

**Universidade Federal de Minas Gerais**  
**Instituto de Ciências Biológicas**  
**Departamento de Bioquímica e Imunologia**  
**Laboratório de Bioquímica Nutricional**

**Luciana Rodrigues Fernandes**

**Belo Horizonte**  
**Minas Gerais**  
**Agosto – 2006**

**Luciana Rodrigues Fernandes**

**Influência da infecção por *Leishmania major* no  
perfil lipídico e aterogênese em camundongos  
deficientes em apoE**

Dissertação apresentada ao Departamento de Bioquímica e Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas/UFMG, como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Ciências: Área de concentração - Bioquímica

Orientadora: Jacqueline I. Alvarez-Leite

Belo Horizonte  
Minas Gerais  
Agosto - 2006

## Agradecimentos

A Deus, pela oportunidade da vida e por permitir que eu conheça uma pequena parte da sua maravilhosa criação.

À prof. Jacqueline, que me mostrou o caminho e, ao mesmo tempo, me tornou segura para segui-lo. Muito obrigada!

À Lu Portugal que, como boa líder, me direcionou nas pesquisas e, como boa amiga, me doou valores preciosos: paciência, tempo e conhecimento. Você é muito especial!

À Ju, pelo companheirismo, bom humor e boa vontade nos experimentos.

À Yani, pelo carinho e pela delicadeza do dia-a-dia

À Érica, Ana Cris, Luciano, Maysa, Tati, Dani, Sabrina, Lu Enéas, Eliane, Marina e Paulo, pela convivência no laboratório e nos *Happys*.

Ao Lab. de Gnotobiologia e Imunologia, Prof. Leda, Virgínia e Cláudia, pelas culturas de *Leishmania* e por colaborarem com o meu trabalho. Em especial ao Helton, pela valiosa e imprescindível contribuição nos experimentos e pela disponibilidade em solucionar minhas dúvidas.

Ao IMPAR pela boa acolhida durante os experimentos.

À Maria Helena, pela competência e cuidado com os animais e o biotério, além de ser fonte de boas gargalhadas.

À Joana, porque além de conceber a idéia deste trabalho, me ajudou a torná-lo real;

À Dani, por compartilhar comigo o aprendizado, os trabalhos, o sofrimento nos experimentos errados e a alegria no final da nossa conquista.

À eterna comissão, Ana, Sílvia, André e Janis pela descontração, brincadeiras e risos, pois sem isto seria muito mais difícil chegar até aqui.

Ao Rodrigo Guabiraba, pelo imenso carinho, amizade, por estar sempre presente na vida do Labin.

À Ellen, Bruno, Bruna e Gu, por acreditarem e confiarem em mim, até mais que eu mesma. Este incentivo e amizade foram fundamentais em todas as etapas desta conquista. Amo vocês!

Ao Rodrigo, meu lindo, pelo amor, por estar sempre ao meu lado, mesmo quando está distante. Seu apoio e carinho foram essenciais durante esta caminhada.

Ao Rafa e Matheus que não me ajudaram em nada na pesquisa, mas me ensinaram a rir de tudo. Valeu!

À minha grande e maravilhosa família, que participou e torceu por mais uma conquista.

Ao meu pai, minha mãe e Mila, que são a base de tudo. A dedicação e o amor de vocês fizeram deste sonho uma realidade. Esta conquista é nossa! Amo MUITO vocês!!!

---

## Sumário

<b>Lista de Abreviaturas e Siglas .....</b>	<b>i</b>
<b>Lista de Figuras .....</b>	<b>iii</b>
<b>Lista de Quadro e Tabelas .....</b>	<b>v</b>
<b>Resumo .....</b>	<b>vi</b>
<b>Abstract.....</b>	<b>viii</b>
<b>1. Introdução .....</b>	<b>1</b>
1.1. Metabolismo de lipídeos e lipoproteínas .....	2
1.2. Aterosclerose .....	6
1.3. Aterosclerose e infecção .....	19
1.3.1. <i>Leishmania major</i> .....	21
1.4. Camundongos como modelos experimentais .....	25
<b>2. Objetivos .....</b>	<b>27</b>
2.1. Objetivo geral .....	27
2.2. Objetivos específicos .....	27
<b>3. Materiais e métodos .....</b>	<b>28</b>
3.1. Animais experimentais .....	28
3.2. Estratégia Experimental .....	29
3.3. Infecção com <i>Leishmania major</i> .....	29
3.4. Acompanhamento do desenvolvimento da lesão provocada por <i>L. major</i> .....	30
3.5. Quantificação dos parasitas na pata .....	30
3.6. Amostras de sangue.....	31
3.6.1. <i>Determinação dos níveis de colesterol total</i> .....	31
3.6.2. <i>Determinação de colesterol HDL e colesterol das         frações aterogênicas</i> .....	32
3.6.3. <i>Determinação dos níveis de triglicerídeos</i> .....	32
3.7. Dosagens de colesterol e lipídeos totais hepáticos .....	32
3.8. Dosagens de colesterol e lipídeos do conteúdo cecal ....	33
3.9. Avaliação das lesões ateroscleróticas no coração .....	34

---

3.10. Avaliação do infiltrado inflamatório na raiz aórtica .....	34
3.11. Quantificação de colágeno nas lesões ateroscleróticas	35
3.12. Avaliação da deposição lipídica na aorta torácica e abdominal .....	35
3.13. Extração de DNA .....	35
3.14. Avaliação para presença de <i>L. major</i> .....	36
3.15. Análise estatística dos dados .....	37
<b>4. Resultados .....</b>	<b>38</b>
4.1. Infecção por <i>L. major</i> e quantificação do parasita .....	38
4.2. Consumo alimentar e crescimento dos animais .....	38
4.3. Colesterol .....	41
4.3.1. <i>Colesterol total</i> .....	41
4.3.2. <i>Colesterol HDL e frações aterogênicas</i> .....	41
4.3.3. <i>Lipídeos e colesterol do conteúdo cecal</i> .....	43
4.3.4. <i>Lipídeos e colesterol hepático</i> .....	43
4.4. Triglicerídeos .....	45
4.4.1. <i>Triglicerídeo sérico</i> .....	45
4.4.2. <i>Triglicerídeo do conteúdo cecal</i> .....	45
4.4.3. <i>Triglicerídeo hepático</i> .....	45
4.5. Placa aterosclerótica .....	46
4.5.1. <i>Aorta torácica e abdominal</i> .....	46
4.5.2. <i>Lesão na válvula aórtica</i> .....	46
4.6. Infiltrado inflamatório .....	49
4.7. Quantificação de colágeno na lesão aterosclerótica .....	52
4.8. Avaliação da presença de <i>L. major</i> .....	52
<b>5. Discussão .....</b>	<b>55</b>
<b>6. Perspectivas .....</b>	<b>63</b>
<b>7. Referência Bibliográfica .....</b>	<b>64</b>
<b>8. Anexo .....</b>	<b>75</b>
8.1. Parecer do Comitê de ética em experimentação animal - CETEA .....	75

## Lista de Abreviaturas e Siglas

µg	Micrograma
µL	Microlitros
µm	Micrômetros
ABCA-1	Cassete de transporte-1 ligado a adenosina trifosfato
ACAT	Acil-coenzima A: colesterol aciltransferase
AIN	Instituição Americana de Nutrição
Apo	Apoproteína
ApoB-100	Apoproteína B-100
ApoB-48	Apoproteína B-48
ApoC	Apoproteína C
ApoE	Apoproteína E
ApoE <sup>-/-</sup>	Deficiência para apoE
APR	Resposta à fase aguda
BHT	Butil hidróxitolueno
CETP	Proteína de transferência de éster de colesterol
CMV	<i>Citomegalovírus</i>
CRP	Proteína C reativa
DC	Célula dendrítica
DNA	Ácido desoxirribonucléico
EDTA	Ácido etileno diamino tetraacético
ELISA	Ensaio imuno adsorvente ligado à enzima
H&E	Hematoxilina e eosina
HDL	Lipoproteína de alta densidade
HL	Lipase hepática
HMG-CoA	hidroximetilglutaril-CoA
HSP	Proteína de choque térmico
ICAM-1	Molécula-1 de adesão intercelular
IDL	Lipoproteína de densidade intermediária
IFN	Interferon
IL	Interleucina

iNOS	Óxido nítrico sintase indutível
LCAT	Lecitina: colesterol acil transferase
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
LDLox	Lipoproteína oxidada
LPL	Lipase lipoprotéica
MCP	Proteína quimiotática para monócitos
M-CSF	Fator estimulador de colônia de macrófago
mmLDL	LDL minimamente oxidada
NK	Células matadoras naturais “natural killer”
nm	Nanômetros
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintase
°C	Grau centígrado
PBS	Salina tamponada com fosfato
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PV	Vacúolo parasitóforo
QM	Quilomícron
QMr	Quilomícron remanescente
RNA	Ácido ribonucléico
ROS	Espécies reativas ao oxigênio
RPM	Rotações por minuto
RCT	Transporte reverso de colesterol
SAA	Proteína sérica amilóide
SMC	Célula muscular lisa
SRA-I	Receptor <i>scavenger-A I</i>
TG	Triglicerídeos
Th1	Resposta celular do tipo 1
Th2	Resposta celular do tipo 2
TNF	Fator de necrose tumoral
VCAM-1	Molécula-1 de adesão da célula vascular
VLDL	Lipoproteína de muito baixa densidade
VLDLr	Receptor de VLDL

## Lista de Figuras

Figura 1 – Metabolismo de lipoproteínas. ....	5
Figura 2 - Infiltração da LDL na artéria e formação de célula espumosa. ....	11
Figura 3 - Papel do macrófago na inflamação da artéria. ....	11
Figura 4 - Efeito da ativação de células T na inflamação da placa aterosclerótica. ....	14
Figura 5 - Composição celular da placa aterosclerótica. ....	16
Figura 6 - Ativação da placa, ruptura e trombose. ....	16
Figura 7 - Representação simplificada do processo aterosclerótico e da estabilidade das lesões. ....	18
Figura 8 – Ciclo de vida de <i>Leishmania major</i> . ....	22
Figura 9 – Modelo do desenvolvimento da resposta Th1/Th2. ....	24
Figura 10 – Curva de infecção de animais apoE <sup>-/-</sup> e C57BL/6 infectados com <i>L. major</i> . ....	39
Figura 11 – Quantificação de parasitas de animais apoE <sup>-/-</sup> e C57BL/6 infectados com <i>L. major</i> . ....	39
Figura 12 - Consumo alimentar semanal dos animais apoE <sup>-/-</sup> controles e infectados com <i>L. major</i> . ....	40
Figura 13 - Evolução ponderal dos animais apoE <sup>-/-</sup> controles e infectados com <i>L. major</i> . ....	40
Figura 14 – Porcentagem de deposição lipídica em aorta torácica e abdominal dos animais apoE <sup>-/-</sup> controle e infectado com <i>L. major</i> . .....	47
Figura 15 – Aspecto histológico da aorta torácica e abdominal dos animais apoE <sup>-/-</sup> controle e infectado com <i>L. major</i> . ....	47
Figura 16 – Área da lesão aterosclerótica dos animais apoE <sup>-/-</sup> controle e infectado com <i>L. major</i> . ....	48
Figura 17 - Aspecto histológico da raiz da aorta dos animais apoE <sup>-/-</sup> controles e infectados com <i>L. major</i> . ....	48
Figura 18 - Infiltrado inflamatório dos animais apoE <sup>-/-</sup> controle e infectado com <i>L. major</i> . ....	50

Figura 19 - Aspecto histológico do infiltrado inflamatório dos animais apoE <sup>-/-</sup> controle.....	51
Figura 20 - Aspecto histológico do infiltrado inflamatório dos animais apoE <sup>-/-</sup> infectados com <i>L. major</i> .....	51
Figura 21 - Colágeno dos animais apoE <sup>-/-</sup> controle e infectado com <i>L. major</i> .....	53
Figura 22 - Aspecto histológico do conteúdo colágeno dos animais apoE <sup>-/-</sup> controles e infectados com <i>L. major</i> .....	53
Figura 23 – Produtos de PCR obtidos de DNA de baço, coração e fígado de animais apoE <sup>-/-</sup> controles e infectados com <i>L. major</i> . ....	54

## **Lista de Quadro e Tabelas**

Quadro 1 – Fatores de risco que contribuem para o desenvolvimento da aterosclerose.....	7
Tabela 1 - Composição da dieta .....	28
Tabela 2 – Colesterol total e frações.....	42
Tabela 3 – Concentração de triglicerídeos séricos, lipídeos totais, colesterol e triglicerídeos do conteúdo cecal e fígado .....	44

## Resumo

A aterosclerose é uma doença inflamatória crônica da parede arterial, induzida por distúrbios do metabolismo lipídico, com presença de células e elementos fibrosos nas grandes e médias artérias. Paralelamente a fatores de risco tradicionais, agentes infecciosos estão sendo relacionados à aterosclerose. Alguns trabalhos demonstram o envolvimento de vírus, bactérias e, mais recentemente, protozoários na aterogênese. A infecção com *Leishmania major* apresenta uma resposta imune pró-inflamatória (perfil Th1) em animais resistentes. Diferente da infecção com outros parasitas, *L. major* provoca uma doença local e resolvida pelos camundongos resistentes. O objetivo deste trabalho foi verificar se este tipo de infecção interfere no metabolismo lipídico e no desenvolvimento da aterosclerose. Animais deficientes em apoE<sup>-/-</sup> foram divididos em dois grupos: controle e infectado com *L. major*. O experimento teve duração de 6 semanas. Nossos resultados mostraram que animais infectados com *L. major* foram capazes de aumentar o colesterol total e suas frações aterogênicas e não aterogênicas, além de diminuir os níveis de triglicerídeos séricos e hepáticos. Em relação à aterogênese, o grupo infectado com *L. major* aumentou o tamanho da placa aterosclerótica quando comparado ao grupo controle. O aumento da lesão foi acompanhado por um maior número de células inflamatórias na região da lesão nos camundongos com *L. major*. A quantidade de colágeno foi similar entre os dois grupos. Com intuito de verificar se o aumento do infiltrado inflamatório estava relacionado com a presença do parasita na área do ateroma e a possibilidade de uma visceralização da doença, foi realizada a busca, por meio de PCR, de DNA específico de *L. major* no baço, fígado e tecido cardíaco de animais infectados. A presença de *L. major* foi observada no coração de camundongos infectados com *L. major*. Não foi detectada a presença de *L. major* no baço e fígado, descartando a hipótese de visceralização, e evidenciando a

possibilidade do recrutamento de macrófagos infectados para a área da lesão aterosclerótica, que é um foco de inflamação. Esta migração de macrófagos infectados pode ter agravado o estado inflamatório no ateroma, contribuindo para o aumento da lesão aterosclerótica. Em conclusão, a infecção provocada por *L. major*, em animais apoE<sup>-/-</sup>, apesar de não ser sistêmica e ser resolvida pelo animal, foi capaz de alterar o perfil lipídico e a aterogênese nestes animais.

## Abstract

Atherosclerosis is a chronic inflammatory disease that affects arterial walls, mainly induced by disturbances on lipid metabolism, characterized by the presence of cells and fibrotic elements in large and medium arteries. Besides traditional risk factors, infectious agents are also related to atherosclerosis. Some consistent studies showed the involvement of virus, bacteria and, recently, protozoan in atherogenesis. *Leishmania major* infection induces a pro-inflammatory immune response (Th1 profile) in resistant animals. Different from infection with other parasites, *L. major* elicits a local and self-limited disease in C57BL/6 resistant mice. The aim of the present work was investigate the possible effects of *L. major* infection on lipid metabolism and on the development of atherosclerosis. For that, ApoE<sup>-/-</sup> deficient mice were distributed in control and *L. major* infected groups. Our results showed that *L. major* infected mice presented an increase in serum total cholesterol as well as in atherogenic and non-atherogenic fractions, associated to the decrease of serum and hepatic triglycerides levels. Concerning atherogenesis, *L. major* infected group showed an increase in atherosclerotic lesion when compared to the control group. The increase in lesion area was associated to higher levels of inflammatory cells in the lesion site of infected mice. Collagen quantification was similar in both groups. Specific *L. major* DNA was detected in the heart of infected mice, highlighting the possibility of infected-macrophages recruitment to the atherosclerotic lesion area. The visceral form of the disease was discarded, as confirmed by the absence of *L. major* in spleen and liver. We suggested that the migration of activated macrophages to the lesion site aggravated the inflammatory status and contributed for the atherosclerosis development. In conclusion, infection caused by *L. major* in apoE<sup>-/-</sup> mice, although not showing an important inflammatory systemic

response, was able to alter the lipid profile and accelerate atherogenesis in these animals.

## 1. INTRODUÇÃO

Doenças cardiovasculares (DVCs) são responsáveis pela morte de 17 milhões de pessoas por ano. Em 2010, é esperado que DVCs representem 31% das mortes de todo mundo (WHO). Este aumento é devido à grande prevalência de obesidade e diabetes em países ricos, mas principalmente ao aumento da incidência de DCVs em países em desenvolvimento, sendo que 82% do futuro aumento de casos de DCV irão acontecer nestes países. Este crescente índice nos países em desenvolvimento deve-se à transição econômica, urbanização, industrialização e globalização, que provocam mudanças no estilo de vida, acarretando a doença cardiovascular.

Dados brasileiros mostram que, em 2000, as DCV foram responsáveis pela principal alocação de recursos públicos em hospitalizações e foram a terceira causa de permanência hospitalar prolongada. Entre 1991 e 2000, os custos hospitalares atribuídos às DCV aumentaram cerca de 176% (Santos, 2001).

A principal causa da doença cardiovascular é a aterosclerose, que tem como origem primária alterações no metabolismo de lipídeos e a conseqüente hiperlipidemia. A aterosclerose está fortemente associada a um estado inflamatório que pode ser perpetuado por uma infecção.

Para saber como este processo ocorre, é preciso, primeiramente, entender o metabolismo dos lipídeos e das lipoproteínas.

## 1.1. Metabolismo de lipídeos e lipoproteínas

Os lipídeos celulares são fundamentais, não só como fonte de energia para a célula, mas também como componente estrutural da membrana celular (Alvarez-Leite & Peluzio, 2003). Estes compostos, com atividades físico-químicas diferentes, são representados principalmente por triglicerídeos (TG), fosfolipídeos e colesterol esterificado e livre (Stein & Myers, 1994).

Devido à natureza hidrofóbica das gorduras neutras, triglicerídeos e ésteres de colesterol, o mecanismo de transporte e distribuição dos lipídeos no plasma não seria possível sem alguma forma de adaptação hidrofílica. Os lipídeos são transportados por lipoproteínas, que são constituídas por um núcleo de lipídeos (TG, colesterol esterificado e vitaminas lipossolúveis) e uma camada externa de fosfolipídeos e proteínas (Alvarez-Leite *et al.*, 2003). Essas proteínas são denominadas de apolipoproteínas (apo) e exercem várias funções fisiológicas no metabolismo de lipoproteínas, dentre as quais: agir como cofatores para enzimas, ligar-se em receptores da superfície celular, contribuir para a solubilização dos lipídeos, além da função estrutural para a biossíntese das lipoproteínas (Rader & Wilson, 1995).

As lipoproteínas diferem quanto à composição química, tamanho e mobilidade eletroforética, porém sua classificação se baseia na densidade. As principais classes de lipoproteínas, quanto a este quesito, são: quilomícrons (QM), lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL), lipoproteínas de densidade intermediária (IDL), lipoproteínas de baixa densidade (LDL) e lipoproteína de alta densidade (HDL) (Scartezini *et al.*, 1997); (Rader & Wilson, 1995).

No metabolismo das lipoproteínas, exibido na Figura 1, os lipídeos da dieta, após digestão e absorção, são transportados na linfa na forma de quilomícrons. Os QM apresentam apoB-48 e apoE como principais apolipoproteínas. Essas lipoproteínas penetram inicialmente pelo ducto torácico para, em seguida, alcançarem a

circulação sistêmica. Poucas horas após a alimentação, os triglicerídeos nos QM são hidrolisados pela enzima endotelial lipase lipoprotéica (LPL), presente nas capilares dos tecidos periféricos. A hidrólise dos TG pela LPL, que requer a apoCII como cofator, libera ácidos graxos. Estes podem ser utilizados como fonte de energia ou para nova síntese de TG no tecido adiposo. Os quilomícrons resultantes, chamados QM remanescentes, são removidos da circulação pelo fígado por meio de um processo que envolve a ligação de apoE com seu receptor hepático (Alvarez-Leite *et al.*, 2003; Rader & Wilson, 1995; Scartezini *et al.*, 1997).

