pela redução direta/indireta da resposta inflamatória inicial – essencial para o controle parasitário. Alguns trabalhos têm também apontado para esse efeito imunossupressor em: (i) cardiopatias de diferentes etiologias, como a diminuição do estresse oxidativo, inflamação e melhoria da função endotelial (Castro *et al*, 2008) em pacientes com falha cardíaca crônica, (ii) pacientes hipercolesterolêmicos apresentando redução de marcadores inflamatórios como TNF, IL-1, IL-6 e ICAM-1 (Ascer *et al*, 2004) ou ainda em (iii) pacientes com infarto agudo do miocárdio apresentando redução do perfil Th1 (Cheng *et al*, 2005).

Com base nesses vários trabalhos, e tendo em vista que a doença de Chagas é uma doença altamente inflamatória, propusemos nesse estudo avaliar a eficácia da Sinvastatina na redução dos efeitos inflamatórios provocados por essa doença. Nesse sentido, avaliamos a produção de 3 citocinas envolvidas na infecção pelo *T. cruzi*, IFN- γ , TNF- α e IL-10, tendo as mesmas sido citadas em diversos trabalhos experimentais (Cunha-Neto *et al*, 2005; Talvani *et al*, 2004) e em seres humanos (Moretti *et al*, 2002; Abel *et al*, 2001), cujas funções estão relacionadas aos processos de controle parasitário inicial e ao desenvolvimento das lesões cardíacas. Apesar de importantes para conter a proliferação do parasitismo tecidual e sanguíneo, as citocinas pró-inflamatórias IFN- γ e TNF- α estão intimamente ligadas ao desenvolvimento de lesões cardíacas, tanto que pacientes com CCC apresentam uma elevada produção periférica dessas citocinas quando comparados aos pacientes com as formas indeterminada e/ou assintomática da doença de Chagas (Cunha-Neto

et al, 2009). Por outro lado, uma resposta mediada por IL-10 leva a um controle do processo inflamatório a longo prazo (Hunter *et al*, 1997). Possivelmente isso ocorre naqueles pacientes portadores de CCC apresentando baixo número de células T regulatórias produtoras de IL-10 (Araujo *et al*, 2007) e baixos níveis plasmáticos de IL-10, em contrapartida aos altos níveis de IFN- γ e TNF- α (Abel *et al*, 2001).

Nossos resultados mostraram que a Sinvastatina foi eficaz na redução da produção das citocinas pró-inflamatórias IFN- γ e TNF- α no modelo murino, sem alterar a produção da citocina regulatória IL-10, o que sugere ser favorável ao miocárdio, uma vez que a resposta inflamatória nesse tecido se apresentaria diminuída. Essa hipótese é corroborada por alguns trabalhos em humanos demonstrando que o uso de estatinas diminui a morbidade e a mortalidade e melhora a função ventricular em pacientes com falha cardíaca crônica independente da etiologia da doença (Folkeringa *et al*, 2006; Wojnicz *et al*, 2006). Num trabalho recente de nosso grupo, demonstrou-se em modelo canino que esse mesmo grupo farmacológico foi essencial na redução do perfil de citocinas inflamatórias, na redução do infiltrado inflamatório e na melhora funcional cardíaca de animais infectados pelo *T. cruzi*, principalmente em fase crônica da doença (Melo, 2009). Essa diferença observada nos cães durante a fase crônica recente da doença foi essencial para a perspectiva desse nosso trabalho, pois é sabido que as maiores lesões e/ou alterações funcionais cardíacas ocorrem exatamente na fase crônica da doença. Por outro lado, também é descrito que os eventos iniciais da fase aguda definem o curso da doença tanto em seres humanos quanto em modelos experimentais (Dutra & Gollob, 2008). Dessa forma, nossos dados de fase aguda abrem perspectivas para uma próxima investigação dos efeitos da Sinvastatina na fase crônica da doença de Chagas no modelo murino.

