

MAYCE HELENA AZOR

**Estudo dos fatores regulatórios e pró-inflamatórios na
urticária crônica idiopática e efeito imunomodulatório *in vitro*
das estatinas**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina
da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Doutor em Ciências

Programa de: Dermatologia

Orientadora: Profa. Dra. Maria Notomi Sato

São Paulo

2010

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Azor, Mayce Helena

Estudo dos fatores regulatórios e pró-inflamatórios na urticária crônica idiopática e efeito imunomodulatório *in vitro* das estatinas / Mayce Helena Azor. -- São Paulo, 2010.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Dermatologia.

Orientadora: Maria Notomi Sato.

Descritores: 1.Urticária crônica idiopática/imunologia 2.Inibidores de hidroximetilglutaril-CoA redutases 3.Fatores regulatórios 4.Fatores pró-inflamatórios

USP/FM/DBD-220/10

DEDICATÓRIA

Dedico esta tese à minha querida mãe Maria das Graças, por todo amor, carinho e dedicação e, mesmo estando em outra dimensão, por toda força e luz que transmite em muitos momentos da minha vida.

*Ao meu lindo irmão Edu, por ser a pessoa mais pura e encantadora que Deus colocou na minha vida e por ter me ensinado o verdadeiro sentido da palavra **AMOR**.*

E ao meu pai Norival, por todo apoio, incentivo e, sem o qual não seria quem eu sou e não estaria aonde estou.

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela oportunidade de viver, aprender, errar e evoluir.

À Dra. Maria Notomi Sato, por sua excelente orientação, por toda sua paciência, calma, compreensão, incentivo e amizade ao longo desses anos. É uma pessoa admirável.

Ao Prof. Dr. Alberto da Silva Duarte, pela oportunidade de desenvolver este projeto no Departamento de Dermatologia e no LIM/56.

Aos Profs. Drs. Evandro Rivitti, Celina Maruta, Érica Prearo do Ambulatório de Urticária do Departamento de Dermatologia do HC-FMUSP pela contribuição na realização deste trabalho.

Às Dras. Valéria Aoki e Mirian Nacagoto pelo incentivo e apoio durante a realização deste trabalho.

Aos amigos do projeto Urticária Viviane Nojima, Juliana Cristina, Eliana Futata, Francinelson Duarte, pela amizade, aprendizado, companheirismo na realização dos experimentos, relatórios científicos e também pela companhia nas viagens científicas.

Aos amigos do grupo Experimental Cyro Alves, Paula Rigato, Elaine Cardoso, Josenilson Feitosa, Shinai Arriel, Isabela Fernandes, Jefferson Victor, Adriana Goldoni, Orlando Guerra, Bruno Pacola, Ana Elisa e Natáli Zanete pela amizade e incentivo.

À Noêmia Orii e Rosângela Araújo por todos os ensinamentos de citometria de fluxo e pela amizade.

À todos os amigos conquistados no LIM/56, Alessandra Pontillo, Vanessa Batista, Camila Cácere, Soraya Ogusuku, Fernando Costa, Adriana de Brito, Rafael Martins, Luciana de Souza, Cláudia Finazzo, Eduardo, Liã Bárbara.

À todos do LIM/56, especialmente ao queridos amigos da secretaria e da limpeza, meu grande carinho por vocês.

À minha querida amiga e irmã Líliliana Rocha por toda sua sinceridade, amizade, amor fraterno e incentivo em muitos momentos da minha vida.

À todos os meus amigos que sempre me incentivaram, apoiaram e torceram para que eu chegasse até aqui.

À todos os pacientes com Urticária Crônica Idiopática do Ambulatório de Dermatologia do HC-FMUSP que foram os maiores responsáveis pela realização deste trabalho.

Esta dissertação está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver)

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 2a ed. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2005.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS

LISTA DE SÍMBOLOS

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

RESUMO

SUMMARY

I. INTRODUÇÃO	1
URTICÁRIA CRÔNICA IDIOPÁTICA.....	1
ATIVIDADE IMUNOMODULATÓRIA DAS ESTATINAS.....	7
INFLAMASSOMAS E SEU PAPEL NAS DOENÇAS INFLAMATÓRIAS E AUTOIMUNES.....	12
II. OBJETIVOS	18
III. CASUÍSTICA	20
IV. MATERIAIS E MÉTODOS	22
1. Obtenção de células mononucleares (CMN) do sangue periférico.....	22
2. Obtenção de células CD14+ e células T CD4+.....	22
3. Influência da estatina na resposta proliferativa a mitógenos e antígenos.....	23
4. Influência da estatina no ciclo celular de células estimuladas por PHA e PWM.....	23
5. Influência da estatina na produção de citocinas de culturas de CMN estimuladas com mitógenos.....	25
6. Influência da estatina na produção de citocinas de culturas de células CD14+ e CD4+ estimuladas.....	25
7. ELISA para dosagem de citocinas.....	25
8. Reação em cadeia da polimerase em tempo real	26
9. Análise estatística.....	27

V. RESULTADOS	29
1. Características demográficas dos pacientes com Urticária Crônica Idiopática.....	29
2. Influência das estatinas na resposta linfoproliferativa aos mitógenos e antígenos de pacientes com UCI e controles.....	30
3. Influência da estatina no ciclo celular em resposta a PHA e PWM.....	35
4. Obtenção de células CD14+ e CD4+ purificadas.....	41
5. Efeito da sinvastatina na secreção de citocinas, fatores regulatórios e inflamatórios em CMN e células CD4+ estimuladas por PHA de pacientes com UCI e controles.....	42
6. Efeito das estatinas na secreção de citocinas, fatores regulatórios e inflamatórios em CMN e células CD14+ estimuladas por LPS de pacientes com UCI e controles	49
VI. DISCUSSÃO	61
VII. CONCLUSÕES	70
VIII. ANEXOS	72
ANEXO A- Termo de consentimento livre e esclarecido.....	72
ANEXO B- Aprovação do Comissão de ética.....	75
ANEXO C- Características individuais dos pacientes com Urticária Crônica Idiopática.....	76
IX. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	79

LISTAS

LISTA DE ABREVIATURAS

Δ cpm	Média aritmética das triplicatas
^3H	Timidina triciada
APC	Células apresentadoras de antígeno
ASST	<i>Autologous serum skin test</i>
CMN	Células mononucleares do sangue periférico
D.P.	Desvio padrão
DAMPs	<i>Danger associated molecular patterns</i>
ELISA	Ensaio imuno enzimático
et al.	E outros
Fc ϵ RI	Receptor de alta afinidade para imunoglobulina E
HMG-CoA	3-Hidroxi-3-metilglutaril coenzima A
ICAM-1	<i>Intracellular cell adhesion molecule 1</i>
IDO	Indolamina 2,3-dioxigenase
IE	Índice de estimulação
IFN- γ	Interferon-gama
Ig	Imunoglobulina
IL	Interleucina
LFA-1	<i>Leukocyte function-associated antigen 1</i>
LPS	Lipopolissacáride
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade
MIP-1 α	Proteína inflamatória de macrófago α
NC	Não consta
NLR	<i>NOD-like receptors</i>
NO	Óxido Nítrico
PAMPs	<i>Pathogen associated molecular patterns</i>
PHA	Fitohemaglutinina
PMA	<i>Phorbol myristate acetate</i>
PRRs	<i>Pattern recognition receptors</i>
PWM	“Pokeweed”
ROR γ τ	<i>Retinoic acid-related orphan receptor</i>
SEA	Enterotoxina estafilocócica tipo A

SOCS3	<i>Supressor of cytokine secretion 3</i>
Th	Células T auxiliares
TLR	<i>Toll-like receptors</i>
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
TT	Toxóide tetânico
UCI	Urticária Crônica idiopática

LISTA DE SÍMBOLOS

μCi	Microcurie
μg	Micrograma
μM	Micromolar
mL	Mililitro
ng	Nanograma
pg	Picograma
rpm	Rotações por minuto
\pm	Mais ou menos
Δ	Delta
<	Menor
=	Igual
$^{\circ}\text{C}$	Graus Celsius

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Distribuição dos autoanticorpos na UCI.....	02
Figura 2: Biossíntese do colesterol e efeito das estatinas na ativação do sistema imunológico.....	08
Figura 3. Efeito de concentrações de sinvastatina na resposta proliferativa.....	32
Figura 4. Efeito de concentrações de estatinas na resposta proliferativa a PWM.....	33
Figura 5. Percentual de inibição da proliferação de CMN pelas estatinas.....	34
Figura 6. Etapas do ciclo celular de CMN de indivíduos controle e pacientes UC.....	37
Figura 7. Histograma ilustrativo das etapas do ciclo celular.....	38
Figura 8. Etapas do ciclo celular de CMN de indivíduos controle.....	39
Figura 9. Histograma ilustrativo das etapas do ciclo celular.....	40
Figura 10. Histogramas ilustrativos da pureza de células CD14+ e CD4+ de um indivíduo controle.....	41
Figura 11. Efeito da sinvastatina na produção de IFN- γ , IL-10, IL-5 e IL-17A induzidas por PHA.....	44
Figura 12. Efeito das estatinas na expressão relativa de mRNA de RORC γ t.....	45
Figura 13. Efeito da sinvastatina na produção de IL-17A induzida por PHA.....	46
Figura 14. Efeito das estatinas na expressão relativa de mRNA de SOCS-3.....	47
Figura 15. Efeito das estatinas na expressão relativa de mRNA de SOCS-3.....	48
Figura 16. Efeito da sinvastatina na produção de IL-6, TNF- α e MIP1- α em CMN em resposta ao LPS.....	52
Figura 17. Efeito das estatinas na produção de TNF- α em CMN em resposta ao LPS.....	53

Figura 18. Efeito das estatinas na produção de MIP1- α por CMN em resposta ao LPS.....	54
Figura 19. Efeito das estatinas na produção de IL-6 por CMN em resposta ao LPS.....	55
Figura 20. Efeito das estatinas na produção de TNF- α , IL-1 β e MIP-1 α de CD14+ em resposta ao LPS.....	56
Figura 21. Efeito das estatinas na expressão relativa de mRNA de IDO de CMN em resposta ao LPS.....	57
Figura 22. Efeito das estatinas na expressão relativa de mRNA de IDO por monócitos em resposta ao LPS.....	58
Figura 23. Efeito das estatinas na expressão relativa de mRNA de NALP3, Caspase-1 e IL-18 em monócitos em resposta ao LPS.....	59

LISTA DE TABELAS

Tabela I. Características demográficas dos pacientes com Urticária Crônica Idiopática.....	29
--	----

RESUMO

Azor MH. Estudo dos fatores regulatórios e pró-inflamatórios na urticária crônica idiopática e efeito imunomodulatório *in vitro* das estatinas [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2010. 95p.

INTRODUÇÃO: A urticária crônica ígmaidiopática (UCI) é uma doença desencadeada pela desgranulação de basófilos e mastócitos com consequente liberação de histamina, sendo que o perfil imunológico nesta doença não é bem estabelecido. As estatinas, inibidores da 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A redutase, apresentam efeitos antiinflamatórios e imunomodulatórios. O efeito desta droga tem sido estudado em muitas doenças inflamatórias crônicas, incluindo doenças autoimunes, mas não existem evidências na UCI. **OBJETIVOS:** O objetivo deste estudo foi analisar o efeito das estatinas na resposta imune e sua influência na expressão de genes regulatórios e relacionados com a resposta inflamatória. **MÉTODOS:** A resposta limfoproliferativa a mitógenos e antígeno-específica de 22 pacientes com UCI e 41 controles na presença de estatinas (0,25-25 μ M) foi analisada pela incorporação de timidina após 3 ou 6 dias de cultura. A progressão do ciclo celular e apoptose foi realizada pela incorporação de bromodeoxiuridina (BrdU) ao DNA após estímulo por PHA ou PWM e analisada por citometria de fluxo. A secreção de citocinas foi quantificada por ELISA e a expressão de mRNA de fatores regulatórios e pró-inflamatórios quantificados por real-time PCR. **RESULTADOS:** Os resultados evidenciaram que as estatinas em elevadas concentrações são capazes de inibir a capacidade mitogênica das células T e B seja dos indivíduos saudáveis ou de pacientes com UCI. A inibição da proliferação celular mediada pelas estatinas foi decorrente ao bloqueio na etapa inicial do ciclo celular (Fase G0/1), o que impediu o prosseguimento para outras fases do ciclo (S e G2/M). A diminuição da resposta proliferativa em resposta a um mitógeno como a PHA resultou na inibição da ativação celular pela estatina e a significativa redução na produção de citocinas como IFN- γ , IL-10, IL-17A e IL-5. Em contraste, o efeito modulatório das estatinas ao estímulo com LPS inibiu a produção de TNF- α e MIP-1 α pelas células dos controles, mas não influenciou na produção de citocinas pró-inflamatórias pelas CMN dos pacientes com UCI. Somente a incubação prévia das células com as drogas, em alta concentração (25 μ M), foi possível verificar a modulação negativa na produção de IL-6 e MIP1- α para ambos os grupos, mas não para o TNF- α para os pacientes. A sinvastatina foi capaz exercer efeito modulatório mais pronunciado que a lovastatina na produção de citocinas induzidas por LPS. Os resultados evidenciaram que os pacientes com UCI possuem uma diminuição da expressão da enzima IDO e aumento de SOCS3 nas CMN. A sinvastatina não altera esse perfil e previne a expressão de fatores inflamatórios como ROR γ t e NALP3 inflamassomas. **CONCLUSÕES:** Em conjunto, os resultados sugerem um desequilíbrio dos mecanismos regulatórios que poderiam contribuir com a cronicidade e o perfil inflamatório na UCI. As estatinas apresentam maior efeito antiinflamatório que pró-inflamatório, sugerindo ter potencial clínico para o tratamento de doenças crônicas como a UCI.

Descritores: 1. Urticária crônica idiopática/imunologia 2. Inibidores de hidroximetilglutaril-CoA reductases 3. Fatores regulatórios 4. Fatores pró-inflamatórios

SUMMARY

Azor MH. Study of regulatory and proinflammatory factors in chronic idiopathic urticaria and *in vitro* immunomodulatory effect of statins [thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2010. 95p.

INTRODUCTION: Chronic Idiopathic Urticaria (CIU) is a disease triggered by degranulation of basophils and mast cells with consequent histamine release and the CIU immunological profile is not well established. Statins, 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors, also display a broad immunomodulatory property. Statins have been studied in several chronic inflammatory diseases, including autoimmune disorders, but there are no evidences in CIU disease. **OBJECTIVES:** The aim of this study was to verify the effect of statins the immune response, and the expression of genes related to regulatory and inflammatory response focusing in CIU patients and healthy controls (HC). **METHODS:** Lymphoproliferative response to mitogens or recall antigens of 22 patients with CIU and 41 HC with statins (0,25-25 μ M) was analyzed by thymidine incorporation after 3 or 6 days of cell cultures. Cell cycle progression and apoptosis were assessed by bromodeoxyuridine (BrDU) incorporation to DNA upon PHA or PWM stimulus by flow cytometry. Cytokines secretion was measured by ELISA and mRNA of regulatory and proinflammatory genes were analyzed by quantitative real-time PCR. **RESULTS:** The results showed that high concentrations of statins can inhibit the mitogenic capacity of T and B cells of HC or CIU patients. The inhibition of cell proliferation mediated by statins was due to blockage in the initial phase of the cell cycle (G0/1), which prevented progress to cycle phases (S and G2/M). The decreased proliferative response in response to PHA mediated by statin resulted in a significant inhibition of IFN- γ , IL-10, IL-17A and IL-5 secretion levels. Statin effect in response to LPS showed inhibition of TNF- α and MIP-1 α secretion by cells from HC, but did not influence the production by PBMC of CIU. It was necessary the pre-incubation of cells with drugs at high concentration (25 μ M) to verify the negative modulation of IL-6 and MIP1- α secretion in both groups, except for TNF- α in CIU. Simvastatin was able to exert more pronounced modulatory effect than lovastatin in cytokine production induced by LPS. Furthermore, CIU patients have a decreased expression of the enzyme IDO and increased of SOCS3 in PBMC, which were not modified by simvastatin, whereas prevented the upregulation of proinflammatory factor as RORC γ t and NALP3 inflammasomes. **CONCLUSIONS:** Altogether, the results evidenced an imbalance of regulatory mechanisms that could contribute to chronic evolution and inflammatory profile in CIU. Statins exhibited more anti-inflammatory effects than proinflammatory, suggesting a potential clinical role for treatment in chronic diseases as CIU.

Descriptors: 1.Chronic idiopathic urticaria/immunology 2. Hydroxymethylglutaryl-CoA reductase inhibitors 3.Immunoregulatory factors 4.Pro-inflammatory factors

I. INTRODUÇÃO

I. INTRODUÇÃO

URTICÁRIA CRÔNICA IDIOPÁTICA

A urticária crônica (UC) é uma doença dermatológica comum caracterizada pelo aparecimento de pápulas eritemato-edematosas, evanescentes, que cursam com ou sem angioedema. Estes sinais clínicos são acompanhados de prurido recorrentes e transitórios acima de seis semanas (Kaplan, 2004). A UC acomete aproximadamente 0,1% da população, e pode reduzir significativamente a qualidade de vida dos pacientes (O'Donnell et al., 1997, Sabroe et al., 1999). Em 70-80% dos pacientes a causa não é conhecida, estes casos são denominados como urticária crônica idiopática (UCI), e a duração da doença pode persistir por 3-5 anos em adultos (Toubi et al., 2004).

A urticária é gerada pela desgranulação cutânea de mastócitos e/ou basófilos que liberam potentes mediadores vasoativos que causam aumento da permeabilidade capilar de pequenas veias resultando na formação de pápulas (Ring et al., 1999). O prurido e a dor são conseqüências da estimulação dos nervos sensoriais. A desgranulação das células inflamatórias é atribuída à causa imunológica (autoimune, IgE, imunocomplexo, complemento), não imunológica (pseudoalérgenos como medicamentos) e idiopática (Hein, 2002).

A incidência da UCI é maior em mulheres do que em homens (2:1) (Greaves, 2000), é mais frequente em adultos, mas pode acometer crianças (Brunetti et al., 2004). O tempo de persistência das lesões de pele varia entre 4 e 36 horas e o espectro da doença depende da freqüência, número e distribuição das lesões, intensidade do prurido e associação desses sintomas com angioedema, o qual ocorre em aproximadamente 40% dos casos (Kaplan, 2004).

Uma parcela dos pacientes com UCI, aproximadamente 35-40%, apresentam autoanticorpos (autoacs) IgG circulantes direcionados contra a cadeia α do receptor de alta afinidade para a IgE (Fc ϵ RI) e 5-10% contra a molécula de IgE (Greaves, 2003; Kaplan, 2004). A figura 1 mostra a distribuição dos autoacs na UCI.

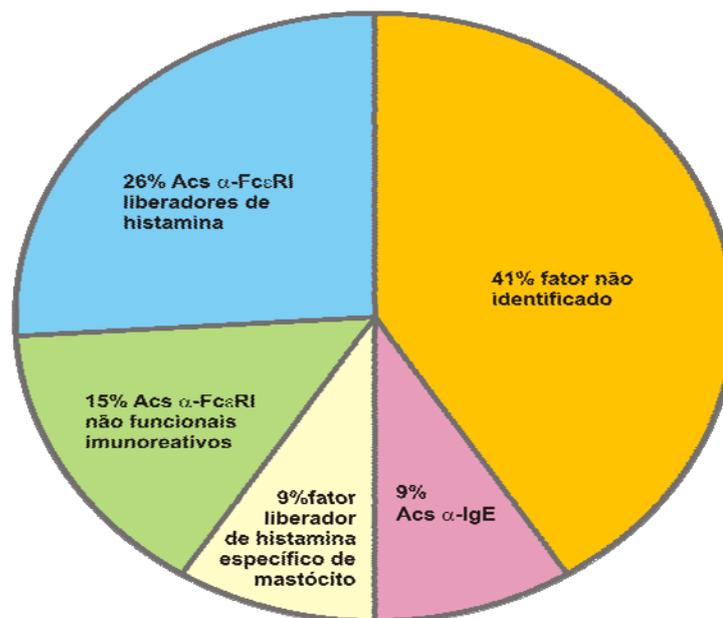


Figura 1: Distribuição dos autoanticorpos na UCI (Sabroe e Greaves, 2006)

Os casos mais graves de UC são de difícil tratamento, e a gravidade dos sintomas parece depender do grau de ativação das células inflamatórias, da liberação de histamina e da ativação do sistema complemento (Sabroe et al., 1999, Fiebiger et al., 1998).

Sabroe et al., evidenciaram que pacientes com UC que desenvolvem autoac IgG anti-Fc ϵ RI e anti-IgE, apresentam quadro clínico mais grave de urticária do que aqueles que não apresentavam atividade sérica de liberação de histamina de basófilos (Sabroe et al., 2002). Além disto, a basopenia encontrada na UC, é mais acentuada no grupo de

pacientes que apresentam autoacs IgG anti-FcεRI ou anti-IgE (Grattan et al., 1997). Outros autoanticorpos podem ser detectáveis, tais como os reativos a tecidos tireoidianos, o que sugere associação desta patologia com a doença autoimune da tireóide (Dreskin e Andrews, 2005). A prevalência de autoanticorpos anti-tireóide na UC tem sido estimada como 12 a 29% (Doutre et al., 2006). Além disto, a evidência de doença autoimune da tireóide e função anormal tireoideana é mais encontrada em pacientes com teste de soro autólogo positivo (O'Donnell et al., 2005). Entretanto, estes autoanticorpos anti-tireóide não parecem ser os agentes causadores diretos da UC.

O teste cutâneo realizado com o soro autólogo, denominado teste intradérmico de soro autólogo (AIST, *autologous intradermal serum test*) evidencia a presença dos autoacs anti-FcεRI e/ou anti-IgE pela desgranulação de mastócitos da pele pela formação de pápulas. Este teste tem sido recomendado como triagem nos casos suspeitos de UC (Sabroe et al., 1999) e possui sensibilidade e especificidade de 65 a 81% e 71 a 78%, respectivamente (Greaves, 2003). Entretanto é um teste *in vivo* que está mais relacionado com autorreatividade, sendo que vários fatores podem interferir no teste como a geração de trombina, uma protease capaz de ativar mastócitos e causar aumento da permeabilidade do endotélio (Asero et al., 2006). Além disto, aproximadamente 50% dos pacientes com UC são positivos no AIST, mas os soros de apenas metade são capazes de reduzir a liberação de histamina de basófilos em cultura (Greaves et al., 2000; Greaves et al., 1995).

O ensaio de liberação de histamina é considerado como teste padrão de laboratório para a identificação dos autoanticorpos anti-FcεRI. Há uma correlação positiva dos pacientes com AIST positivo que apresentam o teste de liberação de histamina positivo, enquanto que não há liberação de histamina em pacientes com AIST negativo (Niimi et al., 1996).