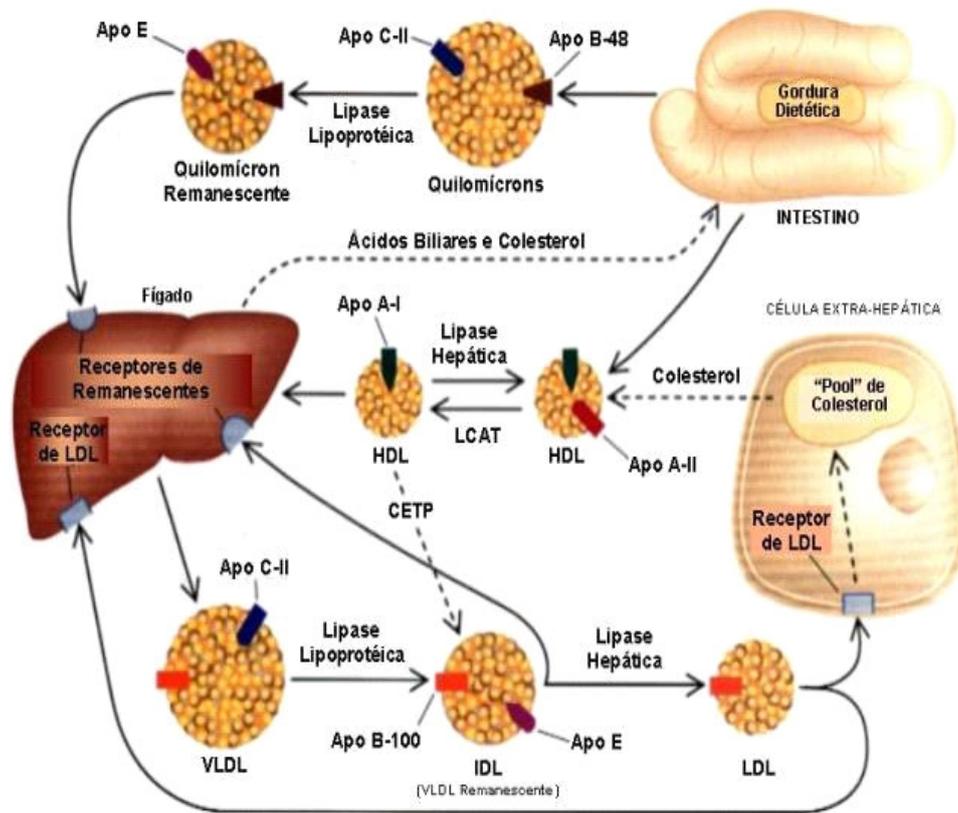
O fígado empacota os lipídeos e os secreta diretamente no sangue na forma de VLDL, lipoproteínas ricas em TG, cuja principal apolipoproteína é uma forma de apoB, denominada apoB-100. Analogamente aos quilomícrons, a VLDL é reduzida de TG por ação da LPL, originando um remanescente mais denso, a IDL. Esta contém quantidades iguais de colesterol e TG, e as principais apolipoproteínas presentes são apoB-100 e apoE. A IDL tem dois destinos: é captada da circulação pelo fígado, pela interação das apoproteínas com receptores hepáticos, ou é processada pela lipase hepática e se transforma em LDL (Alvarez-Leite *et al.*, 2003; Rader & Wilson, 1995).

A LDL é a principal condutora de colesterol na circulação humana. Transporta ésteres de colesterol e vitamina E para os tecidos periféricos, cujas membranas apresentam os receptores de LDL (B/E) que reconhecem a apoB-100. Além disso, significativa quantidade de LDL do plasma é eventualmente removida da circulação pelo fígado, também por interação apoB-100/receptor B/E. A entrada de LDL na célula é seguida por um ataque lisossomal, com conseqüente hidrólise da apoB-100 e do colesterol esterificado. O aumento da concentração intracelular de colesterol livre apresenta os seguintes efeitos regulatórios: 1) inibição da enzima hidroximetilglutaril-CoA (HMG-CoA) redutase, impedindo a síntese de colesterol; 2) inibição da síntese de receptores de LDL; 3) estímulo da enzima acil-CoA colesterol aciltransferase (ACAT)

para esterificação do colesterol citoplasmático (Alvarez-Leite *et al.*, 2003; Rader & Wilson, 1995).

Não existe uma via de catabolismo de colesterol, sendo este eliminado pelo fígado como sais biliares secretados na bile. O transporte reverso de colesterol (RTC) consiste na remoção do excesso de colesterol livre dos tecidos periféricos para o fígado, acarretando em metabolismo e excreção. Este processo é mediado pela HDL, que possui como principais apolipoproteínas a apoA-I e apoA-II. O colesterol livre, em contato com a HDL nascente, é substrato para a enzima plasmática lecitina:colesterol aciltransferase (LCAT), resultando na formação de éster de colesterol e no aumento da HDL. O colesterol esterificado pode ser transferido para lipoproteínas que contêm apoB, como a LDL, pela proteína de transferência de éster de colesterol (CETEP), e retornado para o fígado pelo receptor de LDL. A HDL ainda pode liberar colesterol diretamente para o fígado (Alvarez-Leite *et al.*, 2003; Rader & Wilson, 1995).

As lipoproteínas podem ser aterogênicas ou anti-aterogênicas, dependendo de sua composição e propriedades fisiológicas. O mais conhecido efeito protetor da HDL na aterosclerose é a sua propriedade de retirar o excesso de colesterol das células periféricas para o fígado, no transporte reverso de colesterol. Entretanto, a HDL também desempenha importante papel como antioxidante e na função endotelial (Assmann & Gotto, 2004). Por sua vez, a LDL possui propriedades aterogênicas, visto que há evidente associação entre elevados níveis de LDL e o aumento da aterosclerose. Conforme já citado, a LDL funciona como fonte de colesterol para os tecidos extra-hepáticos. Este sistema de liberação de colesterol pela LDL nas células é delicadamente balanceado para satisfazer as necessidades de colesterol intracelular e evitar seu acúmulo. Infelizmente, esta regulação pode ser perdida, causando modificações clínicas observadas no desenvolvimento da aterosclerose.



**Figura 1 – Metabolismo de lipoproteínas.**

O intestino absorve os lipídeos da dieta em quilomícrons que contêm apoB-48. Lipase lipoprotéica, com seu cofator apoC-II, hidrolisa os QM que são captados pelo fígado pela ligação da apoE. O fígado secreta os lipídeos como VLDL com apoB-100. VLDL é hidrolisada em IDL, a qual pode ser captada pelo fígado. IDL também pode sofrer hidrólise pela lipase hepática e se tornar LDL. Células hepáticas e periféricas removem a LDL da circulação quando apoB-100 se liga ao receptor de LDL. HDL remove o excesso de colesterol das células para o fígado para excreção na bile. O metabolismo das lipoproteínas está simbolizado por linhas sólidas. O transporte de colesterol, quando não contido nas lipoproteínas, está indicado por linhas pontilhadas. Traduzido de (Rader & Wilson, 1995)

## 1.2. Aterosclerose

A aterosclerose é uma doença inflamatória crônica da parede arterial, induzida por distúrbios do metabolismo lipídico, com presença de células (macrófagos, células T, B, musculares lisas e dendríticas) e elementos fibrosos nas grandes e médias artérias (Jonasson *et al.*, 1986; Libby, 2002; Ross, 1999). Vários são os fatores que podem promover a aterosclerose (Quadro 1). Alguns fatores de risco tais como, tabagismo, diabetes mellitus e hipertensão estão bem estabelecidos na literatura. Entretanto, outro fator, como a infecção, é alvo de muitos estudos contraditórios, e a busca do possível papel de agentes infecciosos no desenvolvimento da aterosclerose tem sido foco de inúmeras pesquisas.

Embora qualquer artéria possa ser afetada, os principais alvos da aterosclerose são a aorta e as artérias coronárias e cerebrais. Como consequência clínica, há o infarto do miocárdio, a isquemia cerebral e o aneurisma aórtico (Alvarez-Leite *et al.*, 2003).

Os passos iniciais para o desenvolvimento da aterosclerose são a infiltração e retenção da LDL na matriz subendotelial, seu subsequente acúmulo e captação pelos macrófagos. Este evento acontece devido a uma ativação focal no endotélio das artérias, causada por uma hipercolesterolemia (Hansson, 2005; Skalen *et al.*, 2002). Os macrófagos repletos de colesterol são chamados células espumosas (*foam cell*), que são as unidades básicas da lesão aterosclerótica. Em adição a LDL, outras lipoproteínas contendo apoB, chamadas lipoproteína(a) e remanescentes, podem acumular-se na camada íntima e promover a aterosclerose (Lusis, 2000).

**Quadro 1 – Fatores de risco que contribuem para o desenvolvimento da aterosclerose.**

<b>Fatores de risco da aterosclerose</b>
<b><i>Não modificáveis</i></b>
Idade
Etnia
Gênero (masculino)
História familiar
<b><i>Modificáveis pela mudança do estilo de vida</i></b>
Dieta com alta quantidade de gordura saturada e colesterol, e baixa quantidade de frutas, vegetais e grãos
Obesidade
Sedentarismo
Tabagismo
<b><i>Modificáveis por drogas</i></b>
Dislipidemias
Hipertensão
<b><i>Não tradicionais</i></b>
Elevados níveis de lipoproteína (a)
Elevados níveis de homocisteína
Agentes infecciosos

Fonte: (Scott, 2004)

A LDL nativa não é captada pelos macrófagos para iniciar o processo aterosclerótico. Goldstein *et al.* (1979) foram os primeiros a propor que uma modificação da LDL, por exemplo, a oxidação, seria pré-requisito para a captação pelo macrófago e desenvolvimento da placa.

A oxidação da LDL parece ocorrer em dois estágios: o primeiro acontece antes que os monócitos sejam recrutados e resulta na oxidação dos lipídeos da LDL, com pequena alteração na apoB (Berliner *et al.*, 1995). Neste estágio, a LDL apresenta-se minimamente oxidada (mmLDL) e estimula as células endoteliais a produzirem moléculas pró-inflamatórias, incluindo moléculas de adesão e fatores de crescimento, como o fator estimulador de colônia de macrófago (M-CSF) (Lusis, 2000).

O segundo estágio de oxidação começa quando monócitos são recrutados para a lesão e convertidos em macrófagos, os quais contribuem com sua enorme capacidade oxidativa. Nesta fase, os lipídeos da LDL são adicionalmente oxidados e a parte protéica da LDL também é modificada, o que impede o reconhecimento da lipoproteína pelo receptor de LDL, tornando-a reconhecível apenas pelos receptores *scavengers* ou removedores, presentes nos macrófagos e células musculares lisas (Berliner *et al.*, 1995) (Figura 2). Os receptores *scavengers*, tais como SRA-I, SRA-II e CD36, não sofrem regulação negativa, isto é, sua expressão não é dependente do conteúdo intracelular de colesterol. O resultado é o grande acúmulo de colesterol e a formação de células espumosas, originando a primeira lesão da aterosclerose: a estria gordurosa.

A disfunção endotelial provocada pela hipercolesterolemia leva ao recrutamento focal de monócitos e linfócitos, uma das primeiras respostas vasculares detectáveis na formação da lesão aterosclerótica. Este recrutamento é controlado pelas moléculas de adesão, que são expressas no endotélio e nas células de defesa, circulantes na corrente sanguínea (Nakashima *et al.*, 1998).

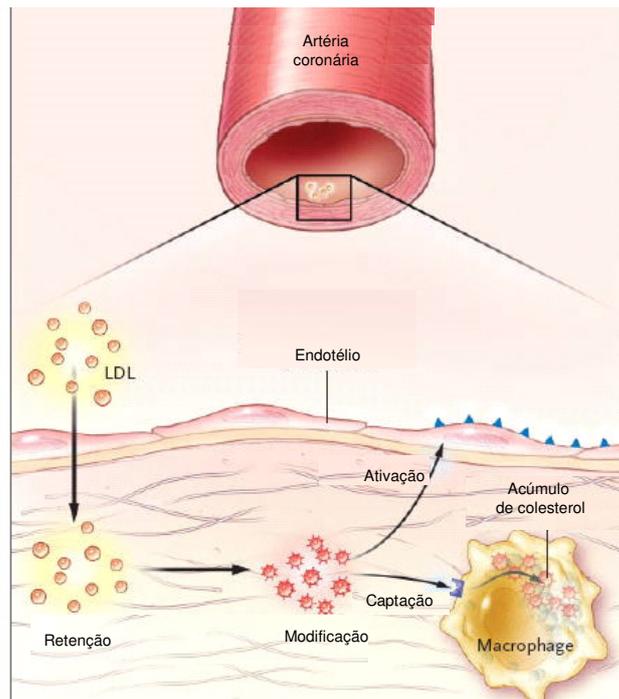
Dentre as moléculas de adesão, as selectinas, como E-selectina e P-selectina, medeiam o rolamento inicial de células inflamatórias ao longo do endotélio (Dong *et al.*, 1998). A adesão firme de monócitos e células T ao endotélio pode ser realizada pelas interações entre as integrinas LFA-1 e Mac-1 e moléculas-1 de adesão intercelular (ICAMs-1), e entre a integrina VLA-4 e a molécula-1 de adesão da célula vascular (VCAM-1) (Cybulsky & Gimbrone, 1991; Ulbrich *et al.*, 2003),

A expressão de VCAM-1 precede a formação da lesão e seu aumento está correlacionado aos níveis de colesterol no plasma. Embora ICAM-1 seja a mais proeminente molécula de adesão no local da lesão, sua expressão é independente dos níveis de colesterol (Nakashima *et al.*, 1998). Interessantemente, a expressão de VCAM-1 pelo endotélio cessa depois de poucas semanas, mas as células musculares lisas começam a expressar esta molécula de adesão (Li *et al.*, 1993).

A distribuição desigual da expressão de moléculas de adesão corresponde à subsequente posição na qual as estrias gordurosas irão se formar. Este padrão irregular da distribuição, provavelmente, reflete as variações hemodinâmicas encontradas no fluxo sanguíneo. A força de cisalhamento (*shear stress*) e a turbulência do fluxo sanguíneo variam ao longo do vaso arterial. Regiões de ramificações e de forte curvatura do vaso, onde há aumento da força de cisalhamento e aumento da turbulência do fluxo, são áreas mais propensas à formação de aterosclerose (Hansson & Libby, 2006; Vanderlaan *et al.*, 2004).

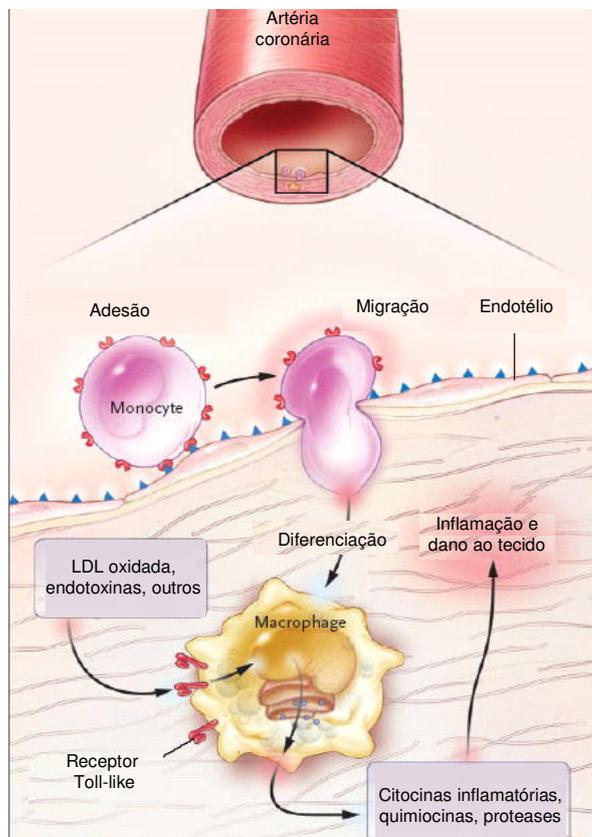
Embora o recrutamento de macrófago, induzido pelo fator de crescimento M-CSF, possa inicialmente servir como função protetora, por remover partículas de LDL oxidada ou células apoptóticas, o acúmulo progressivo e a ativação de macrófagos na parede do vaso são responsáveis por um importante passo para a formação da placa aterosclerótica (Berliner *et al.*, 1995; Hansson, 2005). A ativação do macrófago promove a liberação de citocinas, quimiocinas, proteases e radicais de oxigênio, e irá provocar mais

inflamação e dano ao tecido, contribuindo para o desenvolvimento da lesão (Figura 3). Tal ativação pode ser desencadeada por uma cascata de sinalização via receptores *Toll-like*, já que se sabe que estes receptores reconhecem LDL oxidada (Miller *et al.*, 2003).



**Figura 2 - Infiltração da LDL na artéria e formação de célula espumosa.**

Fonte: (Hansson, 2005)



**Figura 3 - Papel do macrófago na inflamação da artéria.**

Fonte: (Hansson, 2005)

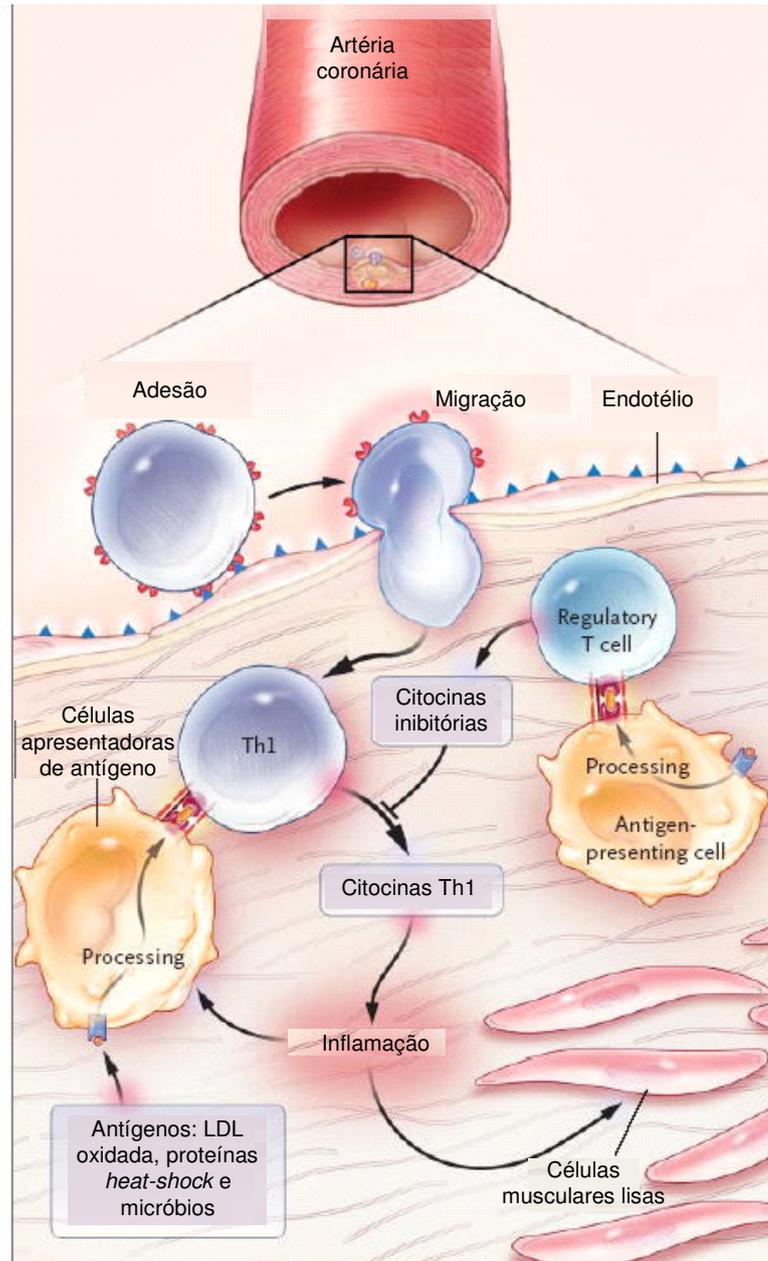
A resposta inflamatória é controlada pelo sistema imune, cujos componentes, como a célula T (predominantemente CD4+), são abundantes na placa aterosclerótica. Uma menor subpopulação de células T, células natural killer (NKT), se encontra nas lesões iniciais e é capaz de reconhecer antígenos lipídicos (Tupin *et al.*, 2004). Células T CD8+, restritas à apresentação de antígenos via MHC classe I, também estão presentes na lesão aterosclerótica (Roselaar *et al.*, 1996).

