

**Universidade de Brasília  
Faculdade de Medicina  
Núcleo de Medicina Tropical**

**Carlos dos Santos Kückelhaus**

**Influência da pravastatina na evolução da lesão, capacidade fagocitária, produção de radicais de oxigênio, nitrogênio e fator de necrose tumoral- $\alpha$  em camundongos Infectados pela *Leishmania (L.) amazonensis***

**Tese de Doutorado**

**Brasília - 2011**

**Universidade de Brasília  
Faculdade de Medicina  
Núcleo de Medicina Tropical**

**Carlos dos Santos Kückelhaus**

**Influência da pravastatina na evolução da lesão, capacidade  
fagocitária, produção de radicais de oxigênio, nitrogênio e fator  
de necrose tumoral- $\alpha$  em camundongos Infectados pela  
*Leishmania (L.) amazonensis***

**Tese apresentada ao Programa de  
Pós-Graduação em Medicina  
Tropical, como requisito parcial  
para obtenção do título de doutor**

**Aluno: Carlos dos Santos Kuckelhaus**

**Orientadora: Profa. Dra. Maria Imaculada Muniz Barboza Junqueira**

**Brasília – 2011**

### Ficha Catalográfica

Kückelhaus, Carlos dos Santos

Influência da pravastatina na evolução da lesão, capacidade fagocitária, produção de radicais de oxigênio nitrogênio e fator de necrose tumoral- $\alpha$  em camundongos infectados pela *Leishmania (L.) amazonensis* / Carlos dos Santos Kückelhaus. Brasília, 2011.

126 p.

Tese (Doutorado) Núcleo de Medicina Tropical

Universidade de Brasília.

Orientador: Maria Imaculada Muniz Barbosa Junqueira

1. *Leishmania (L.) amazonensis* 2. Pravastatina 3. Macrófago 4. Fagocitose  
5. Peróxido de Hidrogênio 6. Óxido Nítrico 7. Fator de Necrose Tumoral- $\alpha$

## **TERMO DE APROVAÇÃO**

**Carlos dos Santos Kuckelhaus**

Influência da pravastatina na evolução da lesão, capacidade fagocitária, produção de radicais de oxigênio, nitrogênio e fator de necrose tumoral- $\alpha$  em camundongos infectados pela *Leishmania (L.) amazonensis*

Tese aprovada como requisito parcial para a obtenção do grau de doutor no curso de Pós-Graduação em Medicina Tropical da Universidade de Brasília, pela seguinte banca examinadora:

Orientador: Profa. Dra. Maria Imaculada Muniz Barbosa Junqueira  
Universidade de Brasília

Prof. Dalmo Correia Filho  
Universidade Federal de Uberaba

Prof. Dr. Albino Verçosa Magalhães  
Universidade de Brasília

Prof. Dr. Cleudson Nery de Castro  
Universidade de Brasília

Profa. Dra. Fabiana Pirani Carneiro  
Universidade de Brasília

Brasília, 28 de Janeiro de 2011

*"Primeiro, o necessário. Depois, o possível. Quem sabe, então,  
talvez, o impossível..."*

*Francisco de Assis*

## Dedicatória

*Dedico este trabalho aos inocentes. A aqueles que experimentaram e padeceram de tão terrível enfermidade por nós infligida. Sem nomes, sem identidades, sem poder de escolha ou de reclamar. Tiveram toda sua existência em cativeiro e suas vidas encurtadas em nome de um conhecimento do qual não se beneficiarão. Oxalá que suas contribuições não se percam na miríade de dados inúteis lançados ao vento em nome de uma ciência mercantilista e segregacionista. Ao tocar suas vidas, pude sentir a fragilidade da minha própria vida e vivenciar o fato que somos todos conectados.*

## AGRADECIMENTOS

Sou profundamente grato ao meu Deus criador dos céus e terra que se revela a nós por meio de sua obra, autor e consumidor da vida. Por me permitir observar e experimentar a beleza de sua criação e testemunhar o cuidado e carinho com que trata todos seus seres, mesmo com o menor dos protozoários, que apesar de seu potencial para nos infligir terríveis enfermidades se mostrou imensamente belo.

Muito obrigado a minha orientadora professora Maria Imaculada Muniz-Junqueira, sem sua ajuda jamais teria conseguido concluir esta obra. Dotada de um enorme conhecimento científico e de uma autodisciplina invejável, sempre conduzindo todos seus trabalhos com grande responsabilidade e ética não perdendo, porém sua humanidade. Sempre a encontrei disposta a ajudar e me impulsionar avante e, não poucas vezes, assumiu a frente e nos puxou (em algumas ocasiões quase nos fins de suas forças). Você é um exemplo inestimável para todos nós seus discípulos e merecedora de um dos títulos mais nobres da humanidade: Professora e Mestre.

Terei sempre uma dívida de gratidão com minha esposa e companheira Selma A Souza Kückelhaus. Guerreira valorosa presente lado a lado comigo em todas as fases deste projeto. Dedicou muito de seu tempo na organização e viabilização do biotério, desde a intermediação na compra dos animais, a organização dos seus alojamentos e assistência aos mesmos. Participou ativamente na coordenação dos trabalhos de bancada e organização dos experimentos. Contribuiu muito com valiosos comentários e críticas na redação da tese. Mas, acima de todo este hercúleo trabalho soube estimular e encorajar-me nos momentos de incertezas. Ainda, manteve acesa em meu espírito a tocha do animo e da longanimidade necessária em todo pesquisador, me transmitindo a força, coragem e vontade para chegar ao fim. Com toda esta prova de amor e dedicação me considero o mais feliz dos homens e só me resta dizer, te amo e reconheço que és uma companheira fantástica.

A meu filho Lucas Souza Kückelhaus que muito me ajudou com a informática, e com seu conhecimento e domínio na língua do “Tio Sam”, na tradução dos artigos. Com toque de gênio muitas vezes destravou computadores, salvou dados e trouxe soluções fantásticas para momentos em que já julgava tudo perdido. Frequentemente teve que enfrentar e suportar o mau humor do pai que exigia soluções imediatas. Também auxiliou no cuidado dos animais e esteve comigo lado a lado na aplicação das drogas e preparo das soluções.

A minha filha Sarah Souza Kückelhaus por sua participação na bancada, auxiliando no preparo das lâminas, soluções e dissecções, muitas vezes trabalhando até altas horas da noite. Todo este seu esforço valeu a pena.

A professora Vanize Macedo (*in memoria*). Figura fantástica e inspiradora deste projeto. Ela será sempre um exemplo vivo em minha memória, pelo seu amor pela ciência e o desejo de ajudar aos que sofrem.

Aos professores do Núcleo de Medicina Tropical. Meu apreço aos professores Cleudson Nery de Castro, João Barberino dos Santos, Gustavo Romero, Pedro Luiz Tauil e Celeste Aída Nogueira Silveira, pelas críticas, sugestões ao trabalho, pelas oportunidades apresentadas e pela amizade.

Aos funcionários e colaboradores do Núcleo de Medicina Tropical. Meu apreço ao Herbert Araújo (*in memoria*), a Regina Borges Pacheco, ao Leandro Mendes Nascimento, José Barbosa Bezerra, Shigueru Ofugi e Walcymar Pereira Santiago que sempre me auxiliaram em tudo. Em especial ao Nelson Pelet Nascimento que preparou os meios de cultura e soluções. Ao Sr. Francisco das Chagas pela sua inspiração e amor ao trabalho.

Ao professor Carlos Eduardo Tosta, por abrir as portas do laboratório, pela confiança em nós depositada, pelos conselhos e sugestões sempre bem fundadas e bem vindas. Sem dúvida sua participação fez diferença nestes anos todos.

Aos funcionários e colaboradores do laboratório de Imunologia, em particular a Shirley Claudino Couto que muito me ajudou e ensinou, estando presente em todos os momentos de experimentos. Sem sua ajuda não teríamos ido longe. Ao José Siqueira pelo preparo das lâminas com grande habilidade e técnica impecável. Ao Rafael Guimarães, Martina Miranda e Luciana de Magalhães Leite, sempre presentes nos momentos que mais precisei de ajuda.

Aos colegas Tatiana Karla dos Santos Borges, Rosana Regina de Saldanha, Cezar Augustus da Silva, Erica Alexandre Rocha Alves, Juarez Castellar, que nunca se furtaram de ajudar nos trabalhos de bancada, dividindo opiniões e estimulando a olhar para novas perspectivas.

Aos alunos, monitores e estagiários do PIC, Bruno Luitgards, Vitor Caldas e Leiliane Sampaio que muito contribuíram ao longo deste trabalho.

A Dra. Luciana Flannery pelo valioso auxílio na bancada e por dividir seu conhecimento conosco ao longo de todo este tempo. Ao Dr. Brendon Flannery por nos ajudar na preparação dos artigos.

A professora Raimunda Nonata Ribeiro Sampaio e aos técnicos, alunos e estagiários do laboratório de dermatologia da Faculdade de Medicina que sempre estiveram presentes dividindo conosco suas dúvidas e aprendizados em apreço a Ada Amália Ayala Urdapilleta, a Gilcelene Maria El Chaer, que muito me ensinaram do manejo com as leishmânias

Aos Professores Anamélia Lorenzetti Bocca e César Augusto Cuba Cuba que nos cederam um pouco de seu tempo discutindo este projeto conosco. Ao professor Luiz Fernando Junqueira Jr. que sempre nos recebeu e nos ajudou inclusive emprestando equipamentos e gaiolas.

Aos meus pais e irmãos pelo apoio, estímulo e compreensão pelas ausências.

A todos aqueles que, direta ou indiretamente, contribuíram para o desenvolvimento e conclusão desse trabalho, meu muito obrigado.

## RESUMO

**Introdução:** As leishmanioses constituem um grupo de doenças de grande impacto na saúde pública mundial alcançando uma incidência de dois milhões de novos casos por ano. O quadro clínico é complexo com apresentações clínicas que vão desde formas cutâneas, mucocutâneas e viscerais, que dependem da espécie do parasito e do hospedeiro, mas, sobretudo, da resposta imunitária predominante no momento da infecção. O controle da leishmaniose é dificultado pela pouca opção terapêutica, alta toxicidade dos medicamentos e crescente resistência dos parasitos. Diante disso, é importante a busca por alternativas terapêuticas eficazes e de baixa toxicidade. As estatinas constituem um grupo de drogas imunomoduladoras, potencialmente capazes de alterar o equilíbrio leishmânia/resposta imunitária. **Objetivo:** O presente estudo objetivou verificar a influência da pravastatina sobre a evolução da doença e função dos fagócitos pela análise da sobrevida e desenvolvimento de lesões cutâneas em camundongos BALB/c, C57BL/6 e hamsters sírio, infectados por *L. (L.) amazonensis*. Verificar os efeitos *in vitro* de diferentes concentrações da pravastatina sobre formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis* e sobre células peritoneais. E sua influência sobre as funções dos fagócitos, produção de peróxido de hidrogênio, óxido nítrico e FNT- $\alpha$  pelos macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c. **Métodos:** camundongos BALB/c, C57BL/6 e hamster sírio foram infectados com formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis* e tratados ou não com 20 mg/kg/dia de pravastatina ou salina, por via oral, durante 90 dias e então, acompanhados até o óbito com controle semanal do peso e diâmetros das patas. Para avaliar a toxicidade da pravastatina para as leishmânias e para os fagócitos, os efeitos de diferentes concentrações de pravastatina foram avaliados *in vitro* por meio da redução do MTT sobre formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis* ou sobre macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c. As funções dos fagócitos foram avaliadas em camundongos BALB/c tratados ou não com a pravastatina por 30 ou 90 dias. A capacidade fagocitária foi avaliada utilizando *S. cerevisiae* sensibilizados ou não com soro fresco. A produção de peróxido de hidrogênio foi avaliada pela oxidação do vermelho fenol em presença de peroxidase. A produção de óxido nítrico foi avaliada pela reação de Griess. A produção de FNT- $\alpha$  foi avaliada por ensaio imunoenzimático. **Resultados:** A pravastatina aumentou a sobrevida dos camundongos BALB/c infectados, mas não a dos camundongos C57BL/6 ou hamster sírio. O tratamento com a pravastatina diminuiu a perda de peso dos camundongos C57BL/6 e hamster sírio infectados pela leishmânia, mas não influenciou a evolução do peso dos camundongos BALB/c. A pravastatina retardou o surgimento da lesão da pata dos camundongos BALB/c e as lesões foram menores no camundongo C57BL/6, mas não interferiu no diâmetro das patas do hamster. A pravastatina diminuiu o percentual de redução de MTT por formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis* em concentrações  $\geq 4 \mu\text{g/mL}$ , mas não afetou a atividade mitocondrial de células peritoneais até a concentração de 256  $\mu\text{g/mL}$ . A pravastatina aumentou a capacidade fagocitária dos macrófagos peritoneais pelos receptores para padrões moleculares de patógeno aos 30 dias, retornando aos valores do grupo controle aos 90 dias. Ao mesmo tempo aumentou o índice fagocitário e a média de leveduras fagocitadas por macrófagos quando avaliado pelos receptores para opsoninas aos 90 dias de tratamento. Camundongos BALB/c infectados com *L. (L.) amazonensis* tratados com pravastatina apresentaram diminuição do índice fagocitário bem como da proporção de macrófagos envolvidos na fagocitose e da media de leveduras fagocitadas por macrófagos após 90 dias de tratamento quando a fagocitose foi avaliada pelos receptores para padrões moleculares de patógenos, mas

não houve alterações na fagocitose pelos receptores para complemento após 30 ou 90 dias de tratamento com a droga. A pravastatina aumentou a produção de peróxido de hidrogênio após 30 dias em animais infectados e em animais não infectados após 90 dias. Também aumentou a produção de óxido nítrico em camundongos infectados tratados com pravastatina comparados a camundongos infectados tratados com salina após 90 dias de tratamento. A pravastatina reduziu a produção de FNT- $\alpha$  em animais infectados tratados com pravastatina por 30 dias, em relação aos animais infectados tratados com salina, mas retornou essa produção aos valores basais aos 90 dias de tratamento. **Conclusão:** o aumento da sobrevivência de camundongos BALB/c, a clínica favorável em animais infectados e os efeitos observados sobre os macrófagos apontam para a potencialidade da pravastatina como co-adjuvante no tratamento da leishmaniose, de forma a contribuir para diminuir a morbidade da doença.

## ABSTRACT

**Introduction:** Leishmaniasis is a group of diseases with great impact on the world public health, with as many as 2 millions new cases by year. The clinical profile of the disease is complex, presenting many clinical forms, such as cutaneous, mucocutaneous and visceral; these forms depend not only on the species of the parasite and of the host, but also on the immune response of the host mainly at the time of infection. Controlling leishmaniasis is a difficult task due to the few therapeutical options available, and due to the high toxicity of the available drugs and due to the increasing resistance of the parasites. In that case, it is important to search for new and efficient therapeutical alternatives, presenting lower toxicity. Statins are a group of immunomodulatory drugs with the potential to alter the balance between *Leishmania* and immune response of the host.

**Objective:** This study aimed to evaluate the influence of pravastatin on the evolution of the disease and to verify the function of phagocytes by analyzing the survival time and the development of cutaneous lesions on BALB/c and C57BL/6 mice and Syrian hamsters infected by *L. (L.) amazonensis*. The *in vitro* effects of different concentrations of pravastatin on promastigotes forms of *L. (L.) amazonensis* and on peritoneal cells, and its influence on phagocytic functions and on the production of hydrogen peroxide, nitric oxide and FNT- $\alpha$  by peritoneal macrophages of BALB/c mice, were assessed. **Material and Method:** BALB/c and C57BL/6 mice and Syrian hamsters were infected or not with promastigote forms of *L. (L.) amazonensis* and treated or not with 20 mg/kg/day of pravastatin, per os, during 90 days. They were then followed until their death, with a weekly control of weight and footpad thickness. In order to evaluate the toxicity of pravastatin to leishmaniasis and to the phagocytes, the effects of different concentrations of pravastatin were evaluated *in vitro* by MTT reduction over promastigotes forms of *L. (L.) amazonensis* or over peritoneal macrophages of BALB/c mice. The functions of the phagocytes were evaluated in BALB/c mice infected or not with *L. (L.) amazonensis* and treated or not with pravastatin for 30 or 90 days. The phagocytic capacity was evaluated using *S. cerevisiae*, sensitized or not with fresh mouse sera. Hydrogen peroxide production was assessed by the oxidation of fenol red in the presence of peroxidase. Nitric oxide production was assessed by the Griess reaction. FNT- $\alpha$  production was assessed by immunoenzymatic assay. **Results:** Pravastatin increased the survival of infected BALB/c mice, but it did not influence the survival of the C57BL/6 mice or Syrian hamsters. Pravastatin treatment decreased weight loss in *Leishmania*-infected C57BL/6 mice and Syrian hamsters, but not infected BALB/c mice. Low footpad thickness was found on BALB/c pravastatin treated mice, the drug delayed the footpad thickness of the C57BL/6 mice, and pravastatin had no influence on footpad thickness of the Syrian hamsters. Pravastatin decreased the MTT reduction percent by promastigotes forms of *L. (L.) amazonensis* in concentrations  $\geq 4$   $\mu\text{g/mL}$ , but did not affect the mitochondrial activity of peritoneal cells until 256  $\mu\text{g/mL}$ . Pravastatin increased the phagocytic capacity through pathogen-associated molecular pattern receptors on the 30<sup>th</sup> day, but the value returned to the control group level on the 90<sup>th</sup> day. At the same time it increased the phagocytic index and the number of phagocytosed yeasts by macrophages when we evaluated the phagocytosis through opsonin receptors on the 90<sup>th</sup> day of treatment. BALB/c mice infected with *L. (L.) amazonensis* and treated with pravastatin presented a decrease in the phagocytic index and a decrease in the proportion of macrophages involved in phagocytosis and a decrease in the number of phagocytosed yeasts by macrophages by pathogen-associated molecular pattern receptors after 90 days of treatment, but there were no alteration in complement receptors after 30 or 90 days. Pravastatin increased hydrogen peroxide production after 30 days in infected animals and after 90 days in animals not infected. After 90 days, it also increased nitric oxide production in infected mice treated with pravastatin when compared to infected mice treated with saline. Pravastatin reduced FNT- $\alpha$  production in infected animals treated with pravastatin by the 30<sup>th</sup> day of treatment in relation to infected animals treated with saline, returning to their base levels by the 90<sup>th</sup> day of treatment. **Conclusion:** The survival increase for BALB/c mice, the favorable clinical evolution observed in the infected animals and the effects observed on the macrophages point to the potential use of pravastatin as a co-adjuvant drug in the therapy of leishmaniasis, to contribute to lower the morbidity of the disease.

## SUMÁRIO

DEDICATÓRIA.....	III
AGRADECIMENTOS.....	IV
RESUMO.....	VIII
ABSTRACT .....	X
SUMÁRIO.....	XI
LISTA DE FIGURAS E TABELAS.....	XVI
LISTA DE ABREVIATURAS UTILIZADAS NO TEXTO.....	XVIII
INTRODUÇÃO .....	1
Leishmaniose Tegumentar Americana.. .....	2
Ciclo de vida e infecção pela Leishmania .....	4
Mecanismos de escape da Leishmania .....	5
Mecanismos de defesa e respostas imunológicas.....	6
Infecção experimental e modelos de estudo animais da leishmaniose.....	7
Radicais de hidrogênio na infecção pela Leishmania spp.....	9
Reconhecimento da leishmânia pelo macrófago e fagocitose.....	11
Óxido nítrico na infecção pela Leishmania.....	12
Tratamento da Leishmania .....	13
A pravastatina como droga imunomoduladora.....	14
OBJETIVO.....	16
1. OBJETIVO.....	17
1.1. OBJETIVOS SECUNDÁRIOS.....	17
MATERIAL E MÉTODOS .....	19

1. FLUXOGRAMA DE TRABALHO.....	20
1.1. Avaliação da influência da pravastatina sobre a evolução da infecção pela <i>Leishmania (L.) amazonensis</i> .....	20
1.2. Influência do tratamento com pravastatina por 30 e 90 dias sobre as funções dos macrófagos de camundongos BALB/c infectados pela <i>Leishmania (L.) amazonensis</i> .....	21
2. TIPO DE ESTUDO .....	21
3. ANIMAIS.....	22
4. INÓCULO .....	22
5. PRAVASTATINA .....	23
6. INFECÇÃO DOS ANIMAIS.....	23
7. GRUPOS DE ESTUDO .....	24
7.1. INFLUÊNCIA DA PRAVASTATINA SOBRE A EVOLUÇÃO DA INFECÇÃO PELA <i>L. (L.) amazonensis</i> .....	24
7.2. AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS IMUNOLÓGICOS .....	25
8. ENSAIOS IN VITRO .....	26
8.1. OBTENÇÃO DE CÉLULAS PERITONEAIS.....	26
8.2. AVALIAÇÃO IN VITRO DA AÇÃO MICROBICIDA DA PRAVASTATINA PARA <i>Leishmania (L.) amazonensis</i> .....	26
8.3. AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DA PRAVASTATINA PARA CÉLULAS PERITONEAIS DE CAMUNDONGOS BALB/c .....	27
8.4. INFLUÊNCIA DA PRAVASTATINA SOBRE A CAPACIDADE FAGOCITÁRIA DE MACRÓFAGOS PERITONEAIS DE CAMUNDONGOS COM LEISHMANIOSE .....	28
8.5. INFLUÊNCIA DA PRAVASTATINA SOBRE A PRODUÇÃO DE PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO POR MACRÓFAGOS PERITONEAIS DE CAMUNDONGOS COM LEISHMANIOSE.....	29
8.6. INFLUÊNCIA DA PRAVASTATINA SOBRE A PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO POR MACRÓFAGOS PERITONEAIS DE CAMUNDONGOS COM LEISHMANIOSE .....	30

8.7. INFLUÊNCIA DA PRAVASTATINA SOBRE A PRODUÇÃO DE FATOR DE NECROSE TUMORAL- $\alpha$ (FNT- $\alpha$ ) PELOS MACRÓFAGOS PERITONEAIS DE CAMUNDONGOS COM LEISHMANIOSE .....	31
9. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	32
RESULTADOS .....	34
1. INFLUÊNCIA DA PRAVASTATINA SOBRE A EVOLUÇÃO DA DOENÇA .....	35
1.1. INFLUÊNCIA DA PRAVASTATINA NA EVOLUÇÃO DA CURVA DE SOBREVIVÊNCIA .....	35
1.1.1. INFLUÊNCIA DA PRAVASTATINA NA EVOLUÇÃO DA CURVA DE SOBREVIVÊNCIA NOS CAMUNDONGOS BALB/c .....	35
1.1.2. INFLUÊNCIA DA PRAVASTATINA NA EVOLUÇÃO DA CURVA DE SOBREVIVÊNCIA NOS CAMUNDONGOS C57BL/6 .....	36
1.1.3. INFLUÊNCIA DA PRAVASTATINA NA EVOLUÇÃO DA CURVA DE SOBREVIVÊNCIA DO HAMSTER SIRIUS.....	37
2.1. EVOLUÇÃO DO PESO CORPORAL.....	38
2.1.1. INFLUÊNCIA DA PRAVASTATINA NA EVOLUÇÃO DO PESO DOS CAMUNDONGOS BALB/c.....	38
2.1.2. INFLUÊNCIA DA PRAVASTATINA NA EVOLUÇÃO DO PESO DOS CAMUNDONGOS C57BL/6.....	39
2.1.3. INFLUÊNCIA DA PRAVASTATINA NA EVOLUÇÃO DO PESO DOS HAMSTERS SIRIUS.....	40
3.1. INFLUÊNCIA DA PRAVASTATINA NA EVOLUÇÃO DO DIÂMETRO DAS PATAS POSTERIORES.....	41
3.1.1. INFLUÊNCIA DA PRAVASTATINA NA EVOLUÇÃO DO DIÂMETRO DAS PATAS DOS CAMUNDONGOS BALB/c.....	42

3.1.2. INFLUÊNCIA DA PRAVASTATINA NA EVOLUÇÃO DO DIÂMETRO DAS PATAS DOS CAMUNDONGOS C57BL/6.....	42
3.1.3. INFLUÊNCIA DA PRAVASTATINA NA EVOLUÇÃO DO DIÂMETRO DAS PATAS DOS HAMSTERS SIRIUS.....	43
3.1.4. ASPECTOS ANATÔMICOS DAS LESÕES.....	44
2. ENSAIOS DE CITOTOXICIDADE.....	46
2.1. DETERMINAÇÃO IN VITRO DE AÇÃO MICROBICIDA DA PRAVASTATINA PARA <i>Leishmania (L.) amazonensis</i> .....	46
2.2. DETERMINAÇÃO DA DOSE TÓXICA DE PRAVASTATINA PARA CÉLULAS PERITONEAIS DE CAMUNDONGOS.....	47
3. ENSAIOS IMUNOLÓGICOS COM MACRÓFAGOS PERITONEAIS DE CAMUNDONGOS BALB/c.....	48
3.1. AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE FAGOCITÁRIA.....	48
A. FAGOCITOSE POR RECEPTORES PARA PADRÕES MOLECULARES DE PATÓGENOS.....	49
B. FAGOCITOSE POR RECEPTORES PARA O COMPLEMENTO E PORÇÃO Fc DE IMUNOGLOBULINAS (IgG).....	52
3.1.2. PRODUÇÃO DE PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO.....	55
3.1.3. PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO.....	57
3.1.4. PRODUÇÃO DE FATOR DE NECROSE TUMORAL ALFA.....	59
DISCUSSÃO.....	61
Efeito da pravastatina na sobrevida dos modelos estudados.....	63
Ação da pravastatina na curva de sobrevida do BALB/c.....	64
Ação da pravastatina na curva de sobrevida do C57BL/b e do hamster....	69
Ação da pravastatina sobre o peso.....	71

Ação da pravastatina sobre as lesões cutâneas.....	72
Ação leishmanicida e citotoxicidade da pravastatina.....	75
Avaliação da fagocitose.....	77
Efeito da pravastatina na fagocitose.....	78
Efeito da infecção pela leishmania sobre a fagocitose.....	80
Efeito do tratamento pela pravastatina de animais infectados sobre a fagocitose.....	81
Ação da pravastatina sobre produção de peróxido de hidrogênio.....	83
Ação da pravastatina sobre a produção de óxido nítrico.....	85
Ação da pravastatina sobre a produção de FNT- $\alpha$ .....	87
CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS.....	91
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	96
ANEXOS.....	121

**LISTA DE FIGURAS E TABELAS**

Figura 1. Fluxograma da avaliação da influência da pravastatina sobre a infecção .....	20
Figura 2. Fluxograma da avaliação da influência da pravastatina sobre as funções dos fagócitos .....	21
Figura 3. Influência da pravastatina na curva de sobrevivência de camundongos BALB/c .....	36
Figura 4. Influência da pravastatina na curva de sobrevivência de camundongos C57BL/6.....	37
Figura 5. Influência da pravastatina na curva de sobrevivência de Hamster .....	38
Figura 6. Variação de peso dos camundongos BALB/c .....	39
Figura 7. Variação de peso dos camundongos C57BL/6 .....	40
Figura 8. Variação de peso dos hamsters sirius.....	41
Figura 9. Variação das medianas dos diâmetros das patas, direita e esquerda, dos camundongos BALB/c .....	42
Figura 10. Variação das medianas dos diâmetros das patas, direita e esquerda, dos camundongos C57BL/6. ....	43
Figura 11. Evolução do diâmetro das patas, direita e esquerda, de hamsters sirius após infecção .....	44
Figura 12. Evolução da lesão leishmaniótica em camundongo BALB/c.....	45
Figura 13. Camundongo BALB/c infectado. ....	45
Figura 14. Formas amastigotas de leishmânias obtidas do “esfregaço” das lesões.....	46

Figura 15. Efeitos de concentrações crescentes de pravastatina sobre formas promastigotas de <i>L. (L.) amazonensis</i> .....	47
Figura 16. Efeitos de concentrações crescentes de pravastatina sobre células peritoneais de camundongos. ....	48
Figura 17. Fagocitose por receptores para padrões moleculares de patógenos..	51
Figura 18 Fagocitose por receptores para opsoninas. ....	54
Figura 19. Produção de peróxido de hidrogênio.....	56
Figura 20 Produção de óxido nítrico .....	58
Figura 21 Produção de fator de necrose tumoral .....	60

**LISTA DE ABREVIATURAS UTILIZADAS NO TEXTO**

ATP = Trifosfato de adenosina

C3 = fator complemento 3

C3bi = fragmento inativo fator complemento 3

CDC42 = Cell division control protein 42 (proteína membro da subfamília das GTPases)

CO<sub>2</sub> = dióxido de carbono

CR3, CR1 = receptor 3 e 1 para complemento

eNOS = óxido nítrico sintase endotelial

Fc $\gamma$ RI, Fc $\gamma$ RII = receptores I e II para fração Fc da imunoglobulina

FNT- $\alpha$  – Fator de Necrose Tumoral Alfa

G protein= proteínas ligantes a nucleotídeos guanosina (nucleotide-binding protein)

GDP = guanosina difosfato

GTP = guanosina trifosfato

GTPases = enzimas hidrolíticas com capacidade de hidrolisar a guanosina trifosfato (GTP)

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> = peróxido de hidrogênio

HMG CoA = 3-hidroxi-3-metil-glutaril-Coenzima A

IL – 1; IL – 2... = Interleucina 1, Interleucina 2 , etc.

INF- $\gamma$  – Interferon gama

iNOS = óxido sintase induzível

LPG = Lipofosfoglicano

LPS = Lipopolissacárideo

LTA = Leishmaniose tegumentar Americana

MHC-I e MHC-II = complexo de histocompatibilidade principal I e II

MTT = brometo de 2-(4,5 dimetil, 2, tiazol)-3-5 difenil-2H – tetrazol

NADPH oxidase = nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidase

NFκB = fator nuclear kapa B

NNN-LIT - Novy-MacNeal-Nicolle + liver infusion tryptose

NO = óxido nítrico

O<sub>2</sub> = oxigênio molecular

P21/ras – proteína membro da subfamília Ras

PKC = Proteína cinase

PMA = acetato de forbol miristato

Rac = Ras-related C3 botulinum toxin substrate 2 = proteína membro da família das Rho GTPases

Ras = Rat Sarcoma – proteínas classificadas como subfamília das pequenas GTPases

Rho = Ras homolog = proteína membro da família GTPases

ROS = espécies reativas de oxigênio

RPMI - meio de cultura nutritivo rico em aminoácidos utilizado para cultivo celular.

STAT4 = signal transducer and activator of transcription 4

STAT6 = signal transducer and activator of transcription 6

STF – salina tamponada com fosfato

Ta1 ou Ta2 = Resposta T auxiliar tipo 1 ou tipo 2

TGF-β – Tissue Grow factor beta – fator de crescimento tissular

TLR2, TLR4 = receptores do grupo toll like 2,4.

WHO = World Health Organization

## **INTRODUÇÃO**

## **Leishmaniose Tegumentar Americana**

As leishmanioses constituem um grupo de doenças com transmissão vetorial de grande impacto epidemiológico e importância para a saúde pública mundial, acometendo cerca de dois milhões de novos casos por ano (WHO 2001). No Brasil, desde 2003, verifica-se sua transmissão autóctone em todos os estados brasileiros (Ministério da Saúde 2007).

São descritas formas clínicas distintas da doença, de acordo com o parasito e a resposta imunológica do hospedeiro (Müller et al. 1989; Ribeiro de Jesus et al. 1998), podendo ser divididas em localizadas ou disseminadas. A forma localizada no qual se inclui a Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA), compromete a pele e/ou mucosa causando lesões deformantes, e se manifesta nas formas cutânea, mucosa e cutânea difusa. A forma disseminada, ou calazar, manifesta-se pela disseminação sistêmica dos parasitos causando uma doença crônica progressiva e debilitante que pode levar ao óbito (Noben-Trauth 2000; Rogers et al. 2002).