Ainda associado à resposta inicial (fase aguda) da doença de Chagas, vale a pena reforçar que a resposta imune Th1 é um dos principais fatores responsáveis pelas lesões secundárias observadas em infecções parasitárias, como as que ocorrem no curso da infecção pelo *T. cruzi*, originando posteriormente os processos relacionados ao aparecimento de remodelamento cardíaco. Em nosso trabalho, esperávamos que com a diminuição das citocinas pró-inflamatórias ocasionada pelo tratamento com a Sinvastatina diminuísse o infiltrado inflamatório presente nos tecidos cardíacos. Esse menor infiltrado inflamatório acarretaria então em menor dano nesses tecidos, em comparação com os tecidos cardíacos de animais infectados

não submetidos ao tratamento. Essa hipótese foi sustentada por Diomedea *et al*, que demonstrou que a pravastatina previniu o desenvolvimento de vasculopatia coronária em ratos submetidos a transplante cardíaco, devido à inibição da infiltração de macrófagos ao coração enxertado (Diomedea *et al*, 2001). Condizente com essa linha de pensamento, em nosso trabalho a Sinvastatina foi eficaz na diminuição do infiltrado inflamatório nos tecidos cardíacos dos camundongos infectados, como pode ser extraído de nossa análise qualitativa. Os resultados dessa análise inclusive foram corroborados pelos resultados da análise quantitativa, a qual apontou diferenças significativas quanto ao número de núcleos celulares presentes nos tecidos dos 4 grupos experimentais.

A importância dada aqui à diminuição do infiltrado inflamatório no coração se deve ao fato de que quanto maior é a inflamação, possivelmente maior será também a substituição de tecido muscular por tecido fibroso, levando ao processo de remodelamento cardíaco, um importante definidor de CCC. Nesse sentido, embora esperássemos um aumento na relação peso cardíaco/peso corporal nos animais infectados não tratados em relação aos tratados, em nosso trabalho não foi possível comprovar essa hipótese, o que pode estar relacionado ao fato de que analisamos apenas camundongos em fase aguda, os quais ainda não apresentavam fibrose, como de fato não fora constatado em nossas análises histológicas.

Frente aos dados obtidos em nosso trabalho, o uso da Sinvastatina poderia, no futuro, apresentar-se como uma terapia alternativa para o tratamento da cardiopatia chagásica, principalmente por sua característica em: (i) modificar a resposta imune do hospedeiro, (ii) reduzir a resposta inflamatória celular e, como demonstrado em outros experimentos de nosso próprio grupo, (iii) melhorar a função ventricular cardíaca.

CONCLUSÃO

7. Conclusão

Nossos dados mostram que o tratamento diário com doses reduzidas de Sinvastatina (20mg) durante a fase aguda da doença de Chagas experimental foi capaz de:

- (i) Reduzir os níveis séricos de colesterol nos animais;
- (ii) Reduzir os níveis séricos de citocinas pró-inflamatórias (IFN- γ e TNF- α) e, ao mesmo tempo, não alterar o nível de produção basal da citocina regulatória IL-10;
- (iii) Diminuir a intensidade do infiltrado inflamatório no tecido cardíaco daqueles animais infectados.

Sendo esse o primeiro trabalho a estudar os efeitos pleiotrópicos da Sinvastatina na infecção murina pelo *Trypanosoma cruzi*, concluímos que o uso diário de Sinvastatina contribui para um efeito protetor cardíaco em animais infectados pelo *T. cruzi*, possivelmente através da alteração da resposta inflamatória. Essa hipótese seria melhor avaliada através de um tratamento prolongado (superior a 30 dias) e, principalmente, utilizando um modelo crônico da doença devido a alta incidência das lesões cardíacas (fibrose, desarranjo de fibras cardíacas, perda funcional).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

8. Referências Bibliográficas

Abel LC, Rizzo LV, Ianni B, Albuquerque F, Bacal F, Carrara D, Bocchi EA, Teixeira HC, Mady C, Kalil J, Cunha-Neto E. Chronic Chagas' disease cardiomyopathy patients display an increased IFN-gamma response to *Trypanosoma cruzi* infection. *J. Autoimmun.*, 17, 99-107, 2001.