A histamina liberada pelos mastócitos e basófilos, induzida pelos autoanticorpos, ativa co-fatores que amplificam a desgranulação destas células inflamatórias. A IgG purificada de soros de pacientes com UC é capaz de ativar indiretamente a desgranulação de basófilos e mastócitos através da ativação do sistema complemento, que amplia a liberação de histamina destas células através do componente C5a (Fiebiger et al., 1998). A atividade funcional das subclasses de IgG anti-Fc ϵ RI nos pacientes com UC são, predominantemente, os anticorpos fixadores de complemento IgG1 e IgG3 e, ocasionalmente, IgG4 (Kaplan, 2004; Soundararajan et al., 2005).

Os autoanticorpos anti-Fc ϵ RI levam a desgranulação dos basófilos e mastócitos, culminando na liberação de histamina e mediadores pré-formados e pré-sintetizados como leucotrienos (LCT4), triptase e prostaglandinas (Kaplan, 2004). Esses mediadores lipídicos aumentam a permeabilidade vascular e são quimiotáticos para neutrófilos. Neste processo, inclui a síntese de citocinas e quimiocinas como IL-4, IFN- γ , IL-6, TNF- α , IL-5, RANTES e proteína inflamatória de macrófago α 1 (MIP1- α). Os basófilos de pacientes com UCI e UCI autoimmune são hiporrespondedores ao estímulo com anticorpos anti-IgE e ao componente C5a, mas capazes de responderem ao MCP-1 ou bradicinina, e hiperreativos ao soro de paciente com UC ou com soro normal comparados com a resposta de basófilos de indivíduos normais (Luquin et al, 2005). O fator sérico dessa resposta ainda não foi identificado, entretanto, os basófilos de pacientes com UC parecem possuir uma regulação anormal na via de sinalização (Luquin et al, 2005).

Previamente, verificamos que os basófilos do sangue periférico de pacientes com UCI possuem um perfil ativado, com aumento da expressão de marcadores de ativação/desgranulação como CD203 e CD63. Em paralelo, observou-se um aumento

de resposta ao estímulo com anticorpos anti-IgE na liberação de histamina, acentuado na presença de IL-3, evidenciando um possível defeito na via de sinalização dos basófilos na UCI (Lourenço et al., 2008).

A cronicidade das lesões encontradas na UC e conseqüente liberação de mediadores e citocinas pró-inflamatórias, pode favorecer o aumento da expressão de moléculas de adesão e de classe II do Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC) e da resposta autoimune. O aumento da produção de citocinas, quimiocinas e mediadores inflamatórios podem ser evidenciados nas lesões de pele de pacientes com UC. Estudos *in situ* das pápulas de pacientes com UC evidenciam um aumento da expressão de E-selectina e de ICAM-1 (*intracellular cell adhesion molecule 1*), associado a elevados níveis de TNF- α , IL-4 e LCT4 e de quimiocinas como RANTES e MIP1- α (Bressler, 1995). Da mesma forma, um outro estudo imunohistoquímico nas pápulas de pacientes com UC positivos ao teste de soro autólogo (AIST+) mostra um perfil imunoinflamatório, envolvendo um papel prevalente dos linfócitos com resposta mista Th1/Th2, com importante infiltração neutrofílica e envolvimento das quimiocinas (Caproni et al., 2005). Já em lesões de pele de pacientes com UC pode se observar maior prevalência de citocinas Th2 como IL-4 e IL-5 em relação ao IFN- γ (Caproni et al., 2003). Aumento de TNF- α e IL-3 são encontradas nas lesões de pele de pacientes com urticária de contato, como também na urticária aguda e crônica (Hermes et al., 1999).

No soro de pacientes com urticária aguda são encontrados níveis normais de IL-8 e TNF- α e alguns pacientes níveis elevados de IL-6 durante a doença ativa (Fujii et al., 2001). Na UC, é observado aumento dos níveis de IL-13 nos soros dos pacientes AIST+ e de MIP-1 α nos AIST-, e níveis séricos de IFN- γ e IL-4 similares entre os grupos (Caproni et al., 2004).

Os achados de produção de citocinas na UC têm sido controversos. Há descrição de que as células T CD4⁺ de pacientes com UC estão ativadas e secretam mais IFN- γ e IL-4 quando estimuladas com PMA (*phorbol myristate acetate*) em relação aos indivíduos controle (Ferrer et al., 2002). Em contraste, outro estudo evidencia diminuição na produção de IL-2, IFN- γ e de IL-4 células mononucleares estimuladas com PHA, principalmente nos AIST positivo, sugerindo modulação negativa das populações de células Th1/Th2 na UC (Confino-Cohen et al., 2004). Piconi e cols, também evidenciaram diminuição significativa de IFN- γ nos pacientes com UC, mesmo quando sub-divididos quanto ao teste de soro autólogo (Piconi et al., 2002). Por outro lado, também observaram aumento na produção de IL-10 e TNF- α em resposta a mitógenos como a fitohemaglutinina e lipopolissacáride dos pacientes com UC em relação ao grupo controle (Piconi et al, 2002). Os níveis das quimiocinas RANTES e MIP-1 α estão aumentados nos pacientes com UC, porém em concentrações mais elevadas nos AIST-. A presença de um processo inflamatório em pacientes AIST positivo é evidenciada pelo aumento de TNF- α , das quimiocinas e também da expressão de moléculas de adesão em células T CD4⁺ e CD8⁺ (Piconi et al., 2002).

Na tentativa de averiguar os fatores liberadores de histamina na UCI, foi avaliada a secreção de IL-18, uma citocina que desempenha um papel importante nas doenças auto-imunes e alérgicas. Nos pacientes com AIST+ e forma ativa crônica foi encontrado aumento dos níveis de IL-18 (Tedeschi et al., 2007).

Recentemente, evidenciamos que na UCI, há um aumento nos níveis de citocinas inflamatórias circulantes como TNF- α , IL-1 β , IL-12p70, IL-6 e IL-10. Subdividindo-se de acordo com o AIST, observou-se um aumento da IL-10 circulante nos sobrenadantes de CMN estimuladas por PHA. Além disto, foi observado um aumento da produção de IL-17A induzida por PHA e da expressão de mRNA de IL-10

nas CMNs do grupo AIST+. Estes dados salientam a ocorrência de um distúrbio imunológico na UCI (Dos Santos et al., 2008).

As evidências sobre o perfil de produção de citocinas na UCI, em pacientes com ou sem autoacs anti-FcεRI, ainda são controversos, indicando entre outras variações, um desequilíbrio na produção de citocinas na resposta linfoproliferativa ao mitógeno PWM (Dos Santos et al., 2008) e alteração na sinalização via p21Ras nos linfócitos dos pacientes com UCI (Confino-Cohen, 2002). As alterações na produção de citocinas pró-inflamatórias ou antiinflamatórias são comuns na UCI e são fatores importantes na instalação e desenvolvimento de doenças inflamatórias crônicas e/ou autoimunes.

ATIVIDADE IMUNOMODULATÓRIA DAS ESTATINAS

Com o melhor entendimento dos mecanismos imunopatológicos das doenças inflamatórias/ autoimunes muitas alternativas terapêuticas, têm sido utilizadas para melhorar os sintomas dessas doenças. Recentemente, fármacos comumente utilizados na terapêutica de doenças cardiovasculares como as estatinas, têm mostrado um potente efeito biológico de caráter pleiotrópico, principalmente no sistema imunológico (Steinman, 2004) por exercer potente atividade antiinflamatória (Kwak, Mulhaupt e Mach, 2003). Neste sentido, estudos que possibilitem avaliar o efeito *in vitro* de drogas com potencial imunomodulatório/antiinflamatório sobre os mecanismos de controle da resposta autorreativa, como a IDO, podem trazer novas perspectivas terapêuticas para as doenças autoimunes.

As estatinas são fármacos inibidores da enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A (HMG-CoA redutase), a qual exerce importante papel na síntese do colesterol. Esses fármacos são utilizados na clínica para o tratamento de

hipercolesterolemia para reduzir os níveis plasmáticos de colesterol (Liao e Laufs, 2005). A HMG-CoA redutase cataliza a conversão do HMG-CoA ao ácido mevalônico durante a síntese do colesterol. Embora, o L-mevalonato seja o componente principal na síntese do colesterol, diversos metabólitos podem alterar a síntese de proteínas específicas envolvidas na diferenciação e proliferação celular (Figura 2).

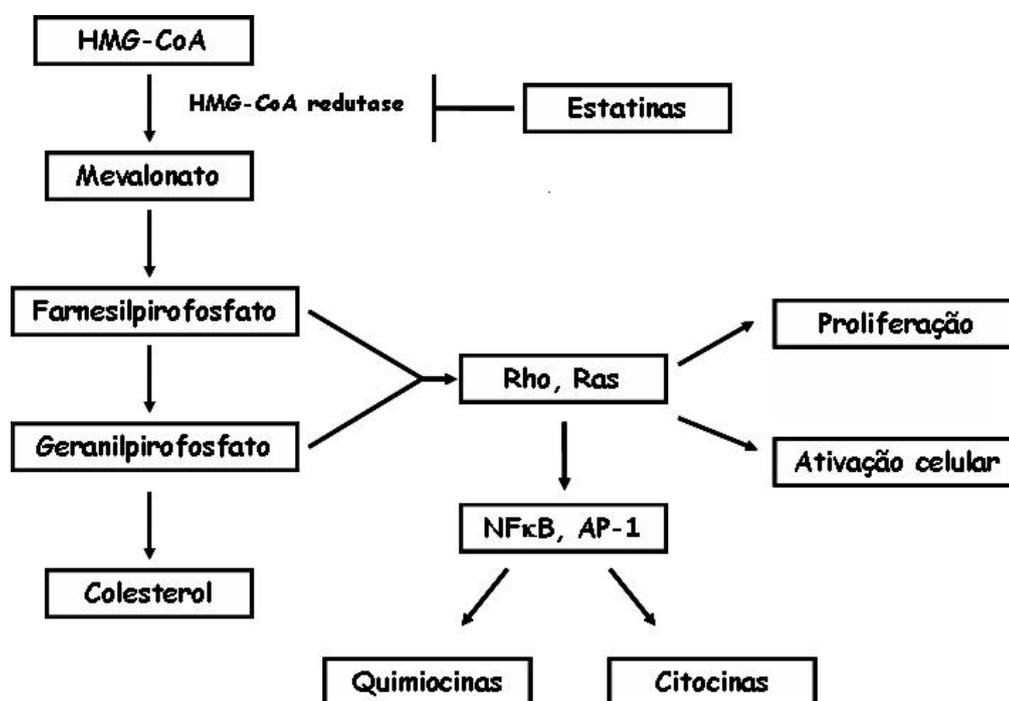


Figura 2: Biossíntese do colesterol e efeito das estatinas na ativação do sistema imunológico

Além dos efeitos redutores do colesterol, as estatinas estabilizam a placa arterosclerótica, inibem a proliferação e ativação de células do músculo liso e modulam a função epitelial (Kwak, Mulhaupt e Mach, 2003). O potencial antiinflamatório mediado pela atividade farmacológica das estatinas, pode ser evidenciado pelo seu

efeito na estabilidade de placas arteroscleróticas e na inflamação vascular. Efeito este, que pode ser mediado, em parte, pela indução de óxido nítrico (NO). A estimulação de linhagem de macrófagos murinos com LPS e as estatinas pravastatina e fluvastatina, mostra que somente a pravastatina é capaz de diminuir significativamente a expressão de NO sintetase e de ciclooxigenase-2 (Ongini et al., 2004).

Estudo *in vitro* realizado com macrófagos e células endoteliais humanas estimuladas por IFN- γ , em presença de concentrações micromolares de pravastatina, lovastatina e atorvastatina mostra que as drogas inibem a expressão de moléculas de classe II do MHC, e diminuem a secreção de IL-2 (Kwak et al., 2000). Foi demonstrado que estas drogas são capazes de influenciar ou diminuir a resposta proliferativa de CMNs de controles sadios à mitógenos como PHA, concanavalina A (Con A) e mitógeno pokeweed (PWM). Além disso, as estatinas apresentam atividade inibitória na secreção de citocinas como IL-2 e IFN- γ em resposta a PHA. Por outro lado, não foi observada nenhuma inibição na produção de IL-6 em resposta ao estímulo por LPS na presença das drogas (Bressler et al., 2005). Algumas estatinas, como a lovastatina e a sinvastatina, podem ligar-se diretamente no sítio das integrinas β_2 e interferir na interação das moléculas de adesão LFA-1 (*leukocyte function-associated antigen 1*) e seu ligante ICAM-1 (*intracellular adhesion molecule 1*) (Weitz-Schmidt et al., 2001). Além disto, a fluvastatina é capaz de diminuir a expressão da molécula de ativação precoce CD69 em células T humanas estimuladas por PHA, além de inibir a produção de IL-2 e, conseqüentemente a proliferação celular (Wu et al., 2004).

A atorvastatina induz anergia das células T por induzir uma rápida fosforilação da molécula ERK1 presente na via de sinalização das GTPases (Waiczies et al., 2005). Esta via envolve a ativação de uma cascata de proteínas (Ras/Raf/MEK/ERK) que estão envolvidas na ativação, diferenciação e proliferação das células T. Em linhagem de

células humanas T CD4⁺ específicas para a proteína básica de mielina, que foram cultivadas em presença de atorvastatina e re-estimuladas com APCs e antígeno específico, as células mantêm-se anérgicas, devido menor degradação da proteína reguladora negativa do ciclo celular (p27^{kip1}) e da expressão de IFN- γ (Waiczies et al., 2005). A adição de L-Mevalonato, metabólito da HMG-CoA redutase nas culturas, reverte o efeito anérgico das células e inibe o aumento da produção de IL-10. Estes resultados sugerem que as estatinas interferem na maturação funcional dos linfócitos T, atenuando a resposta efetora mediada pelas células T. Outros estudos evidenciam o efeito inibitório das estatinas no ciclo celular de células TCD4⁺, com bloqueio da fase inicial do ciclo na fase G0/1 e conseqüente indução de apoptose (Brinkkoetter et al., 2006).

Estas evidências sugerem que as estatinas podem ser candidatas para o tratamento de aterosclerose, doenças inflamatórias crônicas, doenças degenerativas ou autoimunes (Neurauter et al., 2003; Waiczies et al., 2005). Em um estudo com pacientes com esclerose múltipla recorrente foi administrado a dose oral diária de 80 mg de sinvastatina por um período de 6 meses (Vollmer et al., 2004). O número de lesão cerebral diminuiu nesses pacientes, com poucos relatos de efeitos adversos durante o tratamento, salientando que o efeito antiinflamatório da estatina pode ser benéfico na esclerose múltipla.

O estudo com CMN de pacientes com esclerose múltipla demonstrou que a sinvastatina, lovastatina e mevastatina inibem a proliferação celular de maneira dose dependente, e que a sinvastatina inibe a expressão do MHC de classe II em monócitos diminuindo sua capacidade de apresentação. Em linfócitos, é capaz de inibir a ativação e a secreção de IFN- γ , TNF- α e IL-2, bem como a expressão do fator de transcrição T-bet, que regula a diferenciação das células Th1 (Peng et al., 2006).

Recentemente, foi demonstrado que o tratamento de CMNs de pacientes com artrite reumatóide (AR) pela atorvastatina (0,1 μ M) diminui de maneira significativa a expressão e secreção de IFN- γ por células TCD4+. Já nos fibroblastos sinoviais desses pacientes, há a diminuição da expressão de IL-6 e IL-8. Esses dados mostram que a atorvastatina exerce efeito anti-inflamatório na AR, podendo contribuir na terapia dessa doença (Blaschke et al., 2009).

Estudo *in vitro* com CMN de indivíduos sadios mostra que a atorvastatina pode interferir de maneira dose-dependente no catabolismo do triptofano. A estimulação *in vitro* de CMN e linhagens de células monocíticas com IFN- γ recombinante ou mitógenos, como a PHA e Con A, na presença de atorvastatina reduz o catabolismo do triptofano, o qual é revertido pela adição de metabólitos do ácido mevalônico, o GGPP (geranilpirofosfato) e FPP (farnesilpirofosfato) (Neurauter et al., 2003). Estes resultados mostram que a atorvastatina inibe a via mediada por IFN- γ em células monocíticas, sugerindo que tanto a imunorreatividade das células T e dos macrófagos derivados de monócitos são modulados negativamente pela estatina.

A atividade inibitória das estatinas tem sido avaliada na secreção e expressão de IL-17, citocina com atividade pró-inflamatória produzida por células Th17 (Gaffen et al., 2006). As células Th17 são um subtipo de células T CD4+ que apresentam um papel importante no desenvolvimento de doenças autoimunes (Furuzawa-Carballeda et al., 2007). Chen et al, demonstraram que a IL-23 induz a diferenciação de células Th17 em humanos (Chen et al., 2007). Estas células expressam um específico fator de transcrição denominado ROR γ τ (*retinoic acid-related orphan receptor*). Um estudo mostrou que a atorvastatina induz mudanças na expressão de citocinas em monócitos através da inibição da IL-6 e IL-23 e indução de IFN- γ , IL-27 e IL-4, modificando a resposta autoimune observada na esclerose múltipla (Zhang et al., 2008). Esse

mecanismo foi decorrente pela indução de SOCS (*supressor of cytokine secretion*) 3 e 7 e consequente inibição de STAT (*signal transducer and activator of transcription*)1 e 3 fosforiladas em monócitos, o que contribui para o efeito inibitório na transcrição de IL-6 e IL-23. Além disto, foi observado que a diferenciação de células TCD45RA+ na presença de IL-6 e IL-23 aumenta a expressão do fator ROR γ τ e a secreção de IL-17, e diminuição com a adição de IFN- γ , IL-27 e IL-4 (Zhang et al., 2008).

As células Th17 e seus produtos são associados com diversas patologias inflamatórias e auto-imunes humanas. Tanto a citocina como as células Th17 são encontradas em lesões de pacientes com esclerose múltipla (Tzartos et al., 2008). Na artrite reumatóide a IL-17 contribui para a inflamação observada na doença (Chaubad et al., 1999). Na psoríase, uma doença dermatológica inflamatória, a expressão de IL-17 e IL-23 foi detectada nas biópsias de pele lesionadas de pacientes, sugerindo que as células Th17 estão presentes no infiltrado inflamatório, exercendo a quimiotaxia dos neutrófilos (Piskin et al., 2006). Estas evidências sugerem que IL-17/IL23 exercem papel funcional nas lesões inflamatórias dessa doença.

Tendo vista a ampla atividade imunomodulatória das estatinas, seja nas respostas inflamatórias e as mediadas pelas células T, torna interessante averiguar o efeito *in vitro* destes agentes farmacológicos nos mecanismos de controle da resposta imune em doenças inflamatórias ou autoimunes.

INFLAMASSOMAS E SEU PAPEL NAS DOENÇAS INFLAMATÓRIAS E AUTOIMUNES

O sistema imune inato, primeira linha de defesa do organismo, está envolvido na detecção inicial e na remoção de patógenos (Matzinger, 1994). Receptores de

reconhecimento de patógenos (*pattern recognition receptors*, PRRs), codificados por células germinativas do hospedeiro, reconhecem estruturas conservadas de microorganismos conhecidas como padrões moleculares associados ao patógeno (*pathogen associated molecular patterns*, PAMPs), além de sinais de perigo não-microbianos (*danger associated molecular patterns*, DAMPs). PRRs compreendem um grupo de receptores presentes na membrana plasmática e no citosol do hospedeiro. A existência de múltiplos PRRs capazes de reconhecer um único microorganismo garante a indução da resposta imune, mesmo quando um receptor ou suas vias de sinalização são alvo de patógenos. A ativação dos múltiplos PRRs em resposta ao patógeno resulta na ativação de múltiplas vias, incluindo o fator nuclear- κ B (NF- κ B), proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPKs), e resposta do interferon tipo I (IFN-I), que confere a indução pro-inflamatória e respostas antimicrobianas. PRRs compreendem uma classe de receptores de membrana, os receptores Toll-like (TLR), e duas classes de receptores citoplasmáticos, os receptores NOD-like (NLR) e os receptores *retinoic acid-inducible gene I-like* (RLRs) (Franchi et al., 2009).

Os NLRs foram identificados inicialmente em plantas, onde apresentam uma função crítica na resistência a doenças (genes R) contra microorganismos e patógenos parasitas. O fato dos NLRs serem evolutivamente conservados sugere que estes receptores desempenham uma função importante na defesa do indivíduo. Uma importante evidência foi a descoberta de que a desordem imunológica ligada a variações genéticas nos genes NLRs causa doenças ou está associada com uma maior susceptibilidade a várias doenças inflamatórias. Existem 23 membros da família NLR em humanos que são expressos em muitos tipos celulares, incluindo células imunes e epiteliais, e certos membros da família NLR são expressos primariamente em fagócitos, incluindo macrófagos e neutrófilos (Franchi et al., 2009; Pétrilli et al., 2007).

Até agora quatro inflamassomas foram identificados, cada um contendo uma proteína NLR específica: NALP-1, NALP-2, NALP-3 e IPAF-inflamassoma. Esses inflamassomas medeiam a ativação da caspase-1 inflamatória, enzima responsável pela ativação da principal citocina pró-inflamatória, a IL-1 β . Monócitos humanos expressam constitutivamente caspase-1 ativa e apenas a estimulação dos TLRs por LPS, peptídeos glicanos e RNA microbiano induzem a secreção de IL-1 β (Netea et al., 2009).

O NALP-3 inflamassoma é ativado pelo LPS, pelo RNA microbiano, por toxinas bacterianas (*S. hygroscopicus*, Listeriolysin O, *A. hydrophila*, *M. dinoflagellates*, *B. brevis*, *S. aureus*) e por bactérias vivas (*S. aureus*, *L. monocytogenes*, *E. coli*) (Martinon et al., 2005). A ativação do inflamassoma provoca a indução da via NF- κ B e dos genes pró-apoptóticos tardios, confirmando o início da apoptose nas células imunes inatas como um evento crucial da resolução fisiológica da resposta inflamatória. A interação de PAMPs ou DAMPs com TLRs e NLRs leva à maturação das DCs e aumenta sua eficiência para a ativação de células T (Kufner et al., 2006).