Embora uma doença negligenciada em nosso meio, quando comparada com a forma visceral a LTA é mais freqüente. Entre os anos de 2001 e 2006 houve uma média de 30 mil casos novos/ano de LTA (Ministério da Saúde 2007), para um total de 48.455 casos notificados de leishmaniose visceral em dezoito anos (entre 1984 e 2002), ou seja, uma média de 3.156 casos/ano (Ministério da Saúde 2006). Nos últimos anos observaram-se mudanças no comportamento epidemiológico da doença. Foi considerada inicialmente uma zoonose de animais silvestres, acometendo acidentalmente pessoas em contato com florestas, e verifica-se atualmente que há um aumento de incidência em zonas rurais

desmatadas e em regiões periurbanas (Ministério da Saúde 2007). Autoridades sanitárias nos últimos anos alertam para a necessidade de maior atenção com a LTA em função de sua magnitude bem como alta probabilidade de levar a deformidades físicas e psicológicas provocando reflexos no campo social e econômico (Ministério da Saúde 2007). A LTA ocorre em ambos os sexos e todas as faixas etárias havendo um predomínio no sexo masculino (74%) e em maiores de 10 anos (90% dos casos) (Ministério da Saúde 2007).

As espécies causadoras da LTA são protozoários pertencentes ao gênero *Leishmania*, Família *Trypanosomatidae*, são parasitos intracelulares obrigatórios transmitidos ao homem através da picada dos insetos do gênero *Lutzomyia* (Família *Psychodidae*, Subfamília *Phlebotominae*). Conhecidos por várias denominações populares dependendo da localização geográfica tais como: mosquito palha, tatuquira, birigui entre outros. As principais espécies envolvidas na transmissão da LTA em nosso meio são o *Lutzomyia flaviscutellata*, *L. whitmani*, *L. umbratilis*, *L. intermedia*, *L. wellcome* e *L. migonei* (Ministério da Saúde 2007).

No Brasil foram descritas sete espécies do gênero *Leishmania*, seis delas pertencem ao subgênero *Viannia* e uma ao subgênero *Leishmania*. A *L. (V.) braziliensis*, a *L. (L.) amazonensis* e a *L. (V.) guyanensis* são as principais causadoras da doença em nosso país (Ministério da Saúde 2007). Há um nítido predomínio de infecções pela *L. (V.) braziliensis* seguido da *L. (L.) amazonensis*, sendo que a forma cutânea difusa, caracterizada pela ocorrência de múltiplas lesões nodulares disseminadas, está relacionada à *L. (L.) amazonensis* (Moraes & Silveira 1994).

Considerada até recentemente como doença restrita a algumas áreas geográficas, as infecções pela *L. (L.) amazonensis* vêm ganhando importância e são cada vez mais diagnosticadas na prática clínica, estando presente em pelo menos treze Estados da Federação (Ministério da Saúde 2007) com uma frequência relativa estimada de 7,5 a 18,2% (Romero 2001). O principal hospedeiro silvestre é o roedor *Proechimys sp.* (rato-soiá), além de outros roedores: *Oryzomys sp.*, *Neacomys sp.*, *Nectomys sp* e *Dasyprocta sp.*; os marsupiais *Metachirus sp.*, *Philander sp.*, *Didelphis sp.* e *Marmosa sp.*; e a raposa *Cerdocyon thous* (Basano & Camargo 2004).

### **Ciclo de vida e infecção pela Leishmania**

Muito já foi esclarecido sobre ciclo de vida e o comportamento das leishmânias, porém a interação hospedeiro–parasito se dá de uma forma complexa existindo ainda muitas questões a serem respondidas, principalmente quando da interação inicial do parasito com o hospedeiro. Esta fase inicial parece ser o fator determinante do prognóstico da infecção e um campo promissor para o surgimento de novas estratégias de tratamento ou prevenção da doença.

As leishmânias apresentam estágios morfológicos distintos adaptados aos diferentes hospedeiros. A forma infectante chamada de promastigota é transmitida pela picada do flebótomo, enquanto as formas amastigotas estão adaptadas a vida intracelular, infectando células do sistema mononuclear fagocitário, preferencialmente macrófagos, mas também em menor proporção fibroblastos e neutrófilos (Hespanhol et al. 2005; Ritter et al. 2009). A entrada dos parasitos nas células ocorre mediante fagocitose com participação de vários

receptores celulares, dentre esses, receptores para componentes do sistema complemento, como o CR3 e CR1 (Wilson & Pearson 1988; Castellano 2005), receptores Fc (Guy & Belosevic 1993), manose-fucose (Laufs et al. 2002), e receptores semelhantes ao Toll (Kropf 2004).

### **Mecanismos de escape da *Leishmania***

Considera-se que a fagocitose dos parasitos pelos macrófagos ativa a defesa inata do hospedeiro e constitui a primeira barreira contra a infecção, no entanto, as leishmânias são dotadas de mecanismos que lhes permitem escapar dessas defesas. A destruição do parasito pelo sistema do complemento é impedida por não ocorrer a formação do complexo lítico de ataque a membrana (complexo C5b-C9) uma vez que sua montagem pode ser inibida pela presença de lipofosfoglicanos (LPG) e proteases (gp63) nas membranas dos promastigotas e das formas metacíclicas (formas infectantes das leishmânias) (Bogdan & Röllinghoff 1998). Outro mecanismo que favorece ao escape consiste na menor produção de radicais de oxigênio ( $O_2^-$  e  $H_2O_2$ ) pelos fagócitos quando a fagocitose ocorre pela associação dos receptores do complemento CR3 e CR1 aos ligantes C3b e C3bi presentes na superfície dos parasitos; dessa forma os parasitos infectam a célula-alvo em segurança (Wright & Silverstein 1983; Castellano 2005), caso contrário, o poder oxidante desses radicais livres atuaria na destruição dos parasitos (Buchmuller-Rouiller & Mael 1981; Buchmuller-Rouiller & Mael 1986). Uma vez no interior do fagossoma as formas promastigotas evoluem para as amastigotas e, posteriormente, estas se tornam capazes de infectar outros macrófagos. As formas amastigotas também facilitam a fagocitose pela expressão

de fosfolipídios, como a fosfatidilserina, em suas membranas, as quais não somente estimulam a fagocitose como também ativam a produção de citocinas anti-inflamatórias, como a IL-10 e o TGF- $\beta$ , inibindo assim a produção de óxido nítrico (Deolindo 2008).

### **Mecanismos de defesa e respostas imunitárias**

As diversas manifestações clínicas da doença dependem não somente do parasito, mas também da resposta imunológica do hospedeiro, que pode se manifestar com predominância de linfócitos tipo Ta1 favorecendo uma doença limitada ou resposta tipo Ta2 favorecendo a disseminação da doença (Müller et al. 1989; Ribeiro-de-Jesus et al. 1998). Os fatores determinantes do tipo de resposta (Ta1 ou Ta2), com produção de citocinas relacionadas à resistência ou susceptibilidade à doença não estão bem esclarecidos. Infecções experimentais com a *L major* mostram que uma resposta com padrão Ta1, caracterizada pela presença de macrófagos ativados pelo interferon- $\gamma$  (INF- $\gamma$ ) e pelo FNT- $\alpha$  inicia vias secretoras de óxido nítrico bem como de FNT- $\alpha$ , IL-1, IL-12, IL-23 e IL-27, o que parece promover uma resposta predominantemente celular e a uma doença mais restrita com tendência a cura. Já os animais que iniciam uma resposta padrão Ta2 com predomínio de IL-4 e IL-10, cursam com uma menor produção de óxido nítrico, e apresentam as formas mais graves e disseminadas da doença. Conseqüentemente, a inibição da ativação do macrófago e da NOS (óxido nítrico sintase) ocupa papel relevante na fisiopatogenia do desenvolvimento e prognóstico da infecção.

## **Infecção experimental e modelos de estudo animais da leishmaniose**

Por décadas têm sido estudado dois modelos animais para infecção experimental pela leishmânia baseados no tipo de resposta imunológica esperada quando da infecção pela *L. major*, sendo então reconhecida a existência de animais susceptíveis e resistentes. Em infecções pela *L. major*, camundongos C57BL/6, CBA/J, C3h ou BIOD2 resistem à infecção apresentando cura clínica em poucos meses, enquanto os camundongos BALB/c e espécies imunodeficientes manifestam leishmaniose visceral sistêmica e progridem frequentemente para o óbito (Garg & Dube 2006). No entanto, embora de reconhecida importância e de valor inestimável no estudo das reações imunológicas, vem sendo observado que esta polarização Ta1-Ta2 não ocorre de forma tão bem definida no homem como na infecção experimental, havendo variações no perfil de citocinas Ta1 e Ta2 (Karp et al. 1993). Isto é particularmente verdadeiro na infecção pela *L. (L.) amazonensis* onde mesmo nos modelos murinos isogênicos, como BALB/c, C57BL/6 e C3H, a susceptibilidade à doença é determinada não pelo desenvolvimento da resposta Ta2, mas sim pelo enfraquecimento da resposta Ta1 (Afonso & Scott 1993; Ji et al. 2005; Maioli et al. 2004). Desta forma é necessário avançar com estudos buscando experimentar outros modelos de infecção e uma maior compreensão da relação da *L. (L.) amazonensis* com seus hospedeiros vertebrados.

Camundongos BALB/c e C57BL/6 infectados com *L. (L.) amazonensis* cursam inicialmente com o surgimento de uma pápula no local da inoculação que evolui para um nódulo de crescimento progressivo, seguido de ulceração, disseminação da lesão, caquexia e óbito (Coelho & Coutinho-Abath 1965). A

literatura tem registrado na infecção pela *L. (L.) amazonensis* que camundongos BALB/c não apresentam um fenótipo de resposta Ta2 clássico e o camundongo C57BL/6 desenvolve uma fraca resposta Ta1 (Vasquez & Soong 2006). Uma possível explicação seria uma subregulação de cadeia  $\beta 2$  de receptores da IL-12 por via independente da IL-4 (Jones et al. 2000; Vasquez & Soong 2006). Estas células tornam-se refratárias tanto a estímulos intrínsecos como exógenos, o que levaria a uma menor produção de óxido nítrico após estímulo pelo INF- $\gamma$  e pelo FNT- $\alpha$  (Jones et al. 2000; Vasquez & Soong 2006). De forma que a infecção pela *L. (L.) amazonensis* se apresenta como um modelo interessante para avaliar alguns aspectos da ativação da resposta Ta1 - Ta2 nestes animais bem como permite estudar a interferência de drogas imunomoduladoras para um padrão de resposta mais próximo do observado em seres humanos (Afonso & Scott 1993).

O hamster sírio (*Cricetus auratus*) é outro animal freqüentemente utilizado em estudos com leishmânia. Este se apresenta como um excelente modelo para estudo das leishmanioses por ser um animal extremamente sensível a infecção pela maioria das espécies conhecidas de leishmânia, o que permite avaliar a interferência da ação de novas drogas no curso da leishmaniose. Infelizmente são escassos os estudos imunológicos em relação ao hamster, havendo poucos dados clínicos. Em um estudo utilizando *L. mexicana*, observou-se em animais inoculados por via subcutânea o desenvolvimento de lesão inicial no sitio de inoculação até 3 meses após a infecção (Coelho & Coutinho-Abath 1965). Segundo os autores, inicialmente apresentou-se como uma lesão perceptível apenas ao toque cursando com crescimento e endurecimento progressivo e pelo menos em um animal ocorreu disseminação da lesão para a

porção distal ou para ambas as patas próxima à lesão (Coelho & Coutinho-Abath 1965). Hamsters inoculados por via intraperitoneal, após 2 a 3 meses apresentaram lesões disseminadas para o escroto. Dois hamsters inoculados por via subcutânea apresentaram disseminação para fígado e baço e um apresentou hemocultura positiva após seis meses (Coelho & Coutinho-Abath 1965). De forma que estas infecções no hamster parecem cursar tanto como formas localizadas ou como formas disseminadas viscerais.

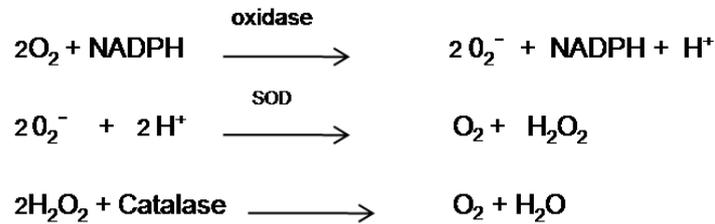
Infecções pela *Leishmania (L.) amazonensis* em modelos murinos mostraram características similares à doença clínica em humanos (Awasthi et al. 2004). Camundongos BALB/c são altamente susceptíveis ao desenvolvimento de lesões crônicas características induzidas pela *Leishmania (L.) amazonensis*, enquanto camundongos C57BL/6 são menos susceptíveis (Calabrese & Da-Costa 1992; Jones et al. 2002).

### **Radicais de hidrogênio na infecção pela *Leishmania***

O controle da infecção e conseqüente eliminação do parasito é um processo complexo. Além de seus grânulos tóxicos no interior do fagolisossoma, macrófagos ativados podem destruir células estranhas e parasitos pela ação de duas vias enzimáticas: produção de espécies reativas de oxigênio e/ou geração de óxido nítrico (Bokoch 2005; Basu & Ray 2005).

As modificações de membrana provocadas pela entrada do parasito ativam enzimas ligadas à membrana, em especial o complexo nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidase (NADPH oxidase), que é um complexo enzimático ligado à membrana que catalisa a redução do O<sub>2</sub> molecular para ânion

superóxido ( $O_2^-$ ) (Chanock et al. 1994; Griendlink & Ushio-Fukal 1998). A ativação do macrófago intensifica esta reação (Forman & Torres 2002; Basu & Ray 2005). O modelo abaixo resume os eventos bioquímicos que se processam no interior do macrófago:



A NADPH oxidase está envolvida diretamente na produção de compostos reativos de oxigênio (ROS). Indivíduos com defeitos genéticos na NADPH oxidase cursam com doenças relacionadas com a falha da imunidade inata, cursando com infecções bacterianas e fúngicas de repetição, ao passo que o excesso de ROS promove graves lesões teciduais pela intensidade aumentada da reação inflamatória (Bokoch 2005). As Rho GTPases atuam como um mecanismo regulatório da NADPH oxidase, com participação direta das subfamílias Rho, Rac e Cdc42 (Bokoch 2005). Suas propriedades químicas permitem que estas proteínas ajam como um “interruptor molecular” passando rapidamente de um estado ativado (ligado ao GTP) para um estado inativo (ligado ao GDP), permitindo respostas rápidas destas moléculas. Além de sua ação na liberação de ROS, as GTPases regulam vias de sinalização modificando as respostas celulares, adequando estas células para execução de funções como células do sistema imune inato (Bokoch 2005). Vários estudos parecem indicar que as Rho GTPases oferecem uma via alternativa na regulação do  $NF\kappa B$ , uma vez que são

importantes fatores na sinalização de receptores Toll, sendo descrito ativação destas proteínas após estimulação de TLR2, TLR4 e TLR9 (Bokoch 2005).

### **Reconhecimento da leishmânia pelo macrófago e fagocitose**

O reconhecimento das partículas a serem fagocitadas é dependente da interação de moléculas da superfície do parasito com receptores na superfície dos macrófagos. Os macrófagos expressam receptores CR3 e CR1 para os componentes do sistema do complemento (Wilson ME & Pearson 1988; Castellano 2005), receptores Fc (Guy & Belosevic 1993), manose-fucose (Laufs et al. 2002), e receptores semelhantes ao Toll (Kropf 2004). Estes receptores podem ser separados em dois grandes grupos: os que se ligam diretamente aos componentes da superfície da partícula a ser fagocitada, dos quais fazem parte os receptores para manose e  $\beta$ -glicanos, CD14, *scavenger A*, CD36 e CD68. O segundo grupo é formado por receptores dependentes de opsoninas, que não reconhecem diretamente os antígenos, mas sim componentes humorais do hospedeiro. Os receptores mais importantes que se ligam às leishmânias são os receptores CR3, CR1, Fc $\gamma$ RI, Fc $\gamma$ RII, receptor para fibronectina e receptores de produtos glicosilados. Em relação à *L. donovani*, foi observado que a fagocitose ocorre tanto na ausência como presença de opsoninas do soro, ou seja, utilizaria tanto receptores CR3 como receptores para manose/N-acetyl glucosamina (Basu & Ray 2005). Juntamente com as GTPases, várias moléculas sinalizadoras e quimiocinas estão também envolvidas na regulação da fagocitose entre as quais os membros da super família cinase C (PKC), uma cinase serina/treonina cálcio e fosfolípido dependente. A ativação da NADPH oxidase depende da fosforilação

da p47phox e p67phox pela PKC- $\beta$  após estímulos de receptores Fc $\gamma$  (Dekker et al. 2000; Dey et al. 2005). Dey et al. (2005) demonstraram que a ação da PKC é alterada por quimocinas C-C sendo diretamente afetada pela MIP-1 $\alpha$  e MCP-1.

### **Óxido nítrico na infecção pela *Leishmania***

O óxido nítrico tem ação antiparasitária atuando no combate de vários agentes infecciosos, como os causadores da malária, toxoplasmose, leishmaniose. As citocinas pro-inflamatórias, como o INF- $\gamma$  e FNT- $\alpha$ , estimulam sua síntese, causando a destruição dos parasitos ou a limitação do seu crescimento (Brunet 2001). A gravidade da infecção pela *Leishmania* spp parece estar vinculada à capacidade de produção de radicais de oxigênio e de óxido nítrico pela célula infectada (Giudice et al. 2007; Campos et al. 2008). Em especial, o óxido nítrico exerce forte impacto na infectividade das leishmânias. Campos et al. (2008). Um estudo que avaliou a infectividade de seis espécies de *Leishmania* em cultura de macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c mostrou que a *L. (V.) braziliensis*, responsável pelas formas mais severas da doença (leishmaniose mucocutânea), apresenta índices mais elevados de infecção, bem como os macrófagos apresentavam baixos índices de produção de NO. Em contraste, a *L. (V.) naiffi*, que apresenta baixa patogenicidade para o homem, apresentou os índices de infecção mais baixos e a mais alta produção de NO pelos macrófagos. De forma que parece haver uma relação inversa entre a infectividade e a habilidade desses parasitos de escaparem da ação microbicida da célula hospedeira, via NO (Campos et al. 2008). As leishmânias mais

resistentes ao óxido nítrico multiplicam-se melhor no hospedeiro e evoluem com quadros clínicos mais graves (Giudice et al. 2007).

O óxido nítrico é formado a partir da conversão da L-arginina para L-citrulina e óxido nítrico através da ação das enzimas sintases. A família NOS compreende 3 isoformas que incluem a endotelial (eNOS), a neuronal (nNOS) e a induzível por citocinas e produtos bacterianos (iNOS). Tem sido demonstrado um papel importante do óxido nítrico durante o reparo tecidual, sendo que esta molécula participa da inflamação, promove vasodilatação, angiogênese, re-epitelização e deposição de colágeno (Witte & Barbul 2002; Kapoor & Appleton 2005).

Estudos experimentais têm mostrado que as leishmânias são capazes de bloquear ou interferir na produção de espécies reativas de oxigênio e de óxido nítrico, seja pela produção de antioxidantes, como fosfoglicanos, ou com produção de superóxido dismutase, catalases e peroxiredoxinas. Estes protozoários desenvolveram também maneiras de inibir a ativação dos macrófagos (Buchmuller-Rouiller & Mauel 1987; Olivier et al. 1992; Bogdan 2008).

### **Tratamento da leishmaniose**

O tratamento da leishmaniose é dificultado pela pouca opção terapêutica disponível. Por décadas a doença tem sido tratada com os derivados do antimônio e a anfotericina B. No entanto, além da toxicidade das drogas, a resistência a estes fármacos já é cada vez mais freqüente (Dietze et al. 1985; Sampaio 1997), o que demanda novas estratégias e/ou novas drogas com ação

leishmanicida e/ou imunomoduladora que possam ser úteis no tratamento desta doença.

### **A pravastatina como droga imunomoduladora**

As estatinas constituem um grupo de drogas promissoras como antiparasitárias potencialmente capazes de alterar o equilíbrio leishmânia/resposta inata. De amplo uso na prática clínica como redutores de colesterol sérico, os inibidores da 3-hidroxi-3-metil-glutaril-CoA (HMG CoA) redutases, apresentam propriedades moduladoras para várias funções do sistema imunitário: a pravastatina reduziu a fagocitose e a produção de peróxido de hidrogênio por monócitos de indivíduos normais (Muniz-Junqueira et al. 2006), diminuiu a produção de FNT- $\alpha$  e a quimioatração de monócitos (Kaesemeyer et al. 1999; Grip et al. 2000). As estatinas também aumentam a produção de óxido nítrico (Laufs 2003), possivelmente pela ativação do óxido nítrico sintase endotelial por vias dependentes do inositol 3 fosfato cinase (PI3K) (Walter et al. 2004). Atividade anti-inflamatória, anti-parasitária e imunomoduladora das estatinas têm sido mostrada em diversos estudos: Haughan et al. (1992) observaram ação sinérgica da lovastatina e miconazol como agentes anti-leishmanias *in vitro*; Kwak et al. (2000) chamaram a atenção para as propriedades imunomoduladoras observando que as estatinas inibem diretamente a indução da expressão do complexo de histocompatibilidade principal II (MHC-II) pelo interferon- $\gamma$ , de forma que reprimem a ativação das células T mediadas pelo MHC-II. Alguns autores observaram possível atividade de estatinas contra o *P. falciparum* (Pradines et al. 2007; Wong & Davis 2009) e o *Schistosoma mansoni* (Araujo et al. 2008).

Entre os efeitos antiinflamatórios das estatinas, observou-se redução da infiltração de células inflamatórias em lesões ateroscleróticas e redução da expressão de citocinas pro-inflamatórias (Kitamoto et al. 2004). Franzoni et al. (2003) reconhecem que as estatinas apresentam propriedade antioxidante intrínseca, tanto com atividade anti-hidroxila como anti radicais peróxidos (Franzoni et al. 2003).

Considerando que as estatinas atuam de diversas formas, como substâncias anti-inflamatórias, antiparasitárias e imunomoduladoras, sobretudo na modulação da produção de óxido nítrico e, considerando também que um dos mecanismos efetores dos macrófagos na eliminação das leishmânias é a produção de óxido nítrico, é possível que as estatinas possam ser utilizadas como coadjuvantes no tratamento das leishmanioses.

Nossa hipótese é que a pravastatina interfere na evolução da leishmaniose pela modificação da capacidade de resposta do macrófago, em particular, em sua capacidade de fagocitose e na produção de óxido nítrico, peróxido de hidrogênio e fator de necrose tumoral- $\alpha$ .

**OBJETIVO**

## 1. OBJETIVO

Verificar a influência do tratamento com a pravastatina sobre a evolução da infecção pela *Leishmania (L.) amazonensis* e sobre as funções dos fagócitos em modelo experimental.

Por meio de:

- Avaliar a influência da pravastatina sobre a sobrevivência de camundongos infectados com *Leishmania (L.) amazonensis* em modelos de maior e menor susceptibilidade à infecção;
- Avaliar os parâmetros clínicos relativos ao peso e ao diâmetro da pata inoculada de camundongos infectados com *Leishmania (L.) amazonensis* em modelos de maior e menor susceptibilidade à infecção;
- Avaliar a influência da pravastatina, *in vitro*, sobre a produção de peróxido de hidrogênio, óxido nítrico e fator de necrose tumoral  $\alpha$  por macrófagos peritoneais de camundongos infectados por *Leishmania (L.) amazonensis* no modelo BALB/c (mais susceptível à infecção);
- Avaliar a influência da pravastatina sobre a fagocitose por macrófagos peritoneais de camundongos infectados por *Leishmania (L.) amazonensis* no modelo BALB/c (mais susceptível à infecção).

### 1.1. OBJETIVOS SECUNDÁRIOS

- Verificar possível ação microbicida da pravastatina, *in vitro*, sobre formas promastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis*.

- Verificar possível ação citotóxica da pravastatina, in vitro, sobre células peritoneais de camundongos.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

## 1. FLUXOGRAMA DE TRABALHO

### 1.1. Avaliação da influência da pravastatina sobre a evolução da infecção pela *Leishmania (L.) amazonensis*.

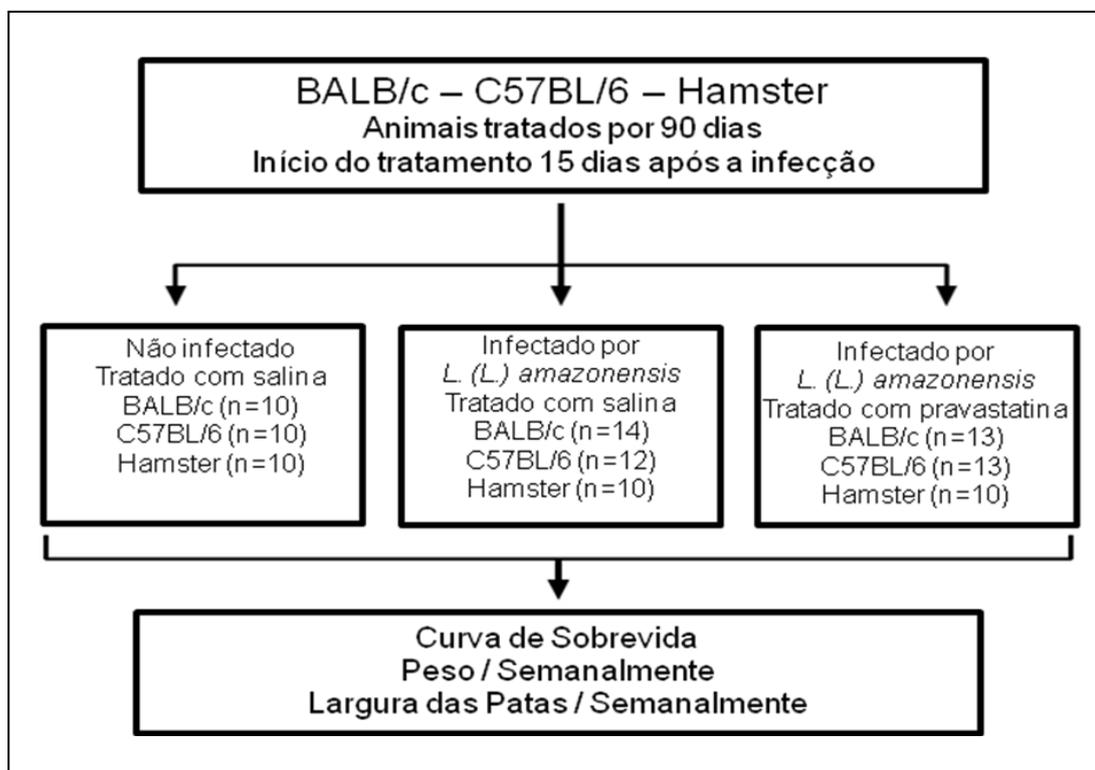


Figure 1. Fluxograma da avaliação da influência da pravastatina sobre a infecção.

**1.2. Influência do tratamento com pravastatina por 30 e 90 dias sobre as funções dos macrófagos de camundongos BALB/c infectados pela *Leishmania (L.) amazonensis***

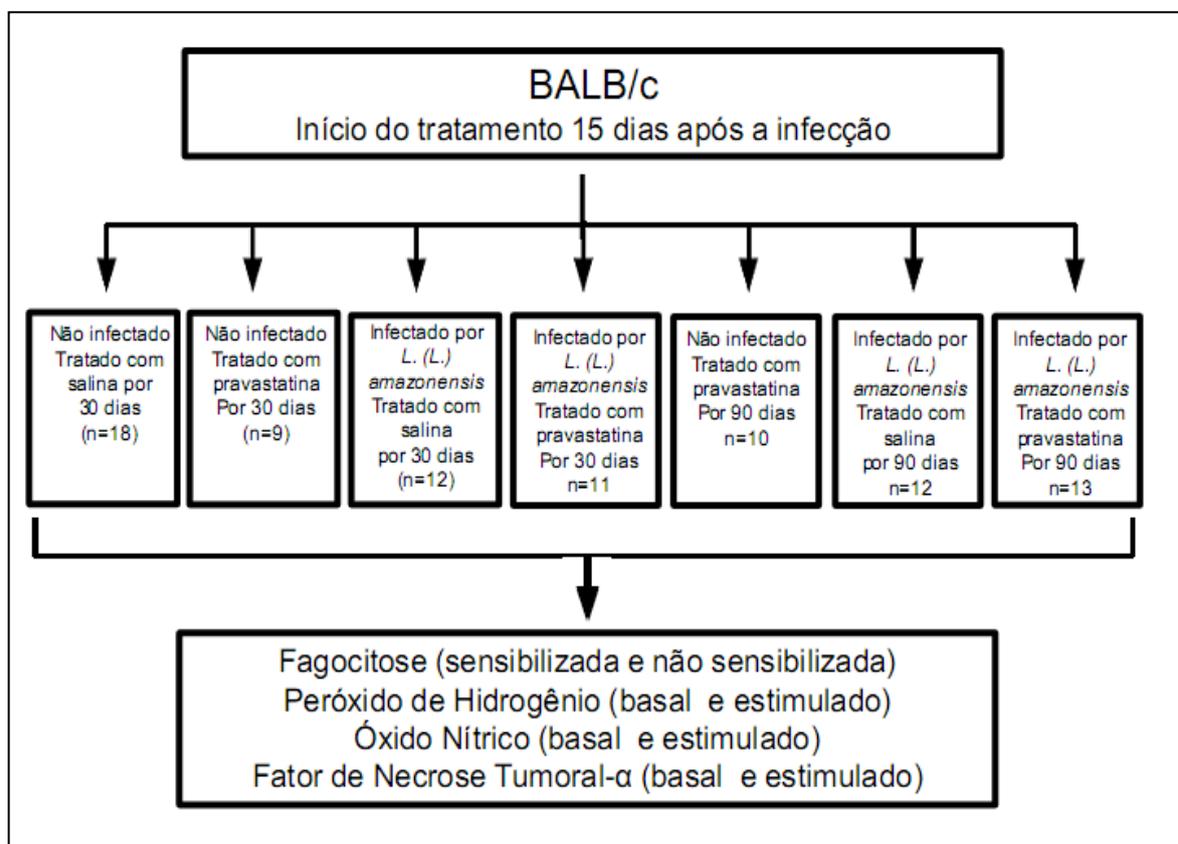


Figure 2. Fluxograma da avaliação da influência da pravastatina sobre as funções dos fagócitos.

## 2. TIPO DE ESTUDO

O presente trabalho é um estudo experimental realizado no laboratório de Imunologia Celular da Área de Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília.

### 3. ANIMAIS

Foram utilizados camundongos das linhagens BALB/c e C57BL/6, fêmeas, provenientes do biotério do Centro Multidisciplinar de Investigação Biológica – CEMIB, da Universidade Estadual de Campinas (SP) com idade entre 2 e 4 meses e pesando de 25 a 30 g. Utilizou-se também hamster sírio (*Mesocricetus auratus*), machos e fêmeas com idade entre 3 a 6 meses, provenientes do Alojamento de Animais da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília. Durante a fase experimental, os animais foram mantidos no alojamento de animais da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília, sob temperatura ambiente, ciclo claro/escuro de 12 horas, alimentados com ração balanceada e recebendo água potável *ad libitum*.

Os critérios adotados para a experimentação e manutenção dos animais estiveram rigorosamente dentro das normas estabelecidas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal. O projeto de pesquisa desenvolvido nesse estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso Animal, do Instituto de Biologia da Universidade de Brasília (Processo nº 81212007).

### 4. INÓCULO

A *Leishmania (L.) amazonensis* da cepa MHOM/BR/PH8 foi proveniente do Laboratório de Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais em Belo Horizonte (MG) e encontrava-se armazenada no Laboratório de Dermatologia da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília, mantida em nitrogênio líquido (-196° C).

A *L. (L.) amazonensis* criopreservada era transferida para o meio NNN-LIT (Novy-MacNeal-Nicolle + liver infusion tryptose) e mantida em estufa a 24°C até que os parasitos atingissem a fase log de crescimento. Em seguida, uma alíquota dessa suspensão era transferida para o meio de cultura Schneider (Sigma-Aldrich, St Louis, EUA), suplementado com 20% de soro fetal bovino e 0,2% de sulfato de gentamicina, onde eram mantidos até que atingissem novamente a fase log de crescimento. Decorrido esse tempo os parasitos eram quantificados em hematocítômetro e a infecção dos animais era feita pela inoculação de uma suspensão contendo  $1 \times 10^6$  parasitos/mL no dorso da pata posterior.

## **5. PRAVASTATINA**

A pravastatina foi obtida por macerado de preparação comercial de pravastatina sódica (Pravacol®, Bristol-São Paulo, Brasil). Os comprimidos de 40 mg foram macerados e administrados por via oral com auxílio de pipeta e ponteira na dose de 20 mg/kg/dia, num volume de 50 µL, durante 90 dias, iniciando 15 dias após a infecção.