Na placa aterosclerótica, as respostas imunes são iniciadas quando células T CD4+ reconhecem antígenos apresentados por macrófagos e células dendríticas. Estes antígenos podem ser lipoproteínas oxidadas, proteínas do choque térmico (HSP) e microorganismos (Frostegard *et al.*, 1999). O reconhecimento ativa uma cascata que resulta na expressão de um conjunto de citocinas, moléculas de superfície celular e enzimas. Dois tipos de respostas podem ser elicitados: a resposta T helper tipo 1 (Th1) ativa macrófagos a iniciarem uma resposta inflamatória similar à hipersensibilidade tardia e possui funções na defesa contra patógenos intracelulares. A resposta T helper tipo 2 (Th2) provoca uma inflamação alérgica. A lesão aterosclerótica contém citocinas que promovem a resposta Th1 preferivelmente à resposta Th2 (Frostegard *et al.*, 1999; Hansson, 2005).

Células Th1 efectoras produzem ativadores de macrófagos, como interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ). O IFN- $\gamma$  melhora a eficiência da apresentação de antígenos e aumenta a síntese de citocinas inflamatórias, fator de necrose tumoral (TNF) e interleucina 1(IL-1). Além disto, IFN- $\gamma$  aumenta a produção de óxido nítrico, mediadores pró-trombóticos e vasoativos. Todos estes fatores tendem a promover a aterosclerose. Células T regulatórias modulam este processo pela secreção de citocinas antiinflamatórias, como IL-10 e TGF- $\beta$  (fator de transformação e crescimento-  $\beta$ ) (Hansson, 2005; Hansson & Libby, 2006), (Figura 4).

Estudos mostram um papel protetor, antiaterogênico, para a resposta Th2. Camundongos C57BL/6, propensos a resposta Th1, desenvolvem estrias gordurosas quando alimentados com dieta aterogênica, enquanto animais Balb/C, favoráveis a resposta Th2, são resistentes à aterogênese (Paigen *et al.*, 1985). A deleção de STAT6, fator de transcrição essencial para a diferenciação de células Th2, faz com que camundongos Balb/C tornem-se susceptíveis à aterosclerose (Huber *et al.*, 2001). Outro trabalho demonstra que a vacinação com HPS estimula a produção de citocinas antiinflamatórias, como a IL-10, no arco aórtico, reduzindo a lesão aterosclerótica (Maron *et al.*, 2002).

Estes estudos mostram como o sistema imune é um importante fator para modular o processo aterogênico. O atual paradigma na aterosclerose estipula que forças opostas da resposta Th1 e Th2 controlam o processo da doença (Daugherty & Rateri, 2002). Em apoio, estudos demonstram que células T regulatórias, que ativamente mantêm a tolerância imunológica (Sakaguchi, 2005), suprimindo tanto a resposta Th1 quanto a Th2 (Von Boehmer, 2005), são capazes de controlar o desenvolvimento da aterosclerose em camundongos (Ait-Oufella *et al.*, 2006).



**Figura 4 - Efeito da ativação de células T na inflamação da placa aterosclerótica.**

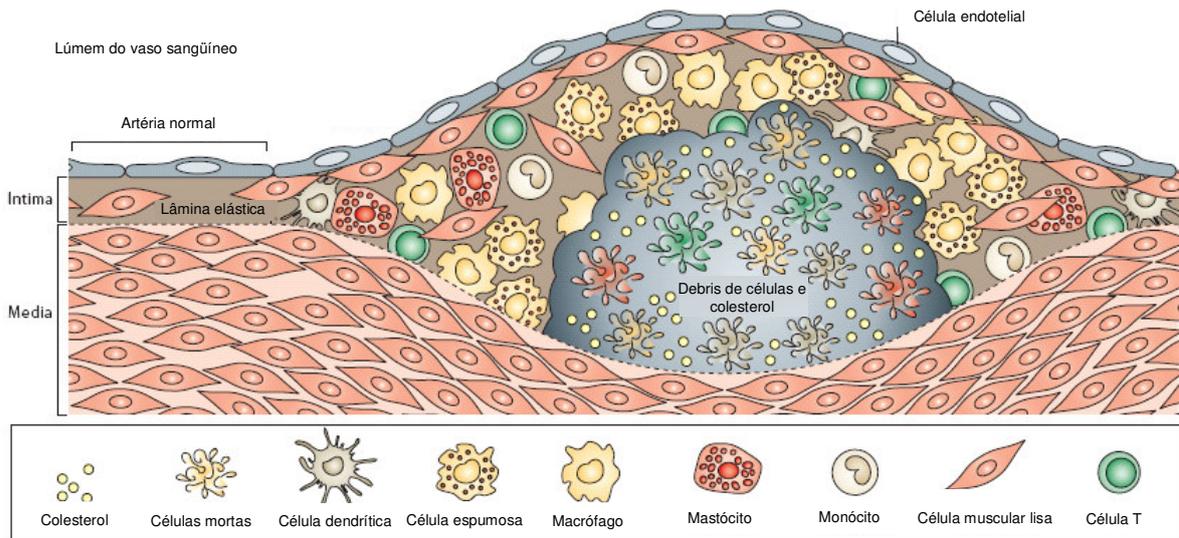
Fonte: (Hansson, 2005)

O acúmulo de células imunes e lipídeos na íntima ocorre durante o primeiro estágio da formação da placa. Estrias gordurosas são prevalentes em indivíduos jovens, nunca causam sintomas e podem progredir para uma lesão aterosclerótica madura ou desaparecer com o tempo (Hansson & Libby, 2006).

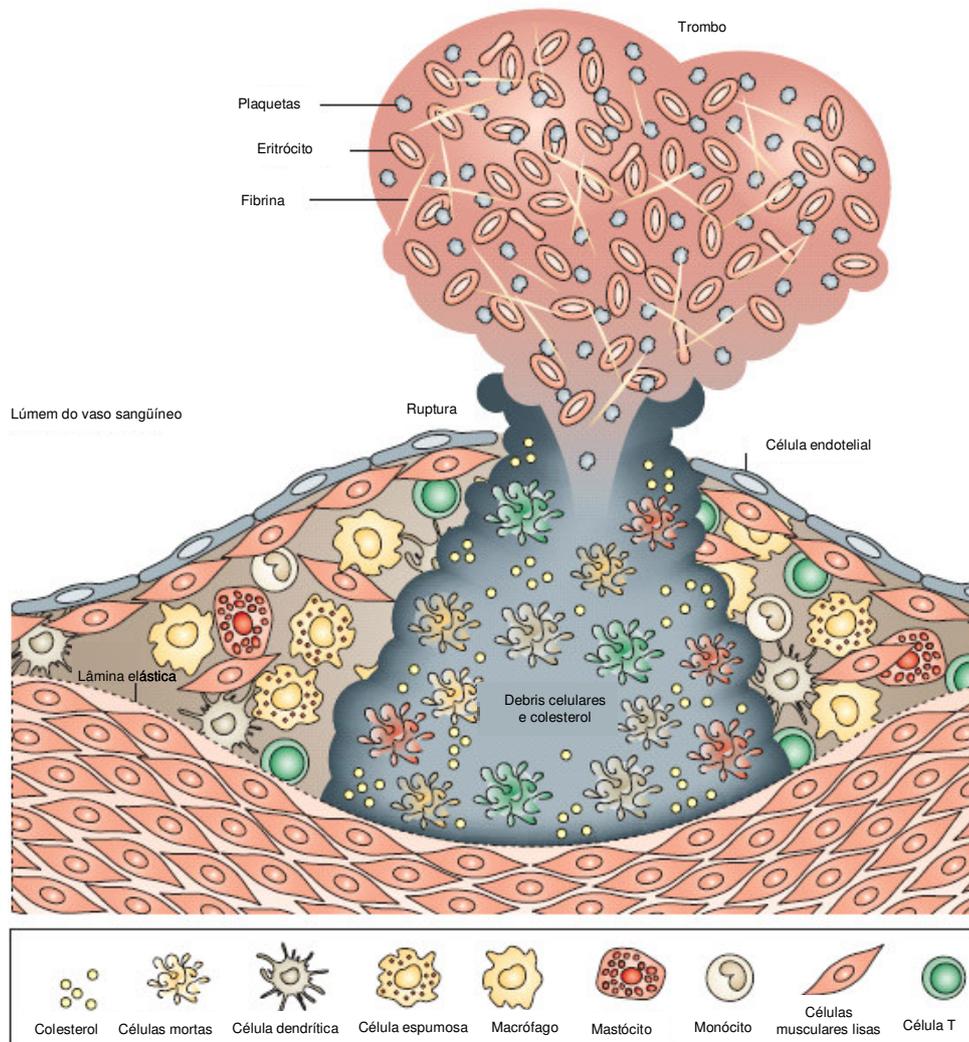
As lesões intermediárias são placas fibrogordurosas, que contêm os mesmos elementos celulares da lesão precoce. Entretanto, a proporção relativa de macrófagos carregados de lipídeos, células T e células musculares lisas pode variar. Estas lesões desenvolvem um núcleo de material rico em lipídeos, sugerindo que elas representam um precursor para lesões mais avançadas, as placas fibrosas (Ross, 1995).

Placas maduras ou fibrosas apresentam uma estrutura mais complexa. No centro da placa, estão presentes células espumosas, lipídeos extracelulares e células necróticas, envolvidos por uma capa de células musculares lisas e fibras de colágeno. Outros tipos celulares que formam a placa são células dendríticas (DC), mastócitos, poucas células B, e provavelmente células natural *killer* (NKT). Na interface da capa e do centro da placa, apresentam-se macrófagos e células T em abundância. (Hansson & Libby, 2006) (Figura 5). Calcificações são encontradas próximas ao centro necrótico. A capa fibrosa pode variar de espessura, sendo mais delgada nas regiões laterais e margens da lesão. A formação de lesões avançadas é usualmente associada a uma contínua diminuição na espessura da camada média da artéria, resultante da migração de células musculares lisas para a camada íntima durante a progressão da doença (Ross, 1995).

Embora lesões avançadas possam proporcionar sintomas de isquemia (fluxo sanguíneo insuficiente para órgãos e tecidos) como resultado de estreitamento progressivo do lúmen do vaso, o mais grave evento clínico que pode ocorrer é a ruptura da placa. Esta ruptura expõe material pró-trombótico na corrente sanguínea e causa oclusão trombótica. (Figura 6) (Hansson & Libby, 2006).

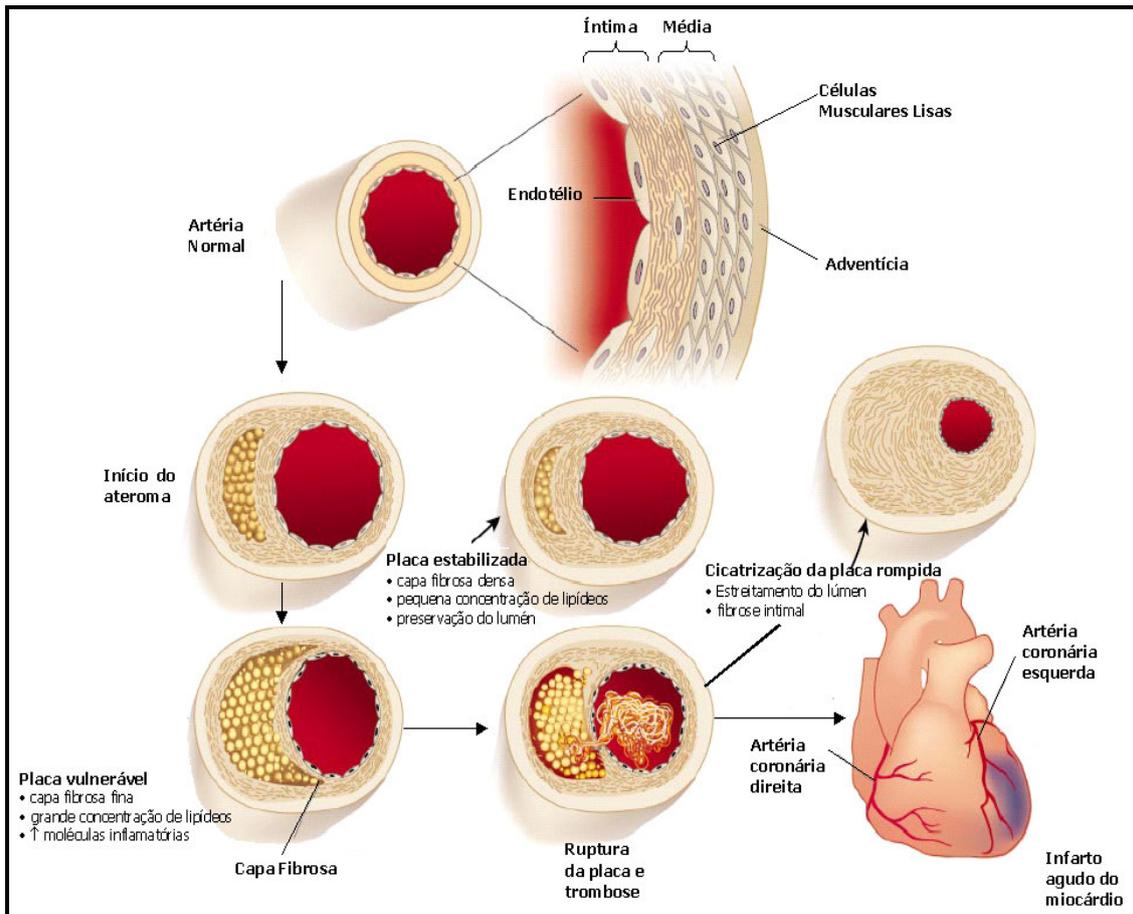


**Figura 5 - Composição celular da placa aterosclerótica.**  
 Fonte: (Hansson & Libby, 2006).



**Figura 6 - Ativação da placa, ruptura e trombose.**  
 Fonte: (Hansson & Libby, 2006)

O processo de ruptura da placa pode ser determinado pela estabilidade das placas ateroscleróticas. Lesões estáveis são mais resistentes à ruptura. Essas se caracterizam por SMC embebidas de densa matriz de colágeno, com baixo conteúdo de células inflamatórias e lipídeos no centro necrótico. Por outro lado, as regiões onde as lesões apresentam centro necrótico e um grande infiltrado de células inflamatórias, capa fibrosa frágil e fina, com pouca quantidade de colágeno, são mais susceptíveis à ruptura, caracterizando lesões instáveis (Davies *et al.*, 1993; Lee & Libby, 1997). A Figura 7 representa o desenvolvimento simplificado do desenvolvimento da lesão aterosclerótica.



**Figura 7 - Representação simplificada do processo aterosclerótico e da estabilidade das lesões.**

Fonte: (Libby, 2002)

### 1.3. Aterosclerose e infecção

Alguns autores sugerem que a aterosclerose deve ser considerada uma doença inflamatória crônica e que a infecção deve ter papel importante na perpetuação desse estado inflamatório (Kiechl *et al.*, 2001; Noll, 1998)

Estudos epidemiológicos sugerem que certos patógenos, tais como bactérias, vírus e protozoários contribuem para o processo aterosclerótico.

A associação entre a bactéria *Chlamydia pneumoniae* e a doença coronariana é muito mais evidenciada do que qualquer outro patógeno, com aproximadamente 40 estudos conduzidos por diferentes grupos (Mussa *et al.*, 2006). Esta associação é referenciada em estudos soropidemiológicos (Saikku, 1999) e de detecção direta deste organismo em lesões ateroscleróticas por imunohistoquímica (Kuo *et al.*, 1993; Kwon *et al.*, 2004), reação em cadeia da polimerase (PCR) (Kuo *et al.*, 1995; Rassa *et al.*, 2001) e microscopia eletrônica (Shi & Tokunaga, 2002). Em adição, *C. pneumoniae* viáveis foram encontrados na lesão de pacientes com doença cardiovascular (Ramirez, 1996).

Alguns pesquisadores demonstraram que a infecção com *C. pneumoniae* não acelera aterosclerose em apoE<sup>-/-</sup> (Aalto-Setälä *et al.*, 2001; Caligiuri *et al.*, 2001), mas que provoca uma redução da capa fibrosa, predispondo à instabilidade da placa (Ezzahiri *et al.*, 2003). Assim, mais estudos serão necessários para certificar se *C. pneumoniae* é encontrado por acaso no ateroma ou se está ativamente envolvido na iniciação ou progressão da doença aterosclerótica.

Desde o primeiro caso reportado em 1994 (Mendall *et al.*, 1994), há muitos estudos epidemiológicos associando *Helicobacter pylori* a doenças cardiovasculares. Embora esta associação possa ser teoricamente concebível, ainda precisa ser debatida sob o ponto de vista prático, pois os vários estudos epidemiológicos demonstram resultados conflitantes (Franceschi *et al.*, 2005).

Murray *et al.* (1995) não encontraram relação entre a infecção bacteriana de *H. pylori* e a aterosclerose, após a normalização para idade e classe social. Entretanto, Birnie *et al.* (1998) defendem que a infecção com *H. pylori* pode levar ao aumento do risco para DCV por mecanismos auto-imunes e que a intensidade da infecção e a extensão da resposta imune são mais importantes que apenas a infecção por si. Isto pode explicar, parcialmente, resultados contraditórios, que não relacionam a infecção com *H. pylori* com aterosclerose, pois investigam isoladamente a soropositividade para *H. pylori* como fator de risco.

Citomegalovírus (CMV) é o herpesvírus mais fortemente associado à aterosclerose (Danesh *et al.*, 1997; Roivainen *et al.*, 2000). Assim como associação com as bactérias, esta relação também é questionada. Em 1978, Fabricant *et al.* demonstraram evidências experimentais da contribuição da infecção viral na aterosclerose. Outros estudos relatam que a infecção por CMV pode iniciar ou acelerar a progressão do ateroma, por aumentar a expressão de vários genes pró-aterogênicos da aorta, como MCP-1, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ , envolvidos na resposta imune ou inflamatória em camundongos deficientes em apoE (Burnett *et al.*, 2004; Vliegen *et al.*, 2004). Por outro lado, segundo Saetta *et al.* (2000), não há evidências do envolvimento deste patógeno na aterogênese em humanos.

Um parasita também envolvido na aterogênese foi estudado por Doenhoff *et al.* (2002), que demonstraram que animais apoE<sup>-/-</sup> infectados com *Shistosoma mansoni* apresentaram redução tanto das lesões aterogênicas quanto dos níveis de colesterol sérico. A infecção helmíntica crônica pode atenuar o desenvolvimento de doenças cardiovasculares por elicitar uma resposta crônica do tipo 2, podendo modular a ativação de monócitos e aumentar a produção de quimiocinas, tais como IL-4, IL-10 e IL-13 no local da infecção (Magen *et al.*, 2005).

O primeiro protozoário envolvido com aterosclerose foi relatado por Sunnemark *et al.* (2000), que demonstraram que a

combinação da infecção pelo protozoário *Trypanosoma cruzi* com a dieta aterogênica pode induzir lesão aterosclerótica na íntima aórtica de animais CBA/J, normalmente resistentes à aterosclerose.

Em 2004, Portugal *et al.* revelaram que animais apoE<sup>-/-</sup> infectados por *Toxoplasma gondii* exibiram um aumento da lesão na válvula aórtica, independente dos níveis séricos de colesterol. Este fato foi justificado pelo processo inflamatório em si, assim como pela maior captação do colesterol pelas células infectadas, para o fornecimento de colesterol ao parasita.