Aliberti JCS, Souto JT, Marino APMP, Lannes-Vieira J, Teixeira MM, Farber J, Gazzinelli RT, Silva JS. Modulation of chemokine production and inflammatory responses in interferon-gamma and tumor necrosis factor-R1-deficient mice during *Trypanosoma cruzi* infection. *Am. J. Pathol.*, 158, 1433-1440, 2001.

Araujo FF, Gomes JA, Rocha MO, Williams-Blangero S, Pinheiro VM, Morato MJ, Correa-Oliveira R. Potential role of CD4+CD25 HIGH regulatory T cells in morbidity in Chagas disease. *Front. Biosci.*, 12, 2797-2806, 2007.

Ascer E, Bertolami MC, Venturinelli ML, Buccheri V, Souza J, Nicolau JC, Ramires JA, Serrano CV Jr. Atorvastatin reduces proinflammatory markers in hypercholesterolemic patients. *Atherosclerosis*, 177, 161-166, 2004.

Backes JM, Howard PA, Ruisinger JF, Moriarty PM. Does simvastatin cause more myotoxicity compared with other statins? *Ann. Pharmacother.*, 43, 2012-2020, 2009.

Bafica A, Santiago HC, Goldszmid R, Ropert C, Gazzinelli RT, Sher A. Cutting edge: TLR9 and TLR2 signaling together account for MyD88-dependent control of parasitemia in *Trypanosoma cruzi* infection. *J. Immunol.*, 177, 3515-3519, 2006.

Bilate, A.M.B. & Cunha-Neto, E. Chagas disease cardiomyopathy: current concepts of an old disease. *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo*, 50, 67-74, 2008.

Braga JC, Labrunie A, Villaça F, do Nascimento E, Quijada L. Thromboembolism in chronic Chagas' heart disease. *Sao Paulo Med. J.*, 113, 862-866, 1995.

Brener Z & Gazzinelli RT. Immunological control of *Trypanosoma cruzi* infection and pathogenesis of Chagas' disease. *Int. Arch. Allergy Immunol.*, 114, 103-110, 1997.

Burleigh BA & Woolsey AM. Cell signaling and *Trypanosoma cruzi* invasion. *Cell Microbiol.*, 4, 701-11, 2002.

Castro PF, Miranda R, Verdejo HE, Greig D, Gabrielli LA, Alcaino H, Chiong M, Bustos C, Garcia L, Mellado R, Vukasovic JL, Godoy I, Lavandero S. Pleiotropic effects of Atorvastatin in heart failure: role in oxidative stress, inflammation, endothelial function, and exercise capacity. *J. Heart Lung Transplant.*, 27, 435-441, 2008.

Cheng X, Liao Y, 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. *The European Journal of Heart Failure*, 7, 1099-1104, 2005.

Coura JR. Chagas disease: what is know and what is needed – A background article. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 102, 113-122, 2007.

Coura, JR. Chagas disease: what is known and what is needed – A background article. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 102, 113-122, 2007.

Cunha-Neto E, Bilate AM, Hyland KV, Fonseca SG, Kalil J, Engman DM. Induction of cardiac autoimmunity in Chagas heart disease: a case for molecular mimicry. *Autoimmunity*, 39, 41-54, 2006.

Cunha-Neto E, Dzau VJ, Allen PD, Stamatou D, Benvenuti L, Higuchi ML, Koyama NS, Silva JS, Kalil J, Liew CC 2005. Cardiac gene expression profiling provides evidence for cytokinopathy as a molecular mechanism in Chagas' disease cardiomyopathy. *Am. J. Pathol.*, 167, 305-313, 2005.