## **6. INFECÇÃO DOS ANIMAIS**

A suspensão contendo  $1 \times 10^6$  formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis*, num volume de 50 µL, era administrada, por via subcutânea, no dorso das patas posteriores.

Os animais foram tratados por 90 dias e observados até o óbito semanalmente para avaliar a influência da pravastatina sobre a evolução da doença, pelos parâmetros de sobrevivência, peso e diâmetro da pata. Para realização das análises estatísticas, os parâmetros foram considerados somente até a 50ª semana. Os animais foram tratados durante 30 ou 90 dias para a avaliação dos parâmetros imunológicos. As medidas de peso (g) e diâmetro das patas posteriores (mm) de todos os camundongos foram obtidas semanalmente.

## **7. GRUPOS DE ESTUDO**

### **7.1. INFLUÊNCIA DA PRAVASTATINA SOBRE A EVOLUÇÃO DA INFECÇÃO PELA *L. (L.) amazonensis***

Para avaliação da influência da pravastatina sobre a evolução da doença foram estudados camundongos BALB/c, C57BL/6 e hamster sirius. Os seguintes grupos de experimentação foram constituídos: Grupo controle normal (n=10 para cada linhagem) tratados com salina por via oral; Grupo de animais infectados com *L. (L.) amazonensis* e tratados com solução salina por via oral (VO) (BALB/c, n=14; C57BL/6, n=12; hamster, n=10); Grupo de animais infectados com *L. (L.) amazonensis* e tratados com 20 mg/kg/dia de pravastatina por via oral (BALB/c, n=13; C57BL/6, n=13; hamster, n=10).

Estes grupos de animais foram acompanhados diariamente até o óbito para o estabelecimento da curva de sobrevivência. As medidas de peso corporal e do diâmetro das patas posteriores, direita e esquerda foram obtidas semanalmente.

## 7.2. AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS IMUNOLÓGICOS

Para a avaliação dos parâmetros imunológicos (fagocitose, produção de peróxido de hidrogênio, óxido nítrico e fator de necrose tumoral- $\alpha$ ) foram estudados camundongos BALB/c dos seguintes grupos:

- Grupo controle normal (C, n=18): animais tratados com solução salina;
- Grupo pravastatina (P30, n=9): animais não infectados e tratados com pravastatina (20 mg/kg/dia) durante 30 dias;
- Grupo leishmânia (L30, n=12): animais infectados com *Leishmania (L.) amazonensis* e após 15 dias da infecção tratados durante 30 dias com solução salina;
- Grupo leishmânia/pravastatina (LP30, n=11): animais infectados com *Leishmania (L.) amazonensis* e após 15 dias da infecção tratados durante 30 dias com pravastatina (20 mg/kg/dia por via oral).
- Grupo pravastatina (P90, n=10): animais não infectados e tratados com pravastatina (20 mg/kg/dia por VO) por 90 dias;
- Grupo leishmânia (L90, n=12): animais infectados com *Leishmania (L.) amazonensis* e após 15 dias da infecção tratados com solução salina VO por 90 dias;
- Grupo leishmânia/pravastatina (LP90, n=13): animais infectados com *Leishmania (L.) amazonensis* e após 15 dias da infecção tratados com pravastatina (20 mg/kg/dia por VO) por 90 dias.

## **8. ENSAIOS *IN VITRO***

### **8.1. OBTENÇÃO DE CÉLULAS PERITONEAIS**

As células peritoneais foram obtidas de camundongos previamente anestesiados com éter etílico, por meio do lavado peritoneal com 10 mL de salina tamponada com fosfato (STF), pH 7,2, a 4°C, infundidos e coletados por uma pequena incisão central no abdômen de aproximadamente 0,5 cm. O material recuperado era centrifugado a 400xg por 10min, em uma centrífuga refrigerada a 4°C. Após o descarte do sobrenadante, o sedimento era ressuspenso com 2 mL de meio RPMI 1640 (Sigma-Aldrich, St Louis, EUA) incompleto e, em seguida, as células eram quantificadas em hematocítômetro. As suspensões de células eram mantidas sob refrigeração em tubos plásticos graduados de 15 mL (LAbTech, Melbourn, Inglaterra), desde sua coleta até o início dos testes de avaliação das funções dos macrófagos.

### **8.2. AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA AÇÃO MICROBICIDA DA PRAVASTATINA PARA *Leishmania (L.) amazonensis***

Para avaliar se a pravastatina apresenta alguma ação microbicida para a *Leishmania (L.) amazonensis*, formas promastigotas do protozoário foram incubadas com concentrações crescentes da pravastatina e a viabilidade das leishmânias foi avaliada pela quantificação da atividade enzimática mitocondrial, utilizando-se o método da redução do 2,5-difenil brometo de tetrazolium (MTT), que detecta cristais de formazan (cor azulada) (Mosmann 1983).

Os experimentos foram conduzidos em triplicata, em placa de microcultivo de 96 escavações de fundo chato (LAbTech, Melbourn, Inglaterra). Uma suspensão contendo  $1 \times 10^6$  formas promastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis*/100 $\mu$ L foi depositada em escavações com as seguintes concentrações de pravastatina: 0, 0,5, 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128, 256, 512  $\mu$ g/mL e incubada em câmara úmida por 1 hora a 37°C na presença de ar + 5% de CO<sub>2</sub>. Em seguida adicionou-se a cada escavação 10  $\mu$ L de solução de 2,5-difenil brometo de tetrazolium (MTT) numa concentração de 5 mg/mL e as preparações foram incubadas por mais 4 horas nas mesmas condições anteriores. Em seguida adicionou-se em cada escavação 50  $\mu$ L de solução de duodecil sulfato de sódio a 10% para propiciar a liberação dos cristais de formazan. A viabilidade dos parasitos foi analisada em espectrofotômetro de placa (SpectraMax® Plus384) com filtro de 570 nm e os resultados foram expressos em absorbância.

### **8.3. AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DA PRAVASTATINA PARA CÉLULAS PERITONEAIS DE CAMUNDONGOS BALB/c**

A avaliação de um possível efeito tóxico direto da pravastatina para as células peritoneais dos camundongos BALB/c foi feita pela determinação da viabilidade dos macrófagos peritoneais pela quantificação da atividade enzimática mitocondrial, utilizando-se o método da redução do 2,5-difenil brometo de tetrazolium (MTT) (Mosmann 1983), após a incubação destas células com diferentes concentrações da droga.

Uma suspensão contendo  $2 \times 10^5$  macrófagos peritoneais/100  $\mu$ L em meio RPMI 1640 sem soro (n=8) foi incubada com as seguintes concentrações da

pravastatina: 0, 0,5, 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128, 256, 512 µg/mL, em duplicata, em placa de microcultivo de fundo chato (96 escavações) (LAbTech, Melbourn, Inglaterra), em câmara úmida, por 1 hora, a 37°C, na presença de ar + 5% de CO<sub>2</sub>. Em seguida adicionou-se a cada escavação 10 µL de solução de 2,5-difenil brometo de tetrazolium (MTT) numa concentração de 5 mg/mL e as células foram novamente incubadas por 4 horas nas mesmas condições anteriores. Em seguida adicionou-se 50 µL de solução de dodecil sulfato de sódio a 10% a cada escavação. As leituras foram feitas em espectrofotômetro de placa (SpectraMax® Plus384) com filtro de 570 nm e os resultados foram expressos em absorbância.

#### **8.4. INFLUÊNCIA DA PRAVASTATINA SOBRE A CAPACIDADE FAGOCITÁRIA DE MACRÓFAGOS PERITONEAIS DE CAMUNDONGOS COM LEISHMANIOSE**

Células peritoneais foram obtidas conforme técnica descrita acima nos itens 7.2.1 e 7.2.2 de cada grupo de animais. Os experimentos foram realizados em placa de microcultivo de fundo chato de 24 escavações (TTP-Therapeutic Training Products, Ohio, EUA), nas quais foram previamente depositadas lamínulas redondas de vidro de 14 mm de diâmetro. As células peritoneais ( $2 \times 10^5$  células/400µL de meio RPMI 1640 não acrescido de soro fetal bovino) foram incubadas em câmara úmida a 37°C por 2 h em atmosfera de ar + 5% de CO<sub>2</sub> para a aderência dos macrófagos e, em seguida, as escavações foram lavadas três vezes com STF (0,15 M, pH 7,2), a 37°C, para retirar as células não aderentes. Em seguida, distribuiu-se em cada escavação uma suspensão de

leveduras (*Saccharomyces cerevisiae*), previamente sensibilizadas ou não com *pool* de soro dos camundongos, contendo  $4 \times 10^6$  leveduras/100 $\mu$ L de meio RPMI 1640 acrescido de soro fetal bovino. As células foram novamente incubadas nas mesmas condições descritas anteriormente e, decorridos 30 min estas foram lavadas com STF (0,15 M, pH 7,2) à temperatura ambiente para retirar as leveduras não fagocitadas e, então, acrescentou-se RPMI acrescido de 20% de soro fetal bovino. As lamínulas foram secas em fluxo de ar quente, fixadas com metanol absoluto e coradas com solução de Giemsa (10% em tampão para coloração, pH 7,2), lavadas com água destilada, secas e montadas com resina sintética (Entelan) em lâminas de microscopia e a fagocitose foi avaliada por microscopia óptica (1000x), analisando-se 200 macrófagos por preparação. Avaliou-se nesse ensaio o índice fagocitário, calculado pelo produto da percentagem dos macrófagos envolvidos na fagocitose pela média de leveduras fagocitadas por macrófago.

#### **8.5. INFLUÊNCIA DA PRAVASTATINA SOBRE A PRODUÇÃO DE PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO POR MACRÓFAGOS PERITONEAIS DE CAMUNDONGOS COM LEISHMANIOSE**

O efeito da pravastatina sobre a produção de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) por macrófagos peritoneais foi avaliado com base na técnica de Pick e Keisari (1980) de oxidação do vermelho fenol em presença de peroxidase.

Os experimentos foram realizados em triplicatas, em placas de microcultivo de fundo chato de 96 escavações (LAbTech, Melbourn, Inglaterra). Foram distribuídas  $2 \times 10^5$  células peritoneais por escavação em 200  $\mu$ L de meio RPMI

1640 sem soro fetal bovino e, incubadas em câmara úmida a 37°C com mistura gasosa de ar + 5% de CO<sub>2</sub>, por 60 min, para a aderência das células. Em seguida, as escavações foram lavadas com STF (0,15M, pH 7,2), a 37°C, para retirar as células não aderidas e então novamente incubadas por mais 60 min, nas mesmas condições descritas, com 140µL de solução de vermelho fenol com 19 U/mL de peroxidase tipo I RZ 1.0 (Sigma), na presença ou não de acetato de forbol miristato (PMA) (20nM/mL). Foi preparada uma curva padrão de peróxido de hidrogênio (0; 1,56; 3,12; 6,25; 12,5; 25; 50 ou 100nM), em 140µL de vermelho de fenol acrescido de peroxidase. A reação foi interrompida pela adição de 10µL NaOH 1N e as leituras de absorvância feitas em espectrofotômetro de placa com filtro de 620nm (SpectraMax® Plus384, Molecular Devices, Sunnyvale, USA). Os resultados foram expressos em micromoles de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (µM/2x10<sup>5</sup>Mφxh<sup>-1</sup>).

#### **8.6. INFLUÊNCIA DA PRAVASTATINA SOBRE A PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO POR MACRÓFAGOS PERITONEAIS DE CAMUNDONGOS COM LEISHMANIOSE**

A quantificação da produção de óxido nítrico por macrófagos peritoneais de camundongos foi avaliada utilizando-se o reagente de Griess, segundo técnica descrita por Green et al. (1982). As células peritoneais foram coletadas dos animais infectados ou não e tratados ou não com pravastatina dos grupos acima descritos (itens 7.2.1 e 7.2.2), quantificadas e distribuídas, em triplicata, em placa de microcultivo de fundo chato de 96 escavações (LAbTech, Melbourn, Inglaterra). Utilizou-se 2x10<sup>5</sup> células/200 µL em meio RPMI 1640 sem soro fetal bovino. Após incubação para aderência, em câmara úmida a 37°C, por 60min,

em atmosfera de ar+ 5% de CO<sub>2</sub>, as escavações foram lavadas 3 vezes com STF (0,15 M, pH 7,2), a 37°C e, em seguida, novamente incubadas, nas mesmas condições anteriores, por 24h em 200 µL na presença ou não de lipopolissacarídeo (LPS) de *Escherichia coli*, sorotipo 055:B5 (Sigma-Aldrich, St Louis, EUA), na concentração de 10 ng/mL, preparado em meio RPMI 1640 acrescido de soro fetal bovino. Terminada a incubação, as placas foram submetidas à centrifugação a 400xg por 10min e em seguida, transferiu-se 100 µL do sobrenadante de cada escavação para outra placa e adicionados 100 µL do reagente de Griess. A curva padrão foi preparada com nitrito de sódio (NaNO<sub>2</sub>), em água destilada nas seguintes concentrações (0; 1,56; 3,12; 6,25; 12,5; 25; 50 ou 100 µM) As leituras das reações colorimétricas foram feitas em espectrofotômetro de placa com filtro de 590 nm e os resultados expressos em µM de NO.

#### **8.7. INFLUÊNCIA DA PRAVASTATINA SOBRE A PRODUÇÃO DE FATOR DE NECROSE TUMORAL- $\alpha$ (FNT- $\alpha$ ) PELOS MACRÓFAGOS PERITONEAIS DE CAMUNDONGOS COM LEISHMANIOSE**

Células peritoneais foram obtidas dos camundongos de todos os grupos previamente definidos (itens 7.2.1 e 7.2.2), e depois de quantificadas,  $2 \times 10^5$  células/400 µL em meio RPMI 1640 sem soro fetal bovino foram distribuídas em placa de microcultivo de fundo plano e 24 escavações (LAbTech, Melbourn, Inglaterra). Após incubação para aderência, em câmara úmida a 37°C, por 2 h em atmosfera de ar+ 5% de CO<sub>2</sub>, as escavações foram lavadas 3 vezes com STF (0,15 M, pH 7,2), a 37°C, e em seguida, novamente incubadas por mais 6 h, na

presença ou não de 20 ng/mL de lipopolissacarídeo (LPS de *Escherichia coli*, sorotipo 055:B5, Sigma-Aldrich, St Louis, EUA), nas mesmas condições anteriores. Decorrido o tempo de incubação os sobrenadantes dos cultivos foram coletados e armazenados a -80 °C até a quantificação do FNT- $\alpha$ . A determinação do FNT- $\alpha$  foi feita por ensaio imunoenzimático, utilizando-se um kit comercial com sistema de detecção por estreptavidina-biotina (BioSource, Nivelles, Bélgica), segundo as recomendações do fabricante. A leitura das absorbâncias foi feita em espectrofotômetro de placa, com filtro de 450 nm, e os resultados expressos em pg/mL de FNT- $\alpha$ .

## 9. ANÁLISE ESTATÍSTICA

A normalidade das variáveis foi analisada empregando-se o teste de Kolmogorov-Smirnov e a igualdade das variâncias pelo teste de Bartlett. Os testes estatísticos empregados para a comparação entre mais do que dois grupos foi o ANOVA ou Kruskal-Wallis, seguido pelos métodos de Student-Newman-Keuls ou Dunn para as múltiplas comparações, para amostras independentes com distribuição normal ou não-normal, respectivamente. Para as comparações entre duas amostras independentes foram usados o teste *t* de Student ou o de Mann-Whitney para amostras com distribuição normal ou não-normal, respectivamente.

A taxa de sobrevida foi analisada pelo teste de Mantel-Cox (log-rank) e apresentado como curva de sobrevida de Kaplan-Meyer.

A avaliação da capacidade microbicida da pravastatina foi feita empregando o teste Wilcoxon. As análises foram feitas empregando-se o programa Prism<sup>®</sup> Software Package (GraphPad, USA, 1997). As diferenças entre

as variáveis comparadas foram consideradas estatisticamente significantes quando a probabilidade bi-caudal da sua ocorrência devida ao acaso (erro tipo I) foi menor que 5% ( $p < 0,05$ ). Os dados foram expressos como mediana, quartis, valores máximos e mínimos. Foi feita a representação gráfica em Box- tipo Tukey, marcando os pontos *outliers*.

**RESULTADOS**

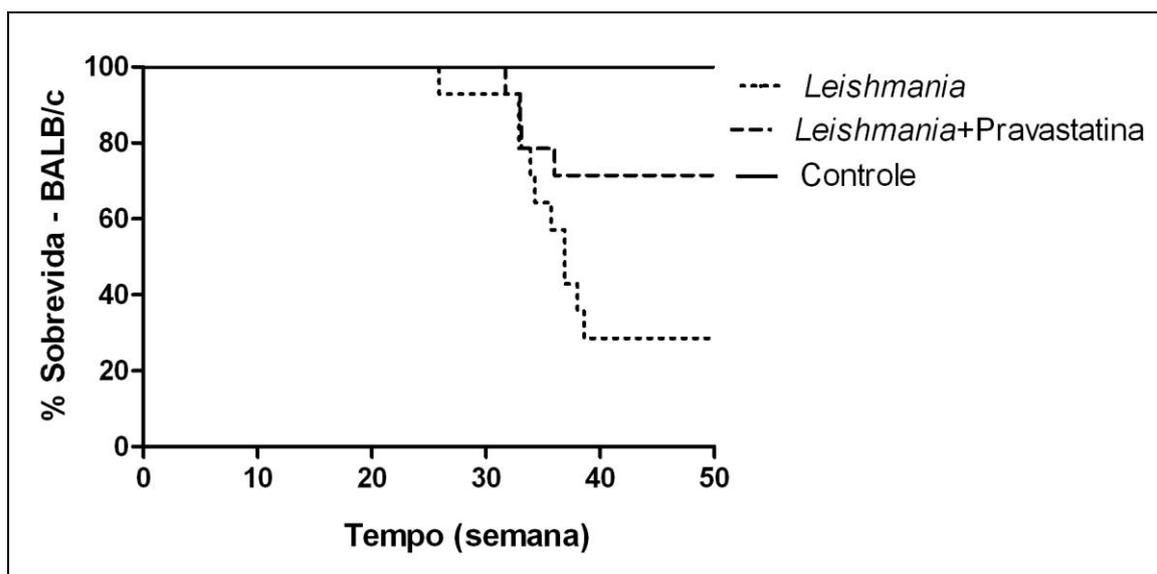
## **1. INFLUÊNCIA DA PRAVASTATINA SOBRE A EVOLUÇÃO DA DOENÇA**

Para verificar a influência da pravastatina na evolução da doença os animais, hamsters sirius (*Mesocricetus auratus*) e camundongos BALB/c e C57BL/6, infectados ou não com, e tratados ou não com a pravastatina foram acompanhados até a morte, com a avaliação dos seguintes parâmetros clínicos: sobrevivida, peso e diâmetro das patas, semanalmente.

### **1.1. INFLUÊNCIA DA PRAVASTATINA NA EVOLUÇÃO DA CURVA DE SOBREVIDA**

#### **1.1.1. INFLUÊNCIA DA PRAVASTATINA NA EVOLUÇÃO DA CURVA DE SOBREVIDA DOS CAMUNDONGOS BALB/c**

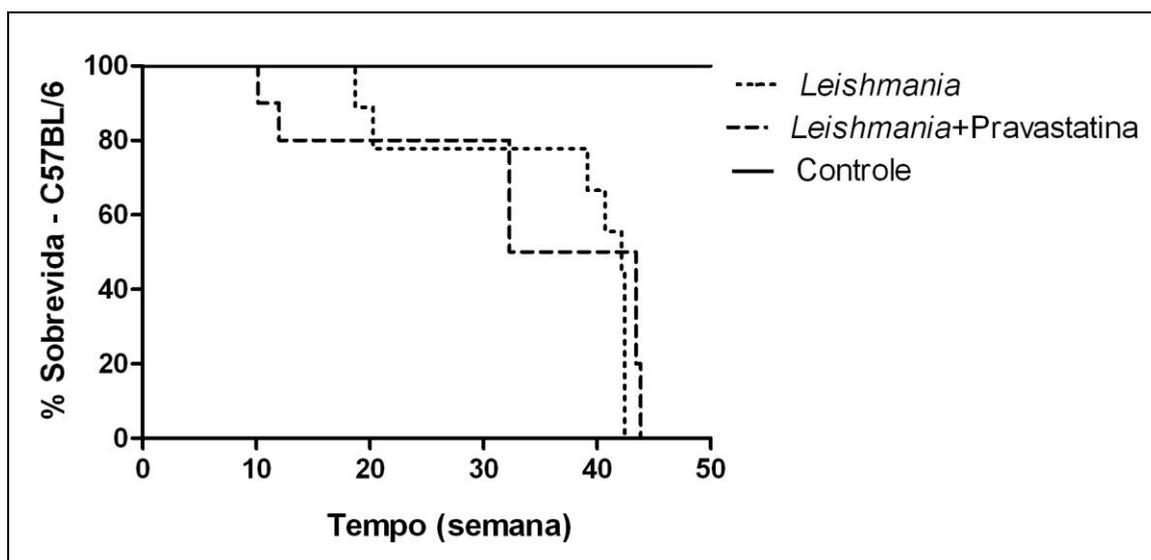
Os resultados mostraram que camundongos BALB/c não tratados começaram a morrer a partir da 26<sup>a</sup> semana de infecção, enquanto os animais tratados com pravastatina começaram a morrer na 32<sup>a</sup> semana de infecção. Na 50<sup>a</sup> semana, 71% dos animais tratados com pravastatina estavam vivos, enquanto apenas 29% dos camundongos não tratados estavam vivos. Todos os camundongos do grupo controle estavam vivos na 50<sup>a</sup> semana (Log-rank-Mantel-Cox,  $p = 0,008$ ; controle > Leishmania e Leishmania + pravastatina (figura 3). O tempo de sobrevivida dos camundongos infectados com a leishmânia tratados com pravastatina foi significativamente prolongado em comparação com aqueles infectados com leishmania e tratados com salina (Log-rank-Mantel-Cox,  $p = 0,048$ ).



**Figura 3.** Influência da pravastatina na curva de sobrevivência de camundongos BALB/c durante 50 semanas. Não infectados (n=10), infectados com *L. (L.) amazonensis* e tratados com salina (n=14) ou pravastatina com 20 mg/kg (n=13). Os resultados analisados pelo teste de Mantel-Cox mostraram diferença entre o grupo leishmânia e leishmânia+pravastatina ( $p=0,048$ ).

### 1.1.2. INFLUÊNCIA DA PRAVASTATINA NA EVOLUÇÃO DA CURVA DE SOBREVIVÊNCIA DOS CAMUNDONGOS C57BL/6

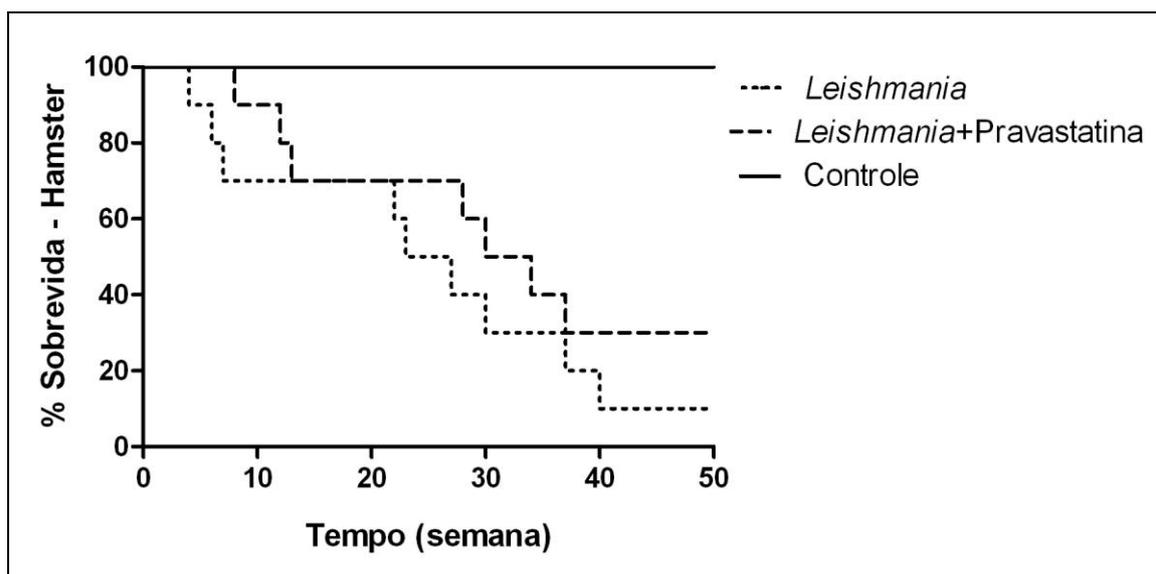
Os dados mostraram que a sobrevivência dos animais infectados com *Leishmania (L.) amazonensis* foi menor quando comparados ao controle normal não infectado (Mantel-Cox;  $p<0,001$ ); os resultados não mostraram diferenças entre os animais infectados e tratados com salina ou pravastatina (Mantel-Cox;  $p=0,7155$ ) (Figura 4).



**Figura 4.** Influência da pravastatina na curva de sobrevivência de camundongos C57BL/6. Não infectados (n=10) ou infectados com *L. (L.) amazonensis*, tratados com salina (n=12) ou pravastatina por 90 dias (n=13). Os resultados analisados pelo teste de Mantel-Cox mostraram diferença entre os grupos ( $p < 0,001$ ). Não houve diferença entre os animais infectados e tratados com salina ou pravastatina (Mantel-Cox;  $p = 0,7155$ ).

### 1.1.3. INFLUÊNCIA DA PRAVASTATINA NA EVOLUÇÃO DA CURVA DE SOBREVIVÊNCIA DO HAMSTER SIRIUS

O estudo para avaliar a sobrevivência de hamsters infectados ou não com *Leishmania (L.) amazonensis* mostrou que dentre os animais infectados e tratados com salina o primeiro óbito ocorreu 4 semanas após a infecção, enquanto dentre os tratados com pravastatina a primeira morte ocorreu na oitava semana, no entanto não houve diferença estatística entre os grupos pela curva de sobrevivência (Mantel-Cox;  $p = 0,281$ ); no grupo controle não foi observado nenhum óbito até a 50ª semana de observação (Figura 5).

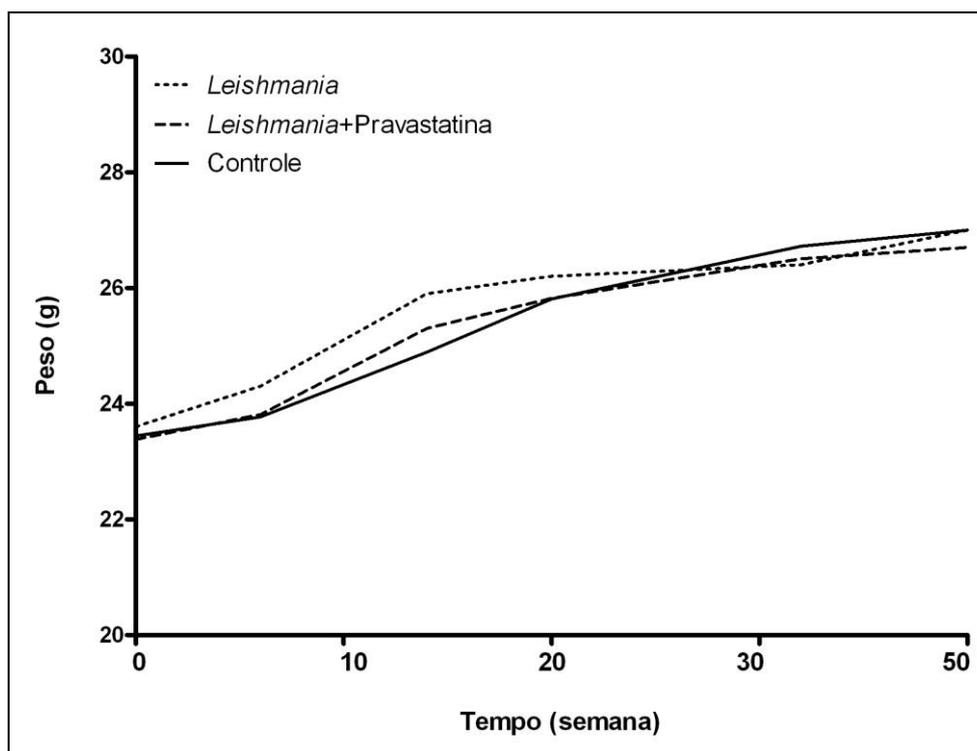


**Figura 5** . Influência da pravastatina na curva de sobrevivência de Hamster durante 50 semanas. Não infectados (n=10); infectados com *L. (L.) amazonensis* e tratados com salina (n=10) ou com 20 mg/kg de pravastatina (n=10). Os resultados analisados pelo teste de Mantel-Cox não mostraram diferenças entre o grupo leishmânia e leishmânia+pravastatina ( $p=0,280$ ).

## 2.1. EVOLUÇÃO DO PESO CORPORAL

### 2.1.1. INFLUÊNCIA DA PRAVASTATINA NA EVOLUÇÃO DO PESO DOS CAMUNDONGOS BALB/c

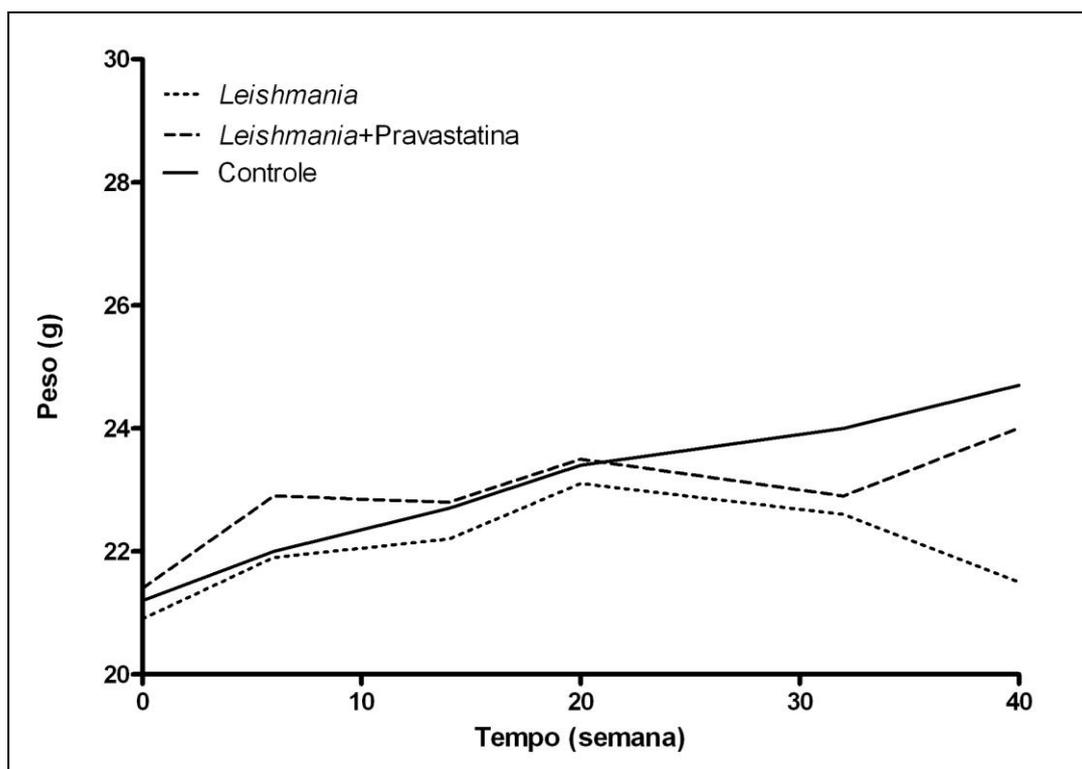
Não houve diferença entre as medianas dos pesos dos camundongos BALB/c dos grupos controle normal (salina) e infectados com *L. (L.) amazonensis* e tratados ou não com 20 mg/kg/dia de pravastatina na 1<sup>a</sup>, 6<sup>a</sup> e 14<sup>a</sup> semanas (ANOVA;  $p>0,05$ ), tampouco nas médias peso na 20<sup>a</sup>, 32<sup>a</sup> e 50<sup>a</sup> semanas de observação (ANOVA;  $p>0,05$ ) (Figura 6).