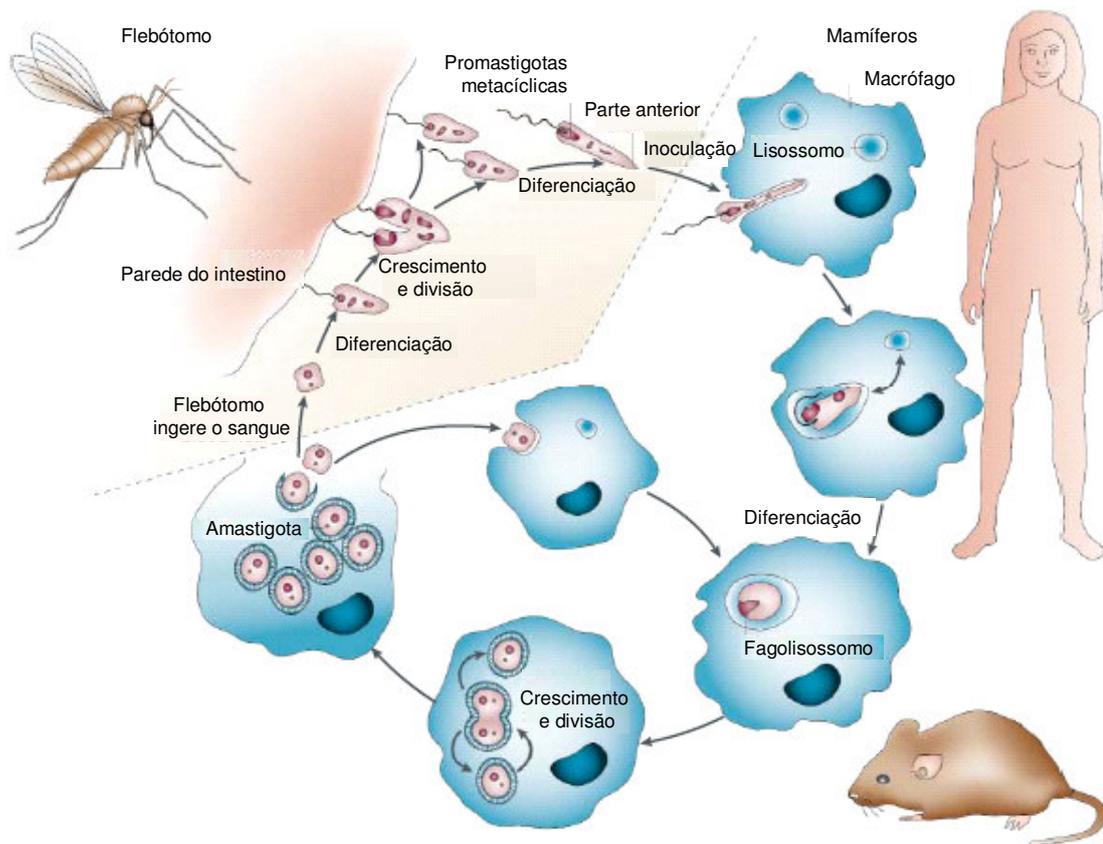
Analogamente ao *T. cruzi* e *T. gondii*, a infecção por *Leishmania major*, em camundongos C56BL/6, induz uma resposta pró-inflamatória.

### **1.3.1. *Leishmania major***

A infecção com patógenos do gênero *Leishmania* resulta em uma série de doenças designadas leishmanioses, a qual apresenta incidência anual de 2 milhões de casos em 88 países (WHO).

*Leishmania major* é transmitida pelo flebótomo, que inocula um pequeno número de promastigotas metacíclicas, forma infectiva, na pele do hospedeiro, (Figura 8).

A infecção com *L. major* em humanos e roedores leva ao desenvolvimento de uma lesão localizada cutânea, que cicatriza e gera imunidade à re-infecção. Entretanto, certas linhagens de camundongos, como BALB/c, falham em controlar esta infecção e desenvolvem uma lesão progressiva e uma doença sistêmica (Sacks & Noben-Trauth, 2002).



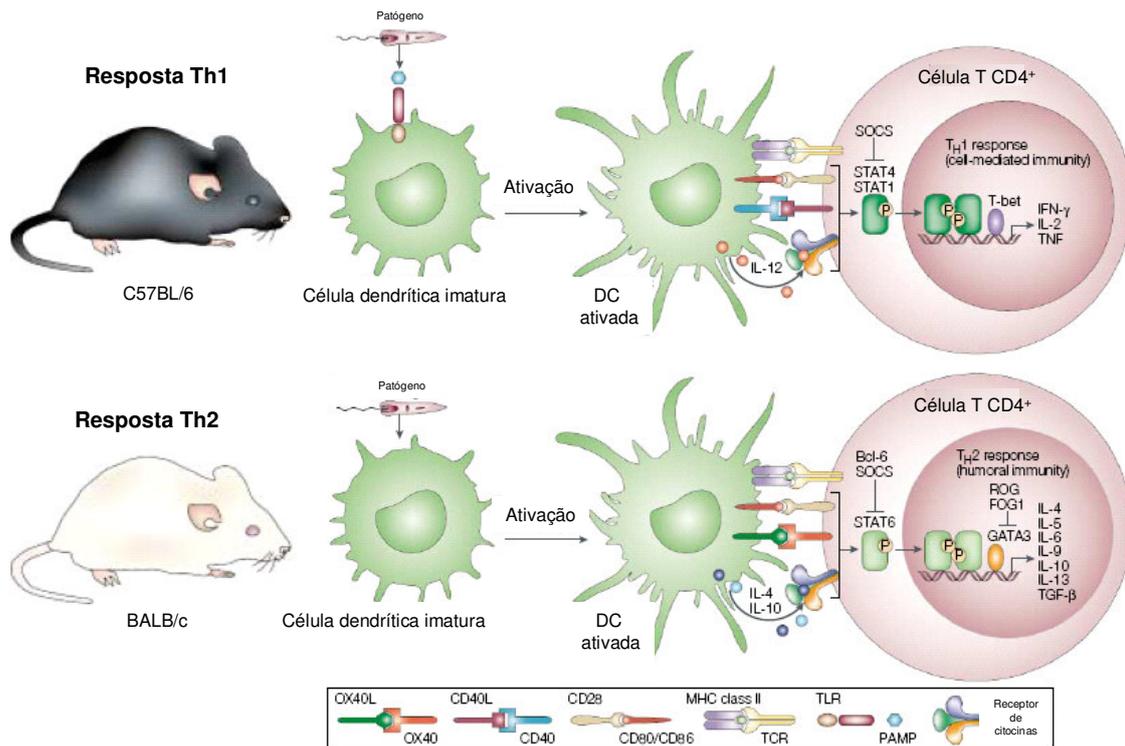
**Figura 8 – Ciclo de vida de *Leishmania major*.**

Parasitas são transmitidos pela picada de flebótomos fêmeas infectadas, a qual injeta promastigotas metacíclicas na pele. Essas formas são opsonizadas eficientemente pelos componentes do soro e captados pelos macrófagos. Nestas células o parasita reside em fagolisossomas e se diferenciam em amastigotas replicativas. Macrófagos são ingeridos pelo vetor durante o repasto sangüíneo, estas células são lisadas no intestino do inseto, liberando parasitas que se dividem rapidamente. As formas promastigotas não infectivas passam por um processo na parede do intestino do flebótomo na qual se diferenciam para forma metacíclica e migram para a parte anterior do tubo digestivo do vetor. O ciclo se completa quando o inseto realiza novo repasto sangüíneo, transmitindo promastigotas metacíclicas. Fonte: (Sacks & Noben-Trauth, 2002).

A predisposição genética, para susceptibilidade ou resistência à infecção com *L. major* em camundongos, correlaciona com a dominância de uma resposta Th2, dirigida por IL-4, que causa a doença, ou com a dominância do perfil Th1 (IFN- $\gamma$ ), dirigida por IL-12, que promove a cura e a retirada do parasita (Sacks & Noben-Trauth, 2002) (Figura 9).

*Leishmania*, na sua forma amastigota, é adaptada para prosperar em fagolisossomas de macrófagos de mamíferos. Apesar de o vacúolo parasitóforo (VP) apresentar um ambiente hostil, fortemente ácido e hidrolítico, a *Leishmania* se beneficia da disponibilidade de nutrientes de baixo peso molecular gerados pelos processos digestivos no vacúolo. O vacúolo parasitóforo maduro de *Leishmania* se assemelha a um compartimento de endossoma (Antoine *et al.*, 1998). Várias vias de tráfego com produtos de fagocitose de macrófagos podem se fundir com endossomas maduros, incluindo VP, fornecendo fontes de nutrientes, como açúcares, lipídeos e aminoácidos, para as amastigotas residentes (Burchmore & Barrett, 2001). Dentre os vários nutrientes necessários para o desenvolvimento do parasita, os lipídeos são essenciais para o desenvolvimento, multiplicação, virulência e diferenciação de espécies de *Leishmania* no hospedeiro (Denny *et al.*, 2004; Pucadyil *et al.*, 2004).

Sabendo-se que *L. major* elicitava uma resposta pró-inflamatória local e que lipídeos apresentam papel importante no desenvolvimento do parasita, é interessante pesquisar o efeito da infecção por este patógeno no metabolismo de lipídeos e na aterogênese de camundongos apoE<sup>-/-</sup>, que possuem fundo genético de C57BL/6 e modelos para aterosclerose.



**Figura 9 – Modelo do desenvolvimento da resposta Th1/Th2.**

Para ambas diferenciações celulares para Th1 e Th2, antígenos são apresentados a células T CD4<sup>+</sup> *naive* por células dendríticas. A interação de moléculas co-estimulatórias com seus respectivos ligantes (CD40-CD40L, OX10-OX40L e/ou CD80-CTLA4/CD28) junto com o ambiente de citocinas local, promovem a diferenciação de células T *naive* em células Th1 que secreta IFN- $\gamma$  ou células Th2 que libera IL-4. Fonte: (Sacks & Noben-Trauth, 2002)

#### 1.4. Camundongos como modelos experimentais

O camundongo é o modelo animal mais utilizado para o estudo de lipídeos e aterosclerose. As espécies selvagens são altamente resistentes ao desenvolvimento de aterosclerose. Em resposta a uma dieta com baixos níveis de gordura e colesterol, os camundongos apresentam baixos níveis plasmáticos de colesterol em VLDL e LDL e a maioria do colesterol está na fração de HDL. Este deve ser o principal fator contribuinte para a resistência ao desenvolvimento de aterosclerose nestes animais. A HDL é responsável pelo transporte de mais de 85% do colesterol plasmático de camundongos, enquanto que, em humanos, a principal lipoproteína carreadora de colesterol é a LDL (65-85%) (Breslow, 1996; Hofker *et al.*, 1998).

Embora pouco compreendida, a diferença no transporte de lipoproteínas entre as espécies é devida a alguns fatores conhecidos, tais como: 1. Ausência da CETP no plasma de camundongos (em humanos, esta enzima transfere ésteres de colesterol da HDL para VLDL e triglicerídeos na direção oposta); 2. Lipase hepática, a qual é ligada à membrana em humanos, e solúvel em camundongos; 3. Reduzida síntese de apoB-100 em camundongos; 4. Alta eficiência da apoE murina na remoção de lipoproteínas remanescentes, quando comparada à apoE humana (Fazio & Linton, 2001). Apesar das diferenças apresentadas, camundongos e seres humanos possuem o mesmo conjunto de genes, com poucas exceções, que controlam o metabolismo de lipoproteínas (Hofker *et al.*, 1998). Além disso, a utilização de camundongos como modelos experimentais apresenta facilidades, uma vez que o animal possui tamanho pequeno, fácil engaiolamento e manipulação, curto período de reprodução e *background* genético bem definido (Moghadasian *et al.*, 2001).

O gene da apoproteína E (apoE) é um dos principais genes determinantes dos níveis de lipídeos no plasma em seres humanos e camundongos (Hofker *et al.*, 1998). A apoE é uma glicoproteína

sintetizada principalmente no fígado e cérebro, podendo ser produzida por outras células, inclusive macrófagos. A apoE é constituinte de todas as lipoproteínas, exceto LDL. A sua função é servir como ligante das lipoproteínas nos seus receptores hepáticos ou nos receptores B/E do fígado e tecidos periféricos (Meir & Leitersdorf, 2004).

Camundongos deficientes em apoE foram criados por recombinação homóloga de células tronco embrionárias. A deficiência desta apolipoproteína resulta em níveis de colesterol elevados devido à remoção defeituosa das lipoproteínas remanescentes. Logo, o acúmulo de remanescentes de QM e VLDL no plasma constitui o estímulo aterogênico nestes animais (Breslow, 1996; Zhang *et al.*, 1992).

Os animais apoE<sup>-/-</sup> possuem colesterol plasmático cerca de cinco vezes mais alto do que os normais, e desenvolvem estrias gordurosas na aorta proximal aos três meses de idade (Zhang *et al.*, 1992). As lesões são exacerbadas pelo consumo de dietas aterogênicas, ricas em gorduras e colesterol (Breslow, 1996).

Nos animais alimentados com dieta comercial, as lesões aparecem como nódulos amarelados em 10 semanas de idade (células espumosas), porém, com 8 semanas, a adesão de células mononucleares e a formação esporádica de células espumosas podem ser observadas. A placa fibrosa aparece com 20 semanas de vida e, em alguns casos, com até 30 semanas ainda predominam as células espumosas (Nakashima *et al.*, 1994).

Os camundongos apoE<sup>-/-</sup> contêm componentes celulares e uma sucessão de lesões similares às observadas durante a aterogênese humana, tornando-se um modelo importante para o estudo dos vários fatores que controlam ou influenciam o desenvolvimento da placa aterosclerótica (Moghadasian *et al.*, 2001; Nakashima *et al.*, 1994).

## 2.OBJETIVOS

### 2.1.Objetivo geral

O objetivo deste trabalho foi verificar o impacto da infecção por *Leishmania major* no perfil lipídico e na formação de placa aterosclerótica em camundongos deficientes em apoE (apo E<sup>-/-</sup>).

### 2.2.Objetivos específicos

1 - Verificar se há modificação no perfil lipídico dos camundongos apo E<sup>-/-</sup>, infectados ou não com *Leishmania major*;

2 - Avaliar se a infecção por *L. major* altera o metabolismo hepático e cecal de colesterol e triglicerídeo;

3 - Quantificar morfometricamente o tamanho da lesão aterosclerótica no sinus aórtico e aorta torácica e abdominal de animais deficientes em apoE, infectados ou não com *Leishmania major*; verificando se a infecção altera o desenvolvimento da aterosclerose nesses animais;

4 - Analisar a estabilidade da placa aterosclerótica, por meio da mensuração do infiltrado inflamatório e do colágeno na área da lesão aterosclerótica nos animais apo E<sup>-/-</sup> infectados ou não com *L. major*;

5 - Pesquisar a possível presença de *Leishmania major* no coração, baço e fígado dos animais infectados.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1. Animais experimentais

Os camundongos homozigotos, com ausência do gene da apolipoproteína E (apoE<sup>-/-</sup>), gerados no *background* C57BL/6, foram obtidos e mantidos no Biotério do Laboratório de Bioquímica Nutricional. Os camundongos selvagens da linhagem C57BL/6 foram obtidos do Biotério Central do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG (CEBIO).

Os animais receberam dieta AIN93-G (Reeves *et al.*, 1993), Tabela 1, tiveram livre acesso à água e ficaram em gaiolas coletivas, em ambiente com ciclos de luminosidade de 12 horas (7:00 às 19:00).

Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética de Experimentação Animal da UFMG (CETEA/UFMG), protocolo nº 147/05. (Anexo)

**Tabela 1 - Composição da dieta**

<b>Ingredientes</b>	<b>AIN93G (%)</b>
Caseína	20,0
Metionina	0,3
Amido de milho	52,95
Sacarose	10,0
Celulose	5,0
Óleo de soja	7,0
BHT	0,0014
Mistura de Minerais	3,5
Mistura de vitaminas	1,0
Colina	0,25

(Reeves *et al.*, 1993)

### 3.2. Estratégia Experimental

Camundongos fêmeas apoE<sup>-/-</sup> de onze semanas de idade foram separados em dois grupos: animais controles não infectados (apoE<sup>-/-</sup> Controle, n=10) e animais infectados com *Leishmania major* (apoE<sup>-/-</sup> Leishmania, n=11). Os animais foram distribuídos de acordo com o peso e o colesterol iniciais. Foram também utilizadas fêmeas selvagens de onze semanas de idade (C57BL/6, n=10), sendo todas infectadas com *Leishmania major*. O experimento ocorreu durante seis semanas.

Semanalmente, os animais tiveram o peso corporal e a ingestão alimentar avaliados e foi restringida a alimentação no grupo que ingeriu maior quantidade de dieta. Tal procedimento foi necessário para que todos os grupos experimentais consumissem a mesma ingestão calórica no final do experimento.

### 3.3. Infecção com *Leishmania major*

Foi utilizado neste estudo o clone de *L. major* (WHO MHOM/IL/80/Friedlin), gentilmente cedido pelo Laboratório de Gnotobiologia e Imunologia. O parasita, em sua forma promastigota extracelular, foi mantido *in vitro* em meio Grace (GIBCO) pH 6,2 suplementado com 20% de soro bovino fetal, L-glutamina a 2mM, penicilina a 100U/mL e estreptomicina a 100 µg/mL. Os inóculos foram preparados, em condições estéreis, a partir de culturas de *L. major* de cinco dias. Este período equivale à fase estacionária do crescimento *in vitro*, época em que a cultura está rica em formas promastigotas metacíclicas viáveis, ou seja, formas infectivas. O meio de cultura com *Leishmania* foi centrifugado a 2000 x g, a 4°C, por 15 minutos. O sobrenadante foi desprezado e adicionaram-se 10 mL de PBS estéril. O tubo foi novamente centrifugado sob as mesmas condições, eliminou-se o sobrenadante e o sedimento foi ressuspendido em 1 mL de PBS. Uma pequena alíquota foi retirada, diluída 1:100 em PBS com

formalina 4% e o número de parasitas foi quantificado em câmara de Neubauer. O inóculo utilizado foi de  $1 \times 10^6$  parasitas em um volume total de 40  $\mu$ L por pata (Vieira *et al.*, 1996).

Os camundongos foram inoculados com *Leishmania major* no coxim plantar da pata esquerda. Como controle, apenas PBS foi injetado na pata direita.

### 3.4. Acompanhamento do desenvolvimento da lesão provocada por *L. major*

O desenvolvimento da lesão na pata de camundongos infectados por *L. major* foi acompanhado semanalmente pelo monitoramento da espessura da lesão, utilizando paquímetro Starret (Itú, São Paulo, Brasil). O tamanho da lesão foi quantificado pela diferença entre as medidas das patas infectada (esquerda) e não infectada (direita).

### 3.5. Quantificação dos parasitas na pata

Após o sacrifício, coletou-se a pata infectada, a pele foi retirada e pesou-se a lesão. Este ensaio foi realizado conforme descrito por (Vieira *et al.*, 1996). Em resumo, parte da lesão foi transferida para o homogeneizador de tecidos, juntamente com cerca de 2 mL de PBS estéril. O material foi centrifugado a 150 x g por 1,5 min a 4°C para retirada de fragmentos de tecido remanescentes. O sobrenadante foi centrifugado a 1540 x g por 10 min a 4°C. O sedimento foi, então, ressuspenso em 500  $\mu$ L de meio Grace acrescido de 20% de soro fetal bovino, L-glutamina a 2 mM e 20  $\mu$ g/mL de sulfato de gentamicina. O material foi distribuído, em duplicatas, em placa estéril de 96 poços. Fez-se diluição seriada 1:10 por 12 poços subsequentes. A placa foi incubada a 26°C por 7 dias, quando foi feita a leitura do crescimento de parasitas, em microscópio invertido (Zeiss). O

resultado obtido foi expresso como o logaritmo do inverso da maior diluição que apresentou crescimento positivo de parasitas.

### 3.6.Amostras de sangue

No início do experimento, após jejum de 8 a 10 horas, amostras de sangue foram retiradas da veia caudal em microtubos heparinizados. O plasma foi separado, após centrifugação a 6000 rpm por 5 minutos, em centrífuga de mesa Fanem Centrimicro 243. No final de 6 semanas, após o mesmo período de jejum, e aplicação da anestesia intraperitoneal de uma solução de ketamina (130mg/kg) e xilazina (0,3mg/kg), os animais foram sacrificados por exangüinação pela aorta abdominal sem anticoagulante. O soro foi separado da mesma forma do plasma.