Cunha-Neto E, Moliterno R, Coelho V, Guilherme L, Bocchi E, Higuchi Mde L, Stolf N, Pileggi F, Steinman L, Kalil J. Restricted heterogeneity of T cell receptor variable alpha chain transcripts in hearts of Chagas' disease cardiomyopathy patients. *Parasite Immunol.*, 16, 171-179, 1994.

Cunha-Neto E, Nogueira LG, Teixeira PC, Ramasawmy R, Drigo SA, Goldberg AC, Fonseca SG, Bilate AM, Kalil J. Immunological and non-immunological effects of cytokines and chemokines in the pathogenesis of chronic Chagas disease cardiomyopathy. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 104, 252-258, 2009.

de Souza MM, Andrade SG, Barbosa AAJr, Macedo Santos RT, Alves VA, Andrade ZA. *Trypanosoma cruzi* strains and autonomic nervous system pathology in experimental Chagas' disease. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 91, 217-224, 1996.

Dias E, Laranja FS, Miranda A, Nobrega G. Chagas' disease; a clinical, epidemiologic, and pathologic study. *Circulation.*, 14, 1035-1060, 1956.

Diomedes, L. *In vivo* anti-inflammatory effect of statins is mediated by nonsterol mevalonate products. *Arterioscler. Thromb. Vasc.*, 21, 1327-1332, 2001.

Dupont J, Aubert R, Kuan SI, Warner DA, Camus MC, Herzog J. Hepatic hydroxymethylglutaryl coenzima A reductase activity in inbred strains of mice. *Enzyme*, 40, 198-203, 1988.

Dutra WO & Gollob KJ. Current concepts in immunoregulation and pathology of human Chagas disease. *Curr. Opin. Infect. Dis.*, 21, 287-292, 2008.

Edwards PA, Muroya H, Gould RG. *In vivo* demonstration of the circadian thym of cholesterol biosynthesis in the liver and intestine of the rat. *J. Lipid Res.*, 13, 396-401, 1972.

Endo K, Miyashita Y, Saiki A, Oyama T, Koide N, Ozaki H, Otsuka M, Ito Y, Shirai K. Atorvastatin and pravastatin elevated pre-heparin lipoprotein lipase mass

of type 2 diabetes with hypercholesterolemia. *J. Atheroscler. Thromb.*, 11, 341-347, 2004.

Engman DM & Leon JS. Pathogenesis of Chagas heart disease: role of autoimmunity. *Acta Tropica*, 81, 123-132, 2002.

Ferreira RC, Ianni BM, Abel LC, Buck P, Mady C, Kalil J, Cunha-Neto E. Increased plasma levels of tumor necrosis factor- α in asymptomatic/"indeterminate" and Chagas disease cardiomyopathy patients. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 98, 407-411, 2003.

Folkeringa RJ, Van Kraaij DJ, Tieleman RG, et al. Statins associated with reduced mortality in patients admitted for congestive heart failure. *J. Card. Fail.*, 12, 134-138, 2006.

Fonarow GC, Wright RS, Spencer FA, et al, for the National Registry of Myocardial Infarction 4 Investigators. Effect of statin use within the first 24 hours of admission for acute myocardial infarction on early morbidity and mortality. *Am. J. Cardiol.*, 96, 611-616, 2005.

Fonseca SG, Moins-Teisserenc H, Clave E. Identification of multiple HLA-A*0201-restricted cruzipain and FL-160 CD8⁺ epitopes recognized by T cells from chronically *Trypanosoma cruzi*-infected patients. *Microbes Infect.*, 7, 688-697, 2005.

Foody JM, Joyce AT, Jeffers BW, Liu LZ, Benner JS. A Large Observational Study of Cardiovascular Outcomes Associated With Atorvastatin or Simvastatin Therapy in Hypertensive Patients Without Prior Cardiovascular Disease. *Am. J. Ther.*, 2010.