Mutações no *NLRP3/CIAS1/NALP3* são causadoras de três desordens auto-inflamatórias e hereditárias caracterizadas por *rashes* cutâneos e febres periódicas sem a presença de infecção. São conhecidas como urticária fria familiar (FCU), síndrome Muckle–Wells (MWS), e doença auto-inflamatória cutânea e articular neurológica infantil crônica (CINCA) (Agostini et al., 2004). Estas desordens são caracterizadas por febres periódicas, aumento dos níveis séricos de proteínas de fase aguda, inflamações articulares, rachaduras na pele e, eventualmente, amiloidoses. CINCA é a mais severa dessas doenças com eventual desenvolvimento de cegueira e retardo mental. Em pacientes com FCU, os sintomas são normalmente desencadeados pela exposição ao frio. As mutações identificadas são principalmente mutações de ganho de função encontradas no domínio NOD do NALP-3, o qual promove ativação aumentada do

inflamassoma, resultando em uma produção de IL-1 β muito elevada. Monócitos de pacientes com MWS e CINCA secretam mais IL-1 β e IL-18 que doadores saudáveis. O antagonista do receptor de IL-1 β demonstrou ser efetivo no tratamento dessas síndromes (Hoffman et al., 2004).

Mutações específicas do NALP1 estão possivelmente associadas com vitiligo ou vitiligo com um fenótipo de doença auto-imune (Jin et al., 2007). O papel do NALP-1 em desordens auto-imunes foi evidenciado em outras doenças como a doença auto-imune de Addison, de diabetes tipo I (Magitta et al., 2008) e dermatite atópica (Macaluso et al., 2007).

Isso mostra que uma ativação anormal do inflamassoma, resultando em uma ativação alterada da IL-1 β e/ou NF- κ B, não causa somente doenças auto-imunes raras, mas também pode contribuir para uma patogênese complexa das desordens auto-imunes e inflamatórias mais comuns. De acordo com esta hipótese, um possível mecanismo de susceptibilidade aumentada a desordens imunológicas é descrita no trabalho de O'Sullivan onde a IL-1 β promove a proliferação e a produção de citocinas pelas células T efectoras/memória CD4(+)CD25(+)FoxP3(-), atenuando a função regulatória das células T CD4(+)CD25(+)FoxP3(+), bloqueando a supressão dos linfócitos T efetores auto-reativos CD4(+)CD25(-). Portanto, uma grande expressão constitutiva de IL-1 β em um indivíduo geneticamente predisposto pode promover a expansão e função auto-reativa de células T efectoras, que atenua a habilidade das células T reguladoras de manter a tolerância ao próprio (O'Sullivan et al, 2006).

Recentemente, em camundongos com a mutação R258W de NALP-3, tem sido demonstrado que a inflamação da pele induzida e/ou por contato apresentou um perfil de citocina predominante da célula Th17 em tecidos afetados. O defeito nestes camundongos reside nas células apresentadoras de antígeno e não na célula T (naive),

sendo atribuída ao excesso de produção de IL-1 β . É possível que distúrbios na homeostase das células T estejam presentes, já que a ativação do inflamassoma está associada com a morte celular necrótica e que a presença de proteínas endógenas resultantes dessa morte celular possam desencadear respostas autoimunes (Meng et al., 2009).

Neste contexto, uma morte celular não-efetiva ou na incapacidade do sistema imune inato em remover “debris” celulares, após a morte da célula, pode ativar respostas inflamatórias através da ativação dos PRRs, incluindo TLRs e NLRs. Existem evidências de que células necróticas liberam moléculas endógenas (sinais DAMP) que promovem uma atividade adjuvante na ativação celular (Bianchi, 2007). A presença de “debris” celulares resultantes de um processo de apoptose não adequado tem sido considerada a principal hipótese etiopatogênica relacionada ao lúpus. Além disso, a ativação específica do inflamassoma ASC/NALP3 induz exposição de MHC-II na superfície dos macrófagos para uma rápida apresentação de antígenos estranhos como parte de uma resposta imune adaptativa que é coordenada com a inflamação local (Qu et al, 2007).

Foi descrito recentemente outro aspeto que liga os inflamassomas e a imunidade adaptativa onde células CD4⁺ T efetoras e de memória de camundongos deletam a ativação dos inflamassomas NALP-1 e NALP-3 e a subsequente secreção de IL-1 β em macrófagos através do contato célula-célula (Guarda et al, 2009).

Doenças inflamatórias e auto-imunes comuns apresentam uma patogênese multifatorial, no qual o fator genético é importante. A família dos genes NALP, pela sua função importante na resposta inflamatória, pode ser um importante campo de estudo na UCI para elucidar possíveis desordens do sistema imune inato e adaptativo na doença.

II. OBJETIVOS

II. OBJETIVOS

Objetivo Geral

A proposta do projeto foi avaliar o efeito imunomodulatório das estatinas na resposta imune induzida por estímulos policlonais para células T e B ou inato em linfócitos ou monócitos em pacientes com Urticária Crônica Idiopática e indivíduos saudáveis.

Objetivos Específicos

- Efeito *in vitro* de concentrações molares da sinvastatina e lovastatina na resposta proliferativa de CMN de pacientes e controles a PHA, SEA, TT e PWM, nas fases do ciclo celular de CMN estimuladas por PHA e PWM por citometria de fluxo e na produção de IL-5, IL-10, IFN- γ e IL-17A de CMN e/ou CD4+ estimuladas por PHA;
- Avaliar a expressão dos genes SOCS3 e RORC γ t em CMN e/ou células CD4+ estimuladas por PHA e a influência das estatinas por real-time PCR;
- Efeito direto ou da pré-incubação das estatinas na produção de IL-1 β , IL-6, MIP1- α , TNF- α em cultura de CMN e/ou CD14+ estimuladas por LPS;
- Avaliar a expressão da enzima regulatóriaIDO em CMN e células CD14+ e fatores pró-inflamatórios como NALP3, Caspase-1 e IL-18 induzida por LPS em células CD14+ e a influência das estatinas por real-time PCR.

III.CASUÍSTICA

III. CASUÍSTICA

Foram selecionados pacientes com quadro de urticária crônica idiopática (N=22, média idade = $49 \pm 12,5$ anos, de 22-67 anos, 19 mulheres e 3 homens), com sintomas recorrentes acima de seis semanas de duração no Ambulatório de Urticária do Departamento de Dermatologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP. O uso de anti-histamínicos pelos pacientes foi evitado por pelo menos 48 horas antes da coleta da amostra como descrito previamente (Lourenço et al., 2008).

Pacientes com urticária-vasculite ou urticária física (dermatografismo, urticária ao frio, urticária colinérgica) e doenças auto-inflamatórias constituíram critérios de exclusão. Indivíduos saudáveis, sem urticária, (N=41, média idade = $42 \pm 10,0$ anos, de 22-60 anos, 30 mulheres e 11 homens) foram utilizados como grupo controle. O sangue dos pacientes foi coletado, após assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (Anexo A). Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética do Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo (Cappesq n^o: 1158/05) (Anexo B).

IV. MATERIAIS E MÉTODOS

IV. MATERIAIS E MÉTODOS

1. Obtenção de células mononucleares (CMN) do sangue periférico: Amostra de sangue periférico foi coletada em tubo heparinizado estéril, diluída, volume a volume, em solução fisiológica e centrifugada por 20 minutos a 2200 rpm em solução gradiente de Ficoll-Hypaque (Amersham Pharmacia Biotech, NJ, EUA) para obtenção de CMN. Após duas lavagens em meio de cultura RPMI-1640 (Inlab, Diadema, SP, BR) suplementado com gentamicina (10 µg/mL, Novafarma, SP, BR) a 1100 rpm por 10 minutos, as células obtidas foram quantificadas em contador automático (Cell Dyn 1400, Abbot) e a concentração de células foi ajustada de acordo com o ensaio a ser realizado. A viabilidade celular foi observada com auxílio do corante Azul de tripan.

2. Obtenção de células CD14+ e células T CD4+: CMN obtidas conforme descrito no item 1 foram incubadas com microbeads magnéticas CD14+ (CD14 microbeads, MACS, Miltenyi Biotec, Germany) por 20 minutos a 4° C. Em seguida, a suspensão celular foi lavada com tampão PBS/0,5%BSA/2 mM EDTA a 1500 rpm por 10 minutos, o sobrenadante foi removido e o pellet ressuspendido em 500µL de tampão. A suspensão foi aplicada na coluna MACS MS (MACS separation columns, Miltenyi Biotec) acoplada ao campo magnético. A população de células CD14+ retidas na coluna foram eluídas com tampão fora do campo magnético e lavadas a 1500 rpm por 10 minutos. As células não marcadas foram eluídas e processadas para a obtenção de células T CD4+ (CD4+ microbeads, MACS, Miltenyi Biotec). O número de células foi quantificado em contador automático (Cell Dyn 1400, Abbot) e a pureza das populações celulares (>90%) obtidas foi verificada por citometria de fluxo (FACScalibur, BD, Califórnia, USA).

3. Influência da estatina na resposta proliferativa a mitógenos e antígenos: Para avaliar a ação modulatória da estatina na resposta aos mitógenos PHA, SEA, PWM e ao antígeno de toxóide tetânico foram realizados ensaios de linfoproliferação em presença de várias concentrações molares de sinvastatina e/ou lovastatina.

CMN (2×10^6 /mL) foram distribuídas em microplaca de 96 orifícios (Costar, Cambridge, MA) com meio de cultura RPMI suplementado com 10% de soro AB (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA, RPMI-S), PHA (2,5 μ g/mL, Gibco), SEA (0.04 μ g/ml, Sigma), PWM (5 μ g/mL; Sigma) e TT (0.04 Lf/ml, Instituto Butantã, Brazil) na presença ou não de concentrações variadas (0.25, 1.0, 5.0 e 25 μ M) de estatinas (Calbiochem, La Jolla, CA) e incubadas a 37° C em estufa a 5% CO₂ por 3 (PHA e SEA) e 6 (PWM e TT) dias, respectivamente.

Dezoito horas antes do término do cultivo, as culturas foram pulsadas com 1 μ Ci/poço de [³H]- timidina (Amersham Pharmacia) e aspiradas com o auxílio de coletor de células automático (Skatron, Dinamarca). A incorporação de timidina triciada foi avaliada em um contador Betaplate 1205 (Wallac Oi, Turku, Finland). Os resultados das culturas expressos por cpm (contagem por minuto) foram avaliados por delta cpm (Δ cpm = média cpm das culturas com estímulo – média cpm das culturas sem estímulo).

4. Influência da estatina no ciclo celular de células estimuladas por PHA e PWM:

Para avaliar a atividade modulatória das estatinas nas fases do ciclo celular, culturas de CMN estimuladas por PHA e PWM foram analisadas pela incorporação de bromodeoxiuridina (BrdU) ao DNA. As fases do ciclo celular (G₀/1, S, G₂/M e apoptose) foram analisadas na região de linfócitos total por citometria de fluxo.

CMN na concentração de $1,5 \times 10^6$ células/poço em 0,250 mL de RPMI-S em microplaca de 24 orifícios (Costar), foram incubadas em presença de RPMI-S ou 2,5µg/mL de PHA ou 5 µg/mL de PWM por 3 ou 6 dias, respectivamente, na presença ou não de estatina (25 µM, sinvastatina ou lovastatina, Calbiochem) a 37° C em estufa a 5% de CO₂. Dezoito horas antes do término da cultura foi adicionado 10µM de BrdU (BD Pharmingen™, San Diego, CA).

Ao término da cultura as células foram coletadas e lavadas com 500µL de solução de DPBS (Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline) / 3% de soro fetal bovino (SFB) e centrifugadas por 5 minutos a 1000 rpm. Posteriormente as células foram ressuspendidas em 50µL de tampão Citofix/Cytoperm (BD Pharmingen™) e incubadas por 20 min a 4° C. Após nova lavagem com 500µL tampão Perm Wash (BD Pharmingen™) foi adicionado 50µL de tampão Cytoperm Plus (BD Pharmingen™) por 10 min a 4° C. Após nova lavagem, foi adicionada 50µL DNase (30µg/mL, BD Pharmingen™) em DPBS por 1 hora a 37° C. Uma nova lavagem foi realizada e as células foram incubadas com anticorpo monoclonal anti-BrdU FITC (Fluorescein Isothiocyanate) por 20 minutos em temperatura ambiente. Em seguida, foi realizada a marcação com 10µL de 7-AAD PC5 (Phycoerythrin-Cyanin 5) e as células foram ressuspendidas em tampão DPBS/3% SFB e avaliadas no citômetro de fluxo BD FACSCalibur™ (CA, EUA) utilizando o programa BD Cell Quest Pro™. Para avaliar a população de linfócitos foram definidas regiões baseadas no tamanho (FSC) e granulosidade (SSC), com uma aquisição de no mínimo de 10.000 eventos totais.

5. Influência da estatina na produção de citocinas de culturas de CMN estimuladas

com mitógenos: A suspensão de CMN, obtida como descrito no item 1, foi distribuída na concentração de $1,5 \times 10^6$ células/poço na microplaca de 24 orifícios (Costar) em RPMI-S, em presença de LPS (100ng/mL, Sigma) por 24 horas ou PHA (2,5 µg/mL, Gibco) por 48 horas com ou sem sinvastatina (25 µM, Calbiochem) e incubadas a 37° C em estufa a 5% de CO₂. Algumas culturas foram incubadas inicialmente com sinvastatina (25µM) por 24 horas e com LPS por mais 24 horas. A dosagem de citocinas nos sobrenadantes foi realizada por ensaio imunoenzimático (ELISA) e as células foram congeladas em RNA later (Sigma) para posterior extração de RNA.

6. Influência da estatina na produção de citocinas de culturas de células CD14+ e

CD4+ estimuladas: A suspensão de células CD14+, obtida como descrito no item 2, foi distribuída na concentração de $0,75 \times 10^6$ células/poço na microplaca de 48 orifícios (Costar) em RPMI-S, e incubadas inicialmente com sinvastatina (25µM) e/ou seu inibidor mevalonato (400µM) por 24 horas e com LPS (1µg/mL, Sigma) por mais 2 horas. A suspensão de células CD4+ foram incubadas com PHA (2,5 µg/mL, Gibco) por 48 horas com ou sem sinvastatina (25 µM, Calbiochem) e/ou seu inibidor mevalonato (400µM) a 37° C em estufa a 5% de CO₂. Foi realizada a dosagem de citocinas (IL-1β, TNF-α, MIP1-α e IL-17) nos sobrenadantes por ensaio imunoenzimático (ELISA) e as células foram congeladas em RNA later (Sigma) para posterior extração de RNA.

7. ELISA para dosagem de citocinas:

A determinação de IL-1β, IL-5, IL-6, IL-10, IL-17A, IFN-γ, TNF-α e MIP1-α nos sobrenadantes de cultura de CMN foi realizada por ELISA, seguindo as especificações do fabricante (R&D System, Minneapolis, MN).

Microplacas com 96 poços (A-2, Costar) foram sensibilizadas com anticorpos monoclonais anti-citocinas diluídos em PBS e incubadas por 18 horas a temperatura ambiente. As placas foram bloqueadas com PBS/SAB 4% (Sigma) e incubadas por uma hora a temperatura ambiente. Em seguida, após um ciclo de três lavagens com tampão PBS/0,05% Tween-20, foram adicionadas as amostras e as diluições seriadas da curva padrão. As placas foram incubadas por 1 hora a temperatura ambiente e, após o término deste período, os respectivos anticorpos anti-citocinas biotinilados foram adicionados às placas e incubados por 1 hora a temperatura ambiente. A seguir, após um ciclo de três lavagens, foi adicionada estreptoavidina peroxidase (Sigma) seguida de uma incubação de 45 minutos a temperatura ambiente. Após novas lavagens, foi adicionado o substrato 3, 3', 5, 5' tetrametilbenzidina (Calbiochem). A reação foi interrompida pela adição de ácido sulfúrico 1M e a leitura foi realizada em leitor de microplacas de Elisa (Molecular Devices, CA, EUA) a 450 nm. O limite de detecção foi de 15 pg/mL (IL-1 β), 2 pg/mL (IL-5), 13 pg/mL (IL-10), 3 pg/mL (IFN- γ), 14 pg/mL (TNF- α), 7 pg/mL (IL-6), 28 pg/mL (IL-17) e 3 μ g/mL (MIP1- α).

8. Reação em cadeia da polimerase em tempo real

O RNA total de $0,75 \times 10^6$ CMN foi extraído com *RNeasy Mini Kit* (Qiagen, Valencia, CA, USA) seguindo as orientações fornecidas pelo fabricante. Para obtenção de cDNA a partir do RNA total purificado foi utilizada a metodologia do kit Sensiscript Reverse Transcriptase (Qiagen). O procedimento da PCR em tempo real foi realizada como descrito previamente (Dos Santos et al., 2008).

Para a realização da reação de amplificação em tempo real, foram utilizados para cada amostra de cDNA (1 μ g) 10 μ L da solução *Platinum SYBR Green qPCR SuperMix-UDG* (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), 0,4 μ L de *ROX Reference Dye*, 7,3 μ L de água

destilada estéril e 200nM do *primer* (Invitrogen). A síntese dos primers foram sintetizados pela Invitrogen (São Paulo, SP, BR). Sequência dos primers: albumina (sense 5'-GCTGTCATCTCTTGTGGGCT GT-3', antisense 5'-AAACTCATGGGAGCTGCTGGTT-3'); IDO (sense 5'-GGTCAT GGAGATGTCCGTAA -3', antisense 5'-ACCAATAGAGAGACCAGGAAGAA -3'); Caspase-1 (sense 5'-ATCCGTTCCATGGGTGAAGGTACA-3', antisense 5'-CAAATGCCTCCAGCTCTGTAATCA-3'); IL-18 (sense 5'-GCTTGAATCTAAATTATC AGTC-3', antisense 5'-GAAGATTCAAATTGCATCTTAT-3'); NALP3 (sense 5'-GGCATATCACGTGGGATTC-3', antisense 5'-GATCTTCGCTGCGAT CAAC-3'); RORC γ t (sense 5'-TGGAAGTGGTGCTGGTTAGGA-3', antisense 5'-AAGGCTCGGAACAGCTCCAT-3'); SOCS3 (sense 5'-AGGAATGTAGCAGCGATG GAA-3', antisense 5'-GCCCTGTCCAGCCCAATAC-3'). A amplificação foi realizada a 45 ciclos de 15 segundos a 95°C, 30 segundos a 60°C e 30 segundos a 72°C, em termociclador iCycler (BioRad, EUA). Os dados obtidos foram interpretados com o programa iCycler iQ Program (BioRad). Os resultados foram avaliados pelo threshold cycle (ct) do gene de interesse normalizado com o ct do controle interno (albumina). A expressão quantitativa relativa dos genes foram calculadas como $2^{-\Delta\Delta CT}$ de acordo com Livak et al. (2001).

9. Análise estatística: A comparação entre os grupos foi realizada utilizando o teste estatístico não paramétrico, *Man-Whitney* e *Wilcoxon* teste pareado para comparar variáveis entre controles e paciente UCI. O teste de *Kruskal-Wallis* com pós-teste de *Dunn's* foi utilizado para comparar dados não pareados entre 3 grupos de dados. O nível de significância foi considerado quando $P \leq 0,05$.

V.RESULTADOS

V. RESULTADOS

1. Características demográficas dos pacientes com Urticária Crônica Idiopática

Para o estudo foram selecionados 22 pacientes com Urticária Crônica Idiopática (UCI) do Ambulatório de Dermatologia HC-FMUSP (Tabela I). A distribuição dos pacientes por sexo foi predominante de mulheres (19) em relação aos homens (3), com idade média de $49 \pm 12,5$ anos. A duração das lesões dos pacientes foi de $13,89 \pm 14,41$ anos. A ocorrência de angioedema foi detectável em 54,54% dos pacientes. As características individuais dos pacientes com UCI encontram-se na Tabela II (Anexo I).

Tabela I. Características demográficas dos pacientes com Urticária Crônica Idiopática

Número de Pacientes	22
Mulheres/Homens	19/3
Idade (Variação)	$49 \pm 12,5^*$ (22-67 anos)
Duração das lesões (anos)	$13,89 \pm 14,41^*$
Angiodema	12/22 (54,5%)

* média \pm D.P.

2. Influência das estatinas na resposta linfoproliferativa aos mitógenos e antígenos de pacientes com UCI e controles

Inicialmente, foi avaliado se as estatinas são capazes de influenciar na capacidade proliferativa das CMN de pacientes com UCI e controles a fitohemaglutinina (PHA), ao mitógeno pokeweed (PWM), ao superantígeno enterotoxina A de *Staphylococcus aureus* (SEA) e ao antígeno específico toxóide tetânico (TT). Para tal, foram realizadas culturas de CMN na presença ou não de concentrações molares de sinvastatina e/ou lovastatina por três dias (PHA e SEA) e seis dias (PWM e TT) de incubação.

Na figura 3a, pode-se observar que as concentrações de 5 μ M e 25 μ M da sinvastatina inibiu significativamente a proliferação de CMN em resposta a PHA de pacientes UCI e controles comparados às culturas na ausência da droga. O perfil de inibição da resposta proliferativa é similar para os estímulos SEA (Fig 3b), TT (Fig 3c) e PWM (Fig 4), onde verificamos inibição significativa com concentrações acima de 5 μ M de sinvastatina e/ou lovastatina em ambos os grupos. O perfil de inibição mostra que 1 μ M de sinvastatina (Fig 5d) é mais eficaz para inibir a resposta proliferativa em 75% sendo que a lovastatina atinge 45%. Já com doses superiores a 5 μ M as drogas mostram similar potencial inibitório, acima de 95% (Fig 5e).

A Figura 5 ilustra o percentual de inibição da resposta proliferativa à PHA (Fig 5a), SEA (Fig 5b), TT (Fig 5c) pela sinvastatina e ao PWM pela sinvastatina (Fig 5d) e lovastatina (Fig 5e). Na qual, a menor dose das drogas, 0,25 μ M, induz 30% de inibição da proliferação, enquanto que em concentração cem vezes superior (25 μ M) a inibição foi de 100% para as CMN de controles e pacientes. Os resultados mostram que as estatinas em elevadas concentrações são capazes de inibir a capacidade mitogênica das

células T e B e a resposta antígeno específica, similarmente em indivíduos saudáveis ou de pacientes com UCI.