#### **3.6.1.Determinação dos níveis de colesterol total**

Os níveis de colesterol total foram medidos de acordo com o método da colesterol oxidase (Allain *et al.*, 1974), utilizando-se *kit* comercial da empresa Doles, Brasil. O método consiste na hidrólise de ésteres de colesterol pela colesterol esterase, produzindo colesterol livre. Este, em presença da colesterol oxidase e de oxigênio, produz peróxido de hidrogênio que, pela ação da peroxidase em presença de fenol e 4-aminoantipirina, produz um composto róseo-avermelhado com absorção máxima em 505 nm. Os níveis de colesterol no soro ou plasma dos animais foram determinados por um ensaio em microplaca de 96 poços, de acordo com Fazio *et al.* (1997). Em resumo, 10 µL das amostras de soro foram diluídas em água destilada (1:100), a fim de que as leituras de absorbância fossem adequadas à variação linear do teste. À diluição, foram adicionados 100 µL de reagente de colesterol total. Após um período de incubação de 10 minutos a 37°C, a absorbância foi lida a 492 nm em um leitor de microplaca (Thermo Plate).

### **3.6.2. Determinação de colesterol HDL e colesterol das frações aterogênicas**

Os níveis de colesterol HDL (HDLc) no soro foram dosados por meio do *kit* enzimático Doles, Brasil. O princípio se baseia na precipitação seletiva de LDL e VLDL por polietilenoglicol tamponado (PEG 6000), restando apenas a fração HDL no sobrenadante. Este foi separado para a dosagem de HDLc da seguinte forma: em uma microplaca de 96 poços, 10  $\mu$ L da amostra foram adicionados a 200  $\mu$ L do reagente de cor Colesterol 250 Doles/Colesterol Enzimático Líquido Doles. Após uma incubação de 10 minutos a 37°C, a absorbância foi lida a 492 nm em leitor de microplaca (Thermo Plate). O colesterol das frações aterogênicas foi calculado pela diferença entre os colesteróis total e HDL.

### **3.6.3. Determinação dos níveis de triglicerídeos**

Os níveis de triglicerídeos séricos foram medidos de acordo com o método enzimático colorimétrico (Fossati & Prencipe, 1982), utilizando *kit* comercial da empresa Doles, Brasil. O método consiste na hidrólise dos triglicerídeos pela lipase lipoprotéica, produzindo glicerol livre, fosforilado pela glicerol quinase, cujo produto sofre a ação da glicerol-P-oxidase que, em presença de oxigênio, produz peróxido de hidrogênio. Este, sob a ação da peroxidase, do reagente fenólico (p-clorofenol) e da 4-aminoantipirina, produz um composto róseo-avermelhado, com máximo de absorção a 500 nm.

As dosagens e a curva padrão foram feitas em microplacas, conforme descrito para o colesterol.

## **3.7. Dosagens de colesterol e lipídeos totais hepáticos**

No final do experimento, após o sacrifício dos animais, o fígado foi removido, lavado em solução salina fisiológica, seco em papel de filtro, e armazenado a -20°C.

A extração da fração lipídica foi feita de acordo com o método de Folch *et al.* (1957). Em resumo, 100 mg de fígado foram triturados, utilizando homogeneizador, durante três minutos, com 1900  $\mu$ L de solução clorofórmio:metanol (2:1). Após adição de 400  $\mu$ L de metanol, os tubos foram centrifugados por 10 minutos a 3000 rpm. O sobrenadante foi recolhido em tubo de peso conhecido e, posteriormente, acrescido de 800  $\mu$ L de clorofórmio e 640  $\mu$ L de solução de NaCl a 0,73%. Após nova centrifugação por 10 minutos a 3000 rpm, desprezou-se a fase superior. A parede interior de cada tubo foi lavada três vezes com 600  $\mu$ L de solução de Folch (solução de 3% de clorofórmio, 48% de metanol, 47% de água e 2% de NaCl a 0,29%). Após cada lavagem, a fase superior foi descartada. Os extratos lipídicos obtidos foram secos em estufa *overnight* a 37°C, e os lipídeos totais quantificados pela diferença de peso entre o tubo contendo os lipídeos e o mesmo tubo vazio, previamente pesado.

Os extratos lipídicos foram ressuspensos em 500  $\mu$ L de isopropanol, diluídos 1:50 em água destilada e as determinações dos níveis de colesterol hepático foram feitas conforme descrito para colesterol total.

### 3.8. Dosagens de colesterol e lipídeos do conteúdo cecal

Durante o sacrifício, o intestino grosso dos animais foi removido e o ceco foi separado para retirada do conteúdo cecal.

Os lipídeos cecais também foram extraídos de acordo com Folch *et al.* (1957). Foi adotado o mesmo procedimento utilizado para extração lipídica hepática, exceto para a quantidade inicial de conteúdo cecal, igual a 50 mg. A quantidade de reagentes usada foi dividida pela metade, para manter a proporção com o peso.

Os extratos lipídicos foram ressuspensos em 500  $\mu$ L de isopropanol, diluídos 1:25 e as determinações dos níveis de

derivados do colesterol cecal foram feitas conforme descrito para colesterol total.

### 3.9. Avaliação das lesões ateroscleróticas no coração

Após o sacrifício dos camundongos, todos os corações foram retirados em bloco, com a raiz da aorta, e perfusionados com PBS 1x. O coração foi separado da aorta torácica e abdominal, fixado em formol tamponado 10% e processado, conforme rotina para inclusão em parafina. Foram feitos cortes consecutivos de 10  $\mu$ m de espessura na região da válvula aórtica. As lâminas foram codificadas e coradas por hematoxilina e eosina.

O tamanho da lesão aterosclerótica foi avaliado em dez cortes, tomando sempre como referência a presença da válvula aórtica. Localizada a formação da válvula aórtica, a cada 30  $\mu$ m um corte era selecionado para a medida. Assim, foi percorrida uma extensão média de 300  $\mu$ m, com cortes analisados intercalados por outros 2 cortes consecutivos, segundo técnica modificada de Paigen *et al.* (1987), (Portugal *et al.*, 2004). As áreas foram medidas por meio da análise morfométrica, pelo programa Image Pro Plus. O cálculo do tamanho da lesão de cada animal foi feito pela soma das áreas dos dez cortes. O valor médio por grupo foi utilizado para comparações estatísticas.

### 3.10. Avaliação do infiltrado inflamatório na raiz aórtica

O infiltrado inflamatório das lesões foi determinado pela contagem do número de células na área da lesão. As medidas foram analisadas em 3 cortes não consecutivos por animal. Em cada corte, a celularidade foi determinada em 4 campos em torno da lesão, totalizando uma análise de 12 campos/animal. O número de células foi determinado automaticamente pelo programa Image-Pro Plus, por intensidade de cor (Portugal *et al.*, 2004).

### 3.11.Quantificação de colágeno nas lesões ateroscleróticas

O colágeno presente nas lesões ateroscleróticas foi visualizado utilizando o corante Tricômio de Gômori contracorado com hematoxilina. Foram analisados 4 cortes não consecutivos por animal. Os resultados foram expressos como porcentagem de colágeno por área de lesão (Portugal *et al.*, 2004).

### 3.12.Avaliação da deposição lipídica na aorta torácica e abdominal

A deposição lipídica foi determinada na aorta torácica e abdominal, utilizando a análise *en face* pela coloração com Sudan IV (Palinski *et al.*, 1994). As aortas foram dissecadas, removendo cuidadosamente toda a adventícia a partir da válvula aórtica até a bifurcação ilíaca. A aorta foi aberta longitudinalmente e fixada durante 12 horas com solução de formol-sacarose (4% paraformaldeído, 5% de sacarose, 20 µmol/L de BHT, e 2 µmol/L EDTA, pH 7,4) a 4<sup>o</sup>C. Após fixadas, as aortas foram submetidas a uma solução de 70% de etanol durante 5 minutos. Posteriormente, foram coradas por 10 minutos sob agitação em uma solução filtrada contendo 0,5% de Sudan IV, 35% de etanol, e 50% de acetona e descoradas por 5 minutos em solução de 80% de etanol. As imagens das aortas coradas com Sudan IV foram digitalizadas e a análise feita pelo programa Image-Pro Plus.

O acúmulo lipídico foi determinado pelo percentual da área total da aorta. O valor médio por grupo foi utilizado para comparações estatísticas.

### 3.13.Extração de DNA

Durante o sacrifício dos animais, foram retirados e armazenados, a -70°C, coração (região da válvula aórtica), fígado

e baço para extração de DNA. Foi adicionado tampão *tail* e 100µL de proteinase K (20 mg/mL) a um pequeno pedaço do órgão que foram incubados em banho-maria a 55°C até a decomposição do tecido. Acrescentou-se 500 µL de fenol e as amostras foram centrifugadas durante 4 minutos a 14.000 rpm a temperatura ambiente. Coletou-se a fase superior e nova centrifugação foi realizada para se obter melhor purificação. A fase aquosa (superior) foi transferida para um novo tubo e 500 µL de clorofórmio:álcool isoamil (24:1) foram acrescentados. Os tubos foram centrifugados a 14.000 rpm durante 2 minutos. Novamente a fase superior foi coletada e adicionou-se 1 mL de etanol gelado, a solução foi homogeneizada. Nesta etapa foi visualizado o DNA, que se precipita em forma de gel. As amostras foram colocadas a -20°C. Após 12 horas, os tubos foram centrifugados durante 4 minutos a 14.000 rpm. Todo o sobrenadante foi retirado, 500 µL de etanol 70% foi adicionado e misturou-se por inversão até ressuspender o precipitado, nova centrifugação foi realizada. Em seguida, desprezou-se o sobrenadante e o DNA no fundo do tubo foi seco durante 15 minutos a temperatura ambiente. O DNA foi ressuspensionado em 100 µL de tampão TE, diluído e quantificado em leitor de ELISA a 260 nm.

### 3.14. Avaliação para presença de *L. major*

Após a extração do DNA, foram realizadas a busca de seqüências específicas para *L. major* e a amplificação das mesmas por meio da técnica de PCR. Para isto, 2 µL de amostra de DNA foram adicionados a 1,2 µL de tampão da Taq polimerase, 1,0 µL de dNTPs (2,5mM), 1,0 µL de *primers*, 0,05 µL de taq polimerase e 5,75 µL de H<sub>2</sub>O Milli-Q estéril.

As amostras foram colocadas em um termociclador e as condições de amplificação para 35 ciclos foram: desnaturação a 94°C por 1 min, anelamento a 54°C por 1 min, alongação a 72°C

por 1,5 min e extensão a 72°C por 10 min (Anders *et al.*, 2002). Os produtos de PCR foram, então, submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida e visualizados pela coloração de prata.

Os *primers* utilizados para verificação da presença de minicírculo kDNA de *L. major* possuem a seguinte seqüência (Anders *et al.*, 2002):

Uni 21- 5'GGGGTTGGTGTAATAAGGCC 3'

LmJ4- 5'CTAGTTTCCCGCCTCCGAG 3'

### 3.15. Análise estatística dos dados

Os dados foram inicialmente analisados usando o teste Komogorov-Smirnov para verificar sua simetria. Como todos os dados apresentaram distribuição normal, foi utilizado teste T de Student, para comparar grupos. Foi adotado o nível de significância de  $p < 0,05$ .

## 4.RESULTADOS

### 4.1.Infecção por *L. major* e quantificação do parasita

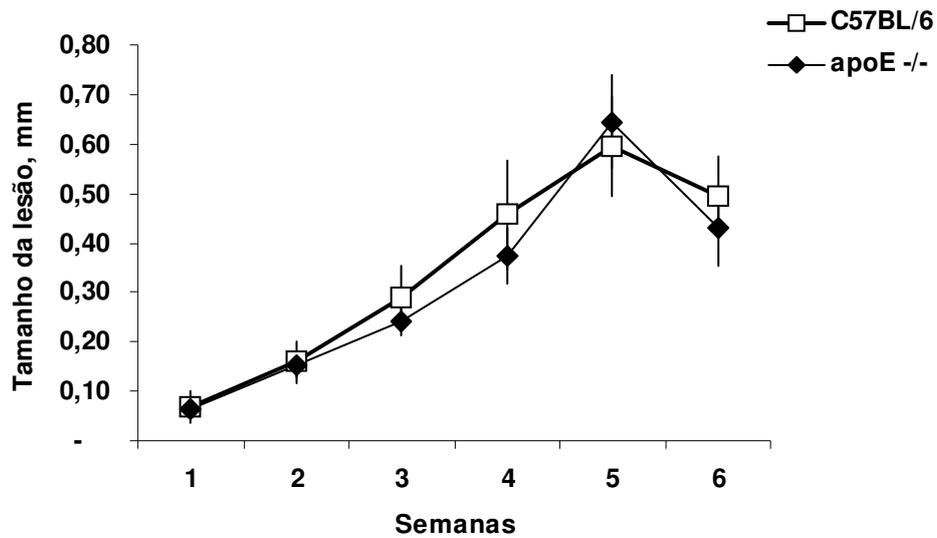
Camundongos apoE<sup>-/-</sup> e C57BL/6 de 11 semanas de idade foram infectados com *L. major* para verificar se esta infecção apresenta a mesma evolução em ambas linhagens. Para tanto, observou-se a progressão da doença e foi mensurada a quantificação do parasita na pata infectada.

O cálculo da lesão mostra que não houve diferença na progressão da doença entre as linhagens apoE<sup>-/-</sup> e C57BL/6, pois estes animais apresentaram o mesmo perfil em relação ao tamanho da lesão (Figura 10). A quantificação final dos parasitas também foi a mesma entre estes dois grupos (Figura 11).

### 4.2.Consumo alimentar e crescimento dos animais

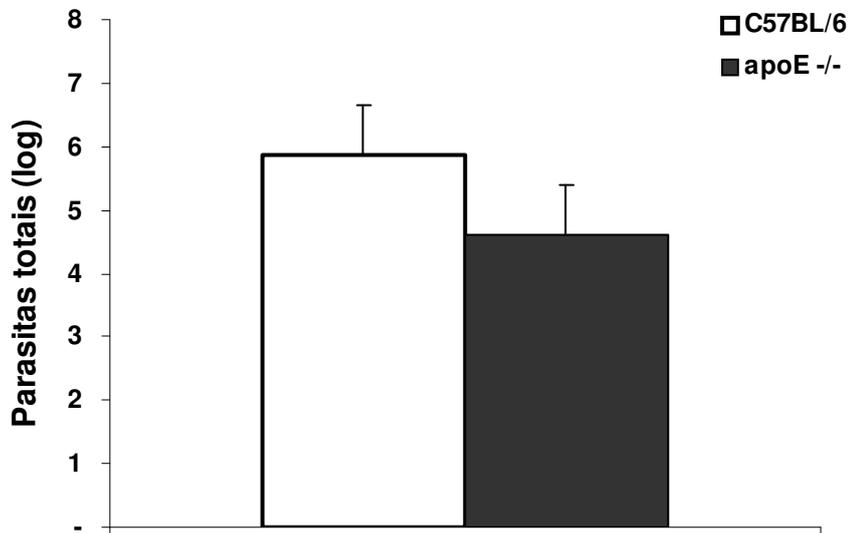
Os experimentos seguintes foram realizados com animais deficientes em apoE (apoE<sup>-/-</sup>) infectados ou não com *L. major*. O consumo alimentar foi monitorado e uma restrição alimentar foi imposta ao grupo controle, que recebeu a mesma quantidade de dieta ingerida pelo grupo infectado. Deste modo, como mostra a Figura 12, a ingestão foi similar entre os animais controles e infectados com *L. major* (25,10 ± 0,95 e 24,72 ± 0,85 g, respectivamente, p=0,7).

Devido à restrição alimentar, não houve diferença entre peso corporal dos animais dos diferentes grupos, durante todo o tempo de experimento (Figura 13).



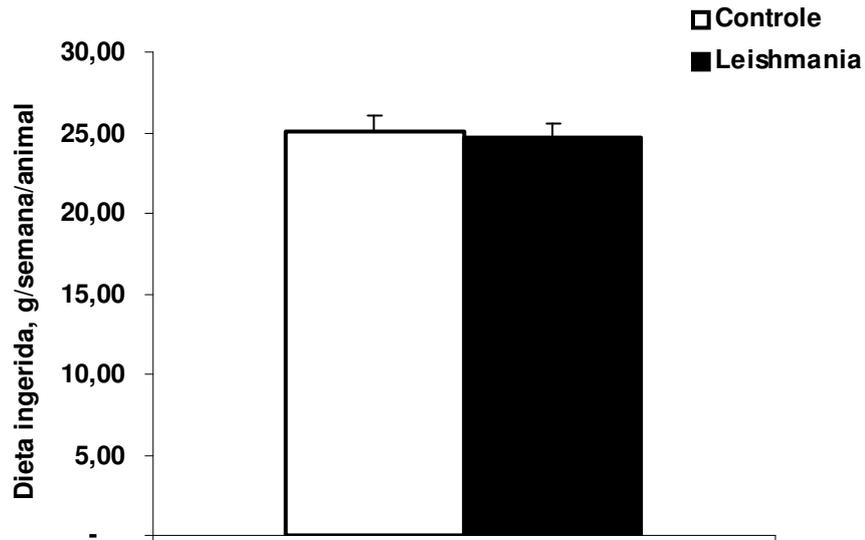
**Figura 10** – Curva de infecção de animais apoE<sup>-/-</sup> e C57BL/6 infectados com *L. major*.

Os resultados foram expressos como média do tamanho da lesão de animais apoE<sup>-/-</sup> (n=11) e C57BL/6 (n=7) em cada semana do experimento. Linhas verticais representam erro padrão.



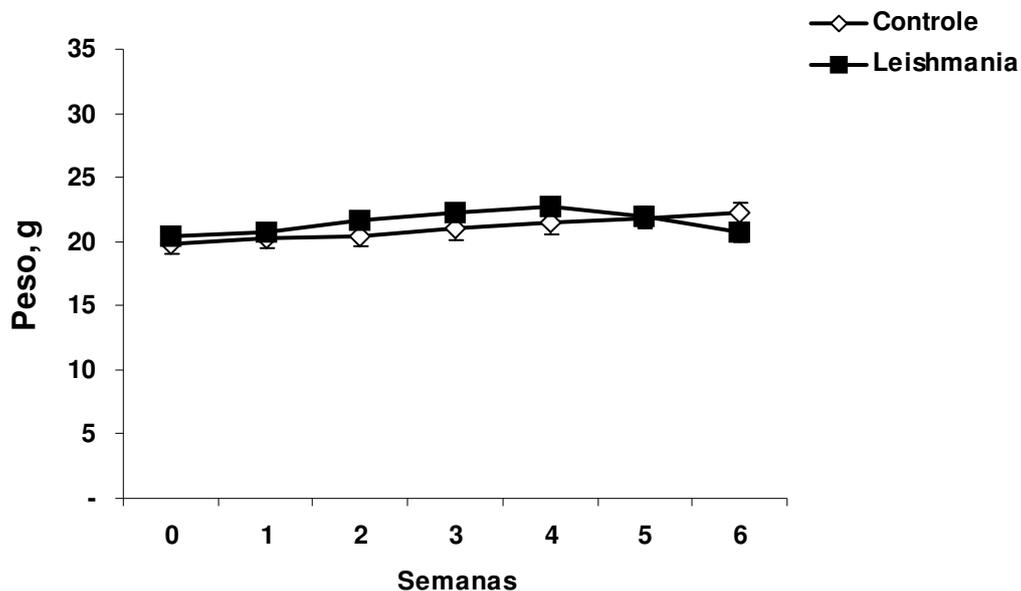
**Figura 11** – Quantificação de parasitas de animais apoE<sup>-/-</sup> e C57BL/6 infectados com *L. major*.

Os resultados foram expressos como média do logaritmo de parasitas totais de animais apoE<sup>-/-</sup> (n=11) e C57BL/6 (n=9) no final do experimento. Linhas verticais representam erro padrão.



**Figura 12 - Consumo alimentar semanal dos animais apoE<sup>-/-</sup> controles e infectados com *L. major*.**

Os resultados foram expressos com média da quantidade de dieta consumida em gramas por semana por animal. Foi utilizado erro padrão.



**Figura 13 - Evolução ponderal dos animais apoE<sup>-/-</sup> controles e infectados com *L. major*.**

Os resultados foram expressos como média do peso em gramas dos animais controles (n=9) e infectados (n=11) em cada semana do experimento. Foi utilizado erro padrão.

### 4.3. Colesterol

#### 4.3.1. *Colesterol total*

Com o objetivo de avaliar o efeito da infecção de *L. major* no metabolismo lipídico, primeiramente foi analisado o nível de colesterol total no plasma dos animais. No início do experimento, os grupos controle e infectado apresentaram níveis de colesterol plasmático similares ( $230,2 \pm 19,3$  e  $225,3 \pm 21,0$  mg/dL, respectivamente,  $p=0,86$ ). Após seis semanas de experimento, a infecção por *L. major* foi capaz de aumentar os níveis de colesterol sérico ( $283,4 \pm 15,8$  mg/dL) em relação aos animais controles ( $222,4 \pm 7,1$ , mg/dL,  $p=0,01$ ) (Tabela 2).