Gazzinelli RT, Talvani A, Camargo MM, Santiago HC, Oliveira MA, Vieira LQ, Martins GA, Aliberti JC, Silva JS. Induction of cell-mediated immunity during early stages of infection with intracellular protozoa. *Brazilian Journal of Medical and*

Biological Research: Revista brasileira de pesquisas médicas e biológicas/Sociedade Brasileira de Biofísica, 31, 89-104, 1998.

Gironès N, Carrasco-Marin E, Cuervo H, Guerrero NA, Sanoja C, John S, Flores-Herráez R, Fernández-Prieto L, Chico-Calero I, Salgado H, Carrión J, Fresno M. Role of *Trypanosoma cruzi* autoreactive T cells in the generation of cardiac pathology. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1107, 434-444, 2007.

Greer JJ, Kakkar AK, Elrod JW, Watson LJ, Jones SP, Lefer DJ. Low-dose simvastatin improves survival and ventricular function via eNOS in congestive heart failure. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, 291, 2743-2751, 2006.

Hagar JM & Rahintoola SH. Chagas' heart disease in the United States. *N. Engl. J. Méd.*, 325, 763-768, 1991.

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.*, 93, 948-956, 2003.

Hayashidani S, Tsutsui H, Shiomi T, et al. Fluvastatin, a 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzima A reductase inhibitor, attenuates left ventricular remodeling and failure after experimental myocardial infarction. *Circulation* 2002; 105, 868-73.

Herbella FAM, Oliveira DRCF, Delgrande JC. Are Idiopathic and Chagasic Achalasia. Two Different Disease? *Digestive Disease Sciences*, 49, 353-360, 2004.

Higuchi ML, Brito T, Parzianello LC, Fukasawa S, Ramires JA. Severe arteriolar dilatation and ischemic lesions in chronic Chagas' cardiopathy: a 3D confocal laser microscopic study. *J. Am. Coll. Cardiol.*, 31, 382, 1998.

Higuchi ML, Gutierrez PS, Aiello VD, Palomino S, Bocchi E, Kalil J, Bellotti G, Pileggi F. Immunohistochemical characterization of infiltrating cells in human chronic chagasic myocarditis: comparison with myocardial rejection process. *Virchows Arch. A. Pathol. Anat. Histopathol.*, 423, 157-160, 1993.

Hoff R, Teixeira RS, Carvalho JS, Mott KE. *Trypanosoma cruzi* in the cerebrospinal fluid during the acute stage of Chagas' disease. *N. Engl. J. Méd.*, 298, 604-606, 1978.

Hunter CA, Ellis-Neyes LA, Slifer T, Kanaly S, Grunig G, Fort M, Rennick D, Araujo FG. IL-10 is required to prevent immune hyperactivity during infection with *Trypanosoma cruzi*. *J. Immunol.*, 158, 3311-3316, 1997.

Hyland KV & Engman DM. Further thoughts on where west and on the autoimmunity hypothesis of Chagas disease. *Trends Parasitol.*, 22, 101–102, 2006.

Jones PJ & Schoeller DA. Evidence for diurnal periodicity in human cholesterol synthesis. *J. Lipid Res.*, 31, 667-673, 1990.

Kirchhoff LV. Chagas disease. American trypanosomiasis. *Infect. Dis. Clin. North. Am.*, 7, 487-502, 1993.

Köberle F. Chagas' heart disease and Chagas' syndromes: the pathology of American trypanosomiasis. *Adv. Parasitol.*, 6, 63–116, 1968.

Lambrecht FL. Biological variations in trypanosomes and their relation to the epidemiology of Chagas' disease. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, 7, 346-352, 1965.

Leon JS, Godsel LM, Wang K, Engman DM. Cardiac myosin autoimmunity in acute chagas' heart disease. *Infect. Immun.*, 69, 5643-5649, 2001.

Machado CR, Caliari MV, de Lana M, Tafuri WL. Heart autonomic innervation during the acute phase of experimental American trypanosomiasis in the dog. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 59, 492-496, 1998.