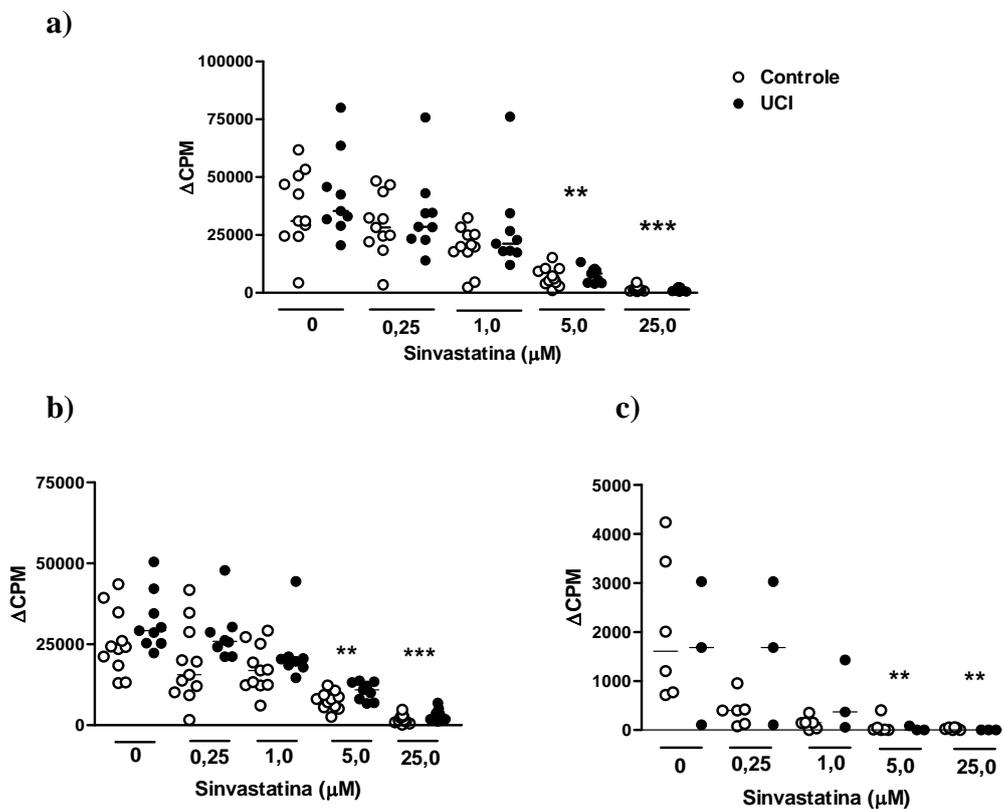
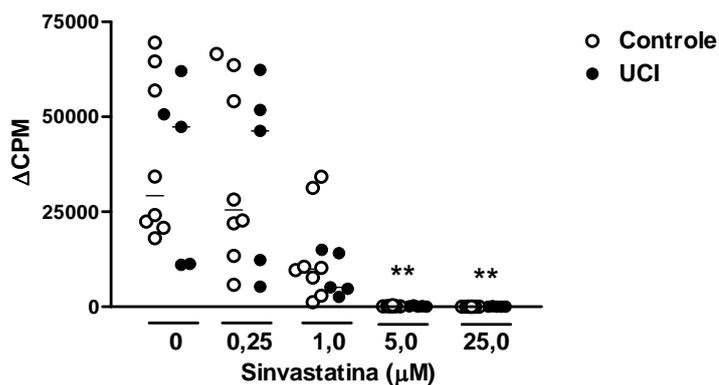


Figura 3. Efeito de concentrações de simvastatina na resposta proliferativa. CMN (1×10^6 céls/mL) de sangue periférico de controles ($n=6-11$) ou de pacientes ($b, n=3-9$) foram estimuladas com PHA (a, $2,5 \mu\text{g/mL}$), SEA (b, $0,04 \mu\text{g/mL}$) e TT (c, $0,04 \text{ Lf/mL}$) na presença ou não de concentrações de simvastatina ($0,25-25 \mu\text{M}$) e incubados a 37°C por três ou seis dias. Os resultados estão expressos em Δcpm (média do cpm da cultura estimulada – média do cpm da cultura não estimulada). ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$ quando comparados com a resposta à PHA na ausência da droga (0).

a)



b)

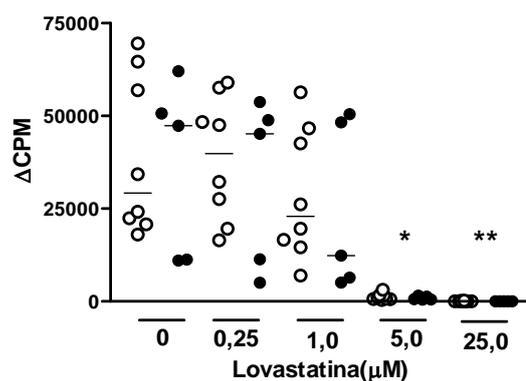


Figura 4. Efeito de concentrações de estatinas na resposta proliferativa a PWM. CMN (1×10^6 céls/mL) de sangue periférico de controles ($n=8$) ou de pacientes ($n=5$) foram estimuladas com PWM ($5 \mu\text{g/mL}$) na presença ou não de concentrações de simvastatina (a) e lovastatina (b) (0,25-25 μM) e incubados a 37°C por seis dias. Os resultados estão expressos em Δcpm (média do cpm da cultura estimulada – média do cpm da cultura não estimulada). * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, quando comparados com a resposta à PWM na ausência da droga (0).

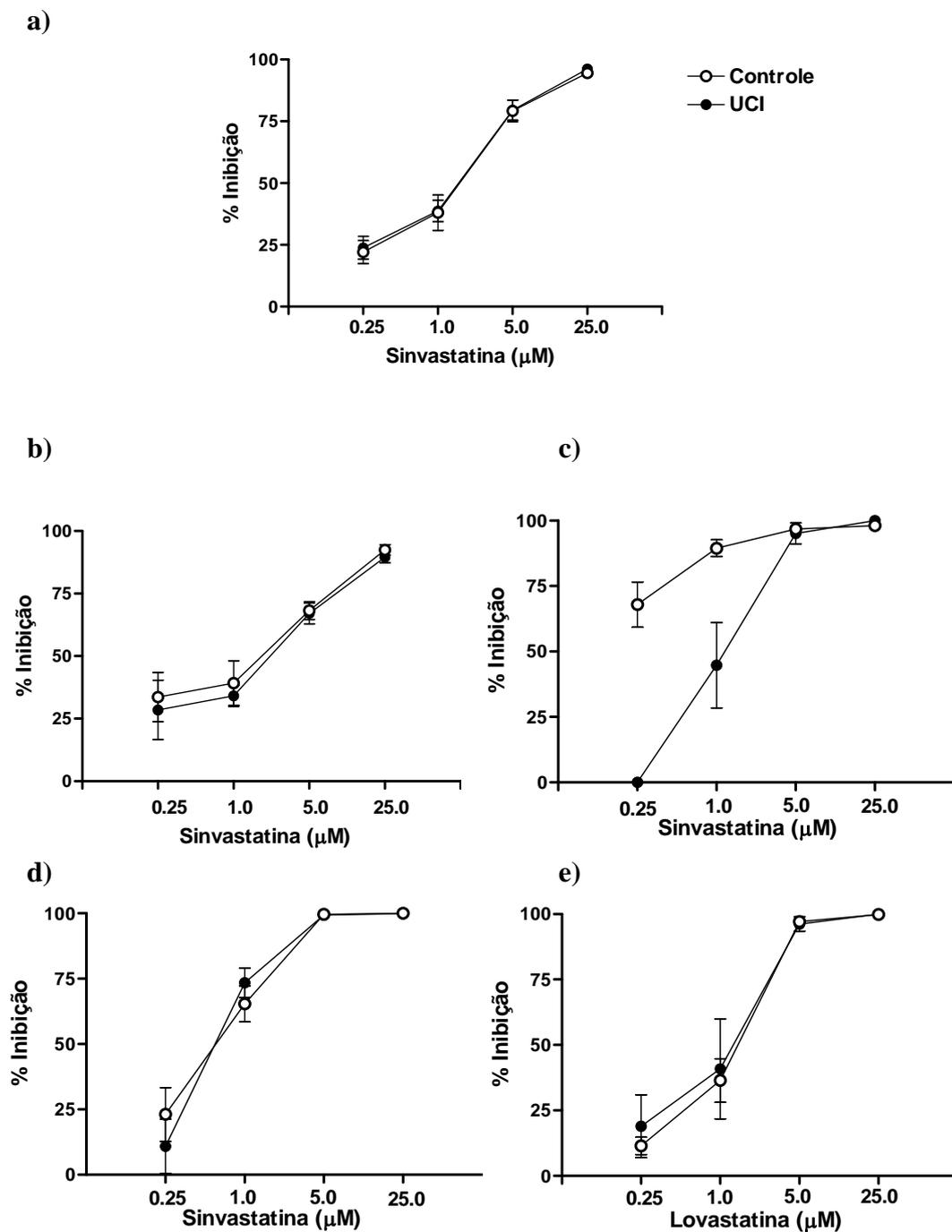


Figura 5. Percentual de inibição da proliferação de CMN pelas estatinas. CMN (1×10^6 céls/mL) foram incubadas com PHA (a, $2,5 \mu\text{g/mL}$), SEA (b, $0,04 \mu\text{g/mL}$), TT (c, $0,04 \text{ Lf/mL}$) PWM (d e e, $5,0 \mu\text{g/mL}$) na presença ou não de concentrações de sinvastatina e/ou lovastatina ($0,25$ - $25 \mu\text{M}$) e incubados por três ou seis dias a 37°C . Os resultados estão expressos em média \pm erro padrão da porcentagem de inibição da resposta proliferativa em Δcpm .

3. Influência da estatina no ciclo celular em resposta a PHA e PWM

Como foi observado um acentuado decréscimo da proliferação celular em paralelo ao aumento da concentração de estatinas, prosseguimos para avaliar qual a influência das drogas nas fases do ciclo celular e também na viabilidade celular. Para tal, foram realizadas culturas de CMN de indivíduos controles e pacientes com PHA (2,5µg/mL) e PWM (5,0µg/mL) em presença das drogas, sinvastatina ou lovastatina (25µM) por três ou seis dias de incubação, respectivamente. As fases do ciclo celular G0/1, S, G2/M e também apoptose de linfócitos totais foram analisadas pela incorporação de bromodeoxiuridina (BrdU) por citometria de fluxo.

Sinvastatina e lovastatina são capazes de inibir a progressão do ciclo celular em CMN estimuladas por PHA de pacientes UCI e controles. Entretanto, apenas nas CMN de controles houve uma significativa inibição na porcentagem das células na fase S e G2/M do ciclo celular para ambas as drogas comparando-se às culturas na ausência das drogas (Fig 6). Além disto, a lovastatina induz aumento significativo no número de células em apoptose nos controles. O histograma na Fig 7 ilustra o efeito da droga nas fases do ciclo celular.

Efeito similar ao da PHA foi observado com o estímulo das CMN de controles por PWM, porém não foi significativo (Fig 8). A figura 9 ilustra o histograma das etapas do ciclo celular em resposta ao estímulo por PWM e as respectivas porcentagens de linfócitos totais em cada fase do ciclo.

Em conjunto, os resultados indicam que a estatina é capaz de inibir a resposta mitogênica de células T e B de pacientes com UCI e controles. Esta inibição mediada pelas estatinas é decorrente do bloqueio da fase inicial do ciclo celular (Fase G0/1), que

impede o prosseguimento para outras fases do ciclo celular. A concentração de 25 μ M de lovastatina foi capaz de induzir apoptose nessas células.

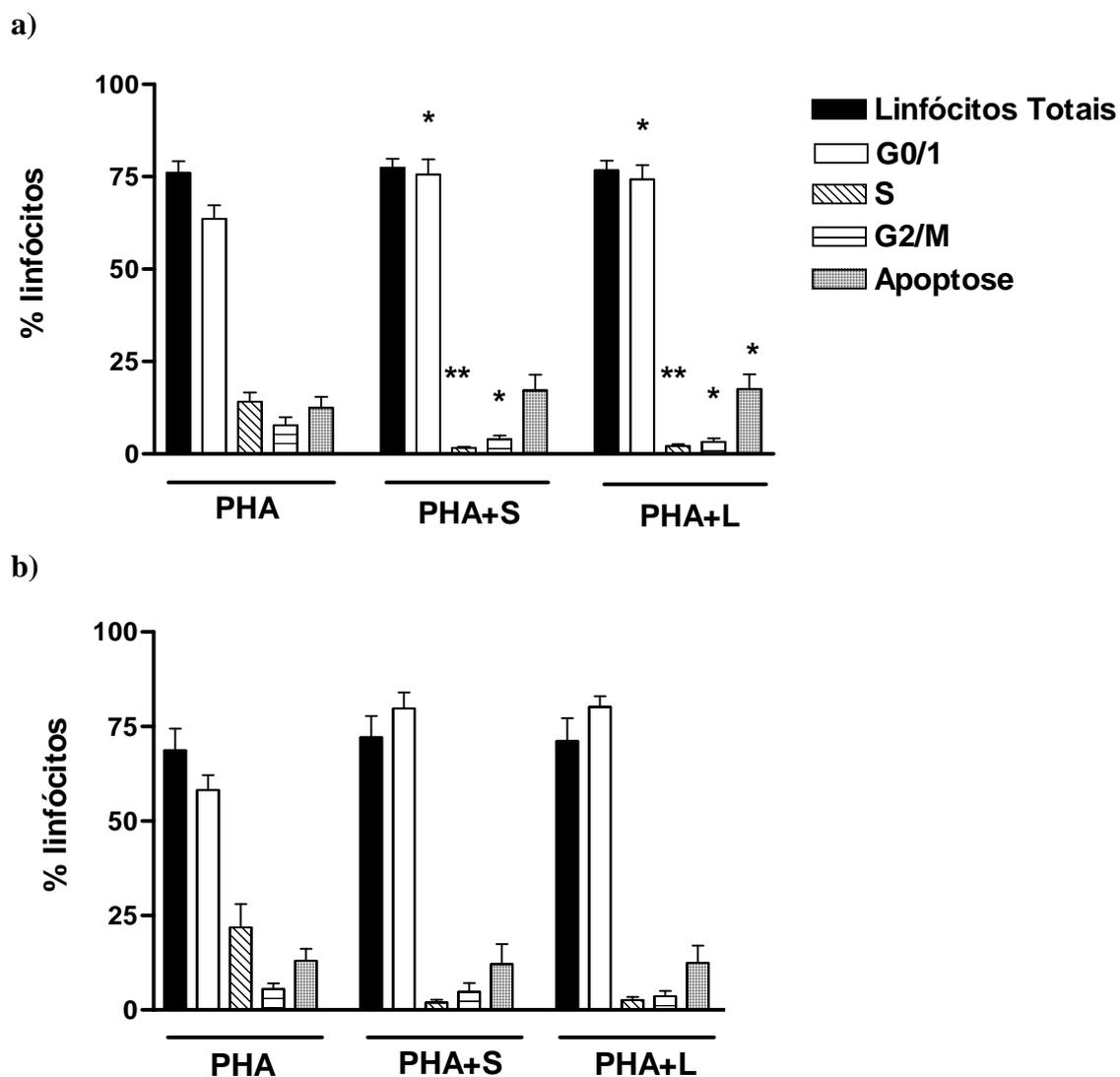
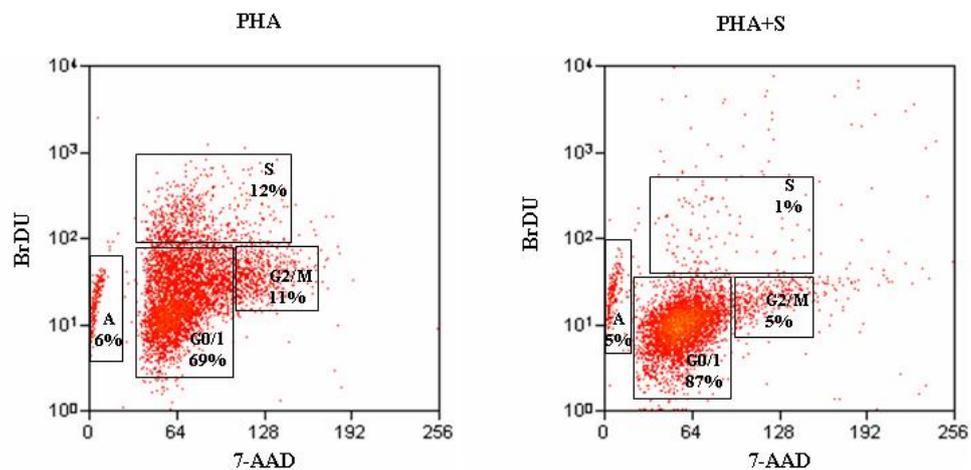


Figura 6. Etapas do ciclo celular de CMN de indivíduos controle (a, n=5) e pacientes UCI (b, n=4). CMN foram incubadas na presença de PHA (2,5µg/mL), sinvastatina (S, 25µM) e lovastatina (L, 25µM) por 72 horas. A incorporação de BrdU foi feita 18 horas antes do término da cultura. Os resultados estão expressos como média ± erro padrão do percentual de linfócitos totais analisados por citometria de fluxo. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ quando comparado às respectivas fases do ciclo celular estimulados com PHA na ausência da droga.

a)



b)

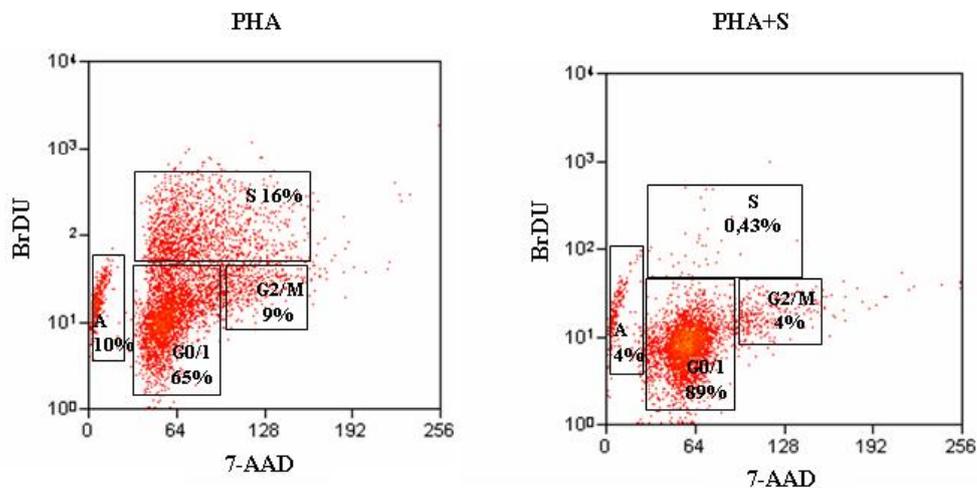


Figura 7. Histograma ilustrativo das etapas do ciclo celular. CMN (1×10^6 céls/mL) de indivíduo controle (a) e paciente UCI (b) foram incubadas na presença de PHA ($2,5 \mu\text{g/mL}$) e sinvastatina (S, $25 \mu\text{M}$) por 72 horas. Em cada quadrante está expresso o valor percentual obtido na população de células totais através de ensaio de incorporação de BrdU 18 horas antes do término da cultura por citometria de fluxo (10.000 eventos). Fase G0/1; Fase S; Fase G2/M e Apoptose.

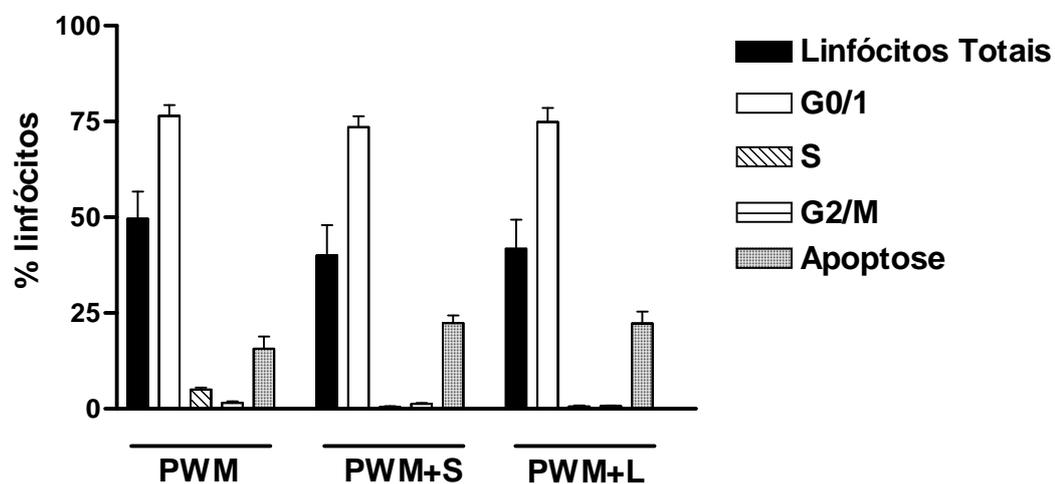


Figura 8. Etapas do ciclo celular de CMN de indivíduos controle (n=4). CMN foram incubadas na presença de PWM (5 μ g/mL), sinvastatina (S, 25 μ M) e lovastatina (L, 25 μ M) por 6 dias. A incorporação de BrdU foi feita 18 horas antes do término da cultura. Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão do percentual de linfócitos totais analisados por citometria de fluxo.

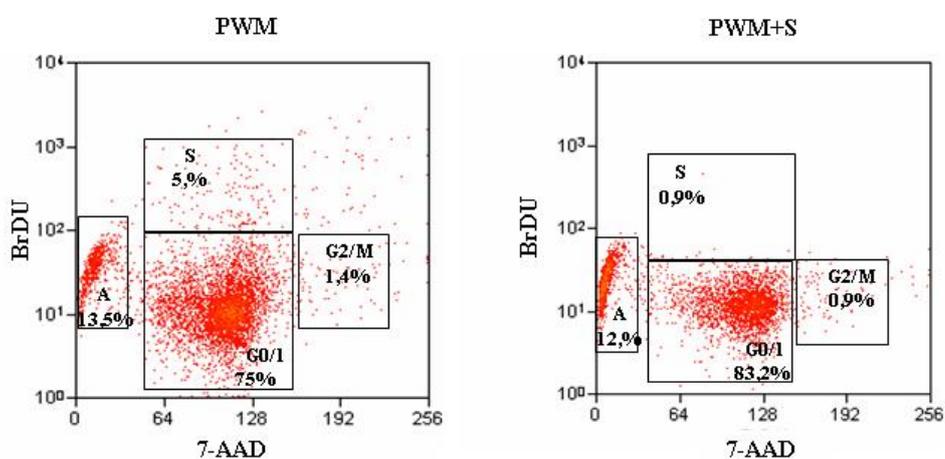
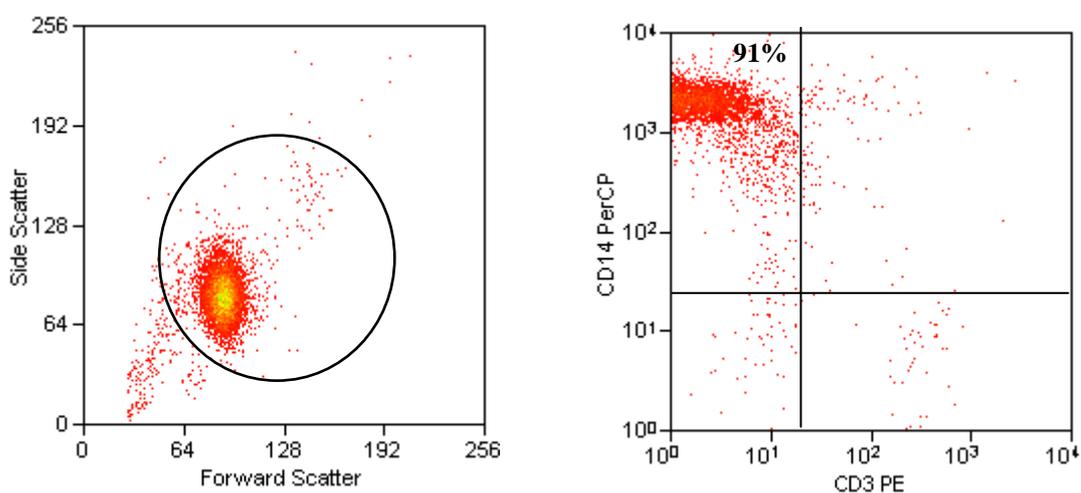


Figura 9. Histograma ilustrativo das etapas do ciclo celular. CMN (1×10^6 céls/mL) de indivíduo controle foram incubadas na presença de PWM ($5,0 \mu\text{g/mL}$) e sinvastatina (S, $25 \mu\text{M}$) por 72 horas. Em cada quadrante está expresso o valor percentual obtido na população de células totais através de ensaio de incorporação de BrdU 18 horas antes do término da cultura por citometria de fluxo (10.000 eventos). Fase G0/1; Fase S; Fase G2/M e Apoptose.