#### 4.3.2. *Colesterol HDL e frações aterogênicas*

A mensuração das frações de colesterol mostrou que o aumento nos níveis de colesterol sérico dos animais infectados refletiu o aumento tanto da fração não aterogênica (HDL) quanto da fração aterogênica (LDL, IDL e VLDL). A Tabela 2 mostra o aumento dos níveis do colesterol HDL do grupo infectado comparado ao grupo controle ( $22,1 \pm 2,0$  e  $15,5 \pm 1,7$  mg/dL, respectivamente,  $p=0,025$ ) e a diferença nos níveis das frações aterogênicas dos animais controles ( $208,1 \pm 9,9$  mg/dL) e infectados ( $261,3 \pm 16,9$  mg/dL,  $p=0,026$ ). A relação fração aterogênica/HDL não apresentou diferença entre os grupos controle e infectado com *L. major* ( $14,7 \pm 0,06$  e  $13,3 \pm 0,06$ , respectivamente,  $p=0,53$ ).

**Tabela 2 – Colesterol total e frações**

<b>Parâmetros(mg/dL)</b>	<b>Controle</b>	<b>Leishmania</b>
Colesterol total <sup>a</sup>		
Inicial	230,2 ± 19,3	225,3 ± 21,0
Final	222,4 ± 7,1	283,4 ± 15,8*
HDLc <sup>b</sup>	15,5 ± 1,7	22,1 ± 2,0*
Frações aterogênicas <sup>b</sup>	208,1 ± 9,9	261,3 ± 16,9*
Relação Aterogênica/HDL <sup>b</sup>	14,7 ± 0,06	13,3 ± 0,06

<sup>a</sup> n= 8 para Controle e 12 para Leishmania

<sup>b</sup> n= 7 para Controle e 12 para Leishmania

\* p<0,05, os resultados foram expressos como média ± erro padrão.

#### **4.3.3. Lipídeos e colesterol do conteúdo cecal**

Um parâmetro utilizado para analisar alterações no metabolismo lipídico, especificamente alterações na absorção/excreção de lipídeos, é a quantificação de lipídeos e derivados de colesterol excretado no conteúdo cecal. Não houve diferença na concentração de lipídeos totais cecais entre os grupos controle e infectado ( $51,11 \pm 8,9$  e  $70,0 \pm 11,0$  mg/g de conteúdo cecal, respectivamente,  $p=0,19$ ). Também não houve alteração na excreção de colesterol e seus derivados ( $3\alpha$ -OH-esteróides) entre os grupos: o grupo controle apresentou média de  $2,8 \pm 0,3$  e os animais infectados  $2,4 \pm 0,3$  mg/g de conteúdo cecal,  $p=0,31$  (Tabela 3).

#### **4.3.4. Lipídeos e colesterol hepático**

Torna-se imprescindível a quantificação de lipídeos totais e colesterol no fígado, uma vez ser este o principal órgão envolvido no metabolismo lipídico. Animais infectados com *L. major* apresentaram uma quantidade menor de lipídeos totais hepáticos em relação aos animais controle ( $171,7 \pm 21,1$  e  $252,0 \pm 11,8$  mg/g de fígado, respectivamente,  $p=0,005$ , (Tabela 3). Esta grande diferença não é acompanhada pela redução do nível de colesterol hepático, que foi similar entre os grupos controle e Leishmania ( $14,1 \pm 1,3$  e  $13,2 \pm 0,9$  mg/g de fígado, respectivamente,  $p=0,58$ , (Tabela 3).

**Tabela 3 – Concentração de triglicerídeos séricos, lipídeos totais, colesterol e triglicerídeos do conteúdo cecal e fígado**

<b>Parâmetros</b>	<b>Controle</b>	<b>Leishmania</b>
Lipídeos cecais <sup>a</sup> (mg/g de conteúdo cecal)	51,11 ± 8,9	70,0 ± 11,0
3α-OH-esteróides <sup>a</sup> (mg/g de conteúdo cecal)	2,8 ± 0,3	2,4 ± 0,3
Triglicerídeos cecais <sup>a</sup> (mg/g de conteúdo cecal)	0,97 ± 0,2	0,76 ± 0,21
Lipídeos hepáticos <sup>b</sup> (mg/g de fígado)	252,0 ± 11,8	171,7 ± 21,1*
Colesterol hepático <sup>c</sup> (mg/g de fígado)	14,1 ± 1,3	13,2 ± 0,9
Triglicerídeos hepáticos <sup>b</sup> (mg/g de fígado)	49,7 ± 4,4	30,2 ± 4,5*
Triglicerídeos séricos <sup>d</sup> (mg/dL)	56,5 ± 5,4	34,4 ± 4,1*

<sup>a</sup> n= 9 para Controle e 10 para Leishmania

<sup>b</sup> n= 10 para Controle e 12 para Leishmania

<sup>c</sup> n= 11 para Controle e 11 para Leishmania

<sup>d</sup> n= 12 para Controle e 13 para Leishmania

\* p<0,05, os resultados foram expressos como média ± erro padrão.

## 4.4. Triglicerídeos

### 4.4.1. Triglicerídeo sérico

Triglicerídeos são componentes importantes de lipoproteínas. Assim, além do colesterol, este lipídeo exerce papel importante no perfil lipídico, e é necessário investigar seu metabolismo, uma vez observadas modificações nos níveis de colesterol sérico. E, ao contrário do colesterol, que aumentou no grupo infectado, animais infectados com *L. major* apresentaram níveis significativamente menores de triglicerídeos sérico que o grupo não infectado ( $56,5 \pm 5,4$  e  $34,4 \pm 4,1$  mg/dL, respectivamente,  $p=0,003$ , (Tabela 3).

### 4.4.2. Triglicerídeo do conteúdo cecal

Assim como ocorreu em relação aos outros parâmetros analisados no conteúdo cecal, os níveis de triglicerídeos também não se alteraram entre o grupo infectado por *L. major* ( $0,97 \pm 0,2$  mg/g) e o grupo controle ( $0,76 \pm 0,21$  mg/g de conteúdo cecal,  $p=0,52$ ) (Tabela 3).

### 4.4.3. Triglicerídeo hepático

A diminuição verificada na quantidade de lipídeos hepáticos, no grupo com *L. major*, foi provocada pela diminuição dos níveis de triglicerídeos hepáticos desses animais, quando comparados com o grupo controle. Os camundongos do grupo controle apresentaram média de  $49,1 \pm 4,4$  mg/g de fígado e o grupo infectado  $30,2 \pm 4,5$  mg/g de fígado,  $p=0,01$  (Tabela 3).

## 4.5.Placa aterosclerótica

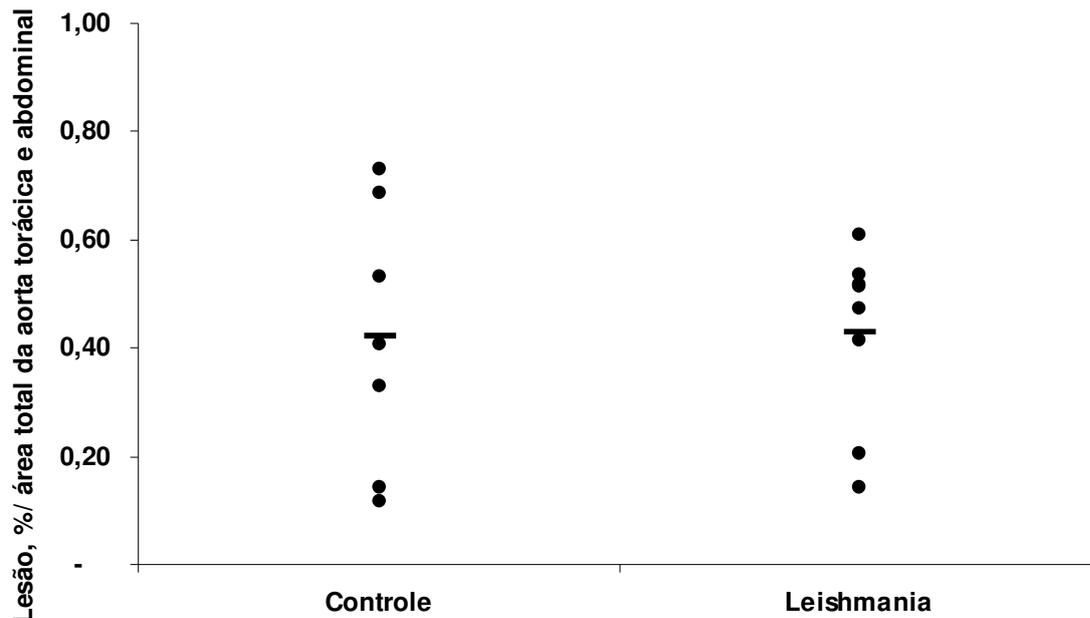
### 4.5.1.Aorta torácica e abdominal

Dados obtidos indicam que a infecção por *L. major* alterou o metabolismo lipídico. O procedimento seguinte foi, então, comparar o desenvolvimento da placa aterosclerótica entre animais controles e infectados. A análise do acúmulo lipídico na aorta torácica e abdominal mostrou que os dois grupos apresentaram a mesma quantidade de lipídeos depositados neste local, no final do experimento (Controle=  $0,42 \pm 0,09$  e *Leishmania*=  $0,43 \pm 0,06$  % de lesão/área total da aorta torácica e abdominal,  $p=0,96$ , Figura 14).

A Figura 15 demonstra aortas representativas do grupo controle (A) e infectado (B) com *L. major*. Nestas figuras percebe-se que as lesões se concentram nas áreas das ramificações, local em que o fluxo sanguíneo sofre mais turbulência e possui maior propensão para o desenvolvimento da lesão aterosclerótica, mas que este padrão é similar em ambos os grupos.

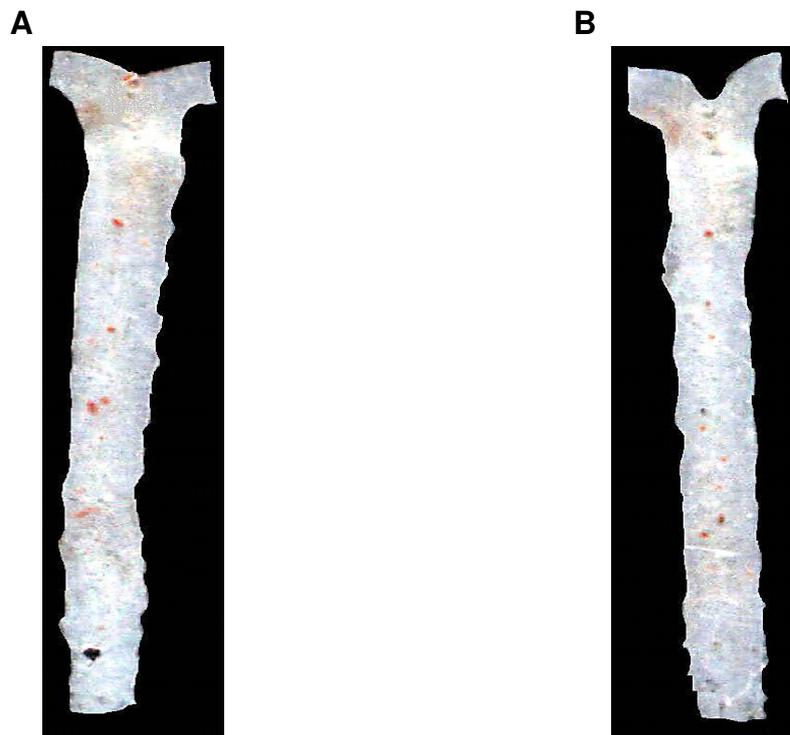
### 4.5.2.Lesão na válvula aórtica

Outro local para avaliação do desenvolvimento da lesão aterosclerótica é a raiz da aorta, na região da válvula. Nesta área, o tamanho da lesão aterosclerótica foi maior em animais infectados com *L. major*, em relação aos animais controles ( $1.042.973 \pm 135.863$  e  $666.465 \pm 90.546 \mu\text{m}^2$ , respectivamente,  $p=0,05$ , Figura 16). Além do maior tamanho, as placas ateroscleróticas foram mais desenvolvidas nos animais infectados: as lesões dos animais controle são formadas por estrias gordurosas com várias camadas de células espumosas. Nos animais infectados, entretanto, nota-se também a presença do centro necrótico com deposição de cristais de colesterol, caracterizando uma lesão mais avançada. (Figura 17).



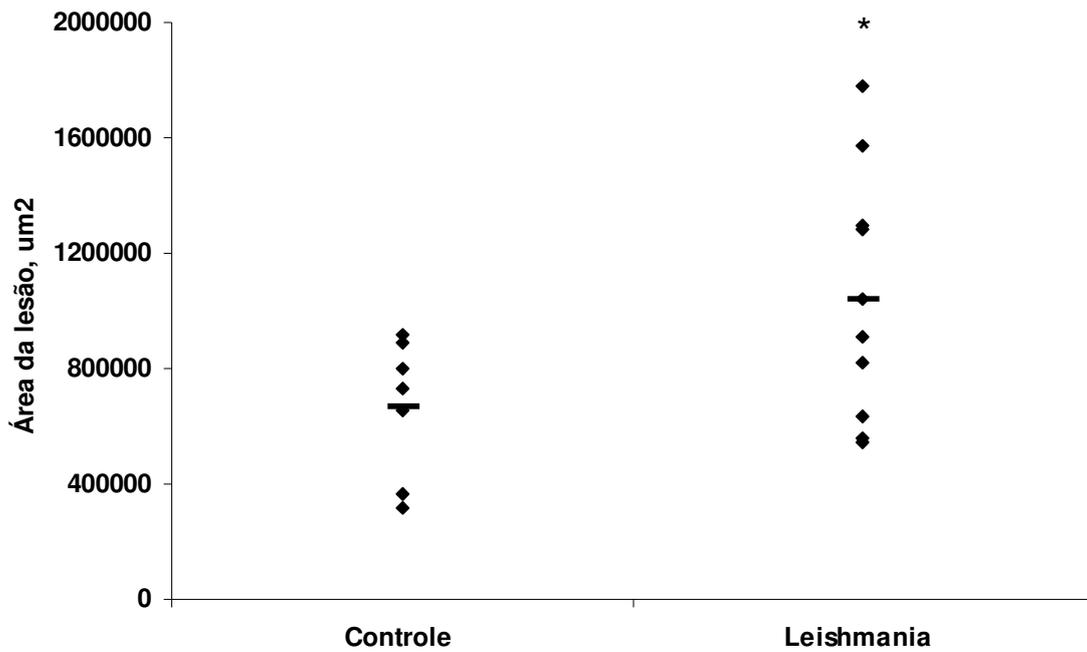
**Figura 14 – Porcentagem de deposição lipídica em aorta torácica e abdominal dos animais apoE<sup>-/-</sup> controle e infectado com *L. major*.**

Resultados expressos como média da porcentagem de lesão pela área total da aorta dos animais controles (n=7) e infectados (n=8) no final do experimento. Linhas horizontais representam média de cada grupo.



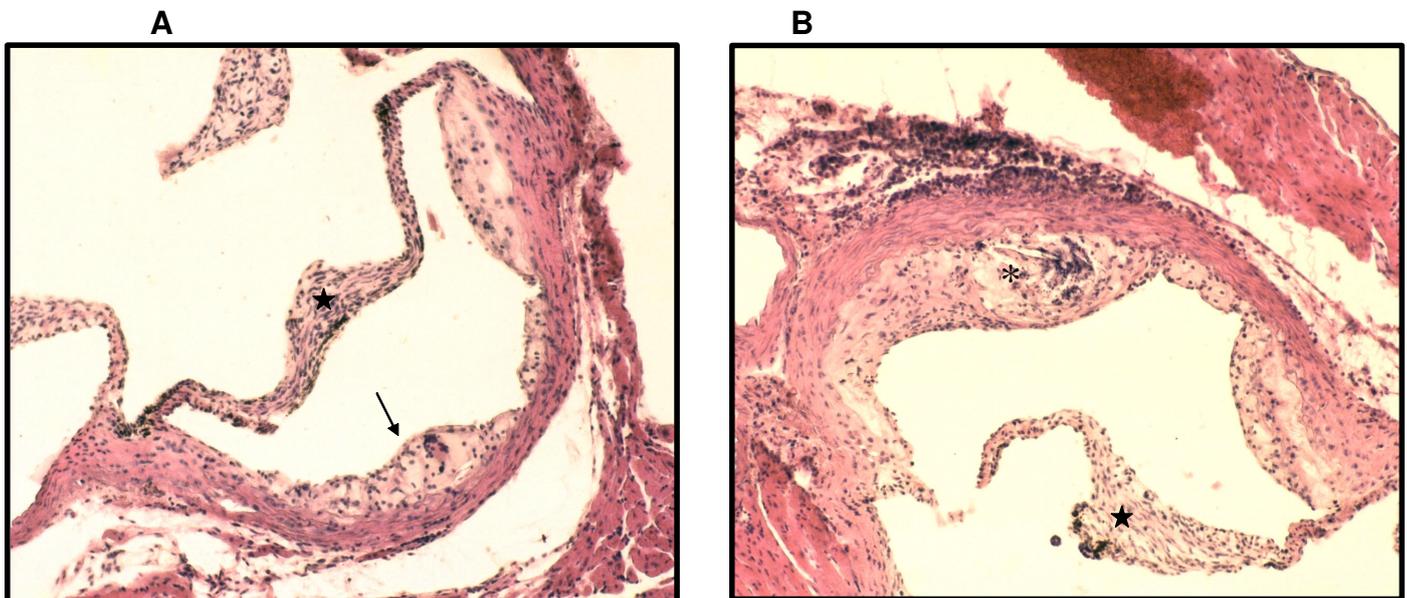
**Figura 15 – Aspecto histológico da aorta torácica e abdominal dos animais apoE<sup>-/-</sup> controle e infectado com *L. major*.**

A - controle. B - *Leishmania*. As aortas foram coradas com Sudan IV específico para lipídeos (vermelho).



**Figura 16 – Área da lesão aterosclerótica dos animais apoE<sup>-/-</sup> controle e infectado com *L. major*.**

Resultado representa o valor de cada animal do grupo controle (n=7) e infectado (n=10) em µm<sup>2</sup> da aorta, no final do experimento. Barra horizontal indica a média da área de lesão \*p=0,05

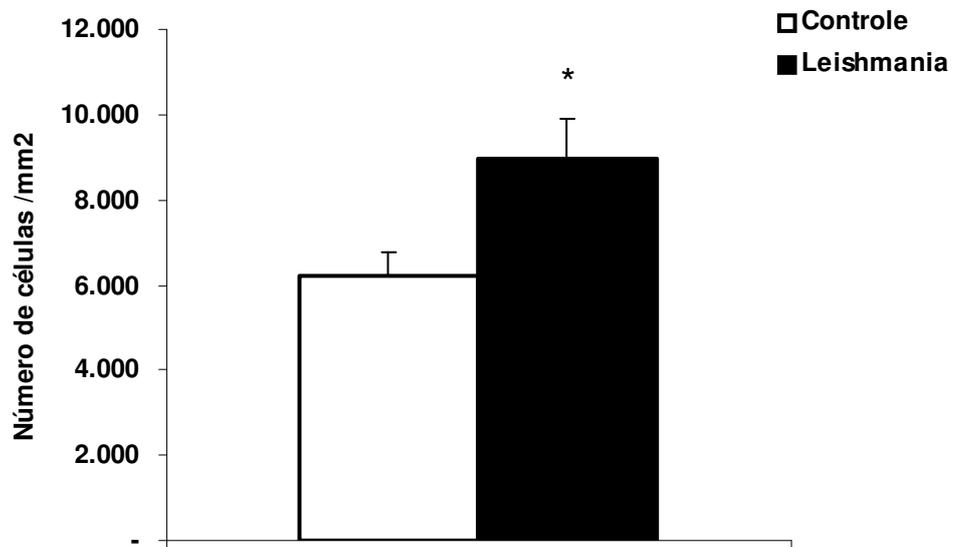


**Figura 17 - Aspecto histológico da raiz da aorta dos animais apoE<sup>-/-</sup> controles e infectados com *L. major*.**

A - Controle. B – *Leishmania*. A estria gordurosa está representada pela seta, e o centro necrótico pelo asterisco. A referência anatômica da válvula está identificada pela estrela. Os cortes foram corados com HE, aumento 100X.