Marin-Neto JA, Cunha-Neto E, Maciel BC, Simões MV. Pathogenesis of Chronic Chagas Heart Disease. *Circulation*, 115, 1109-1123, 2007.

Marin-Neto JA, Marzullo P, Marcassa C, Gallo Jr L, Maciel BC, Bellina CR, L'Abbate AL. Myocardial perfusion abnormalities in chronic Chagas' disease as detected by thallium-201 scintigraphy. *Am. J. Cardiol.*, 69, 780-784, 1992.

Melo, L. Efeitos da Sinvastatina e do treinamento físico aeróbico sobre o remodelamento cardíaco em cães apresentando cardiopatia chagásica crônica. Universidade Federal de Ouro Preto, p. 85, 2009.

Mora S & Ridker PM. Justification for the Use of Statins in Primary Prevention: An Intervention Trial Evaluating Rosuvastatin (JUPITER)— Can C-Reactive Protein Be Used to Target Statin Therapy in Primary Prevention? *The American Journal of Cardiology*, 97 (2A), 2006.

Morimoto H, Takahashi M, Shiba Y, Izawa A, Ise H, Hongo M, Hatake K, Motoyoshi K, Ikeda U. Bone marrow-derived CXCR4+ cells mobilized by macrophage colony-stimulating factor participate in the reduction of infarct area and improvement of cardiac remodeling after myocardial infarction in mice. *Am. J. Pathol.*, 171, 755-766, 2007.

Naoumova RP, Patel DD, O'Neill FH, Thompson GR, Knight BL. Treatment with atorvastatin alters the ratio of interleukin-12/interleukin-10 gene expression. *Eur. J. Clin. Invest.*, 33, 88-91, 2003.

Niemi M. Transporter pharmacogenetics and statin toxicity. *Clin. Pharmacol. Ther.*, 87, 130-133, 2010.

Noma K, Oyama N, Liao JK. Physiological role of ROCKS in the cardiovascular system. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.*, 290, 661-668, 2006.

Ose L, Budinski D, Hounslow N, Arneson V. Comparison of pitavastatin with simvastatin in primary hypercholesterolaemia or combined dyslipidaemia. *Curr. Med. Res. Opin.*, 25, 2755-2764, 2009.

Pontes, MRN & Leães, PE. Remodelamento ventricular: dos mecanismos moleculares e celulares ao tratamento. *Revista da Sociedade de Cardiologia do Rio Grande do Sul - Ano XIII nº 03 Set/Out/Nov/Dez 2004.*

Prata A. Chagas' disease. *Infect. Dis. Clin. North. Am.*, 8, 61-76, 1994.

Prata A. Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. *Lancet. Infect. Dis.*, 1, 92-100, 2001.

Rassi Jr A, Rassi A, Little WC. Chagas' heart disease, *Clin. Cardiol.*, 23, 883-889, 2000.

Remme JHF, Feenstra P, Lever PR, Medici AC, Morel CM, Noma M, Ramaiah KD, Richards F, Seketeli A, Shminis Van Brakel WH, Vassal A. Tropical diseases targeted for elimination: Chagas disease, lymphatic filariasis, onchocerciasis and leprosy. *Disease Control Priorities in Developing Countries*, 22, 433-447, 2006.

Remme WJ. Pharmacological modulation of cardiovascular remodeling: a guide to heart failure therapy. *Cardiovasc. Drugs. Ther.*, 17, 349-360, 2003.

Rezaie-Majd A, Maca T, Bucek RA, Valent P, Müller MR, 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.*, 22, 1194-1199, 2002.

Ribeirão M, Pereira-Chiocola VL, Renia L, Augusto Fragata Filho A, Schenkman S, Rodrigues MM. Chagasic patients develop a type 1 immune response to *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase. *Parasite. Immunol.*, 22, 49-53, 2000.