**Figura 6.** Variação de peso dos camundongos BALB/c dos grupos controle normal (Salina) e infectados com *L. (L.) amazonensis* e tratados com salina ou pravastatina. Os resultados, analisados pelo teste de ANOVA, não indicaram diferenças nas médias dos pesos entre os três grupos na 1<sup>a</sup>, 6<sup>a</sup>, 14<sup>a</sup>, 20<sup>a</sup> e 32<sup>a</sup> semanas ( $p>0,05$ ). Não houve diferença nas medianas dos pesos entre os grupos na 40<sup>a</sup> semana de evolução (Kruskal-Wallis;  $p>0,05$ ).

### 2.1.2. INFLUÊNCIA DA PRAVASTATINA NA EVOLUÇÃO DO PESO DOS CAMUNDONGOS C57BL/6

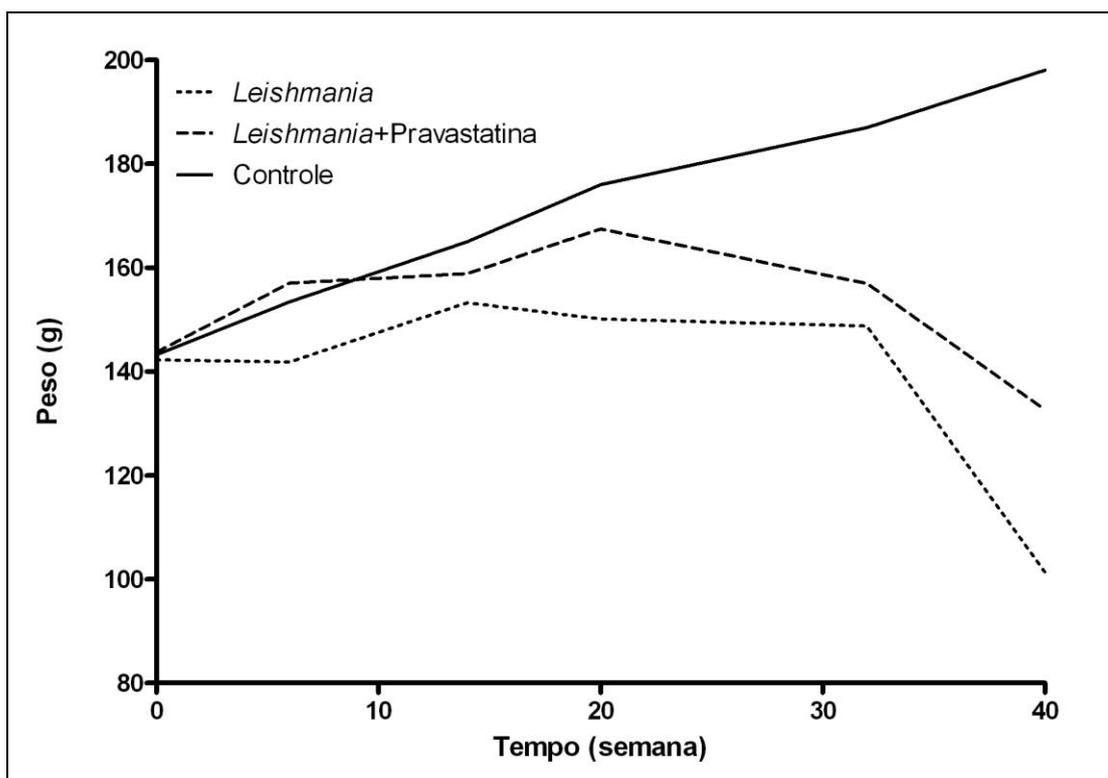
Não houve diferença da média dos pesos dos camundongos C57BL/6 dos três grupos avaliados, na 1<sup>a</sup>, 20<sup>a</sup> e 32<sup>a</sup> semana de observação (ANOVA,  $p>0,05$ ). No entanto, na 40<sup>a</sup> semana de evolução observamos que a média do peso dos animais infectados e tratados com salina ( $21,5\pm 1,9$  g) foi menor do que a do grupo controle normal ( $24,7\pm 0,8$  g) (ANOVA,  $p=0,013$ ; Student-Newman-Keuls,  $p<0,05$ ) e em relação aos tratados com pravastatina ( $24,0\pm 1,9$  g) (Student-Newman-Keuls;  $p<0,05$ ). Não se verificou diferenças nas medianas dos pesos entre os grupos entre a 6<sup>a</sup> e 14<sup>a</sup> semana (Kruskal-Wallis,  $p>0,05$ ; Dunn;  $p>0,05$ ) (Figura 7).



**Figura 7.** Variação de peso dos camundongos C57BL/6 pertencentes ao grupo controle normal (Salina) e infectados com *L. (L.) amazonensis* e tratados com salina ou pravastatina. Os resultados, analisados pelo teste de ANOVA seguido pelo método de Student-Newman-Keuls para a comparação entre os grupos, indicaram que não houve diferença nas médias entre os grupos na 1ª, 20ª e 32ª semanas ( $p > 0,05$ ), mas houve diferença nas médias do peso entre o controle normal e o grupo infectado tratado com salina ( $p < 0,05$ ) e, entre este, e o infectado tratado com pravastatina ( $p < 0,05$ ). Os resultados mostraram que não houve diferença nas medianas dos pesos entre os grupos na 6ª e 14ª semana (Kruskal-Wallis  $p > 0,05$ ).

### 2.1.3. INFLUÊNCIA DA PRAVASTATINA NA EVOLUÇÃO DO PESO DOS HAMSTERS SIRIUS

Não houve diferença entre as médias dos pesos dos hamsters tratados ou não com a pravastatina nas 1ª, 6ª, 14ª, 20ª e 32ª semanas de evolução (ANOVA,  $p > 0,05$ ). No entanto, na 40ª semana, os animais infectados e tratados com salina apresentaram a mediana do peso (101,4 g) menor do que a dos animais do grupo controle normal (197,9 g) (Kruskal-Wallis,  $p = 0,038$ ; Dunn,  $p < 0,05$ ) (Figura 8).



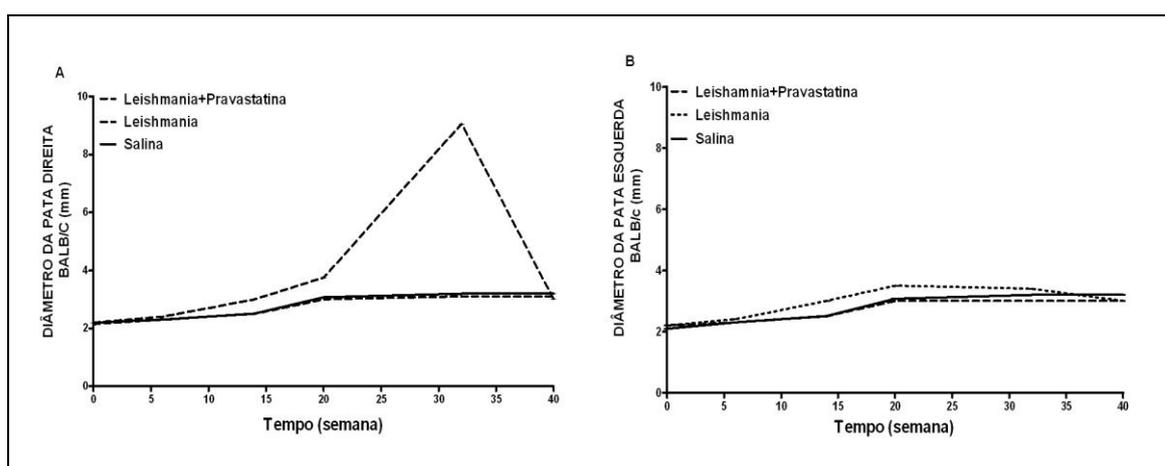
**Figura 8.** Variação de peso dos hamsters sirios dos grupos controle normal (Salina) e infectados com *L. (L.) amazonensis* e tratados com salina  $\bar{\tau}$  ou pravastatina. Os resultados, analisados pelo teste de ANOVA seguido pelo método de Student-Newman-Keuls, indicaram que não houve diferenças nas médias entre os grupos durante nas primeiras 20 semanas ( $p > 0,05$ ). Os resultados analisados pelo teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo método de Dunn para a comparação entre os grupos indicaram que não houve diferenças nas medianas na 32ª semana ( $p > 0,05$ ), no entanto, na 40ª semana o grupo infectado e tratado com salina apresentou redução significativa na mediana do peso em relação ao controle normal não infectado (Kruskal-Wallis  $p = 0,038$ ; teste de Dunn,  $p < 0,05$ ).

### 3.1. INFLUÊNCIA DA PRAVASTATINA NA EVOLUÇÃO DO DIÂMETRO DAS PATAS POSTERIORES

A medida do diâmetro das patas posteriores dos hamsters e camundongos BALB/c e C57BL/6 foi tomada semanalmente, para verificar a influência do tratamento com a pravastatina sobre a evolução do tamanho da lesão no local da infecção.

### 3.1.1. INFLUÊNCIA DA PRAVASTATINA NA EVOLUÇÃO DO DIÂMETRO DAS PATAS DOS CAMUNDONGOS BALB/c

O estudo do diâmetro das patas mostrou que os camundongos BALB/c do grupo leishmânia (infectados tratados com salina) apresentaram da 14<sup>a</sup> semanas de infecção em diante a mediana de ambas as patas, direita e esquerda, maior do que a dos animais tratados com pravastatina ou, os do grupo controle normal (Kruskal-Wallis;  $p < 0,01$ ) (Figura 9).

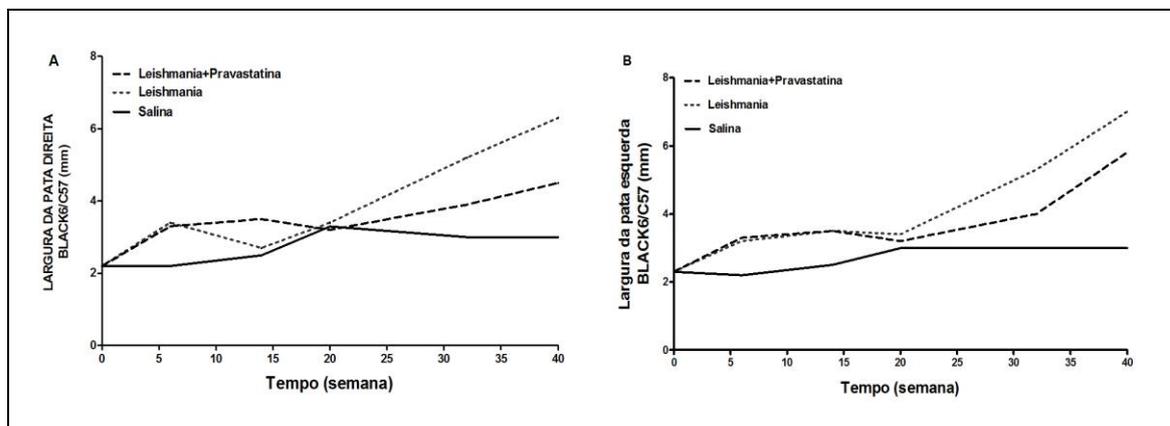


**Figura 9.** Evolução do diâmetro das patas, direita e esquerda, dos camundongos BALB/c após a infecção. Grupo controle normal (salina), infectados com *L. (L.) amazonensis* e tratados com salina ou pravastatina. Os resultados, analisados pelo teste de Kruskal-Wallis seguido pelo método de Dunn, mostraram que o grupo infectado (*Leishmania*), apresentou aumento na mediana do diâmetro das patas, direita e esquerda, da 14<sup>a</sup> semana em diante depois da infecção ( $p < 0,01$ ), em relação ao controle normal não infectado e ao infectado tratado com pravastatina ( $p < 0,05$ ).

### 3.1.2. INFLUÊNCIA DA PRAVASTATINA NA EVOLUÇÃO DO DIÂMETRO DAS PATAS DOS CAMUNDONGOS C57BL/6

Observamos que os camundongos C57BL/6 dos grupos infectados com *L. (L.) amazonensis*, tratados com salina ou pravastatina, apresentaram as medianas dos diâmetros das patas direita (6<sup>a</sup>, 14<sup>a</sup>, 32<sup>a</sup> e 40<sup>a</sup> semana) e esquerda (6<sup>a</sup>, 14<sup>a</sup>, 20<sup>a</sup>, 32<sup>a</sup> e 40<sup>a</sup> semana) maiores do que as do grupo controle normal não

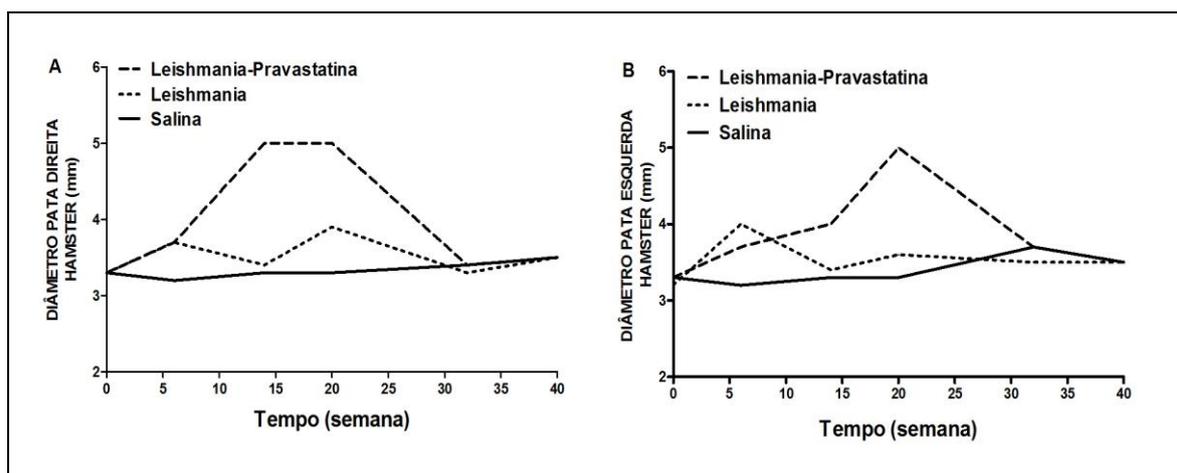
infectado (Kruskal-Wallis;  $p < 0,001$ ). Os diâmetros das patas do grupo infectado e tratado com pravastatina foram menores do que a do grupo infectado e tratado com salina na 20<sup>a</sup> semana (pata esquerda mediana 3,40 mm para leishmania x 3,20 mm para pravastatina; Mann-Whitney,  $p = 0,037$ ) e na 32<sup>a</sup> semana (pata esquerda mediana 5,30 mm para leishmania x 3,95 mm para pravastatina; Mann-Whitney,  $p < 0,001$ ) (Figura 10).



**Figura 10.** Evolução do diâmetro das patas, direita e esquerda, dos camundongos C57BL/6 após infecção. Grupo controle normal (salina) e infectados com *L. (L.) amazonensis* e tratados com salina (Leishmania) ou pravastatina (Leishmania+Pravastatina). Os resultados mostraram que as medianas dos diâmetros das patas direitas e esquerdas eram menores no grupo controle não infectado, quando comparado aos animais infectados, tratados com salina ou pravastatina, na 6<sup>a</sup>, 14<sup>a</sup> (Kruskal-Wallis,  $p < 0,001$ ; Dunn,  $p < 0,05$ ); não houve diferenças entre os grupos leishmânia e pravastatina ( $p > 0,05$ ). As medianas dos diâmetros da pata direita, durante a 32<sup>a</sup> e 40<sup>a</sup> semana (Kruskal-Wallis,  $p < 0,001$ ; Dunn,  $p < 0,05$ ), e da pata esquerda, durante a 20<sup>a</sup>, 32<sup>a</sup> e 40<sup>a</sup> semana eram maiores do que as do controle normal não infectado; houve diferença significativa no diâmetro da pata esquerda entre os grupos leishmânia e pravastatina na 20<sup>a</sup> e 32<sup>a</sup> semanas, Mann-Whitney,  $p = 0,037$  e  $p = 0,049$ , respectivamente.

### 3.1.3. INFLUÊNCIA DA PRAVASTATINA NA EVOLUÇÃO DO DIÂMETRO DAS PATAS DOS HAMSTERS SIRIUS

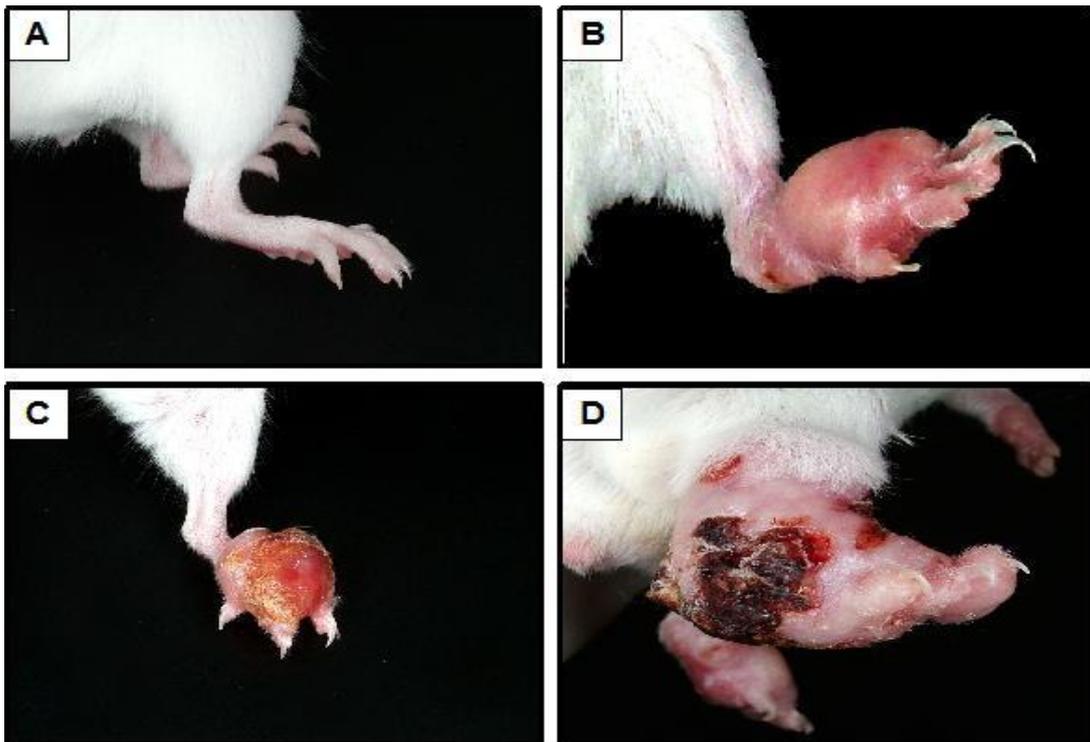
Não houve diferença entre as medianas do diâmetro das patas direita e esquerda dos hamsters nos grupos, controle normal (salina) e infectados com *L. (L.) amazonensis*, tratados ou não com 20 mg/kg/dia de pravastatina ao longo das 40 semanas de observação (Kruskal-Wallis;  $p > 0,05$ ) (Figura 11).



**Figura 11.** Evolução do diâmetro das patas, direita e esquerda, do hamsters sirius após infecção. Grupo controle normal (Salina), infectados com *L. (L.) amazonensis* e tratados com salina ou pravastatina. Os resultados, analisados pelo teste de Kruskal-Wallis não indicaram diferenças nas medianas dos diâmetros das patas entre os três grupos ( $p > 0,05$ ).

### 3.1.4. ASPECTOS ANATÔMICOS DAS LESÕES

As figuras 12 e 13 mostram a formação e evolução da lesão em camundongos BALB/C infectados com *L. (L.) amazonensis*. Depois de aproximadamente quatro semanas da infecção a lesão começou a ser visível, como uma pequena pápula no dorso da pata (Figura 12A). Aproximadamente após 10 semanas depois da infecção observou-se o aumento da lesão que se expressou como nódulo (Figura 12B), com 20 semanas já se observou ulceração dos nódulos (Figura 12C) e com 40 semanas observou-se também tecido necrótico (Figura 12D). É possível observar também na figura 13, diferenças de tamanho e forma das lesões, nas patas do mesmo animal.



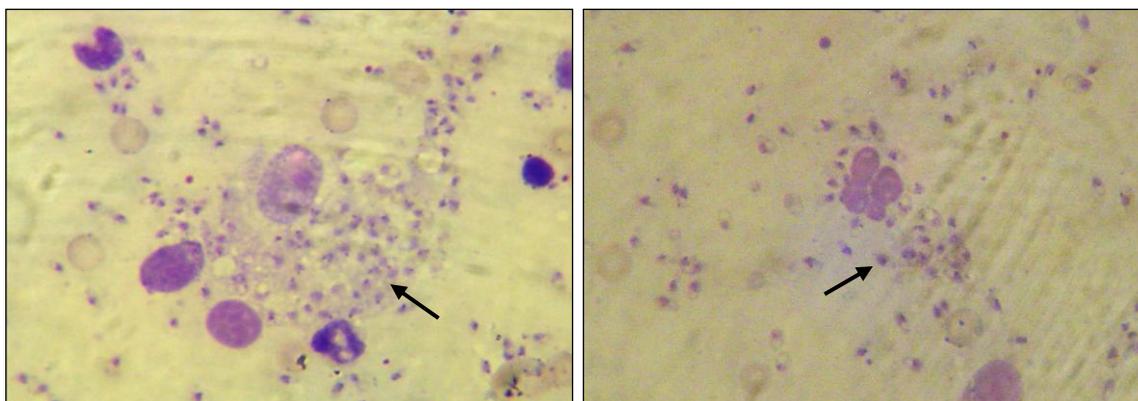
**Figura 12.** Evolução da lesão leishmaniótica em camundongo BALB/c infectado por *L. (L.) amazonensis*. Quatro semanas depois da infecção observa-se uma pápula no dorso da pata (A), Com 10 semanas observa-se um nódulo (B) Com 20 semanas observa-se a presença de uma ulceração no nódulo (C), com 40 semanas observa-se a presença de tecido necrótico (D).



**Figura 13.** Camundongo BALB/c infectado com  $1 \times 10^6$  formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis* em cada pata. Observar diferenças na forma e no tamanho das lesões em ambas as patas após 40 semanas de evolução.

### 3.1.5. Comprovação da infecção leishmaniótica

A figura 14 mostra formas amastigotas de leishmânias em esfregaços das patas de animais infectados com  $1 \times 10^6$  formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis*. Mesmo nos animais sem lesões aparentes foi possível identificar formas amastigotas do parasito, 90 dias depois do tratamento.



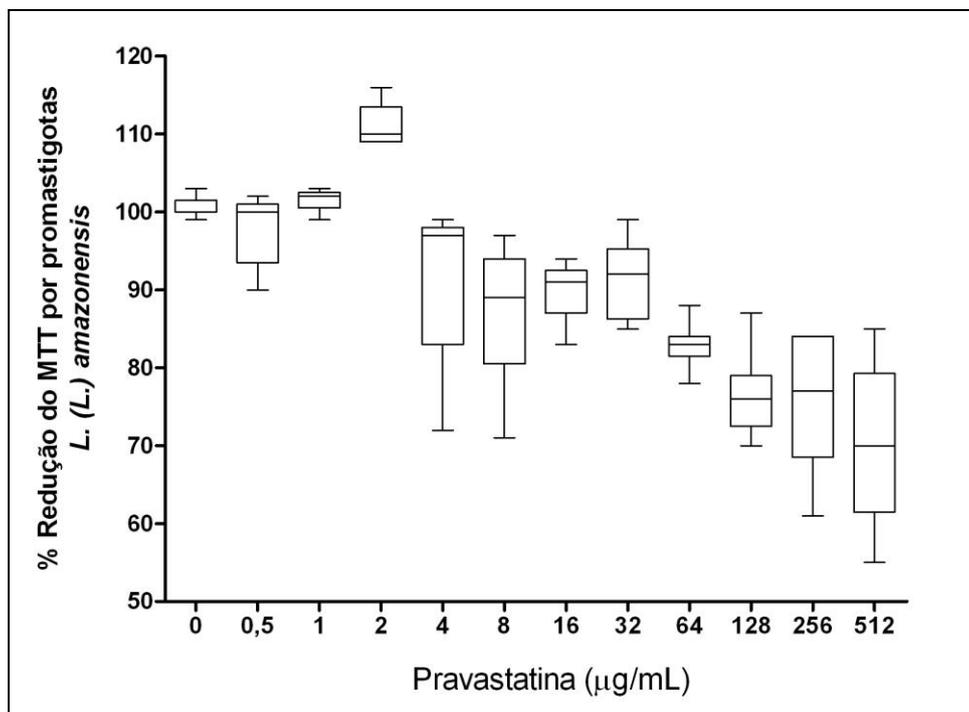
**Figura 14.** Formas amastigotas de leishmânias obtidas do esfregaço das lesões das patas de camundongo BALB/c infectados com  $1 \times 10^6$  formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis* sacrificados após 90 dias de tratamento. Aumento 1000x.

## 2. ENSAIOS DE CITOTOXICIDADE

### 2.1. DETERMINAÇÃO IN VITRO DE AÇÃO MICROBICIDA DA PRAVASTATINA PARA *Leishmania (L.) amazonensis*

O efeito da pravastatina sobre a viabilidade de formas promastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis* foi avaliada verificando-se a atividade metabólica do protozoário, pela redução do MTT, quando incubadas com doses crescentes de 0 a 512  $\mu\text{g/mL}$  de pravastatina, in vitro. Os resultados mostraram redução da atividade metabólica dos protozoários quando incubados com concentrações igual ou superior a 4  $\mu\text{g/mL}$  de pravastatina. Observamos uma redução de 3 a 30% no crescimento do parasito (Wilcoxon;  $p < 0,05$ ), de forma dose dependente.

Entretanto, na dose de 2  $\mu\text{g/mL}$ , a pravastatina estimulou o crescimento do microorganismo (Wilcoxon;  $p < 0,001$ ) (Figura 15).

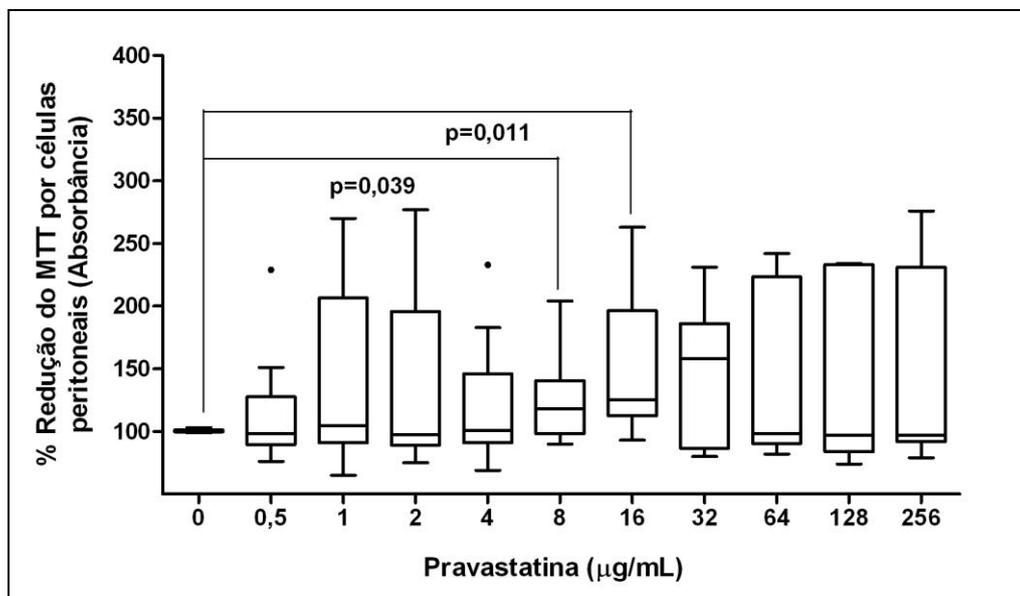


**Figura 15.** Efeitos de concentrações crescentes de pravastatina sobre formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis*, após 4 horas de incubação na presença de MTT ( $n=8$ ). Os resultados, analisados pelo teste de Wilcoxon, mostraram aumento da atividade mitocondrial com 2  $\mu\text{g/mL}$  (Wilcoxon;  $p < 0,001$ ) e diminuição da porcentagem de redução do MTT nas concentrações superiores a 4  $\mu\text{g/mL}$  da droga (Wilcoxon;  $p < 0,05$ ), indicando uma relação inversa entre dose e resposta. Os dados estão representados como medianas, quartis e valores máximos e mínimos.

## 2.2. DETERMINAÇÃO DA DOSE TÓXICA DE PRAVASTATINA PARA CÉLULAS PERITONEAIS DE CAMUNDONGOS

Para excluir possíveis efeitos tóxicos diretos da pravastatina sobre macrófagos peritoneais foi testada a atividade mitocondrial dessas células, *in vitro*, submetidas a concentrações crescentes de pravastatina (0 a 256  $\mu\text{g/mL}$ ). A incubação de macrófagos peritoneais por 4 horas com pravastatina mostrou aumento significativo em 18 e 25% na atividade mitocondrial com reflexo no percentual de redução do MTT, nas concentrações de 8 e 16  $\mu\text{g/mL}$  da droga,

respectivamente. As demais concentrações não influenciaram o percentual de redução do MTT (Wilcoxon;  $p < 0,05$ ) (Figura 16).



**Figura 16.** Efeitos de concentrações crescentes de pravastatina sobre células peritoneais de camundongos avaliado pelo método de redução do MTT, após 4 horas de incubação. Os resultados, analisados pelo teste de Wilcoxon, mostraram que nas concentrações de 8 e 16 µg/mL de pravastatina houve aumento no percentual de redução do MTT pelos macrófagos peritoneais ( $p < 0,05$ ) e nenhum efeito nas outras concentrações ( $p > 0,05$ ). Os dados estão representados como medianas, quartis, valores máximos e mínimos. Os valores *outliers* estão marcados.

### 3. ENSAIOS IMUNOLÓGICOS COM MACRÓFAGOS PERITONEAIS DE CAMUNDONGOS BALB/c

#### 3.1. AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE FAGOCITÁRIA

O teste de fagocitose realizado utilizando-se *S. cerevisiae* não sensibilizadas com soro fetal bovino inativado permitiu avaliar a fagocitose pelos receptores para os padrões moleculares de patógenos, e quando as leveduras foram sensibilizadas com pool de soro fresco de camundongos avaliamos a fagocitose pelos receptores para o complemento e porção Fc de imunoglobulinas (rIgG).