4. Obtenção de células CD14+ e CD4+ purificadas

Para investigar a influência das estatinas em populações de células CD14+ (monócitos) e células T CD4+ purificadas, as CMNs de controles e pacientes UCI foram marcadas com microbeads magnéticas CD14+ ou CD4+ e obtidas por seleção positiva. A pureza da população celular foi analisada por citometria de fluxo. A pureza das células CD14+ (Fig 10a) e CD4+ (Fig 10b) obtidas foram superiores a 90%.

a)



b)

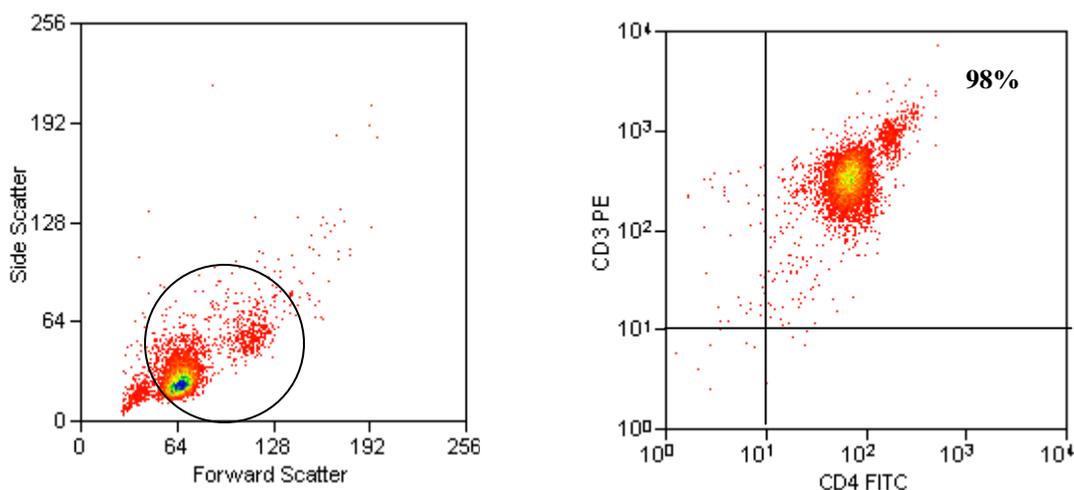


Figura 10. Histogramas ilustrativos da pureza de células CD14+ (a) e células T CD4+ (b) de um indivíduo controle. A população celular foi avaliada pelo tamanho e granulosidade por citometria de fluxo.

5. Efeito da simvastatina na secreção de citocinas, fatores regulatórios e inflamatórios em CMN e células CD4+ estimuladas por PHA de pacientes com UCI e controles

Após observar a inibição da proliferação e ciclo celular, passamos a investigar qual a influência da simvastatina na secreção de citocinas e na expressão de fatores regulatórios em resposta a PHA, em CMN e células T CD4+.

A dosagem de citocinas foi realizada nos sobrenadantes de cultura de CMN estimuladas com PHA por 48 horas (IFN- γ , IL-10, IL-5 e IL-17a), na presença de simvastatina (25 μ M).

Na Figura 11 pode-se observar que após o estímulo com a PHA, apesar da tendência de diminuição da produção de IFN- γ , IL-10 e IL-17 dos pacientes em relação ao grupo controle, não houve diferença estatística entre os grupos. A adição de simvastatina às culturas reduziu significativamente a produção de IFN- γ , IL-10, IL-5 e IL-17, de ambos pacientes e controles, atingindo um percentual de inibição de até 90%.

Os resultados mostram que a simvastatina é eficazmente capazes de inibir a produção de citocinas pró-inflamatórias (IFN- γ e IL-17A) ou regulatórias (IL-10) por estímulo policlonal de células T.

O próximo passo foi investigar o gene RORC γ t envolvido na produção de IL-17 e também o gene supressor da sinalização de citocinas 3 (SOCS3), relacionado com a regulação das citocinas IL-6, IL-23 e também IL-17 (Elliott e Johnston, 2004). A expressão de mRNA de RORC γ t em células CD4+ estimulados por PHA foi similar entre controles e pacientes UCI na ausência de simvastatina, entretanto a droga induziu um aumento significativo de RORC γ t nas células CD4+ de controles (Fig 12). A

secreção de IL-17A (Fig 13) pelas células CD4⁺ é inibida pela sinvastina em ambos os grupos, efeito similar ao observado na secreção desta citocina em CMN (Fig 11).

Quando analisamos a expressão de SOCS3 em CMN de controles e pacientes UCI observamos aumento significativo em células de pacientes em relação ao controle. Entretanto, a sinvastina induziu aumento significativo na expressão deste fator apenas em CMN de controles (Fig 14). Em células CD4⁺ não houve alteração da expressão de SOCS3 pela estatina (Fig 15).

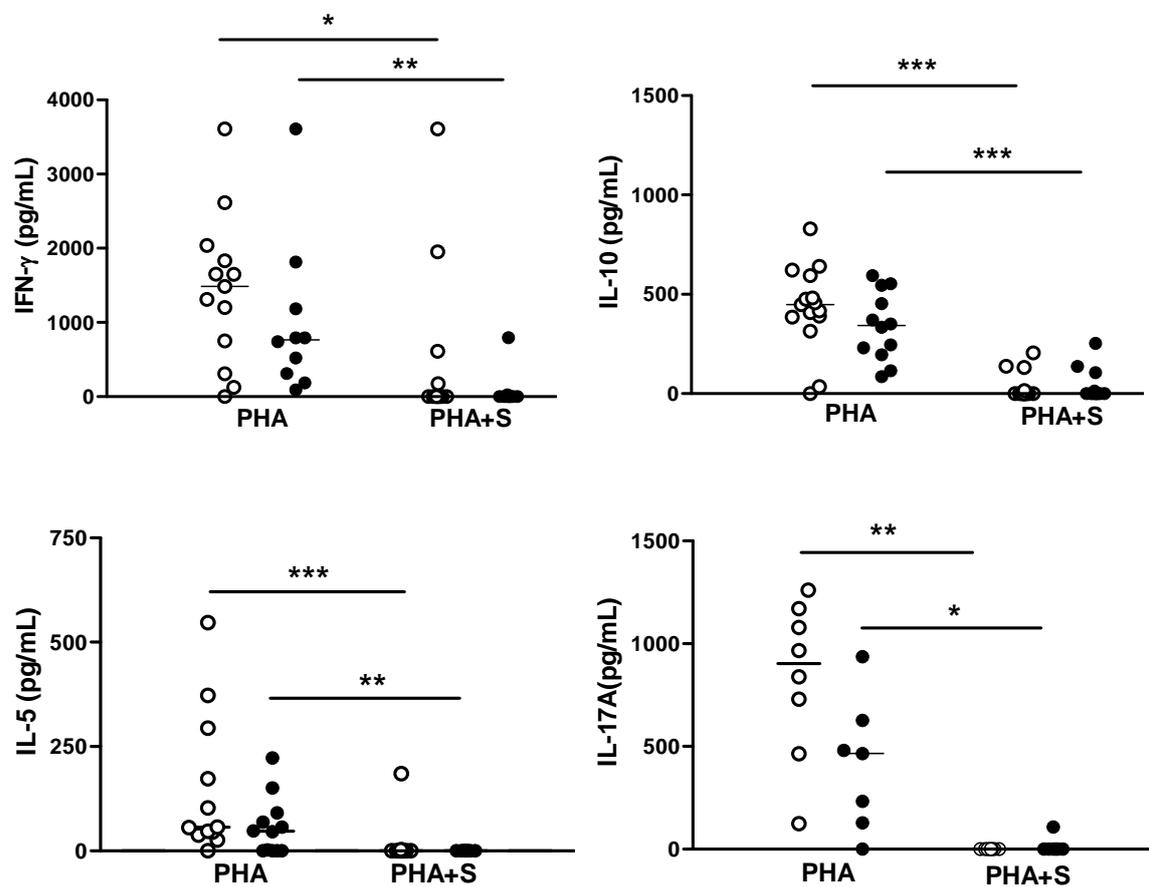


Figura 11. Efeito da simvastatina na produção de IFN- γ , IL-10, IL-5 e IL-17A induzidas por PHA. CMN (3×10^6 céls/mL) de pacientes com UCI (●, n=7-12) e controles (○, n=8-13) foram cultivados com PHA (2,5 μ g/mL) na presença ou não de simvastatina (S, 25 μ M) por 48 horas a 37°C. Os sobrenadantes das culturas foram avaliados por ELISA. * $P < 0,05$ ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$ quando comparados com a ausência da droga.

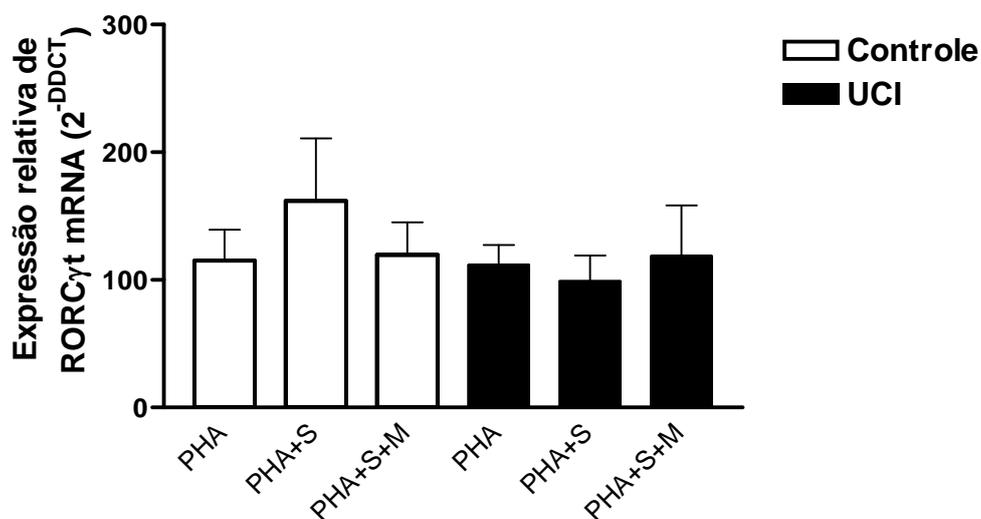


Figura 12. Efeito das estatinas na expressão relativa de mRNA de RORC γ t. Células CD4⁺ ($0,75 \times 10^6$ céls/mL) de controles (n=10) e pacientes com UCI (n=8) foram cultivados com PHA ($2,5 \mu\text{g/mL}$) na presença ou não de sinvastatina (S= $25 \mu\text{M}$) e seu inibidor mevalonato (M, $400 \mu\text{M}$) por 48 horas a 37°C . A expressão do mRNA foi quantificada por real time-PCR. Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão.

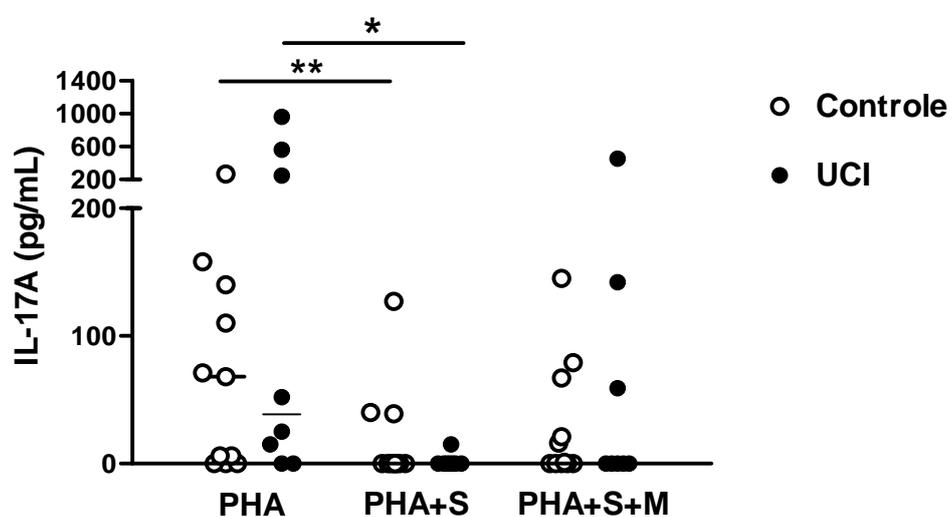


Figura 13. Efeito da sinvastatina na produção de IL-17A induzida por PHA. Células CD4⁺ ($0,75 \times 10^6$ céls/mL) de controles (n=11) e pacientes com UCI (n=8) foram cultivados com PHA ($2,5 \mu\text{g/mL}$) na presença ou não de sinvastatina (S= $25 \mu\text{M}$) e seu inibidor mevalonato (M, $400 \mu\text{M}$) por 48 horas a 37°C . Os sobrenadantes das culturas foram avaliados por ELISA. * $P < 0,05$ ** $P < 0,01$, quando comparados com a ausência da droga.

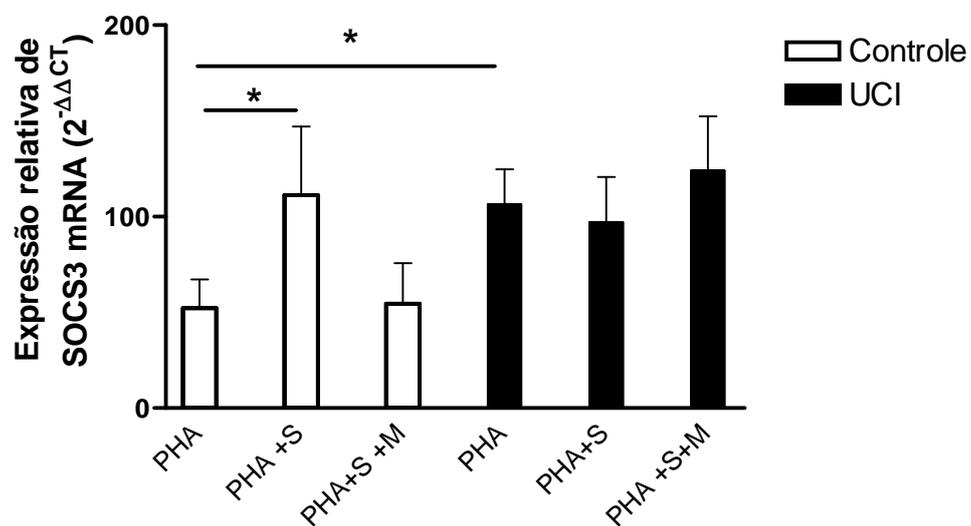


Figura 14. Efeito das estatinas na expressão relativa de mRNA de SOCS-3. CMN ($0,75 \times 10^6$ céls/mL) de controles (n=8) e pacientes com UCI (n=5) foram cultivados com PHA ($2,5 \mu\text{g/mL}$) na presença ou não de sinvastatina (S= $25 \mu\text{M}$) e seu inibidor mevalonato (M, $400 \mu\text{M}$) por 48 horas a 37°C . A expressão do mRNA foi quantificada por real time-PCR. Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão.

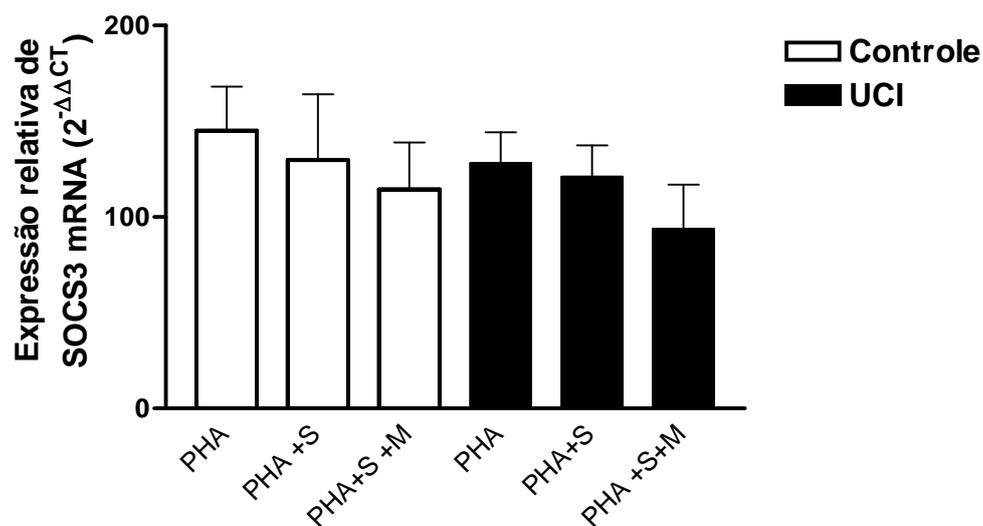


Figura 15. Efeito das estatinas na expressão relativa de mRNA de SOCS-3. Células CD4⁺ ($0,75 \times 10^6$ céls/mL) de controles (n=12) e pacientes com UCI (n=6) foram cultivados com PHA ($2,5 \mu\text{g/mL}$) na presença ou não de sinvastatina (S= $25 \mu\text{M}$) e seu inibidor mevalonato (M, $400 \mu\text{M}$) por 48 horas a 37°C . A expressão do mRNA foi quantificada por real time-PCR. Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão.

6. Efeito das estatinas na secreção de citocinas, fatores regulatórios e inflamatórios em CMN e células CD14+ estimuladas por LPS de pacientes com UCI e controles

Para avaliar o efeito das estatinas na resposta imune inata via TLR4, CMN e células CD14+ foram estimuladas por LPS. Primeiramente analisamos a secreção de TNF- α , IL-6 e MIP-1 α de CMN induzidas por LPS onde foram detectados níveis similares entre o grupo de pacientes e controles (Fig 16). A adição simultânea de sinvastatina e LPS não interferiram na produção de IL-6, entretanto, inibiu a produção de TNF- α e de MIP1- α somente nas culturas de CMN de indivíduos controle comparado às culturas na ausência da droga. O percentual de inibição observado nos indivíduos controle foi de 42% para TNF- α e 56% para MIP1- α .

Como foi observado que a sinvastatina adicionada simultaneamente ao estímulo com LPS não foi eficaz para modular negativamente a produção de citocinas, foi avaliado o efeito da incubação por 24 horas com as drogas, sinvastatina e lovastatina nas concentrações de 2,5 e 25 μ M, previamente ao estímulo com LPS.

A pré-incubação das células com as drogas não interferiu na produção de TNF- α de CMN dos pacientes, mas a sinvastatina manteve a inibição da citocina pelas células dos indivíduos controle (Fig. 17a), como observado com a adição simultânea da droga com o LPS. Já com a incubação prévia com lovastatina, independente da dose, não houve inibição da produção de TNF- α (Fig 17b), porém o efeito inibitório foi evidenciado pela maior dose das drogas na produção de MIP-1 α (Fig. 18) e IL-6 (Fig. 19) tanto pelas CMN de controle e de pacientes com UCI.

Quando a secreção das citocinas foi analisada em células CD14+ não observamos diferença significativa de TNF- α (Fig 20a) e IL-1 β (Fig 20b) entre controles e pacientes UCI. Estes dados corroboram com os observados com o pré-tratamento e

co-cultivo das CMN com as estatinas e LPS onde não foi observado efeito inibitório na secreção de TNF- α nas células de pacientes UCI (Fig 17). Em contraste, as células CD14⁺ de pacientes UCI secretam altos níveis de MIP-1 α comparados aos controles (Fig 20c) e a sinvastatina foi capaz de inibir esta secreção em ambos os grupos.

Após observar o efeito sobre a secreção das citocinas passamos a investigar a influência desta droga em fatores regulatórios como a expressão da enzima IDO e também em fatores envolvidos com a inflamação como o genes NALP3, CASP1 e IL-18.

O LPS induz diminuição significativa da expressão do mRNA de IDO em CMN de pacientes UCI em relação aos controles, mostrando uma alteração na expressão da enzima na UCI. A incubação com sinvastatina ou lovastatina modula negativamente esta expressão (Fig 21). Quando cultivamos apenas células CD14⁺ na presença de LPS e da sinvastatina este efeito não é observado, sugerindo que este efeito é induzido pela presença da população de células T e que na UCI esta interação celular pode estar alterada (Fig 22).

A análise de genes relacionados com os inflamassomas NALP em resposta ao estímulo da resposta imune inata mostrou que a expressão de mRNA de NALP3 (Fig 23a), Caspase-1 (Fig 23b) e IL-18 (Fig 23c) não estão alteradas na UCI e que a sinvastatina não exerce influência. Estes dados evidenciam que esta condição de estímulo ou de tratamento das células com sinvastatina não causa modulação na resposta dos inflamassomas na UCI.

Em conjunto, os dados evidenciam o potencial imunomodulatório das estatinas, seja na entrada do ciclo celular, e conseqüentemente na capacidade de produção de citocinas em resposta a estímulo de células T e em menor intensidade ao estímulo com LPS, principalmete nas células CD14⁺. Além disto, as drogas também são capazes de

interferir em mecanismos de regulação, como na expressão de IDO, que está deficiente nos pacientes UCI.