Ridker PM, Rifai N, Clearfield M, Downs JR, Weis SE, Miles JS, Gotto AM Jr. Measurement of C-reactive protein for the targeting of statin therapy in the primary prevention of acute coronary events. *N. Engl. J. Med.*, 344, 1959-1965, 2001.

Rizzo LV, Cunha-Neto E, Teixeira ARL. Autoimmunity in Chagas' disease: Specific inhibition of reactivity of CD4⁺ T cells against myosin in mice chronically infected with *Trypanosoma cruzi*. *Infect. Immun.*, 57, 2640-2644, 1989.

Santos RR, Hudson L. Denervation and the immune response in mice infected with *Trypanosoma cruzi*. *Clin. Exp. Immunol.*, 44, 349-354, 1981.

Schönbeck U & Libby P. Inflammation, immunity, and HMG-Coa reductase inhibitors: statins como antiinflammatory agents? *Circulation*, 109; II-18-II-26, 2004.

Shanes GJ, Minadeo KN, Moret A, Groner M, Tabaie SA. Statin therapy in heart failure: prognostic effects and potential mechanisms. *Am Heart J.*, 154, 617-623, 2007.

Shimokawa H, Takeshita A. Rho-kinase is an important therapeutic target in cardiovascular medicine. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 25, 1767-75, 2005.

Soares MBP & Santos RR. Current status and perspectives of cell therapy in Chagas disease. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 104, 325-332, 2009.

Sposito AC, Caramelli B, Fonseca FA, Bertolami MC, Afiune Neto A, Souza AD, Lottenberg AM, Chacra AP, Faludi AA, Loures-Vale AA, Carvalho AC, Duncan B, Gelonese B, Polanczyk C, Rodrigues Sobrinho CR, Scherr C, Karla C, Armaganijan D, Moriguchi E, Saraiva F, Pichetti G, Xavier HT, Chaves H, Borges JL, Diamant J,

Guimarães JI, Nicolau JC, dos Santos JE, de Lima JJ, Vieira JL, Novazzi JP, Faria Neto JR, Torres KP, Pinto Lde A, Bricarello L, Bodanese LC, Introcaso L, Malachias MV, Izar MC, Magalhães ME, Schmidt MI, Scartezini M, Nobre M, Foppa M, Forti NA, Berwanger O, Gebara OC, Coelho OR, Maranhão RC, dos Santos RD, Costa RP, Barreto S, Kaiser S, Ihara S, Carvalho T, Martinez TL, Relvas WG, Salgado W. IV Brazilian Guideline for Dyslipidemia and Atherosclerosis prevention: Department of Atherosclerosis of Brazilian Society of Cardiology. *Arq. Bras. Cardiol.*, 88, 2-19, 2007.

Talvani A, Ribeiro CS, Aliberti JC, Michailowsky V, Santos PV, Murta SM, Romanha AJ, Almeida IC, Farber J, Lannes-Vieira J, Silva JS, Gazzinelli RT. Kinetics of cytokine gene expression in experimental chagasic cardiomyopathy: tissue parasitism and endogenous IFN-gamma as important determinants of chemokine mRNA expression during infection with *Trypanosoma cruzi*. *Microbes infect.*, 2, 851-866, 2000.

Talvani A, Rocha MO, Barcelos LS, Gomes YM, Ribeiro AL, Teixeira MM. Elevated concentrations of CCL2 and tumor necrosis factor- α in chagasic cardiomyopathy. *Clin. Infect. Dis.*, 38, 943-950, 2004.

Tarleton RL. Chagas disease: a role for autoimmunity? *Trends in Parasitology*, 19, 447-451, 2003.

Teixeira MM, Gazzinelli RT, Silva JS. Chemokines, inflammation and *Trypanosoma cruzi* infection. *Trends. Parasitol.*, 18, 262-265, 2002.