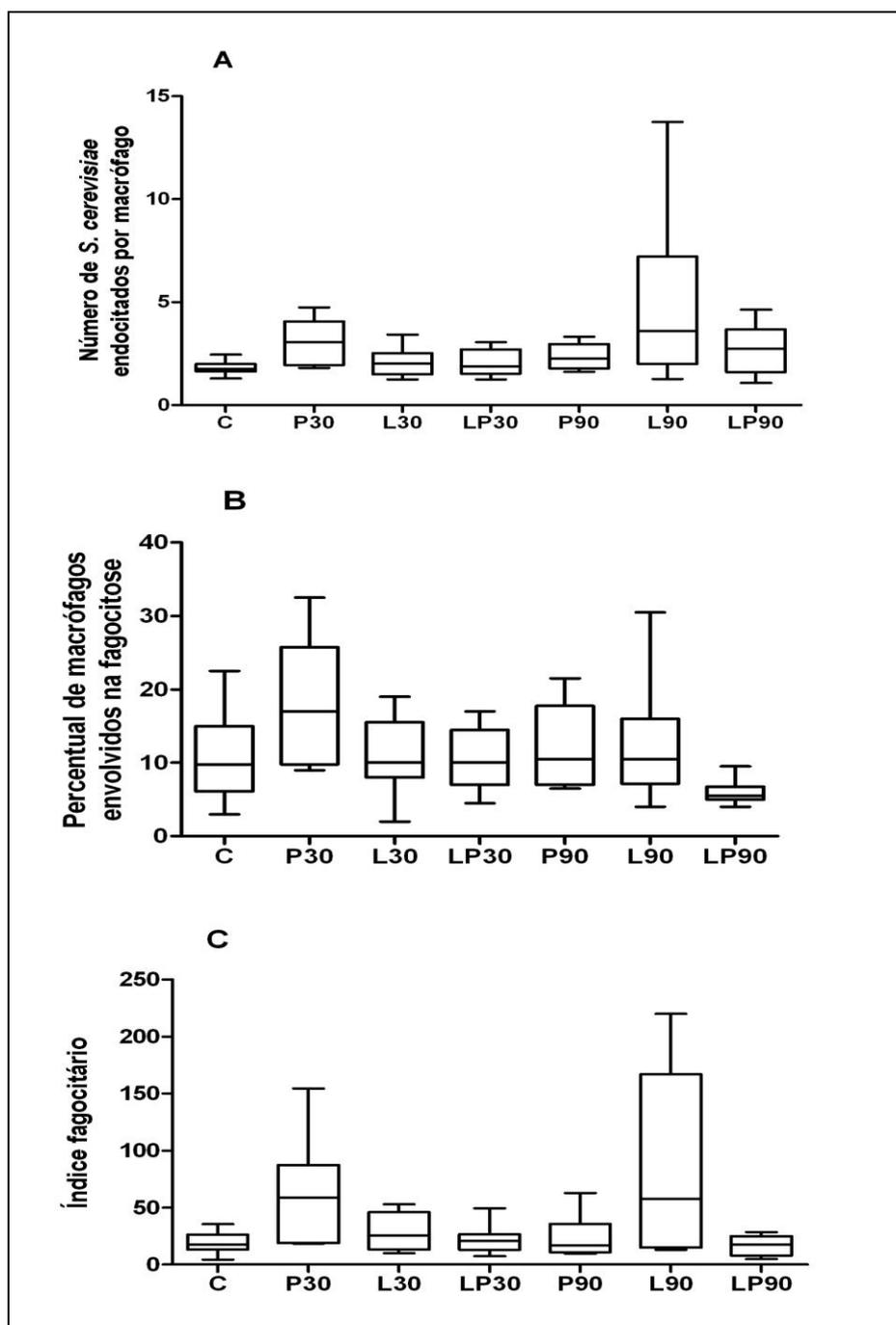
## A. FAGOCITOSE POR RECEPTORES PARA PADRÕES MOLECULARES DE PATÓGENOS

A infecção pela leishmânia aumentou a capacidade fagocitária dos macrófagos somente quando avaliada após 90 dias de tratamento com salina. Os animais infectados com leishmânia e tratados com salina não apresentaram alteração estatisticamente significativa do índice fagocitário aos 30 dias de tratamento em relação ao controle normal, sendo as medianas de 25,8 e 17,5, respectivamente (Kruskal-Wallis;  $p > 0,05$ ), porém, após 90 dias o índice fagocitário foi mais elevado no grupo leishmânia (L90) (57,8) do que no grupo L30 (25,8) e no controle tratado apenas com salina (17,5) (Kruskal-Wallis;  $p < 0,05$ ); sendo que este aumento ocorreu devido ao aumento do número médio de leveduras fagocitadas por macrófago (3,6), comparado a 1,8 do controle; Kruskal-Wallis;  $p < 0,05$ ) (Figura 17 A), pois não houve diferença na proporção de macrófagos envolvidos na fagocitose (Kruskal-Wallis  $p > 0,05$ ;) (Figura 17).

Diferentemente, o efeito da pravastatina foi observado 30 dias após sua administração em animais não infectados, pelo aumento do índice fagocitário em relação ao controle normal, sendo as medianas de 59,0 e 17,5, respectivamente (Kruskal-Wallis;  $p < 0,05$ ); isto se deveu tanto ao aumento da proporção de macrófagos envolvidos na fagocitose (mediana de 17,0 versus 9,8; ANOVA;  $p < 0,05$ ) quanto ao aumento do número médio de leveduras fagocitadas por macrófago (3,1 versus 1,8; Kruskal-Wallis;  $p < 0,05$ ). No entanto, com 90 dias de administração da pravastatina, o grupo P90 apresentou parâmetros de índice fagocitário, proporção de macrófagos envolvidos na fagocitose e média de leveduras fagocitadas comparáveis ao controle normal (Kruskal-Wallis;  $p > 0,05$ )

(Figura 17).

A modulação negativa da pravastatina sobre a fagocitose pelos macrófagos dos animais com leishmaniose somente tornou-se evidente após 90 dias de tratamento com a droga. Animais infectados tratados com pravastatina por 30 dias (LP30) não apresentaram índice fagocitário diferente do grupo leishmânia (L30), sendo as medianas de 21,0 e 23,0, respectivamente (Kruskal-Wallis;  $p>0,05$ ). O mesmo ocorreu para a proporção de macrófagos envolvidos na fagocitose (10,0 leishmânia/pravastatina (LP30) e 10,0 leishmânia/salina (L30); Kruskal-Wallis;  $p>0,05$ ) e para o número médio de leveduras fagocitadas (1,9 para LP30 e 2,0 para L30, Kruskal-Wallis;  $p>0,05$ ). No entanto, após 90 dias de tratamento o índice fagocitário do grupo LP90 (17,5) foi significativamente inferior ao índice fagocitário do grupo L90 (57,8) (Kruskal-Wallis;  $p<0,05$ ); isto ocorreu pela diminuição da proporção de macrófagos envolvidos na fagocitose no grupo LP90 (5,5) em relação ao grupo L90 (10,5) (Kruskal-Wallis;  $p<0,05$ ) e pela diminuição na média de leveduras fagocitadas, sendo as medianas de 2,8 e 3,6 para os grupos LP90 e L90, respectivamente (Kruskal-Wallis;  $p<0,05$ ) (Figura 17 A,B,C).



**Figura 17.** (A) Média de leveduras fagocitadas (MLF), (B) percentual de macrófagos envolvidos na fagocitose (%MEF), (C) índice fagocitário (IF). Os macrófagos peritoneais foram coletados de camundongos BALB/c não infectados, tratados com salina (C), pravastatina 30 ou 90 dias (P30 ou P90) e infectados com *L. (L.) amazonensis*, tratados com salina por 30 (L30) ou 90 dias (L90) ou pravastatina 30 ou 90 dias (LP30 ou LP90). Uma suspensão contendo  $2 \times 10^5$  células de cada camundongo foi incubada com  $4 \times 10^6$  *S. cerevisiae* / escavação, em placa de microcultivo de 24 escavações. Não houve diferença no IF, MLF e na %MEF entre os grupos L30 e C e L30 e LP30. Há aumento do IF e MLF entre o grupo L90 e C. No grupo tratado com pravastatina houve aumento do IF, da MLF e da %MEF entre os grupos P30 e C entre os grupos infectados ocorre redução do IF, da MLF e da %MEF entre L90 e LP90. Estão representadas as medianas, quartis, valores máximos e mínimos.

## **B. FAGOCITOSE POR RECEPTORES PARA O COMPLEMENTO E PORÇÃO Fc DE IMUNOGLOBULINAS (IgG)**

Para avaliar a influência da infecção pela leishmânia sobre a função fagocitária foram comparados os grupos controle e após 30 ou 90 dias da infecção. Quando avaliados pelos receptores para opsoninas, não houve diferença entre os índices fagocitários dos grupos infectados pela leishmânia e tratados com salina após 30 dias, sendo 68,3 a mediana do grupo leishmania (L30) e 66,5 a mediana para o grupo controle (C); (Kruskal-Wallis;  $p > 0,05$ ); o mesmo ocorreu para a proporção de macrófagos envolvidos na fagocitose (controle normal (C) de 23,5 e leishmânia/salina (L30) de 22,5 (ANOVA;  $p > 0,05$ ) e para a média de leveduras fagocitadas (controle normal (C) de 2,9 e leishmânia/salina (L30) de 3,1 (Kruskal-Wallis;  $p > 0,05$ ).

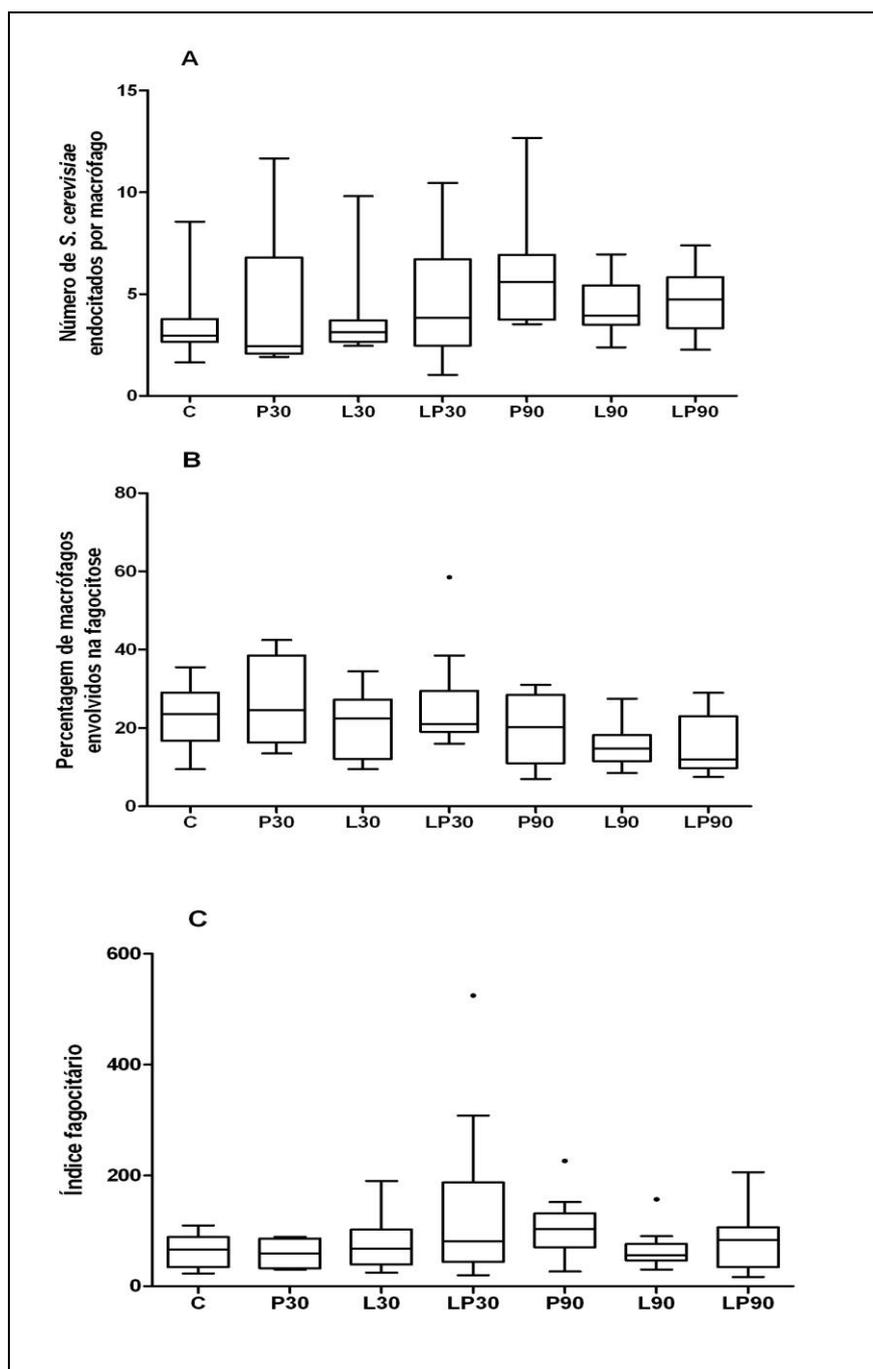
Para os animais com leishmaniose tratados por 90 dias, observamos que não houve aumento do IF do grupo L90 (55,8) em relação ao grupo controle C (66,5) e em relação ao grupo L30, embora tenha ocorrido aumento do número de partículas ingeridas (4,0 para L90, 2,9 para o controle e 3,1 para L30; Kruskal-Wallis  $p < 0,05$ ), houve diminuição na proporção de células envolvidas na fagocitose (14,8 para L90, 23,5 para controle e 22,5 para L30; ANOVA  $p < 0,05$ ).

Para avaliar a influência da pravastatina sobre a capacidade fagocitária foram comparados os animais normais do grupo controle tratado com salina e os animais normais tratados por 30 ou 90 dias com a pravastatina. A pravastatina não alterou os parâmetros do grupo controle (P30) de 30 dias em relação ao controle/salina (C), quanto ao índice fagocitário quanto à proporção de macrófagos envolvidos na fagocitose e média de leveduras fagocitadas (ANOVA;  $p > 0,05$ ). No entanto, para os grupos tratados por 90 dias observou-se aumento significativo no índice fagocitário no grupo pravastatina (P90) (103,5) em relação ao grupo salina (C)

(66,5) (ANOVA;  $p < 0,05$ ); isto foi devido ao aumento da média de leveduras fagocitadas no grupo pravastatina (P90) (5,6) em relação ao grupo salina (C) (2,9) (Kruskal-Wallis;  $p < 0,05$ ), pois não houve diferença na proporção de células envolvidas na fagocitose (ANOVA;  $p > 0,05$ ) (Figura 18 A,B e C).

O tempo de administração de pravastatina afetou o índice fagocitário, com 90 dias este foi significativamente maior (P90) (103,5) em relação a 30 dias (P30) (59,5) (ANOVA;  $p < 0,05$ ); isto ocorreu pelo aumento da média de leveduras fagocitadas, de 2,4 com 30 dias para 5,6 com 90 dias (Kruskal=Wallis;  $p < 0,05$ ), conquanto a proporção de células envolvidas na fagocitose foi semelhante para 30 ou 90 dias (ANOVA;  $p > 0,05$ ) (Figura 18 A,B,C).

O tratamento com pravastatina por trinta ou noventa dias dos animais infectados não influenciou a capacidade fagocitária dos macrófagos quando comparados com animais infectados tratados com salina (Kruskal-Wallis;  $p > 0,05$ ) (Figura 18 A,B,C)



**Figura 18.** (A) Média de leveduras fagocitadas (MLF), (B) percentagem de macrófagos envolvidos na fagocitose (%MEF), (C) Índice fagocitário (IF); macrófagos coletados dos camundongos BALB/c não infectados, tratados com salina (C), pravastatina 30 ou 90 dias (P30 ou P90) e infectados com *L. (L.) amazonensis*, tratados com salina 30 ou 90 dias (L30 ou L90), pravastatina 30 ou 90 dias (LP30 ou LP90). Uma suspensão contendo  $2 \times 10^5$  células de cada camundongo foi incubada com  $4 \times 10^6$  *S. cerevisiae* / escavação, em placa de microcultivo de 24 escavações. Aos 30 dias não houve diferença no IF, MLF e % MEF entre os grupos L30 e C; (  $p > 0,05$ ); P30 e C; L30 e LP30. Aos 90 dias a MLF está aumentada no grupo L90 e no grupo P90 em relação ao grupo C. A %MEF está diminuída no grupo L90 em relação ao grupo C; não se altera em relação aos grupos P90. Estão representados as medianas, quartis, valores máximos e mínimos e pontos extremos. Os valores *outliers* estão marcados.

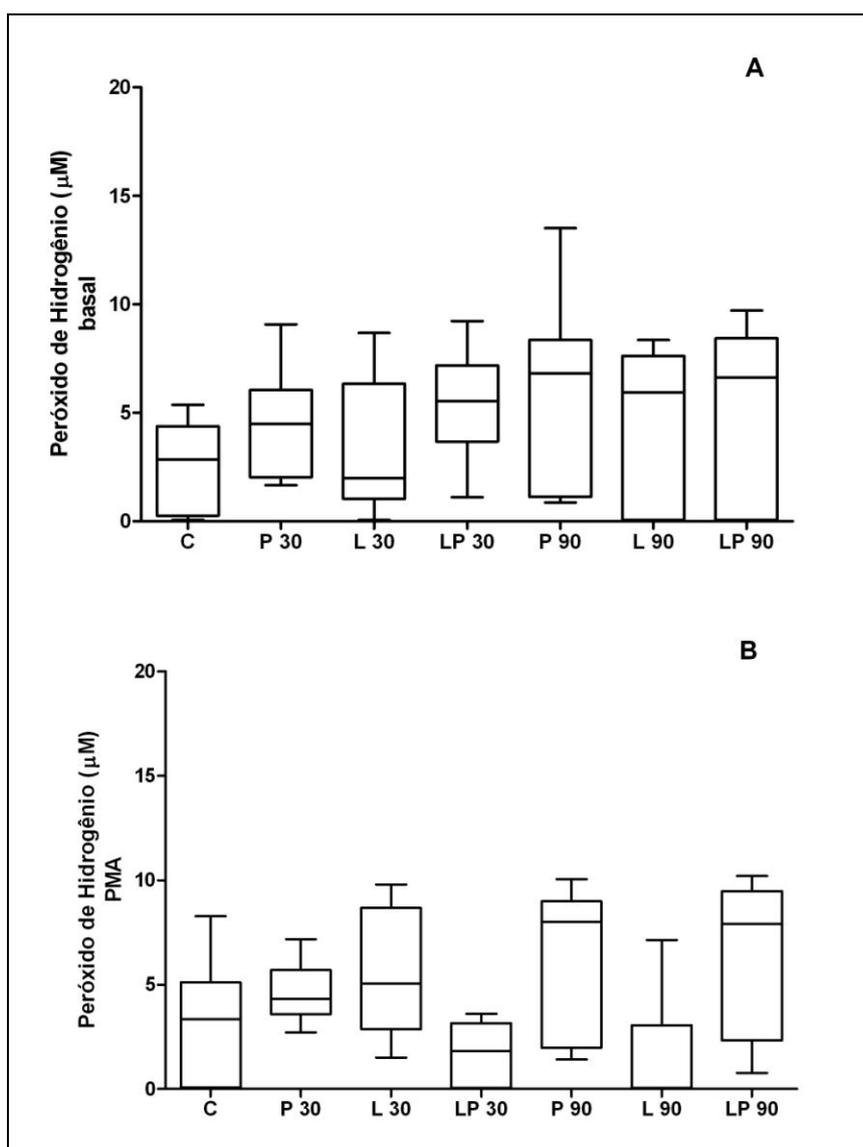
### 3.1.2. PRODUÇÃO DE PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO

A infecção pela leishmânia diminuiu a produção de peróxido de hidrogênio estimulada com PMA após 90 dias e o tratamento com a pravastatina aumentou a produção deste radical de oxigênio (Figura 19A, B).

A administração de pravastatina aos animais não infectados por 90 dias aumentou a mediana da produção de peróxido de hidrogênio, basal ou estimulada por PMA. A produção basal passou de 2,8  $\mu\text{M}$  no controle normal para 6,8  $\mu\text{M}$  no grupo tratado (Kruskal-Wallis;  $p=0,024$ ), enquanto a estimulada passou de 3,4  $\mu\text{M}$  no controle normal para 8,0  $\mu\text{M}$  no grupo tratado (Kruskal-Wallis;  $p=0,028$ ).

Após 90 dias de tratamento com salina dos animais infectados (L90) observamos diminuição da mediana da produção de peróxido de hidrogênio (0,06  $\mu\text{M}$ ), na presença de estímulo com PMA em comparação aos animais infectados após 30 dias (L30) (5,1  $\mu\text{M}$ ) de tratamento com salina (Kruskal-Wallis;  $p=0,041$ ) (Figura 19 B); a produção basal não foi afetada nesses grupos (Kruskal-Wallis;  $p>0,05$ ).

Observamos que a produção de peróxido de hidrogênio estimulada com PMA dos animais infectados tratados com pravastatina por 30 dias, LP30 (3,1), foi menor que no grupo sem tratamento, L30 (4,7) (Kruskal-Wallis;  $p<0,05$ ). Resultado oposto foi encontrado para os grupos de 90 dias (Figura 19).



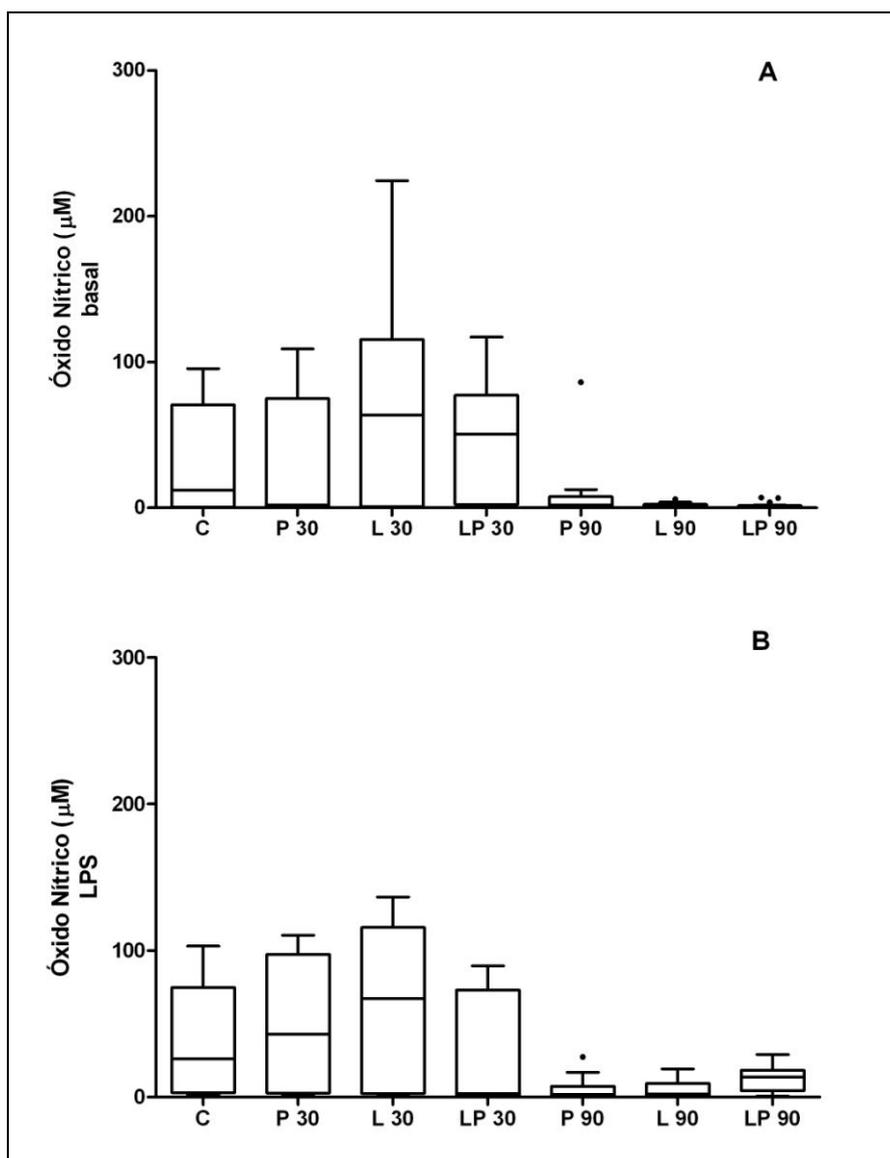
**Figura 19.** Produção basal (A) ou estimulada com PMA (B) de peróxido de hidrogênio por macrófagos peritoneais. As células foram coletadas de camundongos BALB/c não infectados, tratados com salina (C) ou pravastatina (P) e infectados com *L. (L.) amazonensis*, tratados com salina (L) ou pravastatina (LP); o tratamento foi por 30 ou 90 dias. Os resultados indicaram que: 1) a produção de  $\text{H}_2\text{O}_2$  por macrófagos estimulados obtidos de animais não infectados foi maior no grupo tratado com pravastatina por 90 dias quando comparado ao controle (Kruskal-Wallis;  $p=0,028$ ), o mesmo foi obtido para a produção basal (Kruskal-Wallis;  $p=0,024$ ); 2) a infecção por 90 dias reduziu a produção de  $\text{H}_2\text{O}_2$  por macrófagos estimulados quando comparado a 30 dias (Kruskal-Wallis;  $p=0,041$ ); 3) a produção de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , por macrófagos estimulados, foi maior no grupo pravastatina de 90 dias quando comparado ao controle infectado também de 90 dias, (Kruskal-Wallis;  $p=0,017$ ). Estão representados as medianas, quartis inferiores e superiores e valores máximos e mínimos.

### 3.1.3. PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO

A produção de óxido nítrico pelos macrófagos peritoneais foi afetada tanto pela pravastatina como pela infecção pela leishmânia (Figura 20 A,B).

Após 90 dias de acompanhamento observamos uma menor produção de óxido nítrico tanto basal como estimulado pelo LPS, tanto pelos animais não infectados e tratados com pravastatina, como também pelos animais infectados tratados ou não com a pravastatina em comparação com o acompanhamento por 30 dias (Kruskal-Walis;  $p < 0,05$ ).

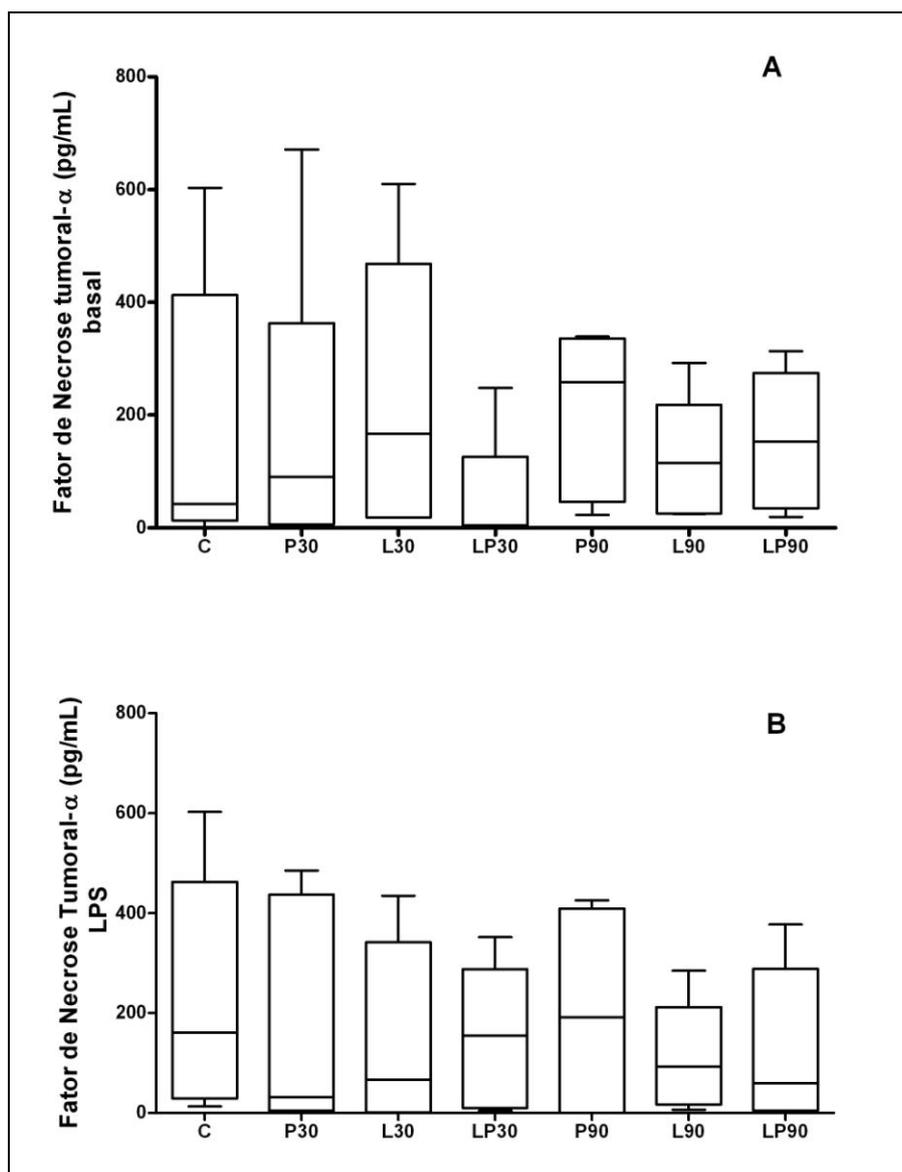
O tratamento com pravastatina por noventa dias dos animais infectados (LP90) foi capaz de aumentar a produção estimulada do óxido nítrico (10,9) em relação ao grupo infectado acompanhado por noventa dias tratado com salina (L90) (2,4) (Kruskal-Walis;  $p < 0,05$ ).



**Figura 20.** Produção basal (A) ou estimulada pelo LPS (B) de óxido nítrico pelos macrófagos peritoneais. As células foram coletadas de camundongos BALB/c não infectados, tratados com salina (C) ou pravastatina (P), e infectados com *L. (L.) amazonensis*, tratados com salina (L) ou pravastatina (LP). Os animais foram tratados por 30 dias ou 90 dias. Os resultados, analisados pelo teste de Kruskal-Wallis seguido pelo método de Dunn para as múltiplas comparações, mostraram que: 1) a pravastatina reduziu a produção de NO, por macrófagos estimulados obtidos do grupo controle de 90 dias (P90), em relação ao de 30 dias (P30) e em relação ao controle normal (C) (Kruskal-Wallis;  $p=0,007$ ); 2) a produção basal de NO por macrófagos obtidos de animais infectados por 30 dias (L30) é maior que o controle normal (C) e que o controle infectado por 90 dias (Kruskal-Wallis;  $p=0,029$ ); 3) a produção estimulada de NO por macrófagos obtidos de animais infectados por 90 dias (L90) é menor que o controle infectado por 30 dias (Kruskal-Wallis;  $p=0,001$ ); 4) o tratamento de animais infectados por 90 dias com pravastatina (LP90) reduziu a produção de NO por macrófagos estimulados, em relação ao controle (Kruskal-Wallis;  $p<0,001$ ). Estão representados por medianas, quartis inferiores e superiores, valores máximos e mínimos. Os pontos *outliers* estão marcados.

#### **3.1.4. PRODUÇÃO DE FATOR DE NECROSE TUMORAL ALFA**

A produção de FNT- $\alpha$  pelos animais infectados e tratados com a pravastatina por trinta dias (LP30) (3,9) foi menor do que no grupo infectado e tratado com salina (L30) (166,6). Entretanto no grupo tratado com a droga por 90 dias a produção basal do FNT foi maior do que a do grupo LP30 (Mann-Whitney;  $p=0,016$ ). Nem a infecção pela leishmânia nem o tratamento pela pravastatina influenciaram a produção estimulada com LPS de FNT- $\alpha$  (Mann-Whitney  $p > 0,05$ ) (Figura 21 B).



**Figura 21.** Produção basal (A) e estimulada (B) de fator de necrose tumoral pelos macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c. Controles não infectados tratados com salina (C) ou pravastatina (P) e infectados com *L. (L.) amazonensis*, tratados com salina (L) ou pravastatina (LP). Os animais foram tratados por 30 dias ou 90 dias. Os resultados, representados por medianas, quartis inferiores e superiores, valores máximos e mínimos, mostraram que: 1) não houve diferenças nos grupos P30, P90, L30 e L90 em relação ao controle para produção basal ou estimulada de FNT (Kruskal-Wallis;  $p > 0,05$ ); 2) o tratamento de animais infectados com pravastatina reduziu a mediana da produção basal de FNT após 30 dias de tratamento, em relação aos animais tratados com salina (Mann-Whitney;  $p = 0,016$ ), no entanto, o tratamento com pravastatina por 90 dias retornou a produção de FNT aos mesmos níveis do controle infectado (Mann-Whitney;  $p = 0,049$ ).

**DISCUSSÃO**

No presente estudo pretendeu-se avaliar o impacto da pravastatina, uma droga imunomoduladora, sobre a infecção por um protozoário bem adaptado às barreiras de defesa inatas. Optou-se pelo estudo com a *L. (L.) amazonensis* em função de seu manuseio mais fácil em infecções experimentais (20 a 30 dias para surgimento das lesões comparados aos 120 dias para a *L. (V.) braziliensis* (Silveira et al. 1990). Também, Afonso & Scott (1993) reconheceram certa semelhança na evolução das lesões pela *L. (L.) amazonensis* no camundongo C57B/10 com a forma cutânea humana de leishmaniose e sugeriram este modelo como sendo adequado para estudar formas crônicas da leishmaniose cutânea humana (Afonso & Scott 1993).

As estatinas apresentam variações farmacodinâmicas em função de sua formulação química podendo variar em potência, ações clínicas e em toxicidade (Fonseca 2005; Schachter 2005). No presente estudo optou-se pela pravastatina por ser uma droga que não sofre biotransformação sendo excretada em sua forma ativa, com amplo uso clínico, apresentando toxicidade mais baixa em relação às estatinas sintéticas. Foi considerado também o fato de ser hidrossolúvel tornando mais fácil a sua diluição e administração por via oral (Schachter 2005).