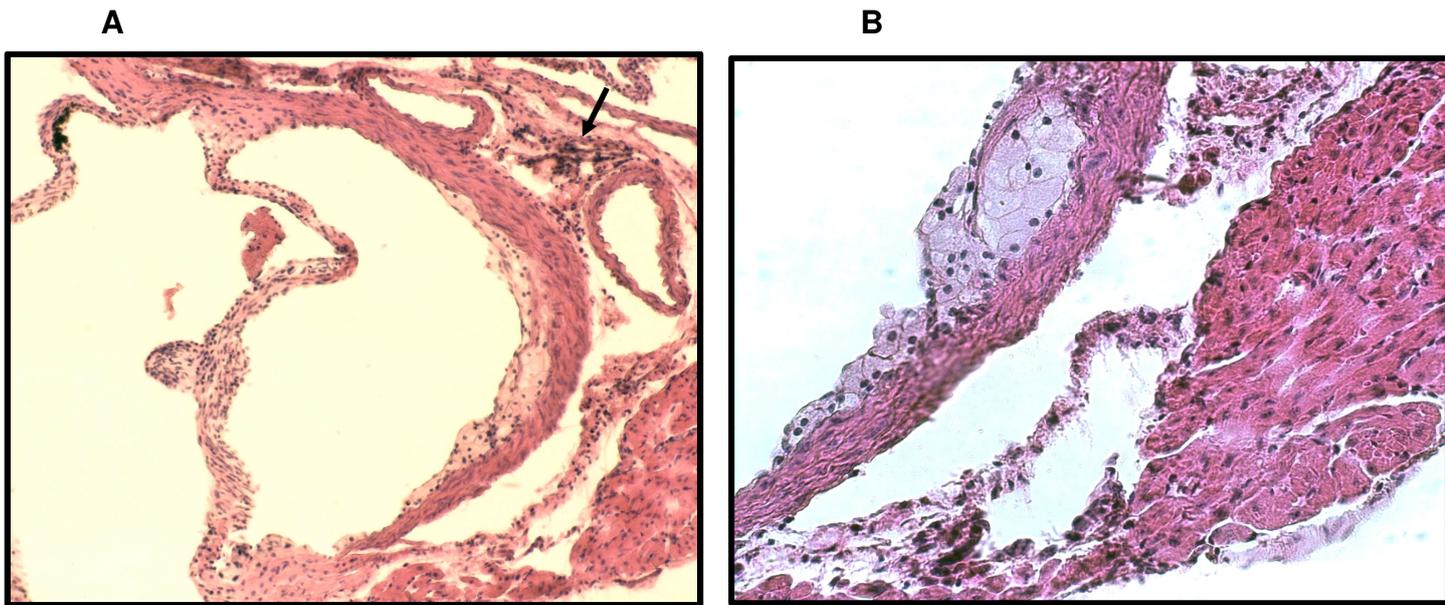
#### 4.6. Infiltrado inflamatório

Foi observada uma grande presença de infiltrado inflamatório nos cortes de animais infectados. Esta observação foi confirmada pela mensuração do número de células inflamatórias na região da lesão aterosclerótica. O infiltrado inflamatório foi maior em animais infectados comparados com os controles ( $8971 \pm 907$  e  $6228 \pm 553$  células/mm<sup>2</sup>, respectivamente,  $p=0,03$ ) (Figura 18). Pelos cortes histológicos, percebe-se que a área no entorno da lesão do grupo controle apresenta poucas células inflamatórias (Figura 19). Contrariamente, nos cortes de animais infectados, o número de células inflamatórias é muito superior e estas não estão restritas ao redor da lesão, mas também encontram-se no interior da placa aterosclerótica (Figura 20).



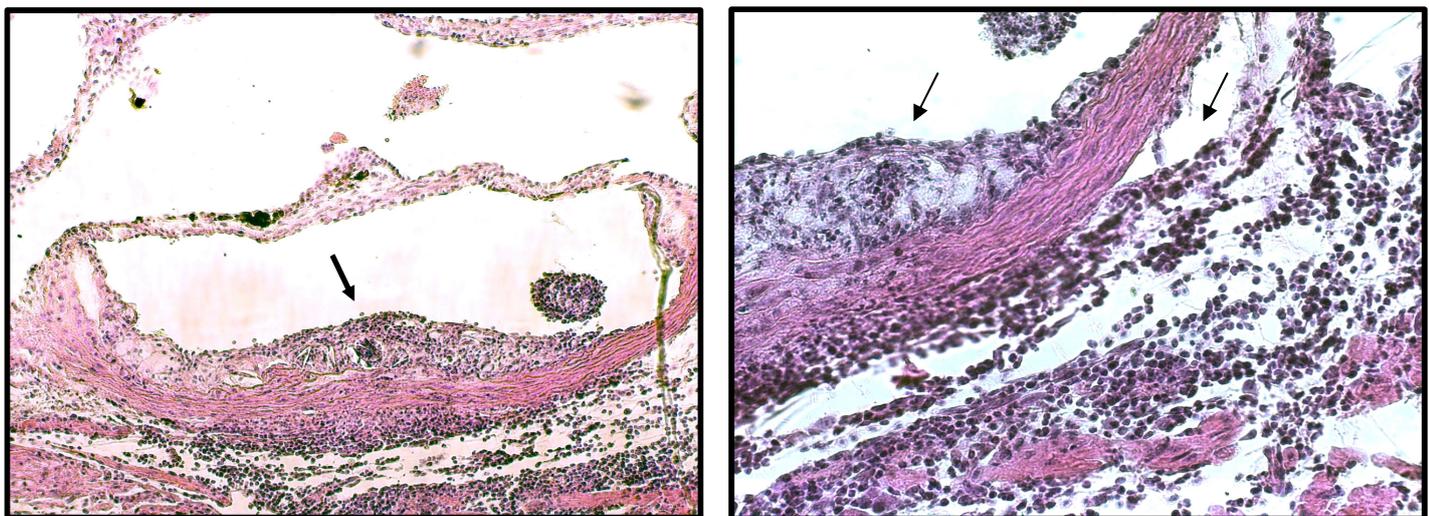
**Figura 18 - Infiltrado inflamatório dos animais apoE<sup>-/-</sup> controle e infectado com *L. major*.**

Resultados expressos como média do número de células/mm<sup>2</sup> dos animais controles (n=5) e infectados (n=5) no final do experimento. Linhas verticais representam erro padrão de cada grupo. \*p<0,05



**Figura 19 - Aspecto histológico do infiltrado inflamatório dos animais apoE<sup>-/-</sup> controle.**

A – aumento de 100X. B – aumento de 200X. A seta indica células inflamatórias. Os cortes foram corados com HE.



**Figura 20 - Aspecto histológico do infiltrado inflamatório dos animais apoE<sup>-/-</sup> infectados com *L. major*.**

A – aumento de 100X. B – aumento de 200X. As setas mostram células inflamatórias no interior e no entorno da placa. Os cortes foram corados com HE.

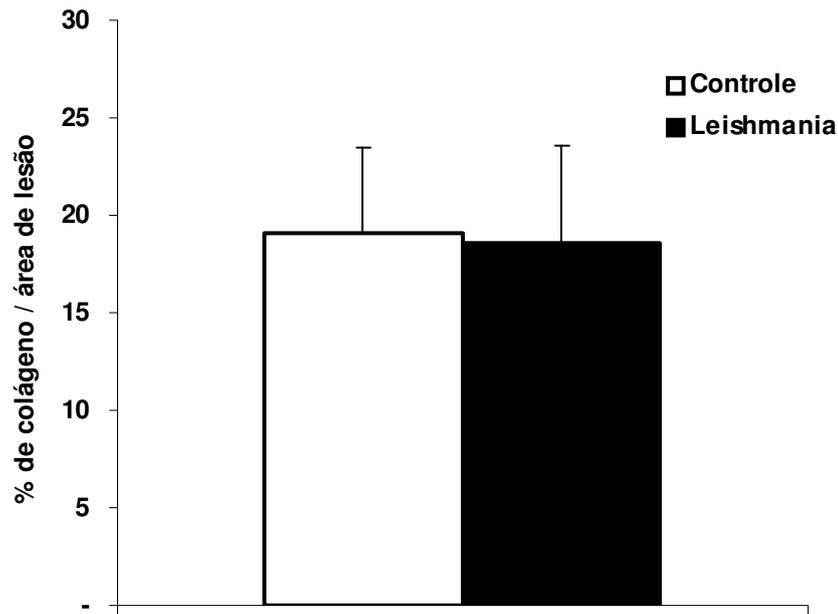
#### 4.7. Quantificação de colágeno na lesão aterosclerótica

Um dos parâmetros para se avaliar a estabilidade da placa aterosclerótica é a quantificação de colágeno. Não foi observada nenhuma diferença entre o grupo controle e infectado em relação à proporção de colágeno no interior da lesão ( $19,1 \pm 4,4$  e  $18,6 \pm 5,0$  % de colágeno / área de lesão, respectivamente,  $p=0,95$ , Figura 21).

A Figura 22 representa o aspecto histológico dos cortes corado com Tricômio de Gômori, específico para colágeno, que é detectado em verde. Percebe-se a similaridade entre o grupo controle (A) e o infectado (B).

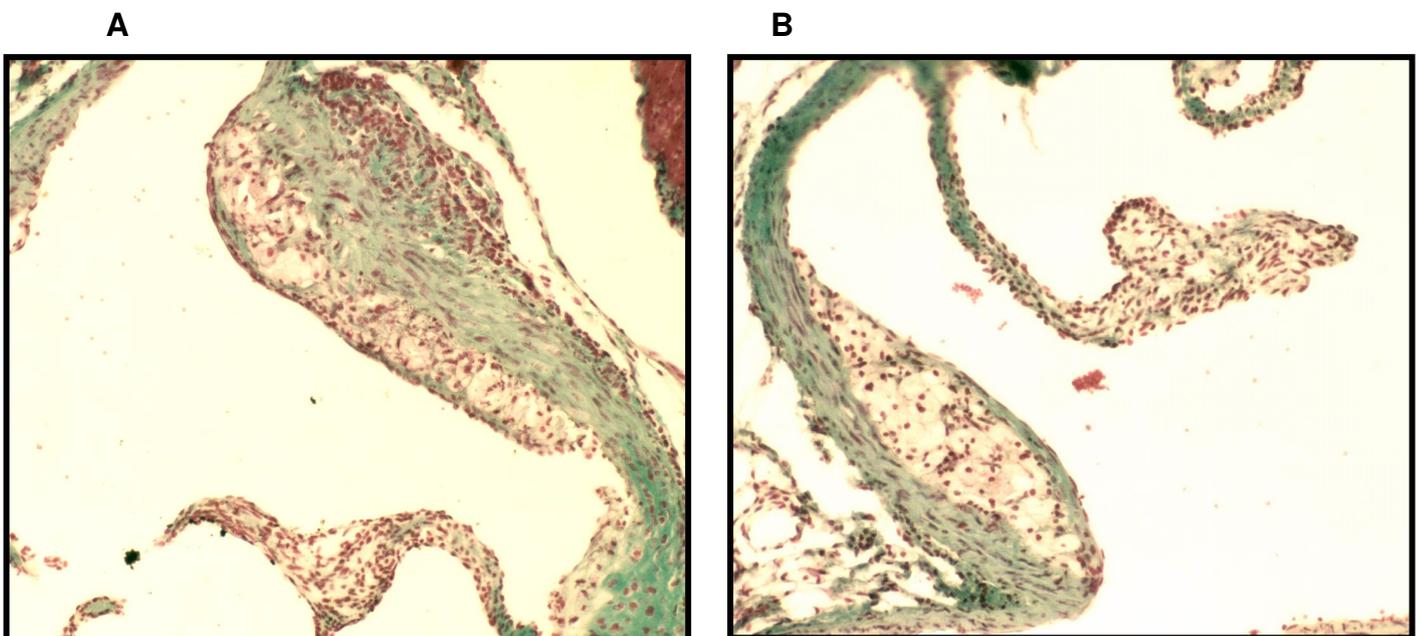
#### 4.8. Avaliação da presença de *L. major*

Com o propósito de investigar se o grande aumento do infiltrado inflamatório e do tamanho da lesão relacionava-se com a possível presença de *Leishmania* naquele local, a presença de DNA específico de *L. major* no baço, fígado e tecido cardíaco (área próxima à válvula aórtica) foi pesquisada. Não foi detectada a presença do parasita no baço e no fígado por meio do PCR, no final do experimento. Entretanto, DNA de *L. major* foi encontrado no coração de 2 animais infectados, em um total de 3 animais. Como era esperado, nenhum parasita foi detectado nos 3 animais controles (Figura 23).



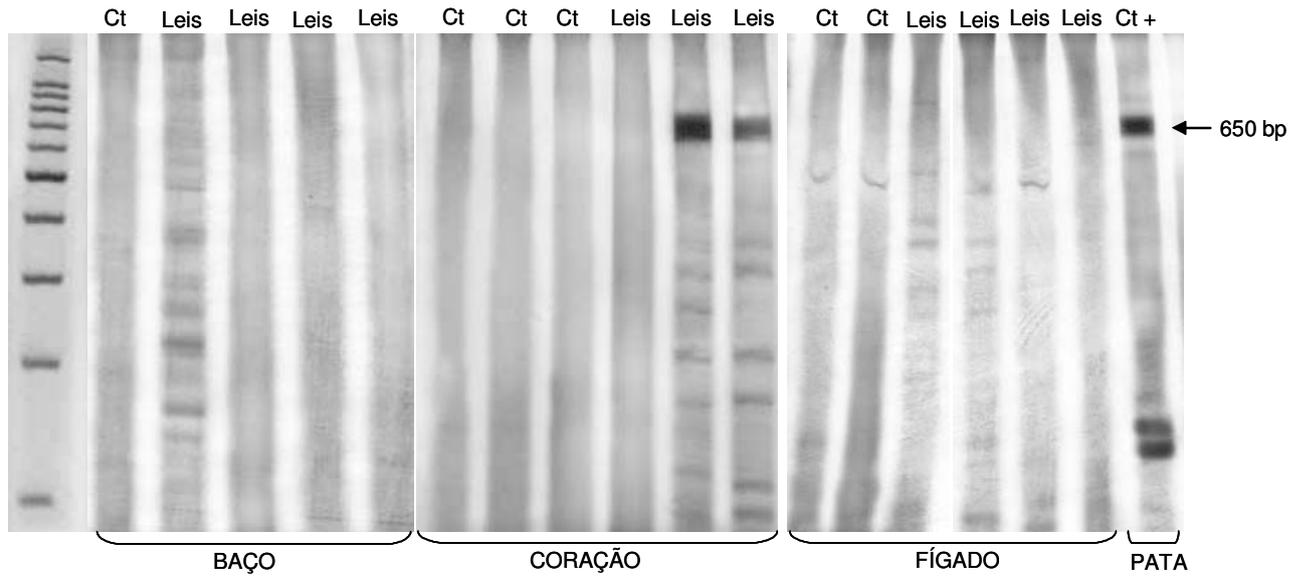
**Figura 21 - Colágeno dos animais apoE<sup>-/-</sup> controle e infectado com *L. major*.**

Resultados expressos como média da porcentagem de colágeno da área total da lesão aterosclerótica dos animais controles (n=5) e infectados (n=5) no final do experimento. Linhas verticais representam erro padrão de cada grupo.



**Figura 22 - Aspecto histológico do conteúdo colágeno dos animais apoE<sup>-/-</sup> controles e infectados com *L. major*.**

A – Controle. B – *Leishmania*. O colágeno é corado em verde. Os cortes foram corados com Tricômio de Gômori. Aumento de 100 X.



**Figura 23 – Produtos de PCR obtidos de DNA de baço, coração e fígado de animais apoE<sup>-/-</sup> controles e infectados com *L. major*.**  
 Última linha- controle positivo, DNA extraído de pata infectada com *L. major*. Ct- animais apoE<sup>-/-</sup> controles. Leis- animais apoE<sup>-/-</sup> infectados com *L. major*.

## 5.DISCUSSÃO

A inflamação na aterosclerose inicia-se como resposta à injúria do endotélio. A disfunção endotelial é o primeiro passo na formação da aterosclerose, e pode ser causada pela LDL elevada e modificada, radicais livres gerados pelo cigarro, hipertensão, diabetes mellitus, alterações genéticas e a combinação destes ou outros fatores. A disfunção endotelial resultante da injúria leva a respostas compensatórias que tentam preservar a homeostase normal do endotélio. Dentre estas respostas, estão o aumento da permeabilidade do vaso; indução de citocinas e fatores de crescimento; estímulo à migração e proliferação de células musculares lisas, macrófagos e subtipos específicos de células T. Todos estes fatores promovem o desenvolvimento da lesão. Além disto, mediadores da inflamação, como TNF- $\alpha$ , IL-1 e MCSF, aumentam a ligação da LDL ao endotélio, gerando mais células espumosas (Ross, 1999)

Infecções estão sendo cada vez mais reconhecidas como fatores de risco para aterosclerose e suas manifestações clínicas (Epstein *et al.*, 1999; Leinonen & Saikku, 2002; Magen *et al.*, 2005). A hipótese infecciosa está relacionada ao crucial papel da inflamação na aterogênese e no desenvolvimento da placa aterosclerótica (Ross, 1999).

Dentre os agentes infecciosos relacionados à aterosclerose, bactérias e vírus são amplamente discutidos na literatura, principalmente *Chlamydia pneumoniae* (Mussa *et al.*, 2006), *Helicobacter pylori* (Franceschi *et al.*, 2005) e citomegalovirus (Stassen *et al.*, 2006). Entretanto, há poucos estudos envolvendo a associação da formação da lesão aterosclerótica com protozoários. As infecções com *Trypanosoma cruzi* ou por *Toxoplasma gondii* mostraram ser pró-aterogênicas, provavelmente devido ao aumento da resposta pró-inflamatória (perfil Th1), induzida de forma sistêmica por estes dois parasitas (Portugal *et al.*, 2004;

Sunnemark *et al.*, 2000). Doenhoff *et al.* (2002) mostraram que a infecção com *Schistosoma mansoni* reduz o tamanho da lesão aterosclerótica. Este helminto elicita uma resposta antiinflamatória tipo Th2, que é uma possível explicação para a diminuição da placa observada.

A infecção com *L. major* em animais resistentes, como camundongos da linhagem C57BL/6, causa uma resposta pró-inflamatória (Th1) no local da lesão, com ativação de linfonodos próximos e, mais discretamente, do baço. Devido ao seu caráter restritivo ao local da infecção, torna-se difícil a detecção de citocinas características do perfil Th1 no sangue de animais infectados com *L. major*. Considera-se, deste modo, a infecção por *L. major* uma doença não sistêmica.

A associação entre infecções por protozoário que desencadeiam grandes respostas sistêmicas (como *T. cruzi* e *T. gondii*) e aterosclerose é de fácil compreensão, uma vez que os componentes pró-inflamatórios (quimiocinas, citocinas, etc.) podem atingir as artérias de médio e grande calibre. O aumento da inflamação nas artérias promove a migração e ativação dos macrófagos na área da lesão ou, alternativamente, aumenta o estresse oxidativo sistêmico, levando à maior oxidação de lipoproteínas ou a alterações no endotélio. Porém, a literatura apresenta mostras que, mesmo infecções localizadas, como as odontológicas, também podem ser associadas à aterosclerose (Meurman *et al.*, 2004). Assim, nosso trabalho teve o intuito de verificar se uma infecção de caráter mais local e autolimitada seria suficiente para acelerar o desenvolvimento da aterosclerose, como ocorre com infecções sistêmicas. Ao nosso conhecimento, este é o primeiro trabalho que estuda a relação da infecção por *Leishmania major* na aterogênese.

Nossos resultados mostram que a infecção por *L. major* em animais apoE<sup>-/-</sup> apresenta a mesma evolução da infecção quando comparados com animais C57BL/6. Ou seja, ambas linhagens apresentaram aumento do tamanho da lesão na pata da 1ª a 5ª

semana, com diminuição do edema na 6<sup>a</sup> semana. Dessa forma, assumimos que a resposta imunológica conhecida, envolvendo *L. major* e animais C57BL/6, tal como a resistência à infecção e o desenvolvimento da resposta Th1, pode ser extensiva a animais apoE<sup>-/-</sup>, de mesmo fundo genético.