Torrico F, Heremans H, Rivera MT, Van ME, Billiau A, Carlier Y. Endogenous IFN-gamma is required for resistance to acute *Trypanosoma cruzi* infection in mice. *J.Immunol.*, 146, 3626–3632, 1991.

Urbina JA, Lazardí K, Marchan E, Visbal G, Aguirre T, Piras MM, Piras R, Maldonado RA, Payares G, de Souza W. Mevinolin (lovastatin) potentiates the antiproliferative effects of ketoconazole and terbinafine against *Trypanosoma*

(Schizotrypanum) cruzi: in vitro and in vivo studies. *Antimicrob. Agents. Chemother.*, 37, 580-591, 1993.

Van Linthout S, Riad A, Dhayat N, Spillmann F, Du J, Dhayat S, Westermann D, Hilfiker-Kleiner D, Noutsias M, Laufs U, Schultheiss HP, Tschöpe C. Anti-inflammatory effects of atorvastatin improve left ventricular function in experimental diabetic cardiomyopathy. *Diabetologia*, 50, 1977-1986, 2007.

Veillard NR, 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*, 188, 51-58, 2006.

Vianna G. Contribuição para o estudo da anatomia patológica da moléstia de Chagas. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 3, 276–294, 1911.

Waehre T, Damås JK, Gullestad L, Holm AM, Pedersen TR, Arnesen KE, Torsvik H, Froland SS, Semb AG, Aukrust P. Hydroxymethylglutaryl coenzyme a reductase inhibitors down-regulate chemokines and chemokine receptors in patients with coronary artery disease. *J. Am. Coll. Cardiol.*, 41, 1460-1467, 2003.

Weitz-Schmidt G. Statins as anti-inflammatory agents. *TRENDS in Pharmacological Sciences*, 23, 482-487, 2002.

WHO (World Health Organization). Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases (TDR). Report of scientific group in Chagas disease. Buenos Aires, Argentina, April 17-20, 2005. Update July 2007.

Wojnicz R, Wilczek K, Nowalany-Kozielska E, et al. Usefulness of atorvastatin in patients with heart failure due to inflammatory dilated cardiomyopathy and elevated cholesterol levels. *Am. J. Cardiol.*, 97, 899–904, 2006

Yin J, Li GQ, Yu Y, Shi Y, Sun BC, Cheng F, Ge WG, Wang XH. Mechanism of enhancement of the CTL activity in mice co-expressing CD80, CD86 and CD137L genes. *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi.*, 30, 654-658, 2008.

Yoshida N. *Trypanosoma cruzi* infection by oral route: how the interplay between parasite and host components modulates infectivity. *Parasitol. Int.*, 57, 105-109, 2008.

Zeledón R & Rabinovich JE. Chagas' disease: an ecological appraisal with special emphasis on its insect vectors. *Annu. Rev. Entomol.*, 26, 101-133, 1981.

Zhang FL & Casey, PJ. Protein prenylation: mechanisms and functional consequences. *Annu. Rev. Biochem.*, 65, 241-269, 1996.

Zhang JM, Ma WL, Xu Y, Li MJ, Zhao MZ, Xing Y, Zhu MY, Hu DY. The relation between post-acute coronary syndrome anxiety and serum levels of inflammatory factors. *Zhonghua Nei Ke Za Zhi.*, 46, 1022-1024, 2007.

Zhao Z, Zhao S, Xu N, Yu C, Guan S, Liu X, Huang L, Liao W, Jia W. Lovastatin improves neurological outcome after nucleus basalis magnocellularis lesion in rats. *Neuroscience*, 2010. (em publicação).

Zornoff LA, Skali H, Pfeffer MA, St John Sutton M, Rouleau JL, Lamas GA, Plappert T, Rouleau JR, Moyé LA, Lewis SJ, Braunwald E, Solomon SD; SAVE Investigators. Right ventricular dysfunction and risk of heart failure and mortality after myocardial infarction. *J. Am. Coll. Cardiol.*, 39, 1450-1455, 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](#)