A curva de sobrevivência é um modo de observar a eficácia de uma intervenção e o efeito em longo prazo de um determinado tratamento. Objetivou-se, no presente trabalho, verificar se a pravastatina interfere na evolução natural de uma doença crônica em três modelos animais distintos, os quais foram acompanhados até o óbito. A utilização de modelos animais para leishmaniose nem sempre é fácil e pode sofrer influência de muitas variáveis que alteram a

curva de sobrevida. Pode-se citar entre estas variáveis, o modelo animal, a espécie de leishmânia, o estágio morfológico em que se encontra a leishmânia, o local de inoculação, a concentração e viabilidade do inóculo e a forma de preservação da leishmânia em laboratório (Cuba 2000; Garg & Dube 2006).

No presente trabalho algumas precauções foram tomadas para assegurar um modelo experimental de infecção mais homogêneo: somente foram utilizadas para inoculações culturas de leishmânias após atingirem fase estacionária de crescimento, com predomínio de formas metacíclicas, verificados pela microscopia óptica, pois tem sido observado ser esta a forma infectante mais adequada para infecção experimental (Almeida et al. 2003). A virulência da cepa foi assegurada pela passagem periódica do inóculo em animais, seguido da sua recuperação por punção, pois tem sido observado que a criopreservação das leishmânias diminui sua virulência gradativamente, e que a recuperação da virulência é obtida pela passagem e recuperação *in vivo*, em animal (Cuba 2000). Ainda a opção pelo estudo com macrófagos assegura uma maior probabilidade de infecção, pois de acordo com Maia et al. (2007), os macrófagos peritoneais de camundongos estão entre as células com maior susceptibilidade para infecção.

### **Efeito da pravastatina na sobrevida nos modelos estudados**

A curva de mortalidade nos três modelos animais mostrou diferenças para cada um dos modelos. A pravastatina na dose de 20 mg/Kg/dia alterou a taxa de mortalidade em fêmeas BALB/c, prolongando a sobrevida destes animais em até oito semanas. Resultados diferentes foram observados para os hamsters e para os camundongos C57BL/6; nesses modelos não houve diferenças na sobrevida

entre os grupos infectados tratados ou não. Embora nossos dados permitam reportar apenas resultados descritivos, esses se revestem de importância em função do grande número de pessoas que utilizam estas drogas de forma crônica e em risco de adquirir leishmaniose tegumentar. Podemos estabelecer algumas hipóteses para tentar explicar estes achados à luz de estudos sobre mecanismos de ação das estatinas.

### **Ação da pravastatina na curva de sobrevivência do BALB/c**

A pravastatina aumentou a sobrevivência dos camundongos BALB/c. Este aumento poderia ter ocorrido ou pela diminuição da virulência da leishmânia ou pelo aumento da defesa do hospedeiro. Uma possibilidade seria uma redução do número de parasitas infectantes circulantes ou de uma redução da resposta inflamatória, que diminuiria a morbidade da doença favorecendo um curso mais crônico e benigno. Colaborando com a hipótese de uma ação microbicida da pravastatina, alguns autores têm observado que as estatinas são tóxicas para outros tripanosomídeos: A lovastatina inibiu o crescimento e a biossíntese de esteróis do *T. cruzi* (Florin-Christensen et al. 1990). O crescimento do *T. brucei* é inibido em cultura de forma dose dependente, por inibidores da HMG-CoA reductase (Coppens et al. 1995). Uma observação interessante é que a pravastatina potencialmente pode interferir no metabolismo da leishmânia, uma vez que bloqueia enzimas da cadeia da síntese de lipídios e do colesterol (HMG-CoA), etapas fundamentais no metabolismo de protozoários e de helmintos. Chen et al. (1990) demonstraram que a HMG-CoA é uma enzima importante para a sobrevivência do *Schistosoma* e o uso de inibidores desta enzima leva à redução

progressiva da mobilidade do helminto, seguido de elevação de lactato e morte (Chen et al. 1990). No entanto, nossos dados não permitem confirmar esta hipótese, uma vez que o teste com MTT demonstrou que nas doses utilizadas para tratamento dos animais a pravastatina não tem ação leishmanicida para formas promastigotas. Mas não se pode excluir a hipótese de uma toxicidade direta da pravastatina sobre formas amastigotas. No hospedeiro, a ação do complemento, de anticorpos anti-leishmânia e um ambiente desfavorável no interior do fagócito, normalmente ácido e rico em compostos reativos de oxigênio, poderiam potencializar os efeitos tóxicos da pravastatina sobre amastigotas ou promastigotas. Falam contra estas hipóteses de toxicidade o fato de que camundongos C57BL/6 e hamster não modificaram a curva de sobrevivência após o uso da pravastatina, no entanto, tais modelos poderiam ter respondido de modo diferente por suas particularidades genéticas com um padrão diferente de resposta imune.

Uma segunda hipótese para explicar o aumento da sobrevivência dos camundongos BALB/c pode estar ligada ao próprio efeito da diminuição do colesterol. A principal indicação terapêutica do uso das estatinas é para redução dos níveis séricos de colesterol. As estatinas atuam sobre os hepatócitos por inibição competitiva da HMG-CoA redutase promovendo uma redução da síntese do colesterol e aumento da expressão de receptores LDL na superfície do hepatócito, aumentando a extração do LDL-c do sangue (Schachter 2005). Reduzem também a síntese de apolipoproteína B100 e a síntese e secreção de lipoproteínas ricas em triglicerídeos, enquanto aumentam a concentração do HDL-c e diminuem a concentração de triglicerídeos (Schachter 2005). As leishmânias

não sintetizam o colesterol, mas sim, esteróis quimicamente semelhantes ao dos fungos que diferem do colesterol pela presença de grupamentos metilas (Montalvetti et al. 2000). O colesterol é importante no crescimento e na virulência da leishmânia, sendo necessário para uma eficiente fixação e interiorização da leishmânia no macrófago (Pucadyl, 2004; Bansal et al. 2005). Inibidores da biosíntese de esteróis, tais como o miconazol e o cetoconazol, têm sido utilizados na terapêutica contra a leishmaniose, sendo considerados agentes anti-proliferativos eficazes (Montalvetti et al. 2000). A associação de estatinas com estes inibidores tem efeito sinérgico potencializando a inibição da proliferação de promastigotas, da infecção de macrófagos e do número de amastigotas (Haughan et al. 1992; Montalvetti et al. 2000).

As alterações no colesterol sérico causam modificações na expressão de lipídios na superfície das membranas celulares (Bodnár et al. 1996; Dabrowski et al. 1980). Uma possibilidade a ser considerada é se variações na quantidade e composição do colesterol na superfície do macrófago poderiam alterar a relação macrófago-leishmânia. Nossos dados mostraram que a pravastatina não influenciou a capacidade fagocitária de macrófagos quando a fagocitose foi avaliada pelos receptores para padrões moleculares de patógenos em animais infectados e tratados com pravastatina até o trigésimo dia em relação aos animais infectados e tratados com salina. Porém, após noventa dias de uso da pravastatina houve redução do índice fagocitário pelos receptores para padrões moleculares de patógenos, em relação ao grupo infectado e tratado com salina, por diminuição da proporção de macrófagos envolvidos na fagocitose e pela diminuição da média de leveduras fagocitadas no grupo leishmânia/pravastatina.

De forma que o uso prolongado da pravastatina parece dificultar a infecção do macrófago por meio de receptores para padrões moleculares de patógenos, o que poderia aumentar a chance de destruição dos parasitos pelos mecanismos de defesa extracelulares.

Outra hipótese para o aumento da sobrevivência observado para os camundongos BALB/c é o fato que as estatinas são drogas imunomoduladoras, podendo ter influenciado os mecanismos de defesa antiparasitária do hospedeiro (Liao, 2002; Chow, 2009). O camundongo BALB/c é pouco resistente à leishmaniose, tendo sido demonstrado que na infecção pela *L. major* a resposta tipo Th2 parece favorecer a disseminação e maior gravidade da doença. As estatinas induzem a fosforilação da via STAT6, promovendo aumento de citocinas tipo Th2 (IL-4, IL-5 e IL-10) bem como de fator transformador de crescimento- $\beta$  (TGF- $\beta$ ), ao mesmo tempo em que inibem a fosforilação da STAT-4, reduzindo a secreção de citocinas tipo Th1 (IL-2, IL-12, IFN- $\gamma$  e do TNF- $\alpha$ ) (Youssef et al. 2002). Em relação ao camundongo BALB/c, o resultado esperado seria um aumento da resposta Th2 com consequente agravamento da doença (Alexander & Bryson 2005) em função do aumento tanto da IL-4 (Chow 2009) como do TGF- $\beta$  (Barral et al. 1995; Pinheiro et al. 2004; Pinheiro et al. 2005), levando a uma menor secreção IL-12, de interferon- $\gamma$  e de TNF- $\alpha$ , com consequente subativação da iNOS. Porém, a literatura tem registrado que na infecção pela *L. (L.) amazonensis*, camundongos BALB/c não apresentam um fenótipo de resposta Th2 clássico, ocorrendo de fato uma diminuição da ativação das células Th1 (Vasquez & Soong, 2006), devido uma sub-regulação de cadeia  $\beta$ 2 de receptores para a IL-12 por via independente da IL-4 (Jones et al. 2000; Vasquez & Soong

2006), deixando estas células refratárias tanto a estímulos intrínsecos como exógenos. Em especial, parece haver uma menor produção de óxido nítrico após estímulo pelo Interferon- $\gamma$  e pelo fator de necrose tumoral- $\alpha$  (Jones et al. 2000; Vasquez & Soong 2006). Não está claro, portanto, de que forma a pravastatina aumentou a sobrevivência destes animais e somente a hipótese de uma modulação entre respostas Ta1 e Ta2 não permite uma explicação completa (Afonso & Scott 1993). É possível que este efeito protetor da pravastatina seja resultado de sua atuação simultânea sobre várias células do sistema imunitário que, em conjunto permitiu uma modulação mais favorável da resposta imunológica. Nesta linha de pensamento devemos considerar a influência das estatinas na resposta humoral e na interação intercelular, uma vez que estudos mostram que estatinas inibem marcadores de superfície de células T, células B, células dendríticas e monócitos, entre as quais: CD3, CD4, CD8, CD28, CD19, CD40, CD80, CD 86, CD11b, CD11c, CD14, CD83, CD54, CD45 (Kuipers et al. 2005). Também há relatos de inibição das células B pela pravastatina (Rudich et al. 1998).

As células B desempenham um papel significativo na infecção pela *L. (L.) amazonensis*, atuando na estimulação das células CD4<sup>+</sup> e intensificando a ação de células CD4<sup>+</sup> mediadas por células B (Wanasen et al. 2008). Camundongos deficientes em células B infectados pela *L. (L.) amazonensis* apresentaram retardo no desenvolvimento da lesão apesar de apresentarem a mesma carga parasitária de camundongos selvagens (Wanasen et al. 2008). Também, a deleção de células B ou ausência de produção de anticorpos altera as respostas das células T mediadas no sítio da infecção, bem como as respostas T CD4<sup>+</sup>

(Wanassen et al. 2008; Buxbaum 2008). Além deste efeito sobre os linfócitos, as estatinas também inibem a expressão de moléculas do MHC I e II (Kuipers et al. 2005; Chow, 2009), diminuindo a intensidade da reação inflamatória, uma vez que bloqueiam a indução de INF- $\gamma$  pela expressão do transativador MHC classe II (CIITA) (Chow, 2009). Segundo Grip et al. (2000), a pravastatina é capaz de inibir a explosão oxidativa em monócitos ativados o que previne danos tissulares por espécies reativas de oxigênio.

Além disso, apesar das estatinas favorecerem uma resposta Ta2 e apresentarem algum efeito anti-inflamatório, estas drogas apresentam paralelamente, algum efeito pró-inflamatório, estimulando a produção de INF- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , IL-18, pelos monócitos de sangue periférico, bem como IL-6, IL-12 pelas células dendríticas (Montero et al. 2000) e FNT- $\alpha$  pelos-macrófagos (Monick et al. 2003), fortalecendo a resposta Ta1. O resultado seria um equilíbrio ou modulação da resposta imunológica, e no caso específico da leishmaniose estes fatores combinados poderiam contribuir aumentando a liberação de óxido nítrico induzido pela INF- $\gamma$ , favorecendo a eliminação do parasito (Mauël et al. 1991; Green et al. 1991). É provável que todos estes elementos em conjunto modularam favoravelmente a resposta inflamatória minimizando os danos tissulares e permitindo uma maior sobrevida dos animais.

### **Ação da pravastatina na curva de sobrevida do C57BL/6 e do hamster**

A pravastatina não modificou a curva de sobrevida do camundongo C57BL/6 ou do hamster sírio na infecção pela *L. (L.) amazonensis*, o que sugere um padrão de resposta imunológico espécie específica e ou uma

imunomodulação insuficiente. Apesar de ser um animal muito utilizado como método diagnóstico, temos poucos estudos sobre a imunologia da infecção leishmaniótica no hamster. O hamster sírio é um animal particularmente sensível a leishmaniose, mas diferente dos camundongos, apresenta uma interação com o parasito muito complexa e não desenvolve uma resposta imune celular bem definida, isto ocasiona a disseminação da doença que leva o animal ao óbito em poucos meses (Cuba 2000). Aparentemente, a pravastatina não interferiu no curso natural da doença no hamster, tendo este cursado com a forma sistêmica da doença.

Camundongos isogênicos da linhagem C57BL/6 são susceptíveis, embora menos que os camundongos BALB/c, à infecção pela *L. (L.) amazonensis*, ao contrário do descrito para *L. major*. Esses camundongos fazem uma forte resposta Ta1 que é traduzida por um aumento na concentração de citocinas pró-inflamatórias e facilita maior controle da lesão e posterior cura clínica (Müller et al. 1989; Ribeiro de Jesus et al. 1998; Noben-Trauth 2000). Animais infectados com *L. (L.) amazonensis* não são capazes de montar uma resposta Ta1-Ta2 eficaz (Ji et al. 2003; Maioli et al. 2004). A maior susceptibilidade do camundongo C57BL/6 à infecção pela *L. (L.) amazonensis* é devido a menor produção de INF- $\gamma$  e de FNT- $\alpha$  (Maioli et al. 2004), porém, da mesma forma que no BALB/c, não ocorre um desvio para resposta Ta2, uma vez que não se detecta elevação nos níveis de IL-4 (Maioli et al. 2004). Segundo Jones et al. (2000), o desenvolvimento da resposta Ta1 depende da presença de IL-12 e da habilidade de resposta destas células em expressar receptores funcionais para IL-12. Camundongos C57BL/6 infectados com *L. (L.) amazonensis* apresentam níveis menores de IL-12 em

relação aos camundongos infectados com *L. (V.) major* e, ainda, camundongos da linhagem C57BL/6 deficientes em IL-4 apresentaram reduzida expressão da subunidade  $\beta 2$  do receptor da IL-12 (Jones et al. 2000). Como a pravastatina aparentemente induz maior resposta Ta2 pelo aumento da IL-4 esperaríamos uma diminuição maior na expressão de IL-12, porém esta diminuição exerceria pouca influência clínica, uma vez que a estimulação para liberação de óxido nítrico já está prejudicada pela inibição do IL-12R pela leishmânia (Jones et al. 2000; Ji et al. 2003; Maioli et al. 2004). A susceptibilidade dos camundongos C57BL/6 à *L. (L.) amazonensis* ocorre em função da incapacidade de montar uma resposta Ta1 eficaz (Jones et al. 2000), não tendo a pravastatina nas doses utilizadas, exercido nenhuma influência na sobrevivência dos animais.

### **Ação da pravastatina sobre a evolução do peso**

Outra variável clínica importante na leishmaniose é a avaliação da variação do peso, uma vez que na forma sistêmica da doença ocorre uma perda ponderal progressiva e significativa (Ministério Saúde 2007). Alterações do peso também podem ser utilizadas como um parâmetro de toxicidade das estatinas. Verificou-se diminuição do peso nos modelos C57BL/6 e hamster infectados em relação aos controles não infectados somente nas últimas semanas de observação. Porém, não se observou variação de peso ao se comparar os grupos infectados nos três modelos. Estudos com estatinas mostram que esta tem pouca influência em ganho ou perda ponderal apesar de ser potencialmente miotóxica e interferir no metabolismo dos lipídios (Lobato et al. 2002; Dias-Zagoya et al. 1999). Perda de peso dos animais foi observada somente nas últimas semanas do seguimento,

quando apresentavam rápido emagrecimento e com máximo de duas semanas evoluíam para óbito.

Cabe também ressaltar que os animais normais (não infectados) tratados com pravastatina não apresentaram evidência clínica de toxicidade ao longo de todo período de tratamento, permanecendo ativos e com aspecto saudável. As estatinas apresentam baixa toxicidade, exceção para algumas reações graves, como miotoxicidade e rabdomiólise, podendo inclusive levar ao óbito (Bellosta et al. 2004). No entanto variam em toxicidade dependendo de sua classe ou do modelo animal. Hamsters tratados com sinvastatina na dose de 10 mg/kg/dia evoluíram com anorexia, perda de peso e óbito, sendo constatada alterações hepatotóxicas e nefrotóxicas (Oms et al. 1995). O tratamento de camundongos com a sinvastatina e a fluvastatina pode cursar com moderada perda de peso corporal e aumento da relação peso do fígado/peso corporal (Dias-Zagoya- 1999).

### **Ação da pravastatina sobre as lesões cutâneas**

A LTA se manifesta por lesões cutâneas e mucosas pleomórficas, inicialmente surgem como uma pápula no local da picada que aumenta de forma insidiosa tornando-se eventualmente nodular ou vegetante ou ulcera-se desde sua fase inicial (Grimaldi Jr 1982). As lesões podem se disseminar e adquirir caráter difuso ou permanecerem únicas e localizadas (Grimaldi Jr 1982). No presente estudo os animais foram acompanhados semanalmente por registro das medidas das patas traseiras. Conforme esperado não houve surgimento de lesões cutâneas no hamster que cursam mais frequentemente com forma disseminada. Ambos os modelos de camundongos cursaram com tumoração

seguido de ulceração nos locais de inoculação tanto nos grupos tratados com pravastatina como com salina. As lesões foram menores e mais tardias no grupo tratado com pravastatina. Para o BALB/c já ocorreu maior aumento da pata a partir da 14ª semana, porém para os camundongos C57BL/6 esta diferença só foi perceptível a partir da 20ª semana. O grupo de camundongos C57BL/6 apresentou aumento do diâmetro da pata a partir da sexta semana de infecção, muito mais precoce que o BALB/C, no qual só se observou aumento do diâmetro da pata após a 10ª semana de evolução, o que é comparável a outros trabalhos experimentais (Belkaid et al. 2000; Felizardo et al. 2007). Tem sido sugerido que alterações no padrão de citocinas modificam o prognóstico e a evolução destas lesões, em especial a concentração de FNT- $\alpha$ , INF- $\gamma$ , IL-1 e IL-12 (Castellano et al. 2009; Alexander & Bryson 2005). Nossas observações mostraram que nos camundongos BALB/c ocorreu uma redução na produção basal de fator de necrose tumoral alfa por macrófagos de animais infectados após trinta dias de tratamento com a pravastatina. Porém, após 90 dias de tratamento não houve diferença na produção de fator de necrose tumoral alfa em relação ao controle não infectado. Também não houve aumento da produção de óxido nítrico pelos macrófagos de camundongos BALB/c após trinta dias de tratamento com a pravastatina, entretanto houve uma acentuada redução da produção de óxido nítrico após 90 dias. De forma que temos uma resposta mais próxima do padrão Ta2, o que poderia justificar o aparecimento de lesões menores por uma resposta celular menos vigorosa.

Em função deste maior efeito Ta2 poderia se esperar que ocorresse um agravamento na resposta clínica nos camundongos C57BL/6, a exemplo de

Ferraz (2008), que observou que a atorvastatina favoreceu a *Leishmania major* em camundongos C57BL/6, tornando o hospedeiro mais permissivo ao microorganismo (Ferraz 2008). No entanto, a evolução do quadro clínico apresentado sugere que não houve inibição da resposta Ta1, pois houve aparecimento de lesões nodulares e uma forte resposta localizada, embora esta resposta não tenha favorecido a cura, pelo contrário, com 40 semanas a maioria dos animais havia evoluído para óbito nos dois grupos infectados. A literatura descreve os camundongos C57BL/6 como uma linhagem resistente à infecção pela *L. major* (Belkaid et al. 2000), porém esta resistência é relativa, quando da infecção pela *L. (L.) amazonensis*, pois apesar de apresentarem uma resposta do tipo Ta1, nem sempre ocorre controle da infecção (Felizardo et al. 2007).

Em modelos murinos as lesões da leishmaniose cutânea localizada são consequência da intensidade da resposta inflamatória, sobretudo da capacidade de montar uma resposta Ta1 eficaz (Da-Cruz et al. 1996; Castellano et al. 2009). Uma possível explicação para a pravastatina reduzir e retardar as lesões pode estar relacionada às propriedades antiinflamatórias das estatinas. Tem sido relatado que as estatinas promovem inibição da ativação e proliferação de células T (Ghittoni et al. 2007), inibição da indução da expressão do MHC-II pelo interferon- $\gamma$  (Kwak et al. 2000), modulação e/ou modificações da resposta Ta1 (Montero et al. 2000; Youssef et al. 2002). De forma que uma redução da intensidade inflamatória pode ser decorrente da ação direta da droga sobre estes mecanismos imunes, diminuindo a intensidade da resposta local para a leishmânia e a imunopatogenia da lesão. Tem sido mostrado que mudanças no processo de ativação da resposta Ta1 e/ou sua intensidade influenciam a

morfologia das lesões (Barral-Netto et al. 1995). Estudos com camundongos imunodeficientes mostraram que quando ocorre inibição da resposta Ta1 após a infecção pela *L. (L.) amazonensis* ocorrerá acentuado crescimento do parasito com aparecimento de grandes lesões, mas quando ocorre impedimento a resposta Ta1 antes da infecção pela leishmânia, ocorre crescimento significativo dos parasitos, porém não ocorre aumento da lesão (Barral-Netto et al. 1995). Concluíram os autores que a resposta Ta1 é essencial não somente para o controle do parasito, mas também para controlar a progressão da doença leishmaniose (Barral Netto et al. 1995).

#### **Ação leishmanicida e citotoxicidade da pravastatina**

Os testes *in vitro* foram realizados para verificar uma possível ação microbicida da pravastatina sobre a *Leishmania (L.) amazonensis* e foi avaliada pelo teste do MTT, que se baseia na capacidade dos compostos tetrazólicos formarem cristais de formazan na presença de radicais de oxigênio, detectáveis por meio de espectrofotometria permitindo a sua quantificação (Mosmann 1983). Quando foram incubadas formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis* com concentrações crescentes de pravastatina observou-se diminuição da percentagem de redução do MTT de forma dose dependente quando em concentrações igual ou acima de 4 µg/mL, sugerido uma redução de seu metabolismo e/ou diminuição do número de parasitos (Mosmann 1983; Berg et al. 1994; William et al. 2003). Estes dados sugerem uma possível toxicidade direta da pravastatina sobre as formas promastigotas quando em doses muito elevadas. No entanto, nas doses terapêuticas, a concentração sérica da pravastatina não

ultrapassa 0,50 µg/mL (Bellosta et al. 2004; Jacobison 2004), não sendo portanto microbicida para a *L. (L.) amazonensis* nas concentrações que utilizamos neste trabalho e na dose que a droga é utilizada para o tratamento da hipercolesterolemia. Resultado oposto foi observado para a concentração 2 µg/mL da pravastatina, que aumentou a atividade oxidativa dos parasitos. Como o valor da absorvância depende do grau de ativação celular, esse achado pode ser um indicativo de aumento do metabolismo celular decorrente da fosforilação oxidativa e produção de ATP, que ocorre na matriz mitocondrial e/ou por estimulação da NADPH redutase (Berridge et al. 2005), ou ainda presença de estímulos tróficos para leishmânia e/ou proliferação celular. Porém, este efeito só foi observado nessa concentração desaparecendo nas concentrações mais elevadas da pravastatina. É possível, portanto, que a pravastatina tenha um pequeno efeito estimulador da proliferação das leishmânias em concentrações mais baixas, entretanto, este possível efeito hormético da pravastatina precisa ser mais bem avaliado. Não encontramos estudos semelhantes na literatura.

Os macrófagos ocupam uma posição chave na infecção pela *Leishmania spp*, embora disponham de arsenais e meios para destruição do parasito não conseguem fazê-lo e ainda propicia-lhes meios de crescimento e desenvolvimento. É importante definir o impacto sobre estas células quando da introdução de uma nova medicação. Os compostos tetrazólicos constituem um teste rápido e reprodutível para avaliação da vitalidade celular permitindo inferir indiretamente a toxicidade de uma droga em teste (Williams et al. 2003; Berridge et al. 2005). Ao incubarmos macrófagos peritoneais de camundongos com concentrações crescentes de pravastatina, observou-se que havia aumento do

percentual de redução do MTT nas concentrações de 8 e 16 µg/mL, sugerindo um aumento do estado de ativação celular e possível aumento de atividade mitocondrial. Embora este aumento de atividade celular possa ser benéfico favorecendo a eliminação do parasito, é de pouca importância prática levando em consideração que a concentração sérica máxima da pravastatina está em torno de 0,45 a 0,55 µg/mL (Bellosta et al. 2004) e uma possível ativação mitocondrial ocorreu apenas para concentrações muito mais elevadas da droga. A literatura registra baixa citotoxicidade pela pravastatina comparada a outras estatinas, como a lovastatina e a sinvastatina (Sindermann et al. 2000). De fato, nossos dados mostraram que em doses terapêuticas, a pravastatina mostrou, pelo teste do MTT, baixa evidência de citotoxicidade para o macrófago.

### **Avaliação da fagocitose**

A fagocitose é uma das funções mais importantes dos macrófagos sendo fundamental para o controle das infecções. No entanto, pode ser também um mecanismo de escape da *Leishmania spp.* Dependendo do receptor pelo qual o parasito é fagocitado, pode constituir elemento essencial na infecção, permitindo o escape da resposta imune e a sobrevivência destes parasitos. Vários autores têm chamado a atenção para a capacidade da pravastatina interferir na fagocitose (Muniz-Junqueira et al. 2006; Salman et al. 2008; Benati et al. 2010). Até à presente data não temos conhecimento de outros estudos sobre a ação da pravastatina em fagocitose de macrófagos peritoneais após noventa dias de tratamento. Nosso estudo permitiu verificar que o tratamento in vivo com 20 mg/kg de pravastatina por trinta e noventa dias modifica a resposta fagocitária de

macrófagos peritoneais em camundongos BALB/c não infectados e infectados pela *L. (L.) amazonensis*. Optou-se pelo uso de *Saccharomyces cerevisiae* em função do fungo ser fagocitado tanto por receptores para padrão molecular (*scavengers*) quanto por receptores para complemento quando sensibilizadas com soro fresco rico em complemento. As leveduras adsorvem em sua superfície componentes do sistema do complemento e propicia a fagocitose pelos receptores para opsoninas (Lachmann & Hobart 1978).

### **Efeito da pravastatina na fagocitose**

Nossos dados mostraram que pravastatina isoladamente aumentou a fagocitose, no entanto, a cronologia deste aumento diferiu se a fagocitose ocorreu através de receptores para padrões moleculares de patógenos, tipo *scavenger*, ou através de receptores para os componentes do sistema do complemento. A fagocitose pelos receptores para padrões moleculares de patógenos estava aumentada em macrófagos de camundongos tratados por 30 dias com a pravastatina, porém os índices fagocitários por estes receptores retornaram aos valores de base em macrófagos de animais tratados por 90 dias. Quando a fagocitose foi avaliada pelos receptores para complemento, observou-se que o índice fagocitário aumentou somente para os macrófagos de animais tratados por 90 dias. O aumento da fagocitose pelos receptores para padrões moleculares de patógenos foi devido ao aumento do número de partículas fagocitadas e do número de fagócitos envolvidos na fagocitose, provavelmente como resultado de uma maior expressão de receptores para padrões moleculares de patógenos na superfície da célula. Já o aumento da fagocitose por receptores para

complemento foi devido ao aumento no número de partículas fagocitadas. Estudos prévios da fagocitose por receptores para padrões moleculares de patógenos, receptores para complemento e receptores para a porção Fc da IgG mostraram que as estatinas nas primeiras horas ou dias de tratamento promoveu diminuição (Muniz-Junqueira et al. 2006, Benati et al. 2010) ou não influenciou a fagocitose (Muniz-Junqueira 2006; Salman et al. 2008). No entanto ao avaliar a fagocitose por receptores para padrão moleculares de patógenos depois de três semanas, Djaldetti et al. (2006) observaram um aumento da capacidade fagocitária pelos macrófagos peritoneais de ratos, e ainda, a atorvastatina melhorou a fagocitose de ox-LDL pelo adipócito de coelhos tratados por 2 semanas, possivelmente pelo aumento da expressões de mRNA de CD36, um receptor para padrões moleculares de patógenos (*scavenger*) (Zhao & Zhang 2004).

Embora animais não infectados tenham apresentado aumento da fagocitose pelos receptores para padrões moleculares de patógenos quando tratados com a pravastatina, este aumento foi temporário e retornou ao nível de base após 90 dias de tratamento, quando aumentou a fagocitose por receptores para complemento. As razões para esses efeitos não estão claras. Uma possível explicação é que pravastatina poderia interferir na quimiotaxia dos fagócitos por estimular a produção de quimiocinas, responsáveis por orquestrar a resposta inflamatória vascular. A pravastatina modula a produção de proteínas quimiotáticas para monócito 1 e IL-8, moléculas que estão envolvidas na quimiotaxia (Grip 2000). Uma hipótese alternativa é que o efeito de redução de lipídios pelas estatinas modifica os microdomínios de membrana ricos em

colesterol (*lipid rafts*) que desempenham um papel central na transdução de sinal em células imunes efectoras (Yoshizki et al. 2008). Estes microdomínios funcionam como plataformas para a associação de moléculas de sinalização, estando os microdomínios da membrana lipídica dos fagócitos envolvidos nas respostas imune inatas, incluindo a migração celular, fagocitose e geração de ânions superóxido (Yoshizaki et al. 2008).

### **Efeito da infecção pela leishmania sobre a fagocitose**

Ao analisarmos o efeito da infecção pela leishmânia sobre a função fagocitária dos macrófagos peritoneais, observamos que na ausência de opsoninas a infecção aumentou a capacidade fagocitária dos macrófagos elevando o índice fagocitário e o número de leveduras fagocitadas por macrófago, mas somente após 90 dias. Uma explicação possível para isto seria um aumento na expressão de receptores na membrana dos macrófagos. De fato, mostrou-se que os macrófagos de camundongos CBA/J aumentam a expressão dos receptores para padrões moleculares de patógenos quando infectados pela *Leishmania major* (Gomes et al. 2009), como também fibroblastos aumentam a expressão dos receptores para manose quando incubados com *Leishmania (L.) amazonensis* (Hespanhol et al. 2005). É possível que este mesmo fenômeno possa também ter ocorrido na interação entre *Leishmania (L.) amazonensis* e os macrófagos dos camundongos BALB/c.

O aumento dos níveis de citocinas inflamatórias, como o FNT- $\alpha$ , seria uma possível explicação para o aumento da expressão dos receptores (Montero et al. 2000; Monick et al. 2003; Chow 2009). Nossos dados, porém, não permitiram

confirmar essa hipótese uma vez que não observamos um aumento da produção de FNT- $\alpha$  pelos macrófagos dos animais por nós avaliados, mas sim a recuperação ao nível do controle. Entretanto, um nível aumentado de citocinas inflamatórias em um período precedente à avaliação não pode ser desconsiderado.

Ao se avaliar o efeito da leishmânia sobre os receptores para opsoninas (para complemento) verificou-se que a infecção não alterou o índice fagocitário final, porém, tem alguma influência sobre a fagocitose, uma vez que há aumento do número de partículas ingeridas pelo macrófago simultaneamente com diminuição do número de macrófagos envolvidos na fagocitose. Este fato ocorreu somente após 90 dias e sugere que o parasito estaria aumentando a expressão dos receptores para complemento nos fagócitos ao mesmo tempo em que inibe a atração e ativação de macrófagos (Nylén & Akuffo 2009).