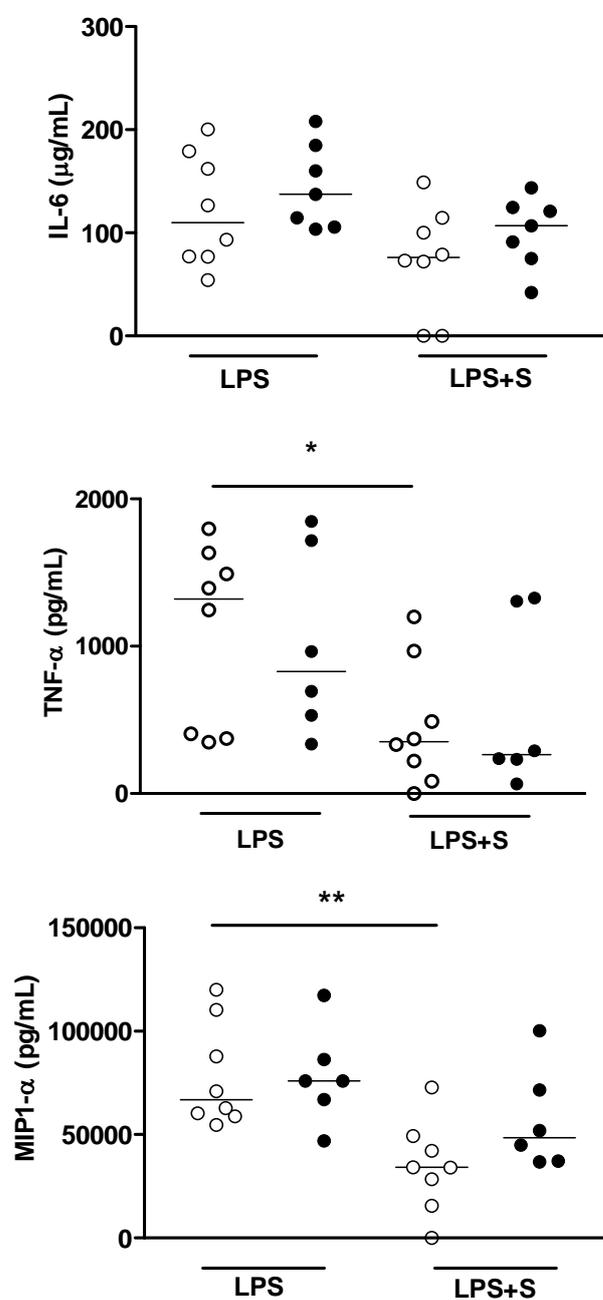
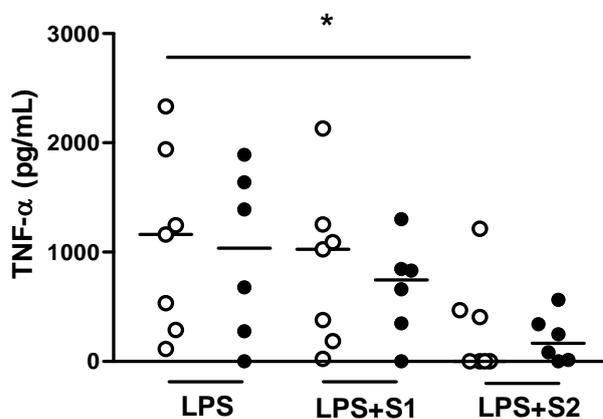


Figura 16. Efeito da sinvastatina na produção de IL-6, TNF- α e MIP1- α em CMN em resposta ao LPS. CMN (3×10^6 céls/mL) de controles (\circ , n=8) e pacientes com UCI (\bullet , n=6-7) foram cultivados com LPS (100ng/mL) na presença ou não de sinvastatina (S=25 μ M) por 24 horas a 37°C. Os sobrenadantes das culturas foram avaliados por ELISA. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ quando comparados com a ausência da droga.

a)



b)

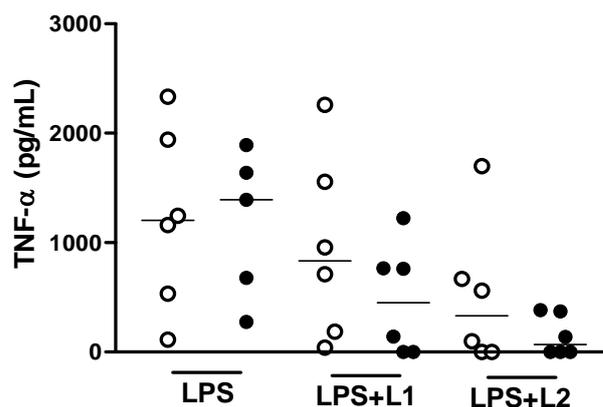


Figura 17. Efeito das estatinas na produção de TNF- α em CMN em resposta ao LPS. CMN (3×10^6 céls/mL) de controles (\circ , $n=6-7$) e pacientes com UCI (\bullet , $n=6$) foram incubados com sinvastatina (a) e lovastatina (b) (S1/L1= $2,5 \mu\text{M}$, S2/L2= $25 \mu\text{M}$) por 24 horas e com LPS (100 ng/mL) por 24 horas a 37°C . Os sobrenadantes das culturas foram avaliados por ELISA e expressos como mediana. $*P < 0,05$ quando comparados com a ausência da droga.

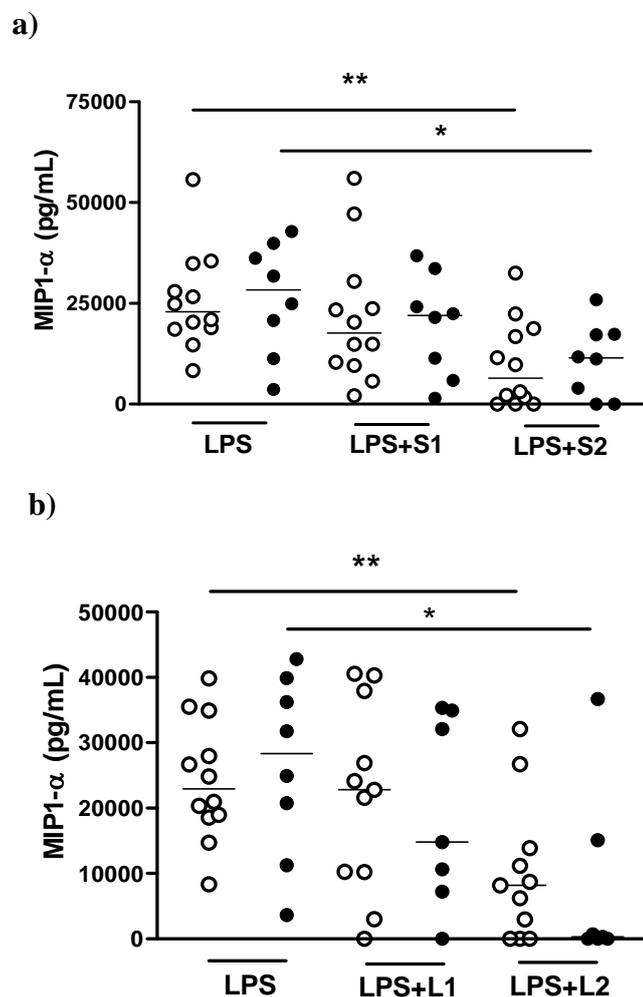
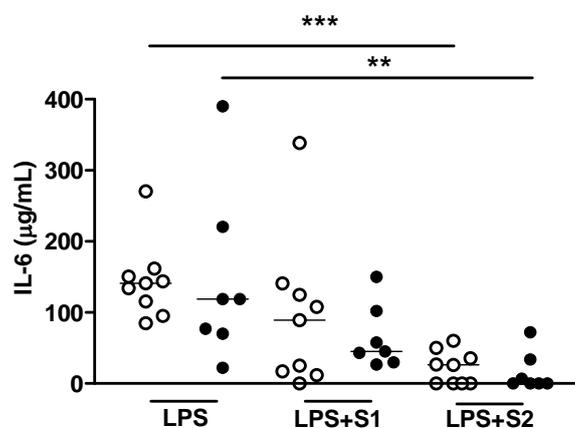


Figura 18. Efeito das estatinas na produção de MIP1- α por CMN em resposta ao LPS. CMN (3×10^6 céls/mL) de controles (\circ , $n=9$) e pacientes com UCI (\bullet , $n=7$) foram incubados com sinvastatina (a) e lovastatina (b) (S1/L1= $2,5 \mu\text{M}$, S2/L2= $25 \mu\text{M}$) por 24 horas e estimulado com LPS (100ng/mL) por 24 horas a 37°C . Os sobrenadantes das culturas foram avaliados por ELISA e expressos como mediana. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ quando comparados na ausência da droga.

a)



b)

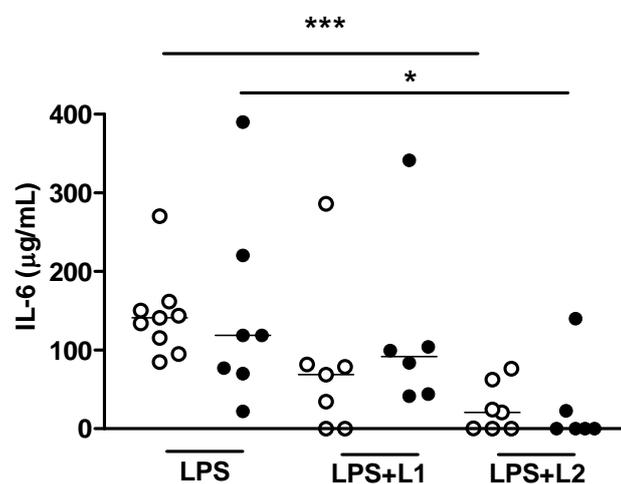


Figura 19. Efeito das estatinas na produção de IL-6 por CMN em resposta ao LPS. CMN (3×10^6 céls/mL) de controles (○, n=9) e pacientes com UCI (●, n=7) foram incubados com sinvastatina (a) e lovastatina (b) (S1/L1=2,5µM, S2/L2=25µM) por 24 horas e após estimulado com LPS (100ng/mL) por 24 horas a 37°C. Os sobrenadantes das culturas foram avaliados por ELISA e expressos como mediana. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$ quando comparados na ausência da droga.

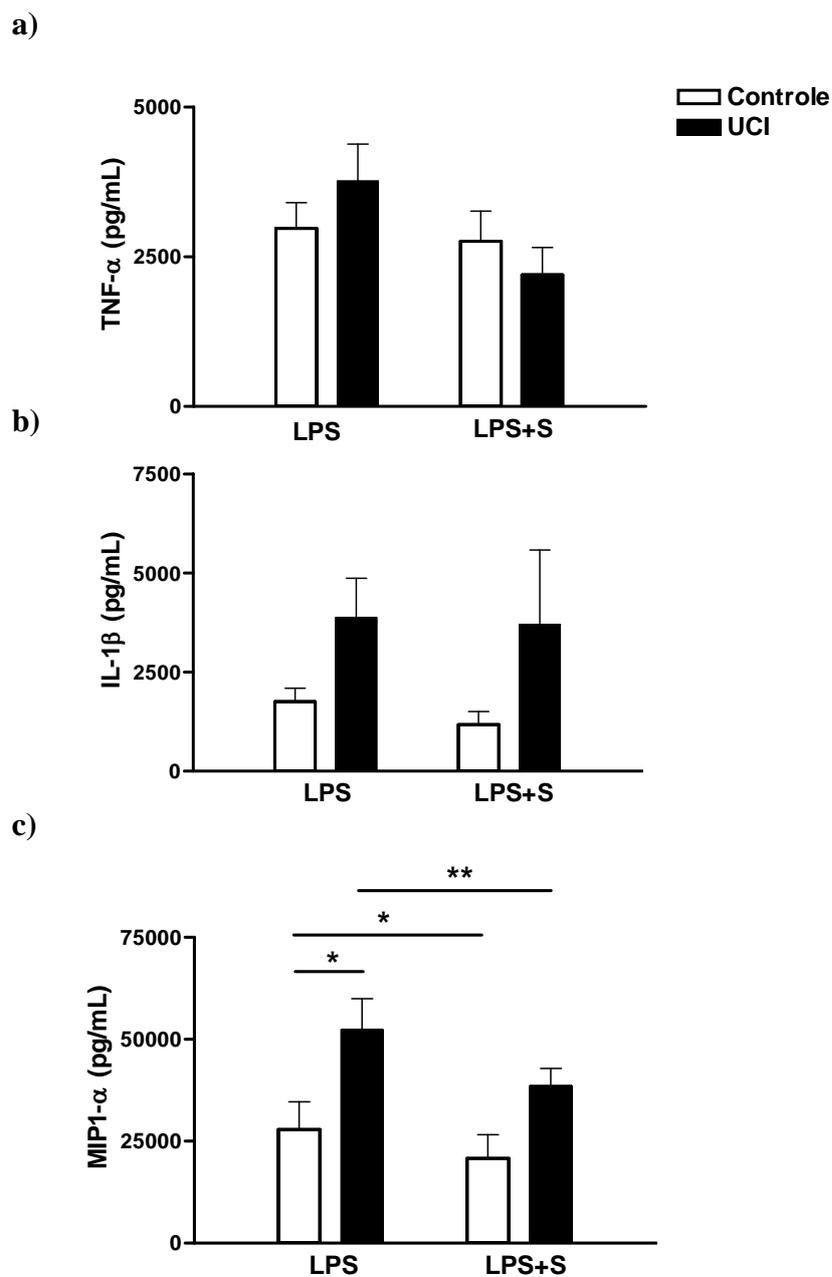


Figura 20. Efeito das estatinas na produção de TNF- α , IL-1 β e MIP-1 α de CD14⁺ em resposta ao LPS. Células CD14⁺ ($0,75 \times 10^6$ céls/mL) de controles (\circ , n=7-9) e pacientes com UCI (\bullet , n=6-7) foram incubados com sinvastatina, (S=25 μ M) por 24 horas e após estímulo com LPS (1 μ g/mL) por 2 horas a 37°C. Os sobrenadantes das culturas foram dosados para TNF- α (a), IL-1 β (b) e MIP-1 α (c) por ELISA. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, quando comparados na ausência da droga.

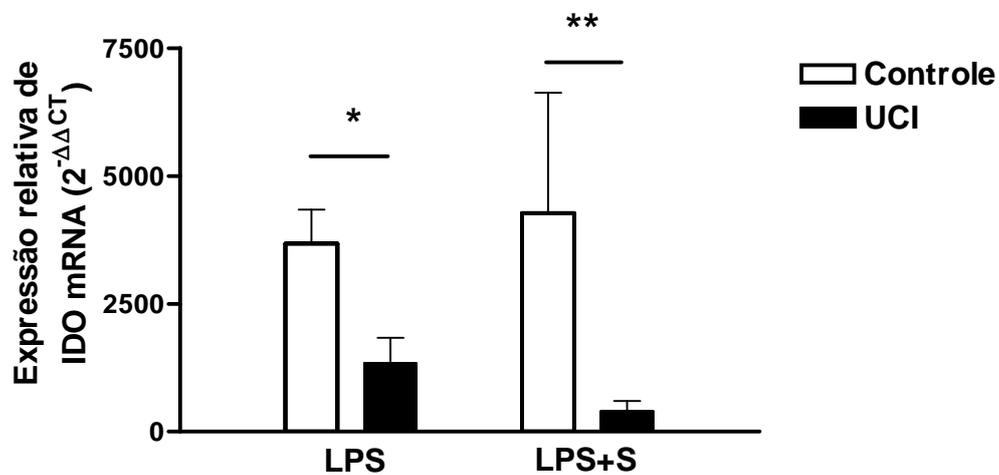


Figura 21. Efeito das estatinas na expressão relativa de mRNA de IDO de CMN em resposta ao LPS. CMN ($0,75 \times 10^6$ céls/mL) de controles ($n=5$) e pacientes com UCI ($n=5$) foram pré-incubados com sinvastatina ($S=25 \mu\text{M}$) por 24 horas e estimulados com LPS (100ng/mL) por 24 horas a 37°C . A expressão do mRNA foi quantificada por real time-PCR. Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$.

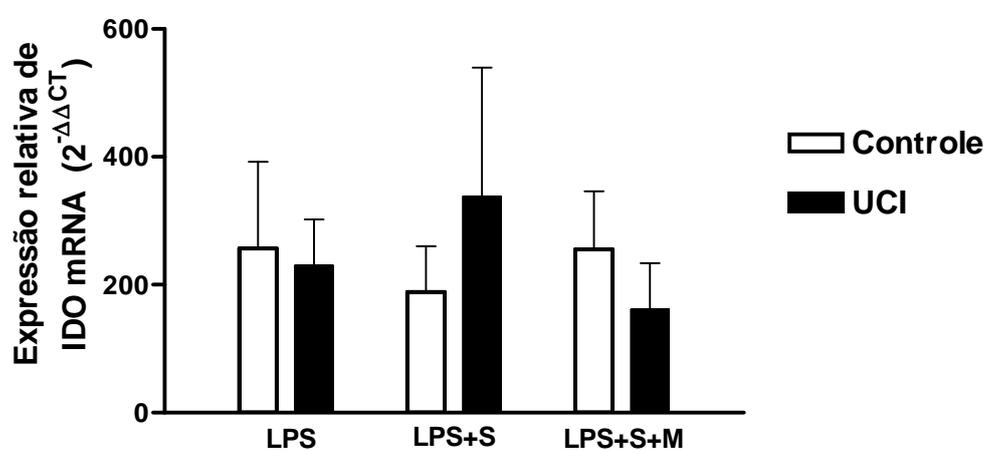


Figura 22. Efeito das estatinas na expressão relativa de mRNA de IDO por monócitos em resposta ao LPS. Células CD14⁺ ($0,75 \times 10^6$ céls/mL) de controles (n=7) e pacientes com UCI (n=6) foram pré-incubados com sinvastatina (S=25 μ M) e/ou seu inibidor mevalonato (M=400 μ M) por 24 horas e estimulados com LPS (1 μ g/mL) por 2 horas a 37°C. A expressão do mRNA foi quantificada por real time-PCR. Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão.

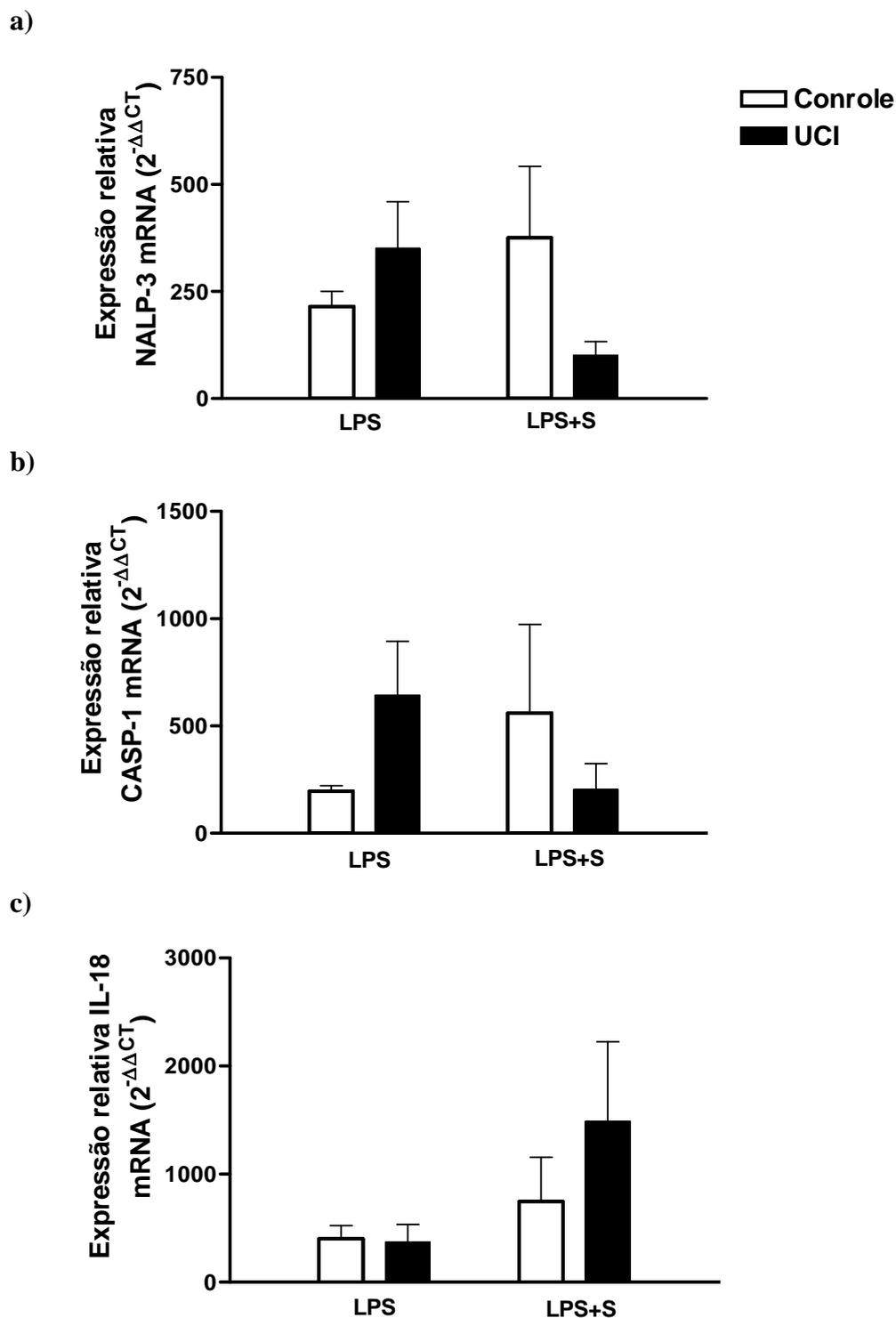


Figura 23. Efeito das estatinas na expressão relativa de mRNA de NALP3, Caspase-1 e IL-18 em monócitos em resposta ao LPS. Células CD14⁺ ($0,75 \times 10^6$ céls/mL) de controles (n=6-7) e pacientes com UCI (n=4-6) foram pré-incubados com sinvastatina (S=25 μ M) por 24 horas e estimulados com LPS (1 μ g/mL) por 2 horas a 37°C. A expressão do mRNA de NALP3 (a), Caspase-1 (b) e IL-18 (c) foi quantificada por real time-PCR. Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão.

VI.DISSCUSSÃO

VI. DISCUSSÃO

Neste projeto foi avaliado o potencial de um agente farmacológico com característica antiinflamatória e imunomodulatória como as estatinas, na resposta proliferativa a mitógenos e antígenos, na progressão do ciclo celular e na produção de citocinas. Outro objetivo do estudo foi avaliar o potencial modulatório das estatinas na expressão de componentes regulatórios como a enzima IDO, a proteína inibidora SOCS3, o fator de transcrição RORC γ τ , citocinas pró-inflamatórias e também sua influência em genes relacionados com os inflamassomas em pacientes com UCI e indivíduos saudáveis.