### **Efeito do tratamento pela pravastatina de animais infectados sobre a fagocitose**

Um dos principais objetivos de nosso trabalho foi verificar a influência do tratamento com pravastatina sobre parâmetros da imunidade inata dos animais infectados pela leishmânia. A pravastatina influenciou diferentemente as diferentes funções analisadas havendo diferenças entre macrófagos provenientes de animais infectados com *L. (L.) amazonensis* tratados com salina (grupo leishmânia) e infectados tratados com pravastatina (grupo leishmânia/pravastatina) nos diferentes mecanismos. Para a fagocitose pelos receptores para padrões moleculares de patógenos, a infecção pela leishmânia

induziu um aumento no índice fagocitário, da média de leveduras fagocitadas e do número de macrófagos envolvidos na fagocitose em relação ao controle. O tratamento com pravastatina reverteu este aumento, retornando a capacidade fagocitária para os níveis basais. Isto sugere que em longo prazo a pravastatina reduziu a expressão de receptores na superfície dos macrófagos ao mesmo tempo em que diminuiu a quimiotaxia destes macrófagos. Uma hipótese para explicar este efeito seria a interferência da pravastatina no citoesqueleto do fagócito pela diminuição da síntese de derivados do farnesyl PP pela via do mevalonato, inibida pela ação das estatinas (Chimini e Chavier 2000; Monick et al. 2003). As proteínas Rho exercem importante papel no controle do citoesqueleto, sendo que não ocorrem extensão e fusão dos pseudópodos na ausência destas proteínas, em especial da Cdc42 e Rac1 (Chimini e Chavier 2000). Estas proteínas Rho fazem parte do subgrupo das pequenas proteínas GTPases da superfamília Ras e são responsáveis por regular várias funções celulares incluindo a organização da actina, do contorno celular, a adesão e a mobilidade celular, o tráfico pelas membranas e ainda a expressão gênica (Van Aelst & D'Souza-Schorey 1997; Chimine & Chavier 2000). A RhoA controla a montagem de fibras actínicas de estresse e a adesão focal (Van Aelst & D'Souza-Schorey 1997). A Rac 1 promove a formação dos lamelopódio e a Cdc42 regula a formação do filopódio (Van Aelst & D'Souza-Schorey 1997). A pravastatina sendo uma inibidora do HMG CoA inibe a síntese destas proteínas interferindo, sobretudo, no transporte intracelular destes mediadores, o que poderia justificar uma modificando na fagocitose (Schachter 2005).

A análise da fagocitose pelos receptores para opsoninas mostrou que a infecção pela leishmânia após 90 dias aumentou a média de leveduras fagocitadas por células, porém houve uma diminuição do número de células envolvidas na fagocitose. O resultado foi um índice fagocitário inalterado em relação ao controle não infectado. Uma possível explicação seria uma modulação da formação de quimiocinas diminuindo a mobilização dos macrófagos (Basu & Ray 2005). A pravastatina não modificou esta resposta do grupo leishmânia tanto aos trinta quanto noventa dias de tratamento. Nossos dados reforçam as observações de Torrecilla et al (2009) que não encontraram nenhuma influência após oito semanas de tratamento com pravastatina sobre receptores para complemento em monócitos do sangue periférico humano (Torrecilla et al. 2009), embora o tratamento com lovastatina ou sinvastatina por seis semanas inibiu em monócitos humanos a formação da CD11b, uma integrina componente dos receptores CR3, reduzindo a ação destes receptores (Weber et al. 1997).

### **Ação da pravastatina sobre produção de peróxido de hidrogênio**

O controle da infecção pelos parasitos depende de uma adequada produção pelo fagócito de moléculas microbidas, como os radicais de oxigênio (Witte et Barbul 2002; Mukbel et al. 2007). A pravastatina na dose de 20 mg/kg/dia não alterou a expressão de peróxido de hidrogênio em macrófagos tratados por 30 dias, porém ocorreu aumento significativo da produção desta molécula pelos macrófagos tratados por 90 dias com a droga. Já animais infectados tratados com salina (grupo leishmânia) apresentaram baixa produção de peróxido de hidrogênio. Esta pequena produção de peróxido de hidrogênio

está de acordo com dados na literatura que tem mostrado que a infecção pela leishmânia pode inibir a explosão respiratória pelo macrófago reduzindo a liberação de compostos reativos de oxigênio (Buchmüller-Rouiller & Mauel 1987; Remaley et al. 1985). No entanto, aos trinta dias os animais infectados e tratados com pravastatina retornam aos níveis basais, sugerindo uma reversão dos efeitos produzidos pela leishmânia. Estes dados estão em desacordo com trabalhos anteriores que mostraram uma redução na produção de radicais de oxigênio pela pravastatina (Wassmann et al. 2001; Muniz-Junqueira et al. 2006); uma possível explicação para estas divergências pode ser devido a diferenças metodológicas e ao tempo de exposição à pravastatina. De fato, nestes trabalhos a avaliação da influência da pravastatina foi mais precoce (poucas horas de exposição à droga). Estes experimentos não permitem comparação de dados com o presente trabalho em função de diferirem quanto ao tipo e dose de estatina utilizada (atorvastatina; mevalonato ou sinvastatina); na dose ou no tipo celular (célula endotelial não infectada), bem como no método de estimulação (meio de cultura e tempo de incubação diferentes).

Fagócitos produzem radicais de oxigênio através do sistema enzimático NADPH oxidase. A forma inativa da enzima se dispõe na membrana e em subunidades no citosol. A ativação do complexo NADPH oxidase requer em uma etapa inicial o ancoramento prenil-dependente à p21 rac2 da membrana. A prenilação da p21 rac 2 corresponde à ligação à um grupo isoprenóide, ou seja, geranylgeraniol- derivado da 3 hidroxi-3 metilglutaril coenzima A (HMG-CoA). Assim, a pravastatina, um inibidor da HMG-CoA redutase, pode desempenhar um papel na regulação da NADPH oxidase pela-inibição da prenilação da p21 rac

(Cordle et al. 2005; Mauël et al. 1991). Pode-se sugerir que em longo prazo esteja ocorrendo uma modulação destas moléculas pela pravastatina por mecanismos ainda não muito claros, levando ao aumento da produção do peróxido de hidrogênio por nós observado.

Uma possível explicação para o aumento da produção de peróxido de hidrogênio pode estar no aumento da fagocitose quando da administração de pravastatina em animais não infectados, porém a fagocitose retorna aos valores basais em animais infectados e tratados com pravastatina. De forma que aqui a fagocitose não parece estar mantendo estímulos suficientemente intensos para produção de radicais de oxigênio. Por outro lado, nossos dados *in vitro* mostraram que macrófagos peritoneais tratados com pravastatina por seis horas aumentaram a redução de compostos tetrazólicos pelo teste do MTT nas concentrações de 8 e 16 µg/mL, o que traduz maior atividade da cadeia respiratória dos macrófagos, ou seja, aumento da produção de radicais de oxigênio (Berridge et al. 2005). Uma possível implicação deste aumento de peróxido pela pravastatina poderia ser um melhor efeito leishmanicida pelo macrófago, o que estaria contrabalançando a baixa produção de óxido nítrico e de FNT- $\alpha$  observados.

### **Ação da pravastatina sobre a produção de óxido nítrico**

Estreitamente vinculado à produção de peróxido de hidrogênio, se encontra a produção de óxido nítrico. Não ocorreu aumento na produção de óxido nítrico pelos macrófagos tratados com pravastatina por 30 dias infectados ou não com *L. (L.) amazonensis*, mesmo após estímulo com LPS. Porém aos noventa dias observamos um discreto, porém significativo, aumento de sua produção nos

animais infectados tratados com pravastatina em relação aos animais infectados tratados com salina. A produção de óxido nítrico pelos macrófagos é dependente da ativação da iNOS e a sua expressão é por sua vez, dependente de um delicado equilíbrio entre estímulos microbianos, citocinas e hormônios, constituindo um importante mecanismo regulatório (Jorens et al. 1995). O INF- $\gamma$  associado ao FNT- $\alpha$  age como fator indutor da síntese de óxido nítrico ao passo que a IL-4, IL-10, IL-12 e TGF- $\beta$  agem como inibidores (Jorens et al. 1995). As estatinas aumentam a expressão de iNOS induzida por citocina pela inibição das pequenas proteínas G da família Rho em células de músculo liso vascular (Muniyappa et al. 2000), células epiteliais de vias aéreas (Kraynack et al. 2002), fibroblastos (Kleinert et al. 1996) e células de músculo cardíaco (Ikeda et al. 2001). Este aumento da resposta da iNOS pelas estatinas pode ser devido a uma intensificação da atividade de promotores de iNOS removendo precursores de isoprenóides (Kraynack et al. 2002).

Parece que a influência das estatinas na produção de óxido nítrico depende do tipo de célula. A literatura diverge sobre os efeitos das estatinas sobre a iNOS. Algumas observações mostram que a estatina bloqueia os estímulos indutores de produção de óxido nítrico por macrófagos (Pahan et al. 1997; Huang et al. 2003), mas, outros estudos com outras células revelaram que as estatinas têm potencial de aumentar a produção de óxido nítrico. Tem sido demonstrado que em astrócitos, microglia e macrófagos as estatinas podem bloquear a indução de iNOS pelo lipopolissacarídeo (LPS), por inibição de etapas do processo de farnesilação (Pahan et al. 1997).

Observamos por outro lado que os três grupos de animais tratados por noventa dias (grupos leishmânia, pravastatina e leishmania+pravastatina) apresentaram uma queda importante na expressão de óxido nítrico em relação aos animais tratados por trinta dias, o que se traduz no favorecimento da cronicidade da doença. Não temos uma explicação para este fato, porém a produção de óxido nítrico pode ser inibida pela presença de citocinas inibitórias entre as quais IL-4, IL-10 e TGF- $\beta$  (Jorens et al. 1995), que normalmente estão aumentadas nas infecções pela leishmânia (Sharma & Singh 2009) e quando do uso de estatinas (Chow 2009). Também se verificou que na presença de intermediários reativos de oxigênio, tais como o peróxido que se mostrou aumentado nestes grupos, ocorre rápida eliminação o óxido nítrico (Green et al. 1991; Jorens et al. 1995).

#### **Ação da pravastatina sobre a produção de FNT- $\alpha$**

O FNT- $\alpha$  se destaca como uma importante citocina no controle da infecção pela leishmânia, induzindo em macrófagos a síntese do óxido nítrico e compostos reativos de oxigênio pela via do NADPH (Drapier et al. 1988; Wilhelm et al. 2001). A cura das lesões parece estar relacionada à capacidade do macrófago de secretar óxido nítrico, após a ativação da iNOS pelo FNT- $\alpha$  em associação com INF- $\gamma$  (Guimarães et al. 2006; Sharma & Singh 2009). No entanto, em nosso estudo, foi observado que não houve alteração da produção de FNT- $\alpha$  por macrófagos tratados com pravastatina por 30 e 90 dias, mesmo com co-infecção pela *L. (L.) amazonensis* em relação aos controles. Porém, ao compararmos a produção de FNT- $\alpha$  pelos macrófagos de animais infectados tratados com salina

com os macrófagos de animais infectados tratados com pravastatina por 30 dias, houve redução significativa na produção de FNT- $\alpha$ . O que sugere que a pravastatina intensificou a diminuição de FNT- $\alpha$  promovido pela leishmânia.

O FNT- $\alpha$  é uma citocina reguladora de inflamação e sua expressão reflete a intensidade do processo inflamatório, embora não deva ser utilizado como único preditor da lesão (D'Oliveira Jr et al. 2002). De forma que, é possível que o camundongo BALB/c, por expressar uma resposta predominantemente Ta2, que se traduz por uma inflamação crônica e com baixa destruição tecidual local, tenha apresentado uma baixa produção de FNT- $\alpha$  e que foi potencializada pelo uso da pravastatina.

Tem havido relato mostrando que pacientes submetidos à cirurgia cardio pulmonar tratados com pravastatina não apresentaram alterações nos níveis séricos de FNT- $\alpha$  até no nono dia da cirurgia (Caorsi et al. 2008). As estatinas podem tanto inibir a expressão do FNT- $\alpha$  favorecendo uma resposta Ta2 (Pahan 1997; Ando et al. 2000; Ando et al. 2003; Chow et al. 2009), como podem favorecer o seu aumento, por prolongar o tempo da ativação da via cinase reguladora de sinal extracelular (ERK), por mecanismo dependente do decréscimo da geranylgeranylação da Rho, uma GTPase (Monick et al. 2003).

A interferência sobre a expressão de FNT- $\alpha$  em macrófagos de animais infectados tratados pela pravastatina pode ser favorável, pois a baixa produção de FNT- $\alpha$  leva a uma menor produção de óxido nítrico e uma menor capacidade leshmanicida pelo macrófago. Porém, um aumento na produção pode levar a danos tissulares. É importante considerar estes efeitos da estatina sobre a produção do FNT- $\alpha$ , pois este é um mediador inflamatório com importantes

funções reguladoras do sistema imunitário, que é relacionado à migração de leucócitos, reabsorção de tecidos, resposta da fase aguda da inflamação, na febre e como bactericida. De forma que o excesso de FNT- $\alpha$  esta relacionado a intensos danos celulares, incluindo choque séptico e, na leishmaniose humana está associado a formas clínicas graves, tais como leishmaniose visceral ativa e leishmaniose cutânea difusa (Da-Cruz et al. 1996; Monick et al. 2003).

Uma possível limitação do nosso estudo foi não termos utilizado a própria leishmânia como partícula a ser fagocitada. Entretanto, se tivéssemos utilizado a própria leishmânia teríamos alguma dificuldade para esclarecer se as alterações das respostas do macrófago estariam relacionadas com o próprio hospedeiro ou se teriam sido influenciadas pelo próprio parasito, o que tornaria difícil avaliar o efeito da pravastatina isoladamente.

Em síntese nossos dados permitiram mostrar que a pravastatina mostrou ter baixa toxicidade e apresentou propriedades moduladoras sobre o sistema imunitário podendo interferir na resposta inflamatória desencadeada pela *Leishmania (L.) amazonensis*, promovendo lesões menores e levando a um aumento da sobrevida de camundongos BALB/c infectados. No camundongo C57BL/6, apesar de a pravastatina não interferir na sobrevida, a droga promoveu lesões menores. Nos camundongos BALB/c, a pravastatina aumentou a expressão de peróxido de hidrogênio e óxido nítrico, ao mesmo tempo que, modulou a expressão de citocinas inflamatórias como o FNT- $\alpha$ , modulou a fagocitose e interferiu na expressão de receptores de uma forma tempo dependente: Para receptores para padrão molecular aumentou a média de leveduras fagocitadas e a proporção de macrófagos envolvidos na fagocitose com

30 dias de tratamento e para receptores de complemento aumentou a média de leveduras fagocitadas após 90 dias de tratamento.

Estes dados em conjunto sugerem que a pravastatina intensificou o efeito anti-inflamatório diminuindo a lesão pela leishmânia ao mesmo tempo em que favoreceu sua eliminação por dificultar a fagocitose e aumentar a produção de peróxido de hidrogênio. Nossos dados apontam para a possibilidade de avaliar um possível uso das estatinas como droga coadjuvante no tratamento da leishmaniose, em alguns subgrupos de pacientes.

**CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS**

Os resultados obtidos nesse trabalho permitem concluir que:

1. A pravastatina mostrou sinais de toxicidade *in vitro* para promastigotas de *L. (L.) amazonensis* em concentrações acima de 4 µg/mL. Testes *in vitro* não mostraram evidências de citotoxicidade da pravastatina sobre macrófagos peritoneais de camundongos saudáveis até a concentração de 256 µg/mL;
2. A pravastatina, após 30 dias de tratamento, aumentou a produção basal de peróxido de hidrogênio por macrófagos de camundongos BALB/c infectados (LP30) e em animais não infectados (L30) após 90 dias de tratamento. Em macrófagos estimulados com PMA a pravastatina estimulou o aumento da produção de peróxido de hidrogênio em animais infectados após 90 dias de tratamento;
3. A pravastatina não modificou a expressão de óxido nítrico por macrófagos de camundongos BALB/c com ou sem estímulo com PMA após 30 dias de tratamento. Após 90 dias de tratamento, a pravastatina aumentou a produção de óxido nítrico em camundongos infectados comparados a camundongos infectados tratados com salina, quando os macrófagos foram estimulados por LPS;
4. A pravastatina reduziu a expressão basal do FNT- $\alpha$  em macrófagos de camundongos infectados (LP30) aos 30 dias de tratamento, em comparação aos macrófagos infectados e tratados com salina (L30);

5. Em animais não infectados o tratamento por 30 dias com pravastatina aumentou o índice fagocitário, a proporção de macrófagos envolvidos na fagocitose e a média de leveduras fagocitadas por célula, quando a fagocitose foi avaliada pelos receptores para padrões moleculares de patógenos em animais não infectados. Após 90 dias de tratamento, todos os parâmetros retomaram para os valores do controle normal;

6. A infecção por *L. (L.) amazonensis* seguido de tratamento por 30 dias com pravastatina (LP30) não interferiu no índice fagocitário, na proporção de macrófagos envolvidos na fagocitose e na média de leveduras fagocitadas por macrófago pelos receptores para padrões moleculares de patógenos em comparação aos animais infectados tratados com salina (L30). Após 90 dias de tratamento a pravastatina diminuiu o índice fagocitário, a percentagem de macrófagos envolvidos na fagocitose e a média de leveduras fagocitadas em animais infectados (LP90) comparados ao grupo tratado com salina (L90);

7. O tratamento por 30 dias com pravastatina não alterou o índice fagocitário, a proporção de macrófagos envolvidos na fagocitose e a média de leveduras fagocitadas por macrófago pelos receptores para complemento em animais não infectados. Após 90 dias de tratamento a pravastatina aumentou o índice fagocitário e a média de leveduras fagocitadas pelos receptores para complemento em animais não infectados;

8. A infecção por *L. (L.) amazonensis* seguido de tratamento por 30 dias com pravastatina (LP30) não afetou o índice fagocitário, a proporção de macrófagos envolvidos na fagocitose e a média de leveduras fagocitadas por macrófagos pelos receptores para complemento, comparado aos animais infectados tratados com salina (L30). Após 90 dias de tratamento com pravastatina (LP90) também não houve alterações no índice fagocitário, na proporção de macrófagos envolvidos na fagocitose e na média de leveduras fagocitadas por macrófagos comparativamente aos animais infectados tratados com salina;

9. O tratamento com pravastatina por 90 dias aumentou a sobrevivência de camundongos BALB/c infectados em sete semanas em relação aos animais infectados e não tratados. A pravastatina não modificou o tempo de sobrevivência do camundongo C57BL/6 ou do hamster sírio infectados com *L. (L.) amazonensis*;

10. Camundongos BALB/c infectados e tratados com pravastatina por 90 dias apresentaram diâmetro das patas menor que o grupo infectado tratado com salina a partir da 14ª semana de infecção. Camundongos C57BL/6 infectados tratados com pravastatina por via oral por 90 dias apresentaram diâmetro das patas menor que os infectados tratados com salina a partir da 20ª semana de infecção. Os hamsters sírio, tratados ou não com pravastatina, na dose de 20 mg/kg/dia não apresentaram lesões cutâneas.

No presente trabalho, as diferentes evoluções das curvas de mortalidade e lesões da pata sugerem mecanismos de resposta imune e adaptações diferentes

para cada modelo animal, com consequentes respostas diferentes à interação com a pravastatina para cada hospedeiro.

A pravastatina na dose de 20 mg/kg/dia influenciou favoravelmente a sobrevivência de camundongos BALB/c infectados com *L. (L.) amazonensis* como também o desenvolvimento de lesões menores em camundongos BALB/c e C57BL/6 infectados.

O tratamento com pravastatina de camundongos BALB/c infectados com *L. (L.) amazonensis* reverteu o aumento do índice fagocitário pelos receptores para padrões moleculares de patógenos promovido pela leishmânia, retornando a capacidade fagocitária para níveis basais por redução da expressão de receptores na superfície dos macrófagos e/ou diminuição da quimiotaxia. Observou-se que provavelmente pelos seus efeitos pleiotrópicos, a pravastatina apresenta propriedades imunomoduladoras que podem favorecer o tratamento da leishmaniose como droga coadjuvante.

Nosso trabalho permitiu melhor compreensão dos efeitos da pravastatina sobre o sistema imunitário, pois identificamos sua interferência na fagocitose por receptores para padrões moleculares de patógenos e por opsoninas.

Novas pesquisas serão importantes para definir o papel e o impacto das estatinas como medicações coadjuvantes no tratamento da leishmaniose.

## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

Afonso LCC, Scott P. Immune responses associated with susceptibility of C57BL/10 mice to *Leishmania amazonensis*. *Infection and Immunity* 61: 2952-2959, 1993.

Alexander J, Bryson K. T helper (h)1/Th2 and *Leishmania*: paradox rather than paradigm. *Immunology Letters* 99: 17-23, 2005.

Almeida MC, Vilhena V, Barral A, Barral-Netto M. Leishmanial infection: analysis of its first steps. A review. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 98: 861-870, 2003.

Ando H, Takamura T, Kobayashi KI. Letter to the Editor. Does pravastatina affect circulating levels of soluble TNF receptor 2 in hypercholesterolemic patients? *Atherosclerosis* 166: 413-414, 2003.

Ando H, Takamura T, Ota T, Nagai Y, Kobayashi KI. Cerivastatin improves survival of mice with lipopolysaccharide-induced sepsis. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 294: 1043-1046, 2000.

Araújo N, Mattos ACA, Sarvel AK, Coelho PMZ, Katz N. Oxamniquine, praziquantel and lovastatin association in the experimental schistosomiasis *mansoni*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 103: 450-454, 2008.

Awasthi A, Mathur RK, Saha B. Immune response to *Leishmania* infection. The Indian Journal of Medical Research 119: 238-258, 2004.

Bansal D, Bhatti HS, Sehgal R. Role of cholesterol in parasitic infections. Lipids in Health and Disease 4:10, 2005.

Barral A, Teixeira M, Reis P, Vinhas V, Costa J, Lessa H, Bittencourt AL, Reed S, Carvalho EM, Barral-Netto M. Transforming growth factor-beta in human cutaneous leishmaniasis. The American Journal of Pathology 147: 947-954, 1995.

Barral-Netto M, Silva JS, Barral A, Reed S. Up-regulation of T helper 2 and down-regulation of T helper 1 cytokines during murine retrovirus-induced immunodeficiency syndrome enhances susceptibility of a resistant mouse strain to *Leishmania amazonensis*. The American Journal of Pathology 146: 635-642, 1995.

Basano SA, Camargo LMA. Leishmaniose tegumentar americana: histórico, epidemiologia e perspectivas de controle. Revista Brasileira de Epidemiologia 7: 328-337, 2004.

Basu MK, Ray Mi. Macrophage and *Leishmania*: an unacceptable coexistence. Critical Reviews in Microbiology 31: 145-154, 2005.

Belkaid Y, Mendez S, Lira R, Kadambi N, Milon G, Sacks D. A natural model of *Leishmania major* infection reveals a prolonged "silent" phase of parasite

amplification in the skin before the onset of lesion formation and immunity. *The Journal of Immunology* 165: 969-977, 2000.

Bellosta S, Paoletti R, Corsini A. Safety of statins: focus on clinical pharmacokinetics and drug interactions *Circulation* 109: 50-57, 2004.

Benati D, Ferro M, Savino MT, Ulivieri C, Schiavo E, Nucditelli A, Pasini FL, Baldari CT. Opposite effects of simvastatin on the bactericidal and inflammatory response of macrophages to opsonized *S. aureus*. *The Journal of Leukocytes and Biology* 87: 433-442, 2010.

Berg K, Zhai L, Chen M, Kharazmi A Owen TC. The use of a water-soluble formazan complex to quantitate the cell number and mitochondrial function of *Leishmania major* promastigotas. *Parasitology Research* 80: 235 – 239, 1994.

Berridge MV, Herst PM, Tan AS. Tetrazolium dyes as tools in cell biology: new insights into their cellular reduction. *Biotechnology Annual Review* 11: 127-52, 2005.

Bodnár A, Jenei A, Bene L, Damjanovich S, Matkó J. Modification of membrane cholesterol level affects expression and clustering of class I HLA molecules at the surface of JY human lymphoblasts. *Immunology Letters* 54: 221-226, 1996.

- Bogdan C, Röllinghoff M. The immune response to *Leishmania*: mechanisms of parasite control and evasion. *International Journal for Parasitology* 28: 121-134, 1998.
- Bogdan C. Mechanisms and consequences of persistence of intracellular pathogens: leishmaniasis as an example. *Cell Microbiology* 10: 1221-1234, 2008.
- Bokoch GM. Regulation of innate immunity by Rho GTPases. *Trends in Cell Biology* 15: 163-171, 2005.
- Brunet LR. Nitric oxide in parasitic infections. *International Immunopharmacology* 1: 1457-67, 2001.
- Buchmuller-Rouiller Y & Mauel J. Correlation between enhanced oxidative metabolism and leishmanicidal activity in activated macrophages from healer and nonhealer mouse strains. *The Journal of Immunology* 136: 3884-3890, 1986.
- Buchmüller-Rouiller Y, Mauël J. Impairment of the oxidative metabolism of mouse peritoneal macrophages by intracellular *Leishmania spp.* *Infection and Immunity* 55: 587-593, 1987.
- Buchmuller-Rouiller, Y & Mauel J. Studies on the mechanisms of macrophage activation – possible involvement of oxygen metabolites in killing of

*Leishmania enriettii* by activated mouse macrophages. Journal of Reticuloendothelial Society 29: 181-192, 1981.

Buxbaum LU. A detrimental role for IgG and FcγR in *Leishmania Mexicana*. Infection and Immunology Research 42: 197-209, 2008.

Calabrese KS, Da-Costa SCG. Enhancement of *leishmania amazonensis* infection in BCG non-responder mice by BCG-antigen specific vaccine. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 1: 49-56, 1992.

Campos MB, Gomes CMC, de Souza AA, Lainson R, Corbett CE, Silveira FT. In vitro infectivity of species of *Leishmania (Viannia)* responsible for American cutaneous leishmaniasis. Parasitology Research 103: 771-776, 2008.

Caorsi C, Pineda F, Munoz C. Pravastatin immunomodulates IL-6 and C-reactive protein, but not IL-1 and TNF-α, in cardio-pulmonary bypass. European Cytokine Network 19: 99-103, 2008.

Castellano LR, Correia Filho D, Argiro L, Dessein H, Prata A, Dessein A, Rodrigues V. Th1/Th2, immune responses are associated with active cutaneous leishmaniasis and clinical cure is associated with strong interferon-γ production. Human Immunology 70: 383-90, 2009.

Castellano LRC. Resposta imune anti-*Leishmania* e mecanismos de evasão Anti-*Leishmania* immune response and evasion mechanisms. Bioline international.

VITAE Academia Biomédica Digital, 2005. Disponível in:  
[HTTP://www.bioline.org.br/request?va05017](http://www.bioline.org.br/request?va05017).

Chanock SJ, Benna JE, Smith RM, Babior B. The respiratory burst oxidase. The Journal of Biological Chemistry 269: 24519-24522, 1994.

Chen GZ, Foster L, Bennett JL. Antischistosomal action of mevinolin: evidence that 3-hydroxy-methylglutaryl-coenzyme a reductase activity in *Schistosoma mansoni* is vital for parasite survival. Naunyn Schmiedebergs Archives in Pharmacology 342: 477-482, 1990.

Chimini G, Chavrier P. Function of Rho family proteins in actin dynamics during phagocytosis and engulfment. Nature Cell Biology 10: e191–196, 2000.

Chow SC, Immunomodulation by statins: mechanisms and potential impact on autoimmune diseases. Archives in Immunology and Therapy Experimental 57: 243-51, 2009.

Coelho MV, Coutinho-Abath E. Experimental cutaneous leishmaniasis. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo 7: 136-144, 1965.

Coppens I, Bastin P, Levade T, Courtoy PJ. Activity, pharmacological inhibition and biological regulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase in *Trypanosoma brucei*. Molecular Biochemistry and Parasitology 69: 29-40, 1995.

- Cordle A, Koenigsknecht-Talboo J, Wilkinson B, Limpert A, Landreth G. Mechanisms of statin-mediated inhibition of small G-protein function. *The Journal of Biological Chemistry* 280: 34202-34209, 2005.
- Cuba CCA. Diagnóstico parasitológico de la leishmaniasis tegumentaria americana. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública* 17: 39-52, 2000.
- D'Oliveira Jr A, Machado P, Bacellar O, Cheng LH, Almeida RP, Carvalho EM. Evaluation of IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  as immunological markers of clinical outcome in cutaneous leishmaniasis. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 35: 7-10, 2002.
- Dabrowski MP, Peel WE, Thomson AER. Plasma membrane cholesterol regulates human lymphocyte cytotoxic function. *European Journal of Immunology* 10: 821-827, 1980.
- Da-Cruz AM, de Oliveira MP, De Luca PM, Mendonça SC, Coutinho SG. Tumor necrosis factor- $\alpha$  in human American tegumentary leishmaniasis. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 91: 225-229, 1996.
- Dekker LV, Leitges M, Altschuler G, Mistry N, McDermott A, Roes J, W. Segal A. Protein kinase C- $\beta$  contributes to NADPH oxidase activation in neutrophils. *The Biochemical Journal* 347: 285-289, 2000.

Deolindo P. Exposição de fosfatidilserina em amastigotas intracelulares de *Leishmania (L.) amazonensis* e seu papel na modulação da resposta macrofágica. Instituto Oswaldo Cruz, Tese doutorado. Rio de Janeiro. Disponível em: [HTTP// bases.bireme.br/ id 500657](http://bases.bireme.br/id/500657), 2008.

Dey R, Sarkar A, Majumder N, Bhattacharyya SM, Roychoudhury K, Bhattacharyya S, Roy S, Majumdar S. Regulation of impaired protein kinase C signaling by chemokines in murine macrophages during visceral leishmaniasis. *Infection and Immunity* 73: 8334–8344, 2005.

Dias-Zagoya JC, Asenjo-Barrón JC, Cárdenas-Vasquez R, Martinez E, Juárez-Oropeza MA. Comparative toxicity of high doses of vastatins currently used by clinicians, in CD-1 male mice fed with a hypercholesterolemic diet. *The Life Science* 65: 947-956, 1999.

Dietze R, Araújo RC, Lima M L R, Vexenat JÁ, Marsden PD, Barretto AC. Ensaio terapêutico com glucantime em sagüis (*Callithrix jacchus*) infectados com uma cepa de *Leishmania donovani* aparentemente resistente ao tratamento. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 18: 39-42, 1985.

Djaldetti M, Salman H, Bergman M, Bessler H. Effect of pravastatin, simvastatin and atorvastatin on the phagocytic activity of mouse peritoneal macrophages. *Experimental and Molecular Pathology* 80: 160-164, 2006.

- Drapier JC, Wietzerbin J, Hibbs JB Jr. Interferon-gamma and tumor necrosis factor induce the L-arginine-dependent cytotoxic effector mechanism in murine macrophages. *European Journal of Immunology* 18: 1587-1592, 1988.
- Felizardo TC, Toma LS, Borges NB, Lima GMCA, Abrahamsohn I A. *Leishmania (Leishmania) amazonensis* infection and dissemination in mice inoculated with stationary-phase or with purified metacyclic promastigotes. *Parasitology* 134:1699-1707, 2007.
- Ferraz FO. Efeitos da atorvastatina sobre a infecção experimental por *Leishmania major* no camundongos C57BL/6. Tese mestrado, Ouro Preto-MG, 2008.
- Florin-Christensen M, Florin-Christensen J, Garin C, Isola E, Brenner RR, Rasmussen L. Inhibition of *Trypanosoma cruzi* growth and sterol biosynthesis by lovastatin. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 166: 1441-1445, 1990.
- Fonseca FAH. Farmacocinética das estatinas. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia Supl V.* 85: 9 -14, 2005.
- Forman HJ, Torres M. Reactive oxygen species and cell signaling. *The American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 166: S4-S8, 2002.
- Franzoni F, Quiñones-Galvan A, Regoli F, Ferrannini E, Galetta F. A comparative study of the in vitro antioxidant activity of statins. *International Journal of Cardiology* 90: 317-21, 2003.

Garg R, Dube A. Animal models for vaccine studies for visceral leishmaniasis. *The Indian Journal of Medicine Research* 123: 439-454, 2006.

Ghittoni R, Lazzerini PE, Pasini FL, Baldari CT. T lymphocytes as targets of statins: molecular mechanisms and therapeutic perspective. *The Inflammatory Allergy and Drug Targets* 6: 3-16, 2007.