Os resultados referentes à avaliação da proliferação de CMN em resposta a PHA e PWM mostraram que a sinvastatina e lovastatina em elevadas concentrações são capazes de inibir os níveis basais de proliferação e intensamente a resposta mitogênica de CMNs de pacientes ou de controles. Além disto, observamos que a sinvastatina exerce efeito inibitório em CMN estimuladas por SEA, um superantígeno, e também na resposta antígeno-específico, como o toxóide tetânico, em pacientes UCI e controles. Similarmente, diversos estudos têm mostrado que as estatinas como a atorvastatina, lovastatina e sinvastatina causam inibição da resposta proliferativa induzida pelos mitógenos Con A, PHA e PWM (Bessler et al., 2005). Também foi descrito que a atorvastatina, em concentrações superiores a 1 μ M, é capaz de inibir a proliferação de células T CD4⁺ em resposta a PHA e também ao estímulo por anticorpos anti-CD3/anti-CD28, porém esta droga causa aumento de apoptose em concentrações acima de 10 μ M (Coward e Chow, 2006). Os nossos dados confirmam que as estatinas apresentam amplo efeito imunossupressivo em CMN estimuladas por diferentes vias de estímulo, seja por policlonal, superantígenos e antígenos-específicos.

Avaliamos o efeito das estatinas nas etapas do ciclo celular e na apoptose pela incorporação de bromodeoxiuridina. Nós detectamos que a sinvastatina e lovastatina induzem inibição significativa da proliferação celular em resposta a mitógenos pelo bloqueio na fase G0/1, impedindo a progressão para as fases S e G2/M em controles em resposta a PHA. Nos pacientes UCI este efeito não foi significativo, devido a uma maior ativação das células T que prosseguem pelo ciclo celular e não são afetadas pelo efeito das estatinas. Além disso, nós verificamos que as lovastatina (25 μ M) induziu aumento na porcentagem de células em apoptose em CMN de controles. Provavelmente as células de pacientes UCI necessitam de um maior tempo de cultura com a droga para observar tal efeito. Foi demonstrado que a fluvastatina inibe a progressão do ciclo de células B humanas estimuladas com SAC (*Staphylococcus aureus*) na fase G0/1 para a S e que este mecanismo é independente de apoptose (Naderi et al., 1999). Por outro lado, foi demonstrado que a atorvastatina na concentração de 10 μ M causa parada do ciclo celular de células T CD4⁺ de indivíduos saudáveis, na fase G0/1 em paralelo ao aumento da expressão da molécula p27^{kip1}, e que posteriormente ocorre a apoptose (Brinkkoetter et al.,2006). Neste estudo o aumento da apoptose ocorre tanto em células T *naive* quanto em células T CD4⁺ ativadas após estímulo com um potente ionóforo de cálcio, o PMA (phorbol myristate acetate) e ionomicina e avaliada pela marcação com anexina (Brinkkoetter et al.,2006). Já a fluvastatina induz apoptose de células T CD4⁺ *naive*, mas não em células T CD4⁺ ativadas com altas concentrações de PMA/ionomicina. Além disso, a fluvastatina (10 μ M) inibe a atividade da caspase-8 e aumenta a caspase-9, sugerindo que o mecanismo de indução de apoptose pela fluvastatina pode ser por vias intrínsecas ou extrínsecas (Samson et al., 2005).

O bloqueio do ciclo celular na resposta a PHA, pela estatina, induziu importante diminuição na secreção de IFN- γ , IL-10, IL-5 e IL-17A para pacientes com UCI e

controles. Estes resultados confirmam a eficácia imunomodulatória da droga, capaz de inibir a resposta de células Th1, Th2 e também das citocinas relacionadas com potencial inflamatório como as células Th17, secretoras de IL-17. Similarmente a esses resultados, o efeito inibitório da fluvastatina foi demonstrado na proliferação celular a PHA e na secreção das citocinas IFN- γ e IL-5 em pacientes com asma alérgica (Samsom et al., 2006).

Análise *in vivo* de indivíduos saudáveis submetidos ao tratamento com sinvastatina (40 mg/diária) por seis semanas, mostra que o tratamento não altera a resposta Th1, mas indica uma ação supressora na resposta Th2 (Cherfan et al, 2007). Nossos resultados *in vitro* mostram que a sinvastatina chega a inibir 66% da produção de IFN- γ e 89% de IL-5 pelas CMN de indivíduos controles, sugerindo que a produção de citocina Th2 seja mais suscetível à ação modulatória da droga. Contudo, a produção de IL-5 é aproximadamente 10 vezes menor do que a produção de IFN- γ , ou seja, a menor frequência de células Th2 na resposta à PHA pode ter facilitado a ação inibitória da droga. Além disto, é possível que os fatores de transcrição envolvidos na sinalização da resposta Th2 sejam mais suscetíveis à ação das estatinas. A atorvastatina (1 μ M), em células humanas, parece não exercer efeito no direcionamento da resposta ao padrão Th1 (IFN- γ) ou Th2 (IL-4), já que não interfere na secreção destas citocinas em células TCD4⁺ em resposta ao estímulo com anticorpos anti-CD3/anti-CD28, sugerindo que esta droga não direciona a resposta imunológica (Coward e Chow, 2006). Em modelo murino de encefalomielite autoimune, a atorvastatina promove um desvio de resposta para o padrão Th2 e reverte a paralisia no sistema nervoso dos animais (Youssef et al., 2002). O tratamento *in vivo* dos camundongos com a estatina foi associada com a inibição da fosforilação de STAT 4 e das citocinas IFN- γ e TNF- α e indução de STAT 6 e das citocinas IL-4, IL-5 e IL-10.

As células Th17 são um subtipo de células T CD4⁺ que apresentam um papel importante no desenvolvimento de doenças autoimunes (Furuzawa-Carballeda et al., 2007). Uma das principais citocinas indutoras de IL-17 é a IL-23, que regula também a expressão do receptor de IL-23 (IL-23R) e o fator de transcrição RORC- $\gamma\tau$ (Chen et al., 2007). A IL-17 é detectada em órgãos alvos de pacientes com doenças autoimunes como artrite reumatóide, psoríase e uveíte autoimune, sugerindo ter importante papel em processos autoimunes humanos (Amadi-Obi et al., 2007). Nós observamos inibição na secreção de IL-17A em células de pacientes UCI e controles, e um aumento na expressão do fator de transcrição RORC- $\gamma\tau$ apenas em células de controles. Este resultado sugere que outros fatores podem estar envolvidos no controle da maior expressão de RORC- $\gamma\tau$ em células CD4⁺ de pacientes UCI, como a maior regulação da expressão do fator supressor SOCS3 detectada em CMN estimuladas por PHA.

A indução de SOCS3 pode ter um efeito inibitório em múltiplas vias inflamatórias de sinalização intracelular, regulando negativamente a via JAK/STAT e a expressão de IL-6 e IL-23, e consequentemente inibindo a expressão do fator proinflamatório RORC- $\gamma\tau$ em células CD4⁺ (Zhang et al., 2008). É possível que a maior expressão de SOCS3 encontradas em pacientes UCI em relação aos controles, inibiu a expressão de RORC- $\gamma\tau$ nas células CD4⁺ pela sinvastatina. Baseado nos nossos resultados, em que a expressão de SOCS3 está aumentada em PBMC de pacientes e que a sinvastatina induz aumento na expressão deste gene em controles, efeito não observado em células CD4⁺, sugere a participação de monócitos ou de outras populações celulares como fatores importantes na modulação da secreção de IL-17 por células CD4⁺. Foi demonstrado que sobranadantes de monócitos tratados com sinvastatina e cultivados com células CD4⁺, significativamente inibem a expressão de RORC- $\gamma\tau$ e IL-17 em células CD4⁺ em comparação com células CD4⁺ cultivadas com

sobrenadantes de monócitos não tratados (Zhang et al., 2008). Este estudo mostra que a sinvastatina induz mudanças na secreção de citocinas envolvidas na indução de IL-17 por células CD4+.

Em contraste ao efeito das estatinas na resposta T, a ativação via *Toll like receptor 4* (TLR4) com LPS teve um diferente perfil modulatório na produção de citocinas pró-inflamatórias. O efeito inibitório da produção de TNF- α e MIP1- α foi somente observado pelas células dos controles, sendo que a produção de IL-6 não alterou para nenhum dos grupos analisados. No soro de pacientes com urticária aguda são encontrados níveis aumentados de TNF- α (Fujii et al, 2001) e recentemente, evidenciamos que na UCI, há aumento no nível sérico desta citocina (Dos Santos et al, 2008).

Considerando o baixo potencial modulatório da estatina em resposta ao LPS, foram realizados experimentos em que as drogas foram incubadas por 24 horas previamente ao estímulo por LPS. Nesta condição, foi observado o efeito inibitório da sinvastatina e lovastatina na secreção de IL-6 e MIP1- α em controles e pacientes com UCI. Entretanto, para TNF- α a inibição só foi verificada em controles e apenas para a sinvastatina. Quando analisamos a secreção destas citocinas em células CD14+ estimuladas com LPS nenhuma inibição foi observada para TNF- α em ambos os grupos. O efeito inibitório na secreção de MIP1- α foi mantido, porém foi encontrado um aumento na secreção de MIP1- α em células CD14+ comparadas com controles. Já havia sido descrito aumento na secreção desta quimiocina em pacientes com UCI em PBMC estimulados por PHA (Piconi et al., 2002). É possível que as estatinas tenham um efeito diferencial em células CD14+, estimulando propriedades antiinflamatórias, já que a sinvastatina não afetou a secreção de TNF- α e IL-1 β . Foi demonstrado que a atorvastatina em concentrações entre 0,1 a 1 μ M ou sinvastatina 0,1 a 10 μ M induzem

resposta pró-inflamatória em CMN pela ativação de caspase 1 em monócitos e induzem a secreção de IL-1 β e IL-18 (Coward et al., 2006). As estatinas podem induzir a secreção de citocinas pró-inflamatórias como IL-6, IL-18, IL-1, IL-12 e TNF- α em monócitos e células dendríticas (Yilmaz et al., 2006; Coward et al., 2006).

As estatinas são capazes de induzir inflamassomas, já que estes estão diretamente ligados à secreção de citocinas pró-inflamatórias como IL-1 β e IL-18, as quais regulam doenças auto-imunes e inflamatórias (Nakanishi et al, 2001). Nos nossos resultados não observamos alteração na expressão dos genes NALP-3, caspase-1, IL-18 e na secreção de IL-1 β na população de células CD14 $^{+}$ de pacientes UCI e controles. As estatinas agem sinergicamente com o LPS na indução de IL-1 β em linhagem de células monocíticas (THP-1) através da ativação de caspase-1 (Kuijk et al., 2008). Na MKD (*mevalonate kinase deficiency*), uma doença hereditária onde existe defeito na enzima mevalonato quinase, caracterizada por episódios recorrentes de febre e inflamação foi demonstrado, em células THP-1 tratadas com LPS que a sinvastatina induz um aumento de caspase-1 e IL-1 β devido ao bloqueio da biossíntese de compostos isoprenóides não esteróides (Kuijk et al., 2008). Em monócitos de pacientes com MKD este efeito não foi observado devido à super expressão de NALP3 na condição basal. Estes dados sugerem a participação do NALP-3 inflamassoma nos efeitos inflamatórios observados nessa doença (Pontillo et al., 2010). A sinvastatina é menos eficiente para modular a secreção de citocinas produzidas por células CD14 $^{+}$, principalmente em pacientes UCI, já que a alta concentração utilizada de sinvastatina (25 μ M) não induz a ativação da plataforma dos inflamassomas. Interessantemente, um mecanismo de inibição dos inflamassomas tem sido descrito em células CD4 $^{+}$ de camundongos, onde as células efetoras e de memória bloqueiam seletivamente NALP3 e NALP1 inflamassomas e conseqüentemente a produção de IL-1 β (Guarda et al.,

2009).

A integridade dos mecanismos efetores do sistema imunológico é vital para induzir não só imunidade protetora como para a manutenção do controle da tolerância periférica. Os mecanismos de controle da resposta imune sejam direcionados aos antígenos próprios ou não, envolvem a interação de vários fatores e/ou células com potencial regulatório. Entre estes fatores, a enzima denominada indolamina 2,3-dioxigenase (IDO), responsável pelo catabolismo do aminoácido triptofano, tem sido recentemente destacada por seu amplo efeito imunomodulatório e imunossupressor (Grohmann et al., 2003). A degradação do aminoácido triptofano e a geração dos metabólitos podem exibir amplo espectro de ação no sistema imunológico, tal como, inibir a resposta mediada por células T (Terness et al., 2002). Nós verificamos uma diminuição na expressão de IDO em CMN de pacientes UCI em relação aos controles. Em células CD14+ não observamos diferença na expressão de IDO em ambos os grupos, o que sugere que outros fatores produzidos pelas CMN estimuladas por LPS podem influenciar a expressão da enzima. A deficiência de IDO nas CMN de pacientes sugere ser um dos fatores envolvidos no desequilíbrio imunológico da doença.

Muitos fatores podem estar envolvidos na regulação negativa da expressão de IDO na UCI e devem ser investigados, entretanto, o fato de observarmos um aumento na expressão de SOCS3 em contraste com a supressão da expressão de IDO em PBMC de pacientes sugere a que a IDO está exercendo uma atividade imunogênica mediado por SOCS3. SOCS3 induz a degradação de IDO nos proteossomos levando a uma resposta imunológica não tolerogênica (Orabona et al., 2008). A maior expressão de IDO pelas APCs pode resultar em imunossupressão e redução da resposta das células T (Terness et al., 2002; Frumento et al., 2002; Mellor e Munn , 2004).

Em conjunto, a UCI mostrou ter um distúrbio na expressão de fatores regulatórios, que podem contribuir para a patogênese da doença, como IDO e SOCS3. Os resultados mostram que a estatina é capaz de modular eficazmente a resposta mediada por CMN em resposta ao estímulo policlonal ou antígeno-específico, por conseqüente bloqueio na fase de síntese do ciclo celular. Por outro lado, o efeito modulatório das estatinas é menos eficaz em monócitos e na modulação da resposta inata, já que não induz a maior expressão dos inflamassomas na UCI. As estatinas apresentam mais efeitos antiinflamatórios que pró-inflamatórios, sugerindo ser uma alternativa terapêutica eficaz para a UCI e outras doenças inflamatórias.

VII.CONCLUSÕES

VII. CONCLUSÕES

- As estatinas inibem de maneira dose-dependente a resposta proliferativa de CMN por estímulos de células T e B por bloqueio na fase inicial do ciclo celular, gerando inibição de citocinas Th1, Th2 e Th17;
- Ao estímulo por LPS, a capacidade modulatória das estatinas é menos eficaz;
- CMN de pacientes com UCI mostraram ter uma menor expressão da enzima regulatória IDO e um aumento na expressão de SOCS3 sugerindo desequilíbrio nos mecanismos regulatórios que podem contribuir para a cronicidade da doença;
- A droga é capaz de interferir em mecanismos de regulação, como na expressão de IDO em CMN, porém tal efeito não é observado em células CD14+, sugerindo o envolvimento de outras populações celulares na indução da enzima;
- As estatinas são capazes de prevenir a expressão dos fatores pró-inflamatórios na UCI;
- Em conjunto, os resultados sugerem um desequilíbrio dos mecanismos regulatórios que poderiam contribuir com a cronicidade e o perfil inflamatório na UCI. As estatinas apresentam maior efeito antiinflamatório que pró-inflamatório, sugerindo ter potencial clínico para o tratamento de doenças crônicas como a UCI.

VIII. ANEXOS

VIII. ANEXOS**ANEXO A- TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

(Instruções para preenchimento no verso)

I - DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME DO PACIENTE :
- DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : SEXO : .M F
- DATA NASCIMENTO:/...../.....
- ENDEREÇO Nº APTO:
- BAIRRO: CIDADE:
- CEP:..... TELEFONE: DDD (.....)
2. RESPONSÁVEL LEGAL
- NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.)
- DOCUMENTO DE IDENTIDADE :.....SEXO: M F
- DATA NASCIMENTO.:/...../.....
- ENDEREÇO: Nº APTO:
- BAIRRO: CIDADE:
- CEP: TELEFONE: DDD (.....).....

II - DADOS SOBRE A PESQUISA CIENTÍFICA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA "Atividade imunorregulatória da enzima indolamina dioxigenase e influência da estatina em células mononucleares de pacientes com Urticária Crônica Autoimune".

PESQUISADOR: Maria Notomi Sato

CARGO/FUNÇÃO: Professor Doutor

INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº CRBM 1690

UNIDADE DO HCFMUSP: Departamento de Dermatologia

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

SEM RISCO RISCO MÍNIMO RISCO MÉDIO RISCO BAIXO RISCO MAIOR

(probabilidade de que o indivíduo sofra algum dano como consequência imediata ou tardia do estudo)

4. DURAÇÃO DA PESQUISA : 2 anos

III - REGISTRO DAS EXPLICAÇÕES DO PESQUISADOR AO PACIENTE OU SEU REPRESENTANTE LEGAL SOBRE A PESQUISA CONSIGNANDO:

1. justificativa e os objetivos da pesquisa 2. procedimentos que serão utilizados e propósitos, incluindo a identificação dos procedimentos que são experimentais 3. desconfortos e riscos esperados 4. benefícios que poderão ser obtidos 5. procedimentos alternativos que possam ser vantajosos para o indivíduo

O Laboratório de Dermatologia e Imunodeficiência (LIM 56) da Faculdade de Medicina da USP está desenvolvendo um estudo para melhor compreender a doença urticária crônica com o objetivo de desenvolver novos tipos de exames e tratamentos. Você está sendo convidado a participar voluntariamente (sem remuneração e de modo não obrigatório) neste estudo. Para isto é preciso coletar 20 ml de sangue de seu braço. Você sentirá a picada da agulha e pode sentir uma leve tontura, que passará em poucos minutos. Um dia após pode aparecer em volta do local da picada uma mancha roxa que desaparece em poucos dias sem maiores problemas. Esta amostra de sangue será utilizada para o estudo de células e substâncias envolvidas no processo inflamatório da Urticária Crônica Autoimune. Este exame tem objetivo de esclarecer uma possível causa da doença urticária crônica e de modo a auxiliar no diagnóstico da doença.

No entanto, se você sentir qualquer tipo de desconforto, antes ou depois dos procedimentos, o médico estará a sua inteira disposição para solucionar o problema ou tirar as dúvidas.

Você não tem nenhuma obrigação de contribuir para este estudo e sua recusa não ocasionará nenhum prejuízo em seu atendimento médico dentro do HC.

IV - ESCLARECIMENTOS DADOS PELO PESQUISADOR SOBRE GARANTIAS DO SUJEITO DA PESQUISA CONSIGNANDO:

1. acesso, a qualquer tempo, às informações sobre procedimentos, riscos e benefícios relacionados à pesquisa, inclusive para dirimir eventuais dúvidas.

Estaremos a sua disposição para qualquer informação ou dúvida sobre o teste a ser realizado nesta pesquisa.

2. liberdade de retirar seu consentimento a qualquer momento e de deixar de participar do estudo, sem que isto traga prejuízo à continuidade da assistência.

Você não tem nenhuma obrigação de contribuir para este estudo e sua recusa não ocasionará nenhum prejuízo em seu atendimento médico dentro do HC.

3. salvaguarda da confidencialidade, sigilo e privacidade.

Os dados obtidos poderão ser acessados somente pelos investigadores, comissão de ética da instituição e autoridades sanitárias do país.

4. disponibilidade de assistência no HC-FMUSP, por eventuais danos à saúde, decorrentes da pesquisa.

A pesquisa não envolve nenhum risco à sua saúde, mas qualquer eventualidade que possa ocorrer durante a coleta de sangue é assegurada a assistência por médicos do HC-FMUSP.

5. viabilidade de indenização por eventuais danos à saúde decorrentes da pesquisa.

Em qualquer eventualidade que possa ocorrer durante a coleta de sangue será assegurada a assistência médica.

V. INFORMAÇÕES DE NOMES, ENDEREÇOS E TELEFONES DOS RESPONSÁVEIS PELO ACOMPANHAMENTO DA PESQUISA, PARA CONTATO EM CASO DE INTERCORRÊNCIAS CLÍNICAS E REAÇÕES ADVERSAS.

VI. OBSERVAÇÕES COMPLEMENTARES:

VII - CONSENTIMENTO PÓS-ESCLARECIDO

Declaro que, após convenientemente esclarecido pelo pesquisador e ter entendido o que me foi explicado, consinto em participar do presente Protocolo de Pesquisa.

São Paulo, de de 2009

assinatura do sujeito da pesquisa ou responsável legal

assinatura do pesquisador
(carimbo ou nome Legível)

ANEXO B



APROVAÇÃO

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 23.03.06, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **1158/05**, intitulado: "Atividade imunorregulatória da enzima indolamina dioxigenase e influência da estatina em células mononucleares de pacientes com Urticária Crônica Autoimune" apresentado pelo Departamento de DERMATOLOGIA, inclusive o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10.10.1996, inciso IX. 2, letra "c")

Pesquisador(a) Responsável: Profa. Dra. Maria Notomi Sato

Pesquisador(a) Executante: Sra. Mayce Helena Azor

CAPPesq, 23 de Março de 2006.

PROF. DR. EUCLIDES AYRES DE CASTILHO
Presidente da Comissão de Ética para Análise
de Projetos de Pesquisa

ANEXO C- Características individuais dos pacientes com Urticária Crônica Idiopática

Paciente	Sexo	Idade	Duração da doença (anos)	ASST	Angiodema	FAN	TPO	TG	Tireopatia
UCI 1	F	38	3	+	+	-	-	-	-
UCI 2	F	55	4	+	+	-	-	-	-
UCI 3	M	67	2	+	-	+	-	-	-
UCI 4	F	28	18	+	+	-	-	-	-
UCI 5	M	22	1,5	+	+	-	-	-	-
UCI 6	F	47	24	+	+	-	-	-	-
UCI 7	F	61	8	+	-	+	-	-	-
UCI 8	F	43	0,5	+	+	+	+	-	+
UCI 9	F	53	4	-	+	-	-	-	-
UCI 10	F	30	7	-	-	-	-	-	-
UCI 11	F	65	34	-	+	-	NC	NC	-
UCI 12	F	57	57	-	+	+	-	-	-
UCI 13	F	39	16	-	-	-	-	-	-
UCI 14	F	40	26	-	+	-	-	-	-
UCI 15	F	54	19	-	+	-	-	-	+
UCI 16	F	51	5	-	+	-	-	-	+
UCI 17	F	42	10	-	-	-	-	-	-
UCI 18	F	50	11	-	-	+	-	-	-

UCI: Urticária Crônica Idiopática, NC: Não Consta, ASST: *Autologous Serum Skin Test*, FAN: Anticorpo Anti-Nuclear, TPO: Anticorpo Anti-Tireoperoxidase, TG: Anticorpo Anti-Tireoglobulina

Tabela 2 (continuação): Características individuais dos pacientes com Urticária Crônica Idiopática

Paciente	Sexo	Idade	Duração da doença (anos)	ASST	Angiodema	FAN	TPO	TG	Tireopatia
UCI 19	F	58	NC	-	NC	-	-	-	-
UCI 20	F	64	NC	-	NC	NC	NC	NC	-
UCI 21	F	60	NC	+	NC	NC	NC	NC	NC
UCI 22	M	61	NC	+	NC	-	-	+	NC

UCI: Urticária Crônica Idiopática, NC: Não Consta, ASST: *Autologous Serum Skin Test*, FAN: Anticorpo Anti-Nuclear, TPO: Anticorpo Anti-Tireoperoxidase, TG: Anticorpo Anti-Tireoglobulina

IX. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

IX.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Agostini L, Martinon F, Burns K, McDermott MF, Hawkins PN, Tschopp J. NALP3 forms an IL-1beta-processing inflammasome with increased activity in Muckle-Wells autoinflammatory disorder. *Immunity*. 2004 Mar;20(3):319-25.

Ahn KS, Sethi G, Aggarwal BB. Simvastatin potentiates TNF-alpha-induced apoptosis through the down-regulation of NF-kappaB-dependent antiapoptotic gene products: role of IkappaBalpha kinase and TGF-beta-activated kinase-1. *J Immunol* 2007;178(4):2507-16.

Asero R, Cugno M, Tedeschi A. Chronic idiopathic urticaria: what is the meaning of skin reactivity to autologous serum? *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2008;22(1):135-6; author reply 136.

Asero R, Tedeschi A, Riboldi P, Cugno M. Plasma of patients with chronic urticaria shows signs of thrombin generation, and its intradermal injection causes wheal-and-flare reactions much more frequently than autologous serum. *J Allergy Clin Immunol*. 2006 May;117(5):1113-7.

Bessler H, Salman H, Bergman M, Straussberg R, Djaldetti M. In vitro effect of statins on cytokine production and mitogen response of human peripheral blood mononuclear cells. *Clin Immunol* 2005;117(1):73-7.

Bianchi ME. DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. *J Leukoc Biol.* 2007 Jan;81(1):1-5.

Blaschke S, Viereck V, Schwarz G, Klinger HM, Guerlueck S, Muller GA. Anti-inflammatory effects of atorvastatin on peripheral blood mononuclear cells and synovial fibroblasts in rheumatoid arthritis. *Scand J Rheumatol* 2009:1-5.

Bressler RB. Pathophysiology of chronic urticaria. *Immunology and Allergy Clinics of North America* 1995; 15: 659-77.

Brinkkoetter PT, Gottmann U, Schulte J, van der Woude FJ, Braun C, Yard BA. Atorvastatin interferes with activation of human CD4(+) T cells via inhibition of small guanosine triphosphatase (GTPase) activity and caspase-independent apoptosis. *Clin Exp Immunol* 2006;146(3):524-32.

Brunetti L, Francavilla R, Miniello VL, Platzer MH, Rizzi D, Lospalluti ML, et al. High prevalence of autoimmune urticaria in children with chronic urticaria. *J Allergy Clin Immunol* 2004;114(4):922-7.

Caproni M, Cardinali C, Giomi B, Antiga E, D'Agata A, Walter S, et al. Serological detection of eotaxin, IL-4, IL-13, IFN-gamma, MIP-1alpha, TARC and IP-10 in chronic autoimmune urticaria and chronic idiopathic urticaria. *J Dermatol Sci* 2004;36(1):57-9.

Caproni M, Giomi B, Volpi W, Melani L, Schincaglia E, Macchia D, et al. Chronic idiopathic urticaria: infiltrating cells and related cytokines in autologous serum-induced wheals. *Clin Immunol.* 2005 Mar;114(3):284-92.

Caproni M, Volpi W, Macchia D, Giomi B, Manfredi M, Campi P, et al. Infiltrating cells and related cytokines in lesional skin of patients with chronic idiopathic urticaria and positive autologous serum skin test. *Exp Dermatol.* 2003 Oct;12(5):621-8.

Chabaud M, Durand JM, Buchs N, Fossiez F, Page G, Frappart L, et al. Human interleukin-17: A T cell-derived proinflammatory cytokine produced by the rheumatoid synovium. *Arthritis Rheum* 1999;42(5):963-70.

Chen Z, Laurence A, O'Shea JJ. Signal transduction pathways and transcriptional regulation in the control of Th17 differentiation. *Semin Immunol* 2007;19(6):400-8.

Chen Z, O'Shea JJ. Regulation of IL-17 production in human lymphocytes. *Cytokine* 2008;41(2):71-8.

Cherfan P, Tompa A, Wikby A, Lofgren S, Jonasson L. Effects of simvastatin on human T cells in vivo. *Atherosclerosis* 2007;193(1):186-92.

Confino-Cohen R, Aharoni D, Goldberg A, Gurevitch I, Buchs A, Weiss M, et al. Evidence for aberrant regulation of the p21Ras pathway in PBMCs of patients with chronic idiopathic urticaria. *J Allergy Clin Immunol* 2002;109(2):349-56.

Confino-Cohen R, Goldberg A, Aharoni D, Naiman L, Buchs A, Weiss M, et al. Low stimulated IL-4 secretion in PBMC from patients with chronic idiopathic urticaria. *Cytokine* 2004;27(2-3):74-80.

Coward W, Chow SC. Effect of atorvastatin on TH1 and TH2 cytokine secreting cells during T cell activation and differentiation. *Atherosclerosis* 2006;186(2):302-9.

Coward WR, Marei A, Yang A, Vasa-Nicotera MM, Chow SC. Statin-induced proinflammatory response in mitogen-activated peripheral blood mononuclear cells through the activation of caspase-1 and IL-18 secretion in monocytes. *J Immunol*. 2006 May 1;176(9):5284-92.

Dos Santos JC, Azor MH, Nojima VY, Lourenco FD, Prearo E, Maruta CW, et al. Increased circulating pro-inflammatory cytokines and imbalanced regulatory T-cell cytokines production in chronic idiopathic urticaria. *Int Immunopharmacol* 2008;8(10):1433-40.

Doutre MS. Chronic urticaria and thyroid auto-immunity. *Clin Rev Allergy Immunol* 2006;30(1):31-7.

Dreskin SC, Andrews KY. The thyroid and urticaria. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2005;5(5):408-12.

Ferrer M, Luquin E, Sanchez-Ibarrola A, Moreno C, Sanz ML, Kaplan AP. Secretion of cytokines, histamine and leukotrienes in chronic urticaria. *Int Arch Allergy Immunol* 2002;129(3):254-60.

Fiebiger E, Hammerschmid F, Stingl G, Maurer D. Anti-FcepsilonRIalpha autoantibodies in autoimmune-mediated disorders. Identification of a structure-function relationship. *J Clin Invest* 1998;101(1):243-51.

Franchi L, Eigenbrod T, Munoz-Planillo R, Nunez G. The inflammasome: a caspase-1-activation platform that regulates immune responses and disease pathogenesis. *Nat Immunol*. 2009 Mar;10(3):241-7.

Frumento G, Rotondo R, Tonetti M, Damonte G, Benatti U, Ferrara GB. Tryptophan-derived catabolites are responsible for inhibition of T and natural killer cell proliferation induced by indoleamine 2,3-dioxygenase. *J Exp Med*. 2002 Aug 19;196(4):459-68.

Fujii K, Konishi K, Kanno Y, Ohgou N. Acute urticaria with elevated circulating interleukin-6 is resistant to anti-histamine treatment. *J Dermatol* 2001;28(5):248-50.

Furuzawa-Carballeda J, Vargas-Rojas MI, Cabral AR. Autoimmune inflammation from the Th17 perspective. *Autoimmun Rev*. 2007 Jan;6(3):169-75.

Gaffen SL, Kramer JM, Yu JJ, Shen F. The IL-17 cytokine family. *Vitam Horm* 2006;74:255-82

Ghittoni R, Patrussi L, Pirozzi K, Pellegrini M, Lazzerini PE, Capecchi PL, et al. Simvastatin inhibits T-cell activation by selectively impairing the function of Ras superfamily GTPases. *Faseb J* 2005;19(6):605-7.

Grattan CE, Walpole D, Francis DM, Niimi N, Dootson G, Edler S, et al. Flow cytometric analysis of basophil numbers in chronic urticaria: basopenia is related to serum histamine releasing activity. *Clin Exp Allergy*. 1997 Dec;27(12):1417-24.

Greaves M. Chronic urticaria. *J Allergy Clin Immunol* 2000;105(4):664-72.

Greaves MW. Chronic idiopathic urticaria. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2003;3(5):363-8.

Greaves MW. Chronic urticaria in childhood. *Allergy* 2000;55(4):309-20.

Greaves MW. Chronic urticaria. *N Engl J Med* 1995;332(26):1767-72.

Grohmann U, Fallarino F, Puccetti P. Tolerance, DCs and tryptophan: much ado about IDO. *Trends Immunol* 2003;24(5):242-8.

Guarda G, Dostert C, Staehli F, Cabalzar K, Castillo R, Tardivel A, et al. T cells dampen innate immune responses through inhibition of NLRP1 and NLRP3 inflammasomes. *Nature*. 2009 Jul 9;460(7252):269-73.

Hein R. Chronic urticaria: impact of allergic inflammation. *Allergy* 2002;57 Suppl 75:19-24.

Hermes B, Prochazka AK, Haas N, Jurgovsky K, Sticherling M, Henz BM. Upregulation of TNF-alpha and IL-3 expression in lesional and uninvolved skin in different types of urticaria. *J Allergy Clin Immunol* 1999;103(2 Pt 1):307-14.

Hoffman HM, Rosengren S, Boyle DL, Cho JY, Nayar J, Mueller JL, et al. Prevention of cold-associated acute inflammation in familial cold autoinflammatory syndrome by interleukin-1 receptor antagonist. *Lancet*. 2004 Nov 13-19;364(9447):1779-85.

Jin Y, Mailloux CM, Gowan K, Riccardi SL, LaBerge G, Bennett DC, et al. NALP1 in vitiligo-associated multiple autoimmune disease. *N Engl J Med*. 2007 Mar 22;356(12):1216-25.

Kaplan AP. Chronic urticaria: pathogenesis and treatment. *J Allergy Clin Immunol* 2004;114(3):465-74.

Kufer TA, Banks DJ, Philpott DJ. Innate immune sensing of microbes by Nod proteins. *Ann N Y Acad Sci*. 2006 Aug;1072:19-27.

Kwak B, Mulhaupt F, Myit S, Mach F. Statins as a newly recognized type of immunomodulator. *Nat Med* 2000;6(12):1399-402.

Kwak BR, Mulhaupt F, Mach F. Atherosclerosis: anti-inflammatory and immunomodulatory activities of statins. *Autoimmun Rev* 2003;2(6):332-8.

Leung BP, Sattar N, Crilly A, Prach M, McCarey DW, Payne H, et al. A novel anti-inflammatory role for simvastatin in inflammatory arthritis. *J Immunol* 2003;170(3):1524-30.

Liao JK, Laufs U. Pleiotropic effects of statins. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2005;45:89-118.

Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C(T)}$ Method. *Methods*. 2001 Dec;25(4):402-8.

Lourenco FD, Azor MH, Santos JC, Prearo E, Maruta CW, Rivitti EA, et al. Activated status of basophils in chronic urticaria leads to interleukin-3 hyperresponsiveness and enhancement of histamine release induced by anti-IgE stimulus. *Br J Dermatol*. 2008 May;158(5):979-86.

Luquin E, Kaplan AP, Ferrer M. Increased responsiveness of basophils of patients with chronic urticaria to sera but hypo-responsiveness to other stimuli. *Clin Exp Allergy* 2005;35(4):456-60.

Macaluso F, Nothnagel M, Parwez Q, Petrasch-Parwez E, Bechara FG, Epplen JT, et al. Polymorphisms in NACHT-LRR (NLR) genes in atopic dermatitis. *Exp Dermatol*. 2007 Aug;16(8):692-8.

Magitta NF, Boe Wolff AS, Johansson S, Skinningsrud B, Lie BA, Myhr KM, et al. A coding polymorphism in NALP1 confers risk for autoimmune Addison's disease and type 1 diabetes. *Genes Immun*. 2009 Mar;10(2):120-4.

Martinon F, Burns K, Tschopp J. The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-beta. *Mol Cell*. 2002 Aug;10(2):417-26.

Martinon F, Tschopp J. NLRs join TLRs as innate sensors of pathogens. *Trends Immunol*. 2005 Aug;26(8):447-54.

Matzinger P. Tolerance, danger, and the extended family. *Annu Rev Immunol*. 1994;12:991-1045.

Mellor AL, Munn DH. IDO expression by dendritic cells: tolerance and tryptophan catabolism. *Nat Rev Immunol*. 2004 Oct;4(10):762-74.

Meng G, Zhang F, Fuss I, Kitani A, Strober W. A mutation in the Nlrp3 gene causing inflammasome hyperactivation potentiates Th17 cell-dominant immune responses. *Immunity*. 2009 Jun 19;30(6):860-74.

Methe H, Kim JO, Kofler S, Nabauer M, Weis M. Statins decrease Toll-like receptor 4 expression and downstream signaling in human CD14⁺ monocytes. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005;25(7):1439-45.

Naderi S, Blomhoff R, Myklebust J, Smeland EB, Erikstein B, Norum KR, et al. Lovastatin inhibits G1/S transition of normal human B-lymphocytes independent of apoptosis. *Exp Cell Res* 1999;252(1):144-53.

Nakanishi K, Yoshimoto T, Tsutsui H, Okamura H. Interleukin-18 regulates both Th1 and Th2 responses. *Annu Rev Immunol*. 2001;19:423-74.

Netea MG, Nold-Petry CA, Nold MF, Joosten LA, Opitz B, van der Meer JH, et al. Differential requirement for the activation of the inflammasome for processing and release of IL-1 β in monocytes and macrophages. *Blood*. 2009 Mar 5;113(10):2324-35.

Neurauter G, Wirleitner B, Laich A, Schennach H, Weiss G, Fuchs D. Atorvastatin suppresses interferon-gamma -induced neopterin formation and tryptophan degradation in human peripheral blood mononuclear cells and in monocytic cell lines. *Clin Exp Immunol* 2003;131(2):264-7.

Niimi N, Francis DM, Kermani F, O'Donnell BF, Hide M, Kobza-Black A, et al. Dermal mast cell activation by autoantibodies against the high affinity IgE receptor in chronic urticaria. *J Invest Dermatol* 1996;106(5):1001-6.

O'Donnell BF, Francis DM, Swana GT, Seed PT, Kobza Black A, Greaves MW. Thyroid autoimmunity in chronic urticaria. *Br J Dermatol* 2005;153(2):331-5.

O'Donnell BF, Lawlor F, Simpson J, Morgan M, Greaves MW. The impact of chronic urticaria on the quality of life. *Br J Dermatol* 1997;136(2):197-201.

Ongini E, Impagnatiello F, Bonazzi A, Guzzetta M, Govoni M, Monopoli A, et al. Nitric oxide (NO)-releasing statin derivatives, a class of drugs showing enhanced antiproliferative and antiinflammatory properties. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101(22):8497-502.

Orabona C, Pallotta MT, Volpi C, Fallarino F, Vacca C, Bianchi R, et al. SOCS3 drives proteasomal degradation of indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) and antagonizes IDO-dependent tolerogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008 Dec 30;105(52):20828-33.

O'Sullivan BJ, Thomas HE, Pai S, Santamaria P, Iwakura Y, Steptoe RJ, et al. IL-1 beta breaks tolerance through expansion of CD25+ effector T cells. *J Immunol*. 2006 Jun 15;176(12):7278-87.

Peng X, Jin J, Giri S, Montes M, Sujkowski D, Tang Y, et al. Immunomodulatory effects of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme-A reductase inhibitors, potential therapy for relapsing remitting multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 2006;178(1-2):130-9.

Petrilli V, Dostert C, Muruve DA, Tschopp J. The inflammasome: a danger sensing complex triggering innate immunity. *Curr Opin Immunol*. 2007 Dec;19(6):615-22.

Piconi S, Trabattoni D, Iemoli E, Fusi ML, Villa ML, Milazzo F, et al. Immune profiles of patients with chronic idiopathic urticaria. *Int Arch Allergy Immunol* 2002;128(1):59-66.

Piskin G, Sylva-Steenland RM, Bos JD, Teunissen MB. In vitro and in situ expression of IL-23 by keratinocytes in healthy skin and psoriasis lesions: enhanced expression in psoriatic skin. *J Immunol* 2006;176(3):1908-15.

Pontillo A, Paoluzzi E, Crovella S. The inhibition of mevalonate pathway induces upregulation of NALP3 expression: new insight in the pathogenesis of mevalonate kinase deficiency. *Eur J Hum Genet*. 2010 Feb 24.

Qu Y, Ramachandra L, Mohr S, Franchi L, Harding CV, Nunez G, et al. P2X7 receptor-stimulated secretion of MHC class II-containing exosomes requires the ASC/NLRP3 inflammasome but is independent of caspase-1. *J Immunol*. 2009 Apr 15;182(8):5052-62.

Ring J, Brockow K, Ollert M, Engst R. Antihistamines in urticaria. *Clin Exp Allergy* 1999;29 Suppl 1:31-7.

Robinson CM, Hale PT, Carlin JM. The role of IFN-gamma and TNF-alpha-responsive regulatory elements in the synergistic induction of indoleamine dioxygenase. *J Interferon Cytokine Res* 2005;25(1):20-30.

Sabroe RA, Fiebiger E, Francis DM, Maurer D, Seed PT, Grattan CE, et al. Classification of anti-FcepsilonRI and anti-IgE autoantibodies in chronic idiopathic urticaria and correlation with disease severity. *J Allergy Clin Immunol* 2002;110(3):492-9.

Sabroe RA, Grattan CE, Francis DM, Barr RM, Kobza Black A, Greaves MW. The autologous serum skin test: a screening test for autoantibodies in chronic idiopathic urticaria. *Br J Dermatol* 1999;140(3):446-52.

Sabroe RA, Greaves MW. Chronic idiopathic urticaria with functional autoantibodies: 12 years on. *Br J Dermatol* 2006;154(5):813-9.

Samson KT, Minoguchi K, Tanaka A, Oda N, Yokoe T, Okada S, et al. Effect of fluvastatin on apoptosis in human CD4+ T cells. *Cell Immunol* 2005;235(2):136-44.

Samson KT, Minoguchi K, Tanaka A, Oda N, Yokoe T, Okada S, et al. Effect of fluvastatin on apoptosis in human CD4+ T cells. *Cell Immunol.* 2005 Jun;235(2):136-44.

Samson KT, Minoguchi K, Tanaka A, Oda N, Yokoe T, Yamamoto Y, et al. Inhibitory effects of fluvastatin on cytokine and chemokine production by peripheral blood mononuclear cells in patients with allergic asthma. *Clin Exp Allergy* 2006;36(4):475-82.

Soundararajan S, Kikuchi Y, Joseph K, Kaplan AP. Functional assessment of pathogenic IgG subclasses in chronic autoimmune urticaria. *J Allergy Clin Immunol* 2005;115(4):815-21.

Steinman L. Immune therapy for autoimmune diseases. *Science* 2004;305(5681):212-6.

Taylor MW, Feng GS. Relationship between interferon-gamma, indoleamine 2,3-dioxygenase, and tryptophan catabolism. *Faseb J* 1991;5(11):2516-22.

Tedeschi A, Lorini M, Suli C, Asero R. Serum interleukin-18 in patients with chronic ordinary urticaria: association with disease activity. *Clin Exp Dermatol* 2007;32(5):568-70.

Terness P, Bauer TM, Rose L, Dufter C, Watzlik A, Simon H, et al. Inhibition of allogeneic T cell proliferation by indoleamine 2,3-dioxygenase-expressing dendritic

cells: mediation of suppression by tryptophan metabolites. *J Exp Med* 2002;196(4):447-57.

Toubi E, Kessel A, Avshovich N, Bamberger E, Sabo E, Nusem D, et al. Clinical and laboratory parameters in predicting chronic urticaria duration: a prospective study of 139 patients. *Allergy* 2004;59(8):869-73.

Tzartos JS, Friese MA, Craner MJ, Palace J, Newcombe J, Esiri MM, et al. Interleukin-17 production in central nervous system-infiltrating T cells and glial cells is associated with active disease in multiple sclerosis. *Am J Pathol* 2008;172(1):146-55.

Veillard NR, Braunersreuther V, Arnaud C, Burger F, Pelli G, Steffens S, et al. Simvastatin modulates chemokine and chemokine receptor expression by geranylgeranyl isoprenoid pathway in human endothelial cells and macrophages. *Atherosclerosis* 2006;188(1):51-8.

Vollmer T, Key L, Durkalski V, Tyor W, Corboy J, Markovic-Plese S, et al. Oral simvastatin treatment in relapsing-remitting multiple sclerosis. *Lancet* 2004;363(9421):1607-8.

Vonakis BM, Saini SS. New concepts in chronic urticaria. *Curr Opin Immunol* 2008;20(6):709-16.

Waiczies S, Prozorovski T, Infante-Duarte C, Hahner A, Aktas O, Ullrich O, et al. Atorvastatin induces T cell anergy via phosphorylation of ERK1. *J Immunol* 2005;174(9):5630-5.

Wanderer AA, Hoffman HM. The spectrum of acquired and familial cold-induced urticaria/urticaria-like syndromes. *Immunol Allergy Clin North Am*. 2004 May;24(2):259-86.

Weitz-Schmidt G, Welzenbach K, Brinkmann V, Kamata T, Kallen J, Bruns C, et al. Statins selectively inhibit leukocyte function antigen-1 by binding to a novel regulatory integrin site. *Nat Med* 2001;7(6):687-92.

Wu LH, Wan YL, Xie HY, Zhang WJ, Zheng SS. Immunosuppression in human peripheral blood T lymphocytes by fluvastatin. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 2004;36(10):649-55.

Yilmaz A, Reiss C, Weng A, Cicha I, Stumpf C, Steinkasserer A, et al. Differential effects of statins on relevant functions of human monocyte-derived dendritic cells. *J Leukoc Biol*. 2006 Mar;79(3):529-38.

Youssef S, Stuve O, Patarroyo JC, Ruiz PJ, Radosevich JL, Hur EM, et al. The HMG-CoA reductase inhibitor, atorvastatin, promotes a Th2 bias and reverses paralysis in central nervous system autoimmune disease. *Nature* 2002;420(6911):78-84.

Zhang X, Jin J, Peng X, Ramgolam VS, Markovic-Plese S. Simvastatin inhibits IL-17 secretion by targeting multiple IL-17-regulatory cytokines and by inhibiting the expression of IL-17 transcription factor RORC in CD4+ lymphocytes; 2008 May 15.

Zhang X, Markovic-Plese S. Statins' immunomodulatory potential against Th17 cell-mediated autoimmune response. *Immunol Res* 2008;41(3):165-74.

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](#)