Giudice A, Camada I, Leopoldo PTG, Pereira JMB, Riley LW, Wilson ME, Ho JL, Jesus AR, Carvalho EM, Almeida RP. Resistance of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* and *Leishmania (Viannia) braziliensis* to nitric oxide correlates with disease severity in Tegumentary Leishmaniasis. *BioMed Central Infectious Disease* 7:7, 2007.

Gomes IN, Palma LC, Campos GO, Lima JGB, Almeida TF, Menezes JPB, Ferreira CAG, Santos RR, Buck GA, Manque PAM, Ozaki LS, Probst CM, Freitas LAR, Krieger MA, Veras PST. The scavenger receptor MARCO is involved in *Leishmania major* infection by CBA/j macrophages. *Parasite Immunology* 31: 188-198, 2009.

Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS, Tannenbaum SR. Analysis of nitrate, nitrite and (<sup>15</sup>N) nitrate in biological fluids. *Analytical Biochemistry* 126: 131-138, 1982.

Green SJ, Nacy CA; Meltzer MS. Cytokine-induced synthesis of nitrogen oxides in macrophages: a protective host response to leishmânia and other intracellular pathogens. *Journal of Leucocyte Biology* 50: 93-103, 1991.

- Griendlink KK, Ushio-Fukal M. Redox control of vascular smooth muscle proliferation. *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine* 132: 9 – 15, 1998.
- Grimaldi Jr GL. Leishmanioses tegumentares: aspectos clínicos e imunopatológicos. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 77: 195-215, 1982.
- Grip O, Janciauskiene S, Lindgren S. Pravastatin down-regulates inflammatory mediators in human monocytes in vitro. *The European Journal of Pharmacology* 410: 83-92, 2000.
- Guimarães ET, Santos LA, Santos RR, Teixeira MM, Santos WLC, Soares MBP. Role of interleukin-4 and prostaglandin E<sub>2</sub> in *Leishmania Amazonensis* infection of BALB/c mice. *Microbes and Infections* 8: 1219-26, 2006.
- Guy RA, Belosevic M. Comparison of receptors required for entry of *Leishmania* major amastigotes into macrophages. *Infection and Immunity* 61:1553-1558, 1993.
- Haughan PA, Chance ML, Goad LJ. Synergism *in vitro* of lovastatin and miconazole as anti-leishmanial agents. *Biochemical Pharmacology* 44: 2199-2206, 1992.
- Hespanhol RC, Soeiro MNC, Meuser MB, Meirelles MNSL, Côrte-Real S. The expression of mannose receptors in skin fibroblast and their involvement in

*Leishmania (L.) amazonensis* invasion. The Journal of Histochemistry and Cytochemistry 53: 35-44, 2005.

Huang KC, Chen CW, Chen JC, Lin, WW. HMG-CoA reductase inhibitors inhibit inducible nitric oxide synthase gene expression in macrophages. The Journal of Biomedical Society 10: 396-405, 2003.

Ikeda U, Shimpo M, Ikeda M, Minota S Shimada K. Lipophilic statins augment inducible nitric oxide synthase expression in cytokine – stimulated cardiac myocytes. The Journal of Cardiovascular Pharmacology 38: 69–77, 2001.

Jacobson TA. comparative pharmacokinetic interaction profiles of pravastatin, simvastatin, and atorvastatin when coadministered with cytochrome p450 inhibitors. The American Journal of Cardiology 94: 1140-1146, 2004.

Ji J, Masterson J, Sun J, Soong L. CD4 + CD25 + regulatory T cells restrain pathogenic responses during *Leishmania amazonensis* infection. The Journal of Immunology 174: 7147-7153, 2005.

Ji J, Sun J, Soong L. Impaired expression of inflammatory cytokines and chemokines at early stages of infection with *Leishmania amazonensis*. Infection and Immunity 71: 4278-4288, 2003.

Jones DE, Ackermann MR, Wille U, Hunter CA, Scott P. Early enhanced Th1 response after *Leishmania amazonensis* infection of C57BL6 interleukin-10

deficient mice does not lead to resolution of infection. *Infection and Immunity* 70: 2151-2158, 2002.

Jones DE, Buxbaum LU, Scott P. IL-4-Independent inhibition of IL-12 responsiveness during *Leishmania amazonensis* infection. *The Journal of Immunology* 165: 364-372, 2000.

Jorens PG, Matthys KE, Bult H. Modulation of nitric oxide synthase activity in macrophages. *Mediators of Inflammation* 4: 75-89, 1995.

Kaesemeyer WH, Caldwell RB, Huang J, Caldwell RW. Pravastatin sodium activates endothelial nitric oxide synthase independent of its cholesterol-lowering actions. *The Journal of American College of Cardiology* 33: 234-241, 1999.

Kapoor M, Appleton I. Wound healing: abnormalities and future therapeutic targets. *Current Anaesthesia and Critical Care* 16: 89-93, 2005.

Karp CL, El-Safi SH, Wynn TA, Satti MM, Kordofani AM, Hashim FA, Hag-Ali M, Neva FA, Nutman TB, Sacks D. In vivo cytokine profiles in patients with Kala-azar Marked elevation of both interleukin-10 and interferon-gamma. *The Journal of Clinical Investigation* 91: 1644-1648, 1993.

Kitamoto S, Nakano K, Hirouchi Y, Kohjimoto Y, Kitajima S, Usui M, Inoue S, Egashira K. Cholesterol-lowering independent regression and stabilization of atherosclerotic lesions by pravastatin and by antimonocyte chemoattractant

protein-1 therapy in nonhuman primates. *Arteriosclerosis and Thrombosis and Vascular Biology* 24: 1522 – 1528, 2004.

Kleinert H, Euchenhofer C, Ihrig-Biedert I, Förstermann U. In murine 3T3 fibroblasts, different second messenger pathways resulting in the induction of NO synthase II (iNOS) converge in the activation of transcription factor NF-kappaB. *The Journal of Biology and Chemistry* 271: 6039-6044, 1996.

Kraynack NC, Corey DA, Elmer HL, Kelley TJ. Mechanisms of NOS2 regulation by Rho GTPase signaling in air way epithelial cells. *The American Journal of Physiology Lung Cell and Molecular Physiology* 283: 604, 2002.

Kropf P, Freudenberg MA, Modolell M, Price HP, Herath S, Antoniazzi S, Galanos C, Smith DF, Müller I. Toll-like receptor 4 contributes to efficient control of infection with the protozoan parasite *Leishmania major*. *Infection and Immunity* 72: 1920-1928, 2004.

Kuipers HF, Biesta PJ, Groothuis TA, Neefjes JJ, Mommaas M, van den Elsen PJ. Statins affect cell-surface expression of major histocompatibility complex class II molecules by disrupting cholesterol-containing microdomains. *Human Immunology* 66: 653-65, 2005.

Kwak B, Mulhaupt F, Myit S, Mach F. Statins as a newly recognized type of immunomodulator. *Nature Medicine* 6: 1399-1402, 2000.

- Lachmann PJ, Hobart MJ. Complement technology, p.1A-5A. In D.M. Weir (ed.), Handbook of experimental immunology, vol I. Immunochemistry. Blackwell, Oxford, United Kingdom. 1978.
- Laufs H, Müller K, Fleisher J, Reiling N, Jahnke N, Jensenius JC, Solbach W, Laskay T. Intracellular survival of *Leishmania major* in neutrophil granulocytes after uptake in the absence of heat-labile serum factors. Infection and Immunity 70: 826–835, 2002.
- Laufs U. Beyond lipid-lowering: effects of statins on endothelial nitric oxide. The European Journal of Clinical Pharmacology 58: 719-731, 2003.
- Liao JK. Beyond lipid lowering: the role of statins in vascular protection. International Journal of Cardiology 86: 5–18, 2002.
- Lobato CMSD, Tavares MLB, Silva ARS, Pinto NT. Efeitos da pravastatina no comportamento de ratos submetidos a ação da nicotina. Revista de Parasitologia Médica 16: 23-27, 2002.
- Maia C, Rolão N, Nunes M, Gonçalves L, Campino L. Infectivity of five different types of macrophages by *Leishmania infantum*. Acta Tropica 103: 150-155, 2007.
- Maioli TU, Takane E, Arantes RME, Fietto JLR, Afonso LCC. Immune response induced by new world *Leishmania* species in C57BL/6 mice. Parasitology Research 94: 207-212, 2004.

Mauel J, Ransjin A, Buchmüller-Rouiller Y. Killing of *Leishmania* parasites in activated murine macrophages is based on an L-arginine-dependent process that produces nitrogen derivatives. *Journal of Leukocyte Biology* 49: 73-82, 1991.

Ministério da Saúde. Manual de vigilância e controle da Leishmaniose Visceral. 1ª. Ed. Brasília DF 1 – 120, 2006.

Ministério da Saúde. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana, 2ª. Ed. Brasília DF 1-179, 2007.

Monick MM, Powers LS, Butler NS, Hunninghake GW. Inhibition of Rho Family GTPases results in increased TNF- $\alpha$  production after lipopolysaccharide exposure. *The Journal of Immunology* 171: 2625 -2630, 2003.

Montalvetti A, Peña-Díaz J, Hurtado R, Ruiz-Pérez LM, González-Pacanowska D. Characterization and regulation of *Leishmania major* 3-hydroxy-3methylglutaryl-CoA reductase. *Biochemical Journal* 349: 27-34, 2000.

Montero MT, Hernández O, Suárez Y, Matilla J, Ferruelo AJ, Martínez-Botas J, Gómez-Coronado D, Lasunción MA. Hydroxymethylglutaryl-coenzyme A reductase inhibition stimulates caspase-1 activity and Th1-cytokine release in peripheral blood mononuclear cells. *Atherosclerosis* 153: 303-313, 2000.

- Moraes MA, Silveira FT. Histopatologia da forma localizada de leishmaniose cutânea por *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo 36: 459-463, 1994.
- Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. The Journal of Immunological Methods 65: 55-63, 1983.
- Mukbel RM, Patten C Jr, Gibson K, Ghosh M, Petersen C, Jones DE. Macrophage killing of *Leishmania amazonensis* amastigotes requires both nitric oxide and superoxide. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 76: 669-675, 2007.
- Müller I, Pedrazzini T, Farrell JP, Louis J. T-cell responses and immunity to experimental infection with *Leishmania major*. Annual Review Immunology 7: 561-578, 1989.
- Muniyappa R, Xu R, Ram JL, Sowers JR. Inhibition of Rho protein stimulates iNOS expression in rat vascular smooth muscle cells. The American Journal of Physiology Heart and Circulation Physiology 278:1762-1768, 2000.
- Muniz-Junqueira MI, Karnib SR, Paula-Coelho VN, Junqueira-Jr LF. Effects of pravastatin on the in vitro phagocytic function and hydrogen peroxide production by monocytes of healthy individuals International Immunopharmacology 6: 53-60, 2006.

- Muniz-Junqueira MI, Peçanha LMF, da Silva-Filho VL, Cardoso MCA, Tosta CE. Novel microtechnique for assessment of postnatal maturation of the phagocytic function of neutrophils and monocytes. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 10: 1096-1102, 2003.
- Noben-Trauth, N. Susceptibility to *Leishmania major* infection in the absence of IL-4. *Immunology Letters* 75: .41-44, 2000.
- Nylén S, Akuffo H. Tracing immunity to human leishmaniasis. *Future Microbiology* 4: 241-254, 2009.
- Olivier M, Brownsney RW, Reiner NE. Defective stimulus-response coupling in human monocytes infected with *Leishmania donovani* is associated with altered activation and translocation of protein-kinase-C. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of the American* 89: 7481–7485, 1992.
- Oms P, Assie N, Bruniquel F, Degryse AD, van Haverbeke G, Delhon A. Biochemical changes and morphological alterations of liver and kidney in hamsters after administration of the HMG-coenzyme A reductase inhibitor, simvastatin: prevention and reversibility by mevalonate. *Pharmacology and Toxicology* 77: 391-396, 1995.
- Pahan K, Sheikh FG, Namboodiri AMS, Singh I. Lovastatin and phenylacetate inhibit the induction of nitric oxide synthase and cytokines in rat primary

astrocytes, microglia, and macrophages. *The Journal of Clinical Investigation* 100: 2671-2679, 1997.

Pick E, Keisari Y. A simple colorimetric method for the measurement of hydrogen peroxide produced by cells in culture. *The Journal of Immunological Methods* 38: 161-170, 1980.

Pinheiro RO, Pinto EE, Benedito AB, Lopes UG, Rossi-Bergmann B. The T-cell anergy induced by *Leishmania amazonensis* antigens is related with defective antigen presentation and apoptosis. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 76: 519-527, 2004.

Pinheiro RO, Pinto EF, Lopes JRC, Guedes HLM, Fentanes RF, Rossi-Bergmann BR. TGF- $\beta$ -associated enhanced susceptibility to leishmaniasis following intramuscular vaccination of mice with *Leishmania amazonensis* antigens. *Microbes and Infection* 7:1317-1323, 2005.

Pradines B, Torrentino-Madamet M, Fontaine A, Henry M, Baret E, Mosnier J, Briolant S, Fusai T, Rogier C. Atorvastatin is 10 fold more active in vitro than other statins against *Plasmodium falciparum*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 51: 2654–2655, 2007.

Pucadyil TJ, Tewary P, Madhubala R, Chattopadhyay A. Cholesterol is required for *Leishmania donovani* infection: implications in leishmaniasis. *Molecular and Biochemical Parasitology* 133: 145-152, 2004.

- Remaley AT, Glew RH, Kuhns DB, Basford RE, Waggoner AS, Ernst LA, Pope M. *Leishmania donovani*: surface membrane acid phosphatase blocks neutrophil oxidative metabolite production. *Experimental Parasitology* 60: 331-341, 1985.
- Ribeiro-De-Jesus, A, Almeida RP, Lessa H, Bacellar O, Carvalho EM. Cytokine profile and pathology in human leishmaniasis. *Brazilian Journal of Medicine and Biological Research* 31: 143-148, 1998.
- Ritter U, Frischknecht F, van-Zandbergen Ger. Are neutrophils important host cells for *Leishmania* parasites? *Trends in Parasitology* 25: 505-510, 2009.
- Rogers KA, DeKrey GK, Mbow ML, Gillespie RD, Brodskyn CI, Titus RG. Type 1 and type 2 responses to *Leishmania major*. *Federation of European Microbiological Societies Microbiology Letters* 209: 1-7, 2002.
- Romero GAS. Predicting relapse after treatment for American Cutaneous leishmaniasis. *Letters in Bulletin of the World Health Organization* 79: 1169, 2001.
- Rudich SM, Mongini PKA, Perez RV, Katznelson S. HMG-CoA Reductase Inhibitors pravastatin and simvastatin inhibit human B-lymphocyte activation. *Transplantation Proceedings* 30: 992-995, 1998.
- Salman H, Bergman M, Djaldetti M, Bessler H. Hydrophobic but not hydrophilic statins enhance phagocytosis and decrease apoptosis of human peripheral blood cells in vitro. *Biomedicine and Pharmacotherapy* 62: 41–45, 2008.

- Sampaio RNR, Marsden PD. Tratamento da forma mucosa de leishmaniose sem resposta a glucantime, com anfotericina B liposomal. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 30: 125-128, 1997.
- Schachter M. Chemical, pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of statins: An update. *Fundamental and Clinical Pharmacology* 19: 117–125, 2005.
- Sharma U, Singh S. Immunobiology of leishmaniasis. *Indian Journal of Experimental Biology* 47: 412-423, 2009.
- Silveira FT, Moraes MAP, Lainson R, Shaw J. Leishmaniose cutânea experimental — aspectos histopatológicos do comportamento evolutivo da lesão cutânea produzida em *Cebus apella* (PRIMATES: CEBIDAE) por *L(V) lainsoni*, *L(V) braziliensis* e *L(L) amazonensis*. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 32: 387-394, 1990.
- Sindermann JR, Fan L, Weigel KA, Troyer D, Müller JG, Schmidt A, March KL, Breithardt G. Differences in the effects of HMG-CoA reductase inhibitors on proliferation and viability of smooth muscle cells in culture. *Atherosclerosis* 150: 331-341, 2000.
- Torrecilla E, González-Muñoz M, García-Iglesias F, Lahoz C, Laguna F, Mostaza JM. Modificaciones en la activación y la expresión de moléculas de adhesión y receptores celulares monocitáricos en pacientes hipercolesterolémicos

tratados com pravastatina. *Clinical Investigation and Arteriosclerosis* 21: 45-50, 2009.

Van Aelst L, D'Souza-Schorey C. Rho GTPases and signaling networks. *Genes and Development* 11:2295-322, 1997.

Vasquez RE, Soong L. CXCL10/Gamma interferon-inducible protein 10-mediated protection against *Leishmania amazonensis* infection in mice. *Infection and Immunity* 74: 6769-6777, 2006.

Walter DH, Dimmerler S, Zeiher AM. Effects of statins on endothelium and endothelial progenitor cell recruitment. *Seminars in Vascular Medicine* 4: 385-393, 2004.

Wanasen N, Xin L, Soong L. Pathogenic role of B cells and antibodies in murine *Leishmania amazonensis*. *Infection* 38: 417-429, 2008.

Wassmann S, Laufs U, Bäumer AT, Müller K, Konkol C, Sauer H, Böhm M, Nickenig G. Inhibition of geranylgeranylation reduces angiotensin II-mediated free radical production in vascular smooth muscle cells: involvement of angiotensin AT1 receptor expression and Rac1 GTPase. *Molecular Pharmacology* 59: 646-654, 2001.

Weber C, Erl W, Weber KS, Weber PC. HMG-CoA reductase inhibitors decrease CD11b expression and CD11b-dependent adhesion of monocytes to endothelium and reduce increased adhesiveness of monocytes isolated

from patients with hypercholesterolemia. *The Journal of American College and Cardiology* 30: 1212-1217, 1997.

WHO. Tropical disease research: progress 1999–2000. World Health Organization, Geneva. 2001. Disponible in: <http://www.who.int/tdrold/publications/publications/pr15.htm>.

Wilhelm P, Ritter U, Labbow S, Donhauser N, Röllinghoff M, Bogdan C, Körner H. Rapidly fatal leishmaniasis in resistant C57BL/6 mice lacking TNF. *The Journal of Immunology* 166: 4012-4019, 2001.

Williams C, Espinosa AO, Montenegro H, Cubilla L, Capson TL, Ortega-Barría E, Romero LI. Hydrosoluble formazan XTT: its application to natural products drug discovery for *Leishmania*. *Journal of Microbiological Methods* 55: 813-816, 2003.

Wilson ME, Pearson RD. Roles of CR3 and mannose receptors in the attachment and ingestion of *Leishmania donovani* by human mononuclear phagocytes. *Infection and Immunity* 6:363–369, 1988.

Witte MB, Barbul A. Role of nitric oxide in wound repair. *American Journal of surgery* 183: 406-412, 2002.

Wong RPM, Davis TME. Statins as potential antimalarial drugs: low relative potency and lack of synergy with conventional antimalarial drugs. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 53: 2212-2214, 2009.

Wright SD, Silverstein SC. Receptors for C3b and C3bi promote phagocytosis but not the release of toxic oxygen from human phagocytes. *The Journal of Experimental Medicine* 158: 2016–2023, 1983.

Yoshizaki F, Nakayama H, Iwahara C, Takamori K, Ogawa H, Iwabuchi K. Role of glycosphingolipid-enriched microdomains in innate immunity: microdomain-dependent phagocytic cell functions. *Biochimica and Biophysica Acta* 1780: 383-392 2008.

Youssef S, Stüve O, Patarroyo JC, Ruiz P, Radosevich JL, Hur EM, Bravo M, Mitchel DJ, Sobel RA, Steinman L, Zamvil SS. The HMG-CoA reductase inhibitor, atorvastatin, promotes a TH2 bias and reverse paralysis in central nervous system autoimmune disease. *Nature* 420: 78-84, 2002.

Zhao SP, Zhang DQ. Atorvastatin enhances cellular uptake of oxidized LDL in adipocytes from hypercholesterolemic rabbits. *Clinica Chimica Acta* 339: 189-194, 2004.





UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
COMITÊ DE ÉTICA NO USO ANIMAL

Brasília, 29 de fevereiro de 2008.

### **DECLARAÇÃO**

Declaramos que o projeto intitulado "INFLUÊNCIA DA PRAVASTATINA E DO GLUCANTIME NA RESPOSTA INFLAMATÓRIA, NAS VIAS DE ATIVAÇÃO NFKB E DA CICATRIZAÇÃO DA ÚLCERA LEISHMANIÓTICA NO CAMUNDONGO", UNBDOC nº 8121/2007, sob responsabilidade da Profa. Maria Imaculada Muniz B. Junqueira, foi avaliado e aprovado pelo Comitê de Ética no Uso Animal (CEUA) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília.

  
Prof. Anamélia Lorenzetti Bocca  
Coordenadora do CEUA

## TABELAS

**Tabela 1.** Percentual de redução do MTT *in vitro* por *Leishmania (L.) amazonensis* (atividade microbicida).

<b>Concentração da Pravastatina (<math>\mu\text{g/mL}</math>)</b>	<b>Redução do MTT (%) Mediana (Mínimo – Máximo)</b>	<b>Estatística Teste de Wilcoxon</b>
0	100,0 (99,0 – 103,0)	
0,5	100,0 (90,0 – 102,0)	$p > 0,05$
1	102,0 (99,0 – 103,0)	$p > 0,05$
2	110,0 (109,0 – 116,0) <sup>a</sup>	$p < 0,05$
4	97,0 (72,0 – 99,0) <sup>a</sup>	$p < 0,05$
8	89,0 (71,0 – 97,0) <sup>a</sup>	$p < 0,05$
16	91,0 (83,0 – 94,0) <sup>a</sup>	$p < 0,05$
32	92,0 (85,0 – 99,0) <sup>a</sup>	$p < 0,05$
64	83,0 (78,0 – 88,0) <sup>a</sup>	$p < 0,05$
128	76,0 (70,0 – 87,0) <sup>a</sup>	$p < 0,05$
256	77,0 (61,0 – 84,0) <sup>a</sup>	$p < 0,05$
512	70,0 (55,0 – 85,0) <sup>a</sup>	$p < 0,0$

<sup>a</sup>Diferença significativa entre os grupos e o controle (0  $\mu\text{g/mL}$ )

**Tabela 2.** Percentual de redução do MTT *in vitro* por células peritoneais de camundongos BALB/c (toxicidade).

<b>Concentração da Pravastatina (<math>\mu\text{g/mL}</math>)</b>	<b>Redução do MTT (%) Mediana (Mínimo – Máximo)</b>	<b>Estatística Teste de Wilcoxon</b>
0	100,0 (99,0 – 103,0)	
0,5	98,0 (7,0 – 229,0)	$p > 0,05$
1	104,0 (65,0 – 27,0)	$p > 0,05$
2	110,0 (109,0 – 116,0)	$p > 0,05$
4	97,5 (75,0 – 277,0)	$p > 0,05$
8	101,0 (69,0 – 233,0) <sup>a</sup>	$p < 0,05$
16	118,0 (9,00 – 204,0) <sup>a</sup>	$p < 0,05$
32	125,0 (93,0 – 263,0)	$P > 0,05$
64	98,0 (82,0 – 242,0)	$p > 0,05$
128	97,0 (74,0 – 234,0)	$p > 0,05$
256	100,0 (99,0 – 103,0)	$p > 0,05$
512	98,0 (76,0 – 229,0)	$p > 0,05$

<sup>a</sup>Diferença significativa entre os grupos e o controle (0  $\mu\text{g/mL}$ )

**Tabela 3.** Mediana (extremos) das variáveis da capacidade fagocitária dos macrófagos peritoneais dos camundongos BALB/c infectados ou não com *Leishmania (L.) amazonensis* e tratados ou não com pravastatina

<b>Fagocitose de <i>S. cerevisiae</i> por macrófagos peritoneais</b>						
<b>Grupos</b>	<b>Leveduras não sensibilizadas</b>			<b>Leveduras sensibilizadas</b>		
	Número de leveduras fagocitadas	% macrófagos envolvidos na fagocitose	Índice fagocitário	Número de leveduras fagocitadas	% macrófagos envolvidos na fagocitose	Índice fagocitário
Salina	1,8 (1,3 - 2,5)	9,8 (3,0 - 22,5)	21,5 (4,5 - 41,0)	2,9 (1,6 - 4,8)	22,3 (9,5 - 29,0)	66,5 (23,0 - 109,5)
Pravastatina 30	3,1 <sup>a</sup> (1,8 - 4,8)	17,0 <sup>c</sup> (9,0 - 32,5)	59,0 <sup>e</sup> (18,5 - 154,5)	2,4 <sup>h</sup> (1,9 - 3,1)	27,0 (17,0 - 42,5)	59,5 (30,5 - 89,5)
Leishmania 30	2,0 (1,3 - 3,4)	10,0 (2,0 - 19,0)	25,8 (10,0 - 53,0)	3,1 (2,5 - 3,8)	22,5 (9,5 - 34,5)	68,3 (24,5 - 190,0)
Leish/Prav 30	1,9 (1,3 - 3,1)	10,0 (4,5 - 17,0)	21,0 (7,5 - 49,5)	3,8 (1 - 10,5)	21,0 (16,0 - 58,5)	81,5 (20,0 - 525,0)
Pravastatina 90	2,3 (1,6 - 3,3)	10,5 (6,5 - 21,5)	21,3 (9,5 - 125,0)	5,6 (3,5 - 12,7)	20,3 (7,0 - 31,0)	103,5 <sup>k</sup> (26,5 - 226,5)
Leishmania 90	3,6 <sup>a</sup> (1,3 - 13,8)	10,5 (4,0 - 30,5)	37,3 <sup>f</sup> (8,0 - 220,0)	4,0 <sup>h</sup> (2,4 - 7,0)	14,8 <sup>j</sup> (8,5 - 27,5)	55,8 (30,5 - 157,0)
Leish/Prav 90	2,8 <sup>b</sup> (1,1 - 4,6)	5,5 <sup>d</sup> (4,0 - 9,5)	17,5 <sup>g</sup> (5,0 - 28,5)	4,7 <sup>i</sup> (2,3 - 7,4)	14,0 (9,0 - 29,0)	84,0 <sup>m</sup> (17,0 - 206,0)

\*ANOVA ou Kruskal-Wallis para a comparação entre os grupos e teste Student Neuman-Keuls ou Dunn para as múltiplas comparações ( $p < 0,05$ ). <sup>a</sup>Diferença significativa ( $p < 0,05$ ) na comparação com o grupo salina, <sup>b</sup>Diferença significativa ( $p < 0,05$ ) na comparação com o grupo Leishmania 90, <sup>c</sup>Diferença significativa ( $p < 0,05$ ) na comparação com o grupo salina, <sup>d</sup>Diferença significativa ( $p < 0,05$ ) na comparação com o grupo Leishmania 90, <sup>e</sup>Diferença significativa ( $p < 0,05$ ) na comparação com o grupo salina, <sup>f</sup>Diferença significativa ( $p < 0,05$ ) na comparação com o grupo Leishmania 30, <sup>g</sup>Diferença significativa ( $p < 0,05$ ) na comparação com o grupo Leishmania 90, <sup>h</sup>Diferença significativa ( $p < 0,05$ ) na comparação com o grupo salina, <sup>i</sup>Diferença significativa ( $p < 0,05$ ) na comparação com o grupo Leishmania 30, <sup>j</sup>Diferença significativa ( $p < 0,05$ ) na comparação com o grupo salina, <sup>k</sup>Diferença significativa ( $p < 0,05$ ) na comparação com o grupo salina, <sup>m</sup>Diferença significativa ( $p < 0,05$ ) na comparação com o grupo Leish+Prav 30.

**Tabela 4.** Mediana (extremos) das variáveis da produção de peróxido de hidrogênio por macrófagos peritoneais dos camundongos BALB/c infectados ou não com *Leishmania (L.) amazonensis* e tratados ou não com pravastatina

<b>Grupos</b>	<b>Produção basal</b>	<b>Produção estimulada com PMA</b>
Salina (C)	2,8 (0,1 - 5,4)	3,4 (0,0 - 8,3)
Pravastatina 30	4,5 (1,7 - 9,1)	4,3 (2,7 - 7,2)
Leishmania 30	2,0 (0,1 - 8,7)	5,1 (1,5 - 9,8)
Leish/Prav 30	5,5 (1,1 - 9,2)	1,8 (0,1 - 3,6)
Pravastatina 90	6,8 (0,9 - 13,5) <sup>a</sup>	8,0 (1,4 - 10) <sup>b,d</sup>
Leishmania 90	5,9 (0,1 - 8,4)	0,1 (0,1 - 7,1) <sup>c</sup>
Leish/Prav 90	6,6 (0,1 - 9,7)	7,9 (0,8 - 10,2)

\*ANOVA ou Kruskal-Wallis para a comparação entre os grupos e teste Student-Neuman-Keuls ou Dunn para as múltiplas comparações. <sup>a</sup>Diferença significativa ( $p < 0,028$ ) na comparação com o grupo salina, <sup>b</sup>Diferença significativa ( $p < 0,024$ ) na comparação com o grupo salina, <sup>c</sup>Diferença significativa ( $p < 0,041$ ) na comparação com o grupo Leishmania 30, <sup>d</sup>Diferença significativa ( $p < 0,041$ ) na comparação com o grupo Leishmania 90.

**Tabela 5.** Mediana (extremos) das variáveis da produção de óxido nítrico por macrófagos peritoneais dos camundongos BALB/c infectados ou não com *Leishmania (L.) amazonensis* e tratados ou não com pravastatina

<b>Grupos</b>	<b>Produção basal</b>	<b>Produção estimulada com LPS</b>
Salina (C)	12,2 (0,2 - 95,6)	26,2 (1,7 - 102,9)
Pravastatina 30	1,8 (0,1 - 109)	43,0 (0,9 - 110,5)
Leishmania30	63,7 (0,2 - 224,4) <sup>a</sup>	67,3 (0,5 - 136,6)
Leish/Prav30	50,6 (0,4 - 117,2)	2,3 (0,2 - 89,5)
Pravastatina 90	1,9 (0,1 - 86,1)	1,8 (0,1 - 27,3) <sup>b</sup>
Leishmania90	1,5 (0,1 - 6,0)	2,1 (0,1 - 19,3) <sup>c</sup>
Leish/Prav90	1,0 (0,1 - 7,1)	13,6 (0,7 - 29,0) <sup>d</sup>

\*ANOVA ou Kruskal-Wallis para a comparação entre os grupos e teste Student Neuman-Keuls ou Dunn para as múltiplas comparações, <sup>a</sup>Diferença significativa ( $p < 0,029$ ) na comparação com o grupo salina e com Leishmania 90, <sup>b</sup>Diferença significativa ( $p < 0,007$ ) na comparação com o grupo salina e com Pravastatina 30, <sup>c</sup>Diferença significativa ( $p < 0,001$ ) na comparação com o grupo Leishmania 30, <sup>d</sup>Diferença significativa ( $p < 0,041$ ) na comparação com o grupo Salina

**Tabela 6.** Mediana (extremos) das variáveis da produção de fator de necrose tumoral- $\alpha$  por macrófagos peritoneais dos camundongos BALB/c infectados ou não com *Leishmania (L.) amazonensis* e tratados ou não com pravastatina.

<b>Grupos</b>	<b>Produção basal</b>	<b>Produção estimulada com LPS</b>
Salina (C)	24,6 (0,3 - 602,8)	161,0 (12,7 - 602,8)
Pravastatina 30 (P30)	90,2 (0,4 - 670,8)	31,0 (0,7 - 485,1)
Leishmania30 (L30)	35,8 (0,4 - 609,0)	66,3 (0,4 - 434,6)
Leish/Prav30 (LP30)	8,7 (0,1 - 630,7) <sup>a,b</sup>	154,8 (4,2 - 351,8)
Pravastatina 90 (P90)	163,7 (0,3 - 339,4)	191,4 (0,2 - 425,7)
Leishmania90 (L90)	115,1 (24,9 - 292,2)	160,4 (20,2 - 284,3)
Leish/Prav90 (LP90)	153,0 (19,7 - 313,3)	59,1 (3,9 - 377,3)

\*ANOVA ou Kruskal-Wallis para a comparação entre os grupos e teste Student Neuman-Keuls ou Dunn para as múltiplas comparações. <sup>a</sup>Diferença significativa ( $p < 0,016$ ) na comparação com o grupo salina e com Leishmania30, <sup>b</sup>Diferença significativa ( $p < 0,049$ ) na comparação com o grupo salina e com Leish+Prav 90.