Em nosso trabalho, a infecção levou a uma discreta diminuição da ingestão alimentar nos animais infectados. Em consequência, foi provocada uma redução concomitante da oferta alimentar aos animais controles não infectados, com o intuito de manter os fatores alimentares (que podem relacionar-se com a aterogênese) similares entre os grupos. Embora esta redução discreta não tenha desencadeado mudanças estatísticas no peso corporal, ela sugere que, pelo menos em uma fase determinada, a infecção por *L. major* tenha apresentado uma repercussão sistêmica suficiente para induzir uma redução do apetite e da ingestão calórica. Além disso, é conhecido que componentes inflamatórios como TNF- $\alpha$  estão ligados à redução da ingestão calórica e perda de peso (Coppack, 2001; Hube & Hauner, 1999). Assim, reconhecemos que embora discreta, a infecção por *L. major* leva a uma repercussão sistêmica, que poderia influenciar no metabolismo lipídico e na formação da aterosclerose.

Infecção e inflamação desencadeiam uma variedade de mudanças na concentração de proteínas, como proteína C reativa (CRP), proteína sérica amilóide (SAA) e albumina, conhecidas como resposta à fase aguda (APR). A síntese de proteínas desta fase é mediada por citocinas (TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6 e IFN- $\gamma$ ) e tem como objetivo proteger o dano tecidual e facilitar mecanismos de reparo (Gabay & Kushner, 1999). As mudanças ocorridas no metabolismo lipídico durante a APR, como aumento de colesterol e triglicerídeos e diminuição da HDL, auxiliam na redistribuição de nutrientes para as células que são importantes na defesa do hospedeiro (Khovidhunkit *et al.*, 2004). Deste modo, em nosso trabalho, também observamos alterações no metabolismo lipídico em animais infectados com *Leishmania major*, embora o perfil das

mudanças obtidas neste estudo seja diferente daquele relatado na APR. Dentre as modificações observadas, houve um aumento no nível de colesterol total e das frações aterogênicas em camundongos infectados com *L. major*. Este aumento pode ser devido à necessidade de colesterol para o reparo e regeneração de membranas danificadas durante a resolução da doença. Além disto, sabe-se que, durante a infecção, o colesterol total e em LDL estão aumentados em roedores e coelhos. Em humanos este aumento não é usualmente observado (Esteve *et al.*, 2005), embora Faucher *et al.* (2002) descrevam um aumento de colesterol total, HDL e LDL em pacientes portadores de malária. Especificamente em relação à *Leishmania*, há apenas o relato de Nieto *et al.* (1992) que, estudando cães infectados com *L. infantum*, observaram aumento de colesterol total e LDL nestes animais. Os autores justificam este aumento devido à disfunção hepática provocada pela doença e às interações entre o parasita e o colesterol do hospedeiro.

No entanto, Sunnemark *et al.* (2000) e Portugal *et al.* (2004) observaram diminuição nos níveis de colesterol total em camundongos CBA/J infectados com *T. cruzi* e apoE<sup>-/-</sup> infectados com *T. gondii*, respectivamente. Tais dados, contrários aos obtidos no atual trabalho, podem ser justificados pelas diferenças nas infecções, visto que *T. cruzi* e *T. gondii* causam infecção (sistêmica) mais grave que a causada por *L. major*, em animais com fundo genético de C57BL/6. Infecções sistêmicas podem levar à redução significativa da ingestão alimentar, perda de peso e um direcionamento metabólico do acetil CoA e acetoacetato para o fornecimento de energia, e não para a síntese de colesterol, reduzindo a síntese e aumentando a captação do colesterol sanguíneo. Adicionalmente, ocorrem diferenças na obtenção de colesterol entre *T. gondii* e *L. major*, sendo o primeiro incapaz de sintetizar seu próprio colesterol. Deste modo, é significativa a dependência do *T. gondii* em relação ao colesterol do hospedeiro, o que é refletido na diminuição do colesterol sérico. Urbina *et al.*

(2002) sugerem que a *Leishmania* necessita de esteróides endógenos estritos (ergosterol e análogos) para a sobrevivência e crescimento, mas não pode utilizar o abundante suprimento de colesterol, presente no hospedeiro. Além disto, Ginger *et al.* (2000) relatam que *L. mexicana* utiliza o aminoácido leucina como a principal fonte de carbono para a biossíntese de esteróide durante as duas fases do seu ciclo de vida, amastigota intracelular e promastigota extracelular.

Nossos resultados demonstram que, pelo menos em animais apoE<sup>-/-</sup>, a infecção com *L. major* interfere no metabolismo lipídico levando ao aumento tanto das frações aterogênicas como da fração protetora HDL.

Em relação aos triglicerídeos, a infecção por *L. major* provocou redução nos seus níveis de hepático e sérico, o que pode ser devido à maior utilização de ácidos graxos pelo parasita. Estudos com *L. mexicana* demonstram que a taxa de captação e catabolismo de ácidos graxos não esterificados foi 10 vezes maior em amastigotas, em relação a promastigotas, sugerindo que ácidos graxos são importante fonte de energia para amastigota (Hart & Coombs, 1982). Assim, a infecção pode ter causado uma redução de triglicerídeos em remanescentes de lipoproteínas (abundantes em apoE<sup>-/-</sup>), o que levaria à conversão mais rápida destas em LDL pequenas e densas que são mais aterogênicas que as LDL normais (Rizzo & Berneis, 2006).

Em resumo, nossos resultados indicam que a infecção por *L. major* provoca mudanças tanto no colesterol e triglicérides circulantes como no teor de lipídeos no fígado.

Nosso próximo procedimento foi averiguar se estas mudanças no perfil lipídico seriam suficientes para induzir um aumento da aterosclerose. Os resultados na raiz da aorta mostram que, interessantemente, a infecção provocada por *L. major*, apesar de localizada e autolimitada, mostrou-se capaz de aumentar em 64% o tamanho da placa aterosclerótica em relação ao controle. Este aumento pode ser explicado de várias formas.

Em primeiro lugar, a hipercolesterolemia e o elevado nível de lipoproteínas aterogênicas são fatores de risco para a aterosclerose. Embora a hipertrigliceridemia possa também ser considerada um fator de risco, a redução de triglicerídeos não foi suficiente para diminuir a lesão ou, como citado anteriormente, pode ter causado a formação de LDL mais aterogênica. Além da hipercolesterolemia, a inflamação, por si só, pode aumentar o estresse oxidativo e a injúria endotelial (Hansson, 2005), o que levaria à maior migração de monócitos e linfócitos para a área da lesão, culminando no aumento da aterogênese. Isso só ocorreria caso houvesse, mesmo que transitório, um quadro inflamatório sistêmico induzido pela infecção. Nossos resultados suportam este fato, uma vez que, além das alterações no perfil sanguíneo e no metabolismo hepático de lipídeos, ocorreu um aumento significativo do infiltrado inflamatório na raiz da aorta de camundongos infectados. Este aumento relaciona-se com o maior desenvolvimento das lesões ateroscleróticas.

Várias linhas de evidências demonstraram a importância da participação de células inflamatórias na aterosclerose. Segundo estudos realizados por Dansky *et al.* (1997), Reardon *et al.* (2003) e Reardon *et al.* (2001), camundongos apoE<sup>-/-</sup> cruzados com camundongos deficientes em células B e T (RAG<sup>-/-</sup>) apresentaram redução da lesão aterosclerótica inicial, quando comparados com seus controles imunocompetentes. Sabe-se também que a presença de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e macrófagos está relacionada com a progressão da doença. Igualmente, a produção de citocinas inflamatórias por estas células irá acarretar a ativação de fatores endoteliais ou trombóticos, importante no desenvolvimento da lesão. Nossos resultados estão de acordo com Portugal *et al.* (2004) que mostraram um maior desenvolvimento do ateroma, associado a um aumento de macrófagos, células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> em animais infectados com *T. gondii*.

Após a constatação da expressiva quantidade de células inflamatórias, nosso objetivo foi tentar estabelecer se este fato foi devido à presença do parasita na área da lesão.

Surpreendentemente a presença de *L. major* foi detectada, pela técnica de PCR, no tecido cardíaco próximo ao ateroma. Estudos anteriores relatam a detecção de DNA específico de *L. major* em linfonodos, baço, medula óssea e fígado de animais C57BL/6, após 1 ano da infecção (Aebischer *et al.*, 1993). Entretanto, não há relatos de presença do parasita no coração. Possivelmente a presença de *L. major* nas proximidades da lesão deve-se à migração de monócitos/macrófagos infectados. Como é bem estabelecido, a lesão aterosclerótica é um foco de inflamação e assim, recruta, de forma inespecífica, macrófagos ativados ou não, células T e SMC para a área da lesão. A conseqüente migração de macrófagos infectados ativados para a área da lesão agrava a inflamação, acelerando a formação de ateromas maiores e com características de placa mais avançada, como visto na histologia. Em nosso estudo, não foi verificada a presença do parasita no baço ou no fígado, descartando a hipótese de visceralização, e evidenciando a especificidade do recrutamento de macrófagos infectados para a área de lesão.

Por outro lado, não foram encontradas diferenças na quantificação da lesão aterosclerótica na aorta abdominal e torácica entre animais controles e infectados. O fato se justifica pelo desenvolvimento mais lento nesta região, em relação à válvula aórtica. A aorta torácica e abdominal possuem baixa força de cisalhamento e menor predisposição à aterogênese que a raiz da aorta (Teupser *et al.*, 2003). Assim, diferenças na área de lesão aterosclerótica na aorta descendente e suas ramificações apenas são vistas mais tardiamente em relação à válvula aórtica.

O aumento do infiltrado inflamatório na região da lesão aterosclerótica e, principalmente, a presença de IFN- $\gamma$  e metaloproteinases, relacionam-se à instabilidade da placa, acarretando em redução da capa fibrosa e conseqüente ruptura da

lesão com desenvolvimento de trombos (Scott, 2004). A deposição de colágeno na capa fibrosa é fator de estabilidade da placa, melhorando o prognóstico da doença. Nossos resultados não demonstraram diferenças no conteúdo de colágeno entre animais infectados com *L. major* e controles. Resultado similar foi obtido no trabalho envolvendo *T. gondii*, onde houve aumento do infiltrado, mas sem diferença na quantificação de colágeno (Portugal *et al.*, 2004). Este fato pode ser devido ao estágio de desenvolvimento da lesão (entre estrias gordurosas e lesões intermediárias), onde a formação da capa fibrosa ainda é inicial, sendo assim, um estágio precoce para a detecção de mudanças em sua composição.

Em conclusão, a infecção com *L. major*, mesmo sendo uma doença local e autolimitada em camundongos resistentes, provoca mudanças negativas no perfil lipídico e aceleração da aterogênese. Estes resultados são a consequência das alterações na resposta inflamatória provocada pela infecção por *Leishmania*, e podem, ainda, ter sido estimulados pela própria presença do parasita ou macrófagos ativados pelo parasita no tecido cardíaco.

## 6.PERSPECTIVAS

1- Estudar, *in vitro*, a captação de lipoproteínas por macrófago peritoneal infectado com *L. major*;

2- Analisar a expressão de receptores *scavengers*, moléculas de adesão e MCP-1;

3- Caracterizar a placa pela imunohistoquímica do infiltrado inflamatório;

4- Verificar a presença de *L. major* no baço, fígado e coração por meio de PCR real time;

## 7.REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

AALTO-SETALA, K., LAITINEN, K., ERKKILA, L., LEINONEN, M., JAUHAINEN, M., EHNHOLM, C., TAMMINEN, M., PUOLAKKAINEN, M., PENTTILA, I. e SAIKKU, P. Chlamydia pneumoniae does not increase atherosclerosis in the aortic root of apolipoprotein E-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, v.21, n.4, p.578-84. **2001**.

AEBISCHER, T., MOODY, S.F. e HANDMAN, E. Persistence of virulent Leishmania major in murine cutaneous leishmaniasis: a possible hazard for the host. *Infect Immun*, v.61, n.1, p.220-6. **1993**.

AIT-OUFELLA, H., SALOMON, B.L., POTTEAUX, S., ROBERTSON, A.K., GOURDY, P., ZOLL, J., MERVAL, R., ESPOSITO, B., COHEN, J.L., FISSON, S., FLAVELL, R.A., HANSSON, G.K., KLATZMANN, D., TEDGUI, A. e MALLAT, Z. Natural regulatory T cells control the development of atherosclerosis in mice. *Nat Med*, v.12, n.2, p.178-80. **2006**.

ALLAIN, C.C., POON, L.S., CHAN, C.S., RICHMOND, W. e FU, P.C. Enzymatic determination of total serum cholesterol. *Clin Chem*, v.20, n.4, p.470-5. **1974**.

ALVAREZ-LEITE, J.I., OLIVEIRA, D.R. e PELUZIO, M.C.G. Dislipidemias. In: NETO, F. (Ed.). Nutrição clínica. Rio de janeiro: Guanabara Koogan 196-211, **2003**.

ALVAREZ-LEITE, J.I. e PELUZIO, M.C.G. Lípides. In: NETO, F. (Ed.). Nutrição clínica. Rio de janeiro: Guanabara Koogan 7-19, **2003**.

ANDERS, G., EISENBERGER, C.L., JONAS, F. e GREENBLATT, C.L. Distinguishing Leishmania tropica and Leishmania major in the Middle East using the polymerase chain reaction with kinetoplast DNA-specific primers. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, v.96 Suppl 1, p.S87-92. **2002**.

ANTOINE, J.C., PRINA, E., LANG, T. e COURRET, N. The biogenesis and properties of the parasitophorous vacuoles that harbour Leishmania in murine macrophages. *Trends Microbiol*, v.6, n.10, p.392-401. **1998**.

ASSMANN, G. e GOTTO, A.M., JR. HDL cholesterol and protective factors in atherosclerosis. *Circulation*, v.109, n.23 Suppl 1, p.III8-14. **2004**.

- BERLINER, J.A., NAVAB, M., FOGELMAN, A.M., FRANK, J.S., DEMER, L.L., EDWARDS, P.A., WATSON, A.D. e LUSIS, A.J. Atherosclerosis: basic mechanisms. Oxidation, inflammation, and genetics. *Circulation*, v.91, n.9, p.2488-96. **1995**.
- BIRNIE, D.H., HOLME, E.R., MCKAY, I.C., HOOD, S., MCCOLL, K.E. e HILLIS, W.S. Association between antibodies to heat shock protein 65 and coronary atherosclerosis. Possible mechanism of action of Helicobacter pylori and other bacterial infections in increasing cardiovascular risk. *Eur Heart J*, v.19, n.3, p.387-94. **1998**.
- BRESLOW, J.L. Mouse models of atherosclerosis. *Science*, v.272, n.5262, p.685-8. **1996**.
- BURCHMORE, R.J. e BARRETT, M.P. Life in vacuoles--nutrient acquisition by Leishmania amastigotes. *Int J Parasitol*, v.31, n.12, p.1311-20. **2001**.
- BURNETT, M.S., DURRANI, S., STABILE, E., SAJI, M., LEE, C.W., KINNAIRD, T.D., HOFFMAN, E.P. e EPSTEIN, S.E. Murine cytomegalovirus infection increases aortic expression of proatherosclerotic genes. *Circulation*, v.109, n.7, p.893-7. **2004**.
- CALIGIURI, G., ROTTENBERG, M., NICOLETTI, A., WIGZELL, H. e HANSSON, G.K. Chlamydia pneumoniae infection does not induce or modify atherosclerosis in mice. *Circulation*, v.103, n.23, p.2834-8. **2001**.
- COPPACK, S.W. Pro-inflammatory cytokines and adipose tissue. *Proc Nutr Soc*, v.60, n.3, p.349-56. **2001**.
- CYBULSKY, M.I. e GIMBRONE, M.A., JR. Endothelial expression of a mononuclear leukocyte adhesion molecule during atherogenesis. *Science*, v.251, n.4995, p.788-91. **1991**.
- DANESH, J., COLLINS, R. e PETO, R. Chronic infections and coronary heart disease: is there a link? *Lancet*, v.350, n.9075, p.430-6. **1997**.
- DANSKY, H.M., CHARLTON, S.A., HARPER, M.M. e SMITH, J.D. T and B lymphocytes play a minor role in atherosclerotic plaque formation in the apolipoprotein E-deficient mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v.94, n.9, p.4642-6. **1997**.
- DAUGHERTY, A. e RATERI, D.L. T lymphocytes in atherosclerosis: the yin-yang of Th1 and Th2 influence on lesion formation. *Circ Res*, v.90, n.10, p.1039-40. **2002**.

- DAVIES, M.J., RICHARDSON, P.D., WOOLF, N., KATZ, D.R. e MANN, J. Risk of thrombosis in human atherosclerotic plaques: role of extracellular lipid, macrophage, and smooth muscle cell content. *Br Heart J*, v.69, n.5, p.377-81. **1993**.
- DENNY, P.W., GOULDING, D., FERGUSON, M.A. e SMITH, D.F. Sphingolipid-free Leishmania are defective in membrane trafficking, differentiation and infectivity. *Mol Microbiol*, v.52, n.2, p.313-27. **2004**.
- DOENHOFF, M.J., STANLEY, R.G., GRIFFITHS, K. e JACKSON, C.L. An anti-atherogenic effect of Schistosoma mansoni infections in mice associated with a parasite-induced lowering of blood total cholesterol. *Parasitology*, v.125, n.Pt 5, p.415-21. **2002**.
- DONG, Z.M., CHAPMAN, S.M., BROWN, A.A., FRENETTE, P.S., HYNES, R.O. e WAGNER, D.D. The combined role of P- and E-selectins in atherosclerosis. *J Clin Invest*, v.102, n.1, p.145-52. **1998**.
- EPSTEIN, S.E., ZHOU, Y.F. e ZHU, J. Infection and atherosclerosis: emerging mechanistic paradigms. *Circulation*, v.100, n.4, p.e20-8. **1999**.
- ESTEVE, E., RICART, W. e FERNANDEZ-REAL, J.M. Dyslipidemia and inflammation: an evolutionary conserved mechanism. *Clin Nutr*, v.24, n.1, p.16-31. **2005**.
- EZZAHIRI, R., STASSEN, F.R., KURVERS, H.A., VAN PUL, M.M., KITSLAAR, P.J. e BRUGGEMAN, C.A. Chlamydia pneumoniae infection induces an unstable atherosclerotic plaque phenotype in LDL-receptor, ApoE double knockout mice. *Eur J Vasc Endovasc Surg*, v.26, n.1, p.88-95. **2003**.
- FABRICANT, C.G., FABRICANT, J., LITRENTA, M.M. e MINICK, C.R. Virus-induced atherosclerosis. *J Exp Med*, v.148, n.1, p.335-40. **1978**.
- FAUCHER, J.F., NGOU-MILAMA, E., MISSINOU, M.A., NGOMO, R., KOMBILA, M. e KREMSNER, P.G. The impact of malaria on common lipid parameters. *Parasitol Res*, v.88, n.12, p.1040-3. **2002**.
- FAZIO, S., BABAEV, V.R., MURRAY, A.B., HASTY, A.H., CARTER, K.J., GLEAVES, L.A., ATKINSON, J.B. e LINTON, M.F. Increased atherosclerosis in mice reconstituted with apolipoprotein E null macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v.94, n.9, p.4647-52. **1997**.

FAZIO, S. e LINTON, M.F. Mouse models of hyperlipidemia and atherosclerosis. *Front Biosci*, v.6, p.D515-25. **2001**.

FOLCH, J., LEES, M. e SLOANE STANLEY, G.H. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J Biol Chem*, v.226, n.1, p.497-509. **1957**.

FOSSATI, P. e PRENCIPE, L. Serum triglycerides determined colorimetrically with an enzyme that produces hydrogen peroxide. *Clin Chem*, v.28, n.10, p.2077-80. **1982**.

FRANCESCHI, F., LEO, D., FINI, L., SANTOLIVU, A., FLORE, R., TONDI, P., ROCCARINA, D., NISTA, E.C., CAZZATO, A.I., LUPASCU, A., POLA, P., SILVERI, N.G., GASBARRINI, G. e GASBARRINI, A. Helicobacter pylori infection and ischaemic heart disease: an overview of the general literature. *Dig Liver Dis*, v.37, n.5, p.301-8. **2005**.

FROSTEGARD, J., ULFGREN, A.K., NYBERG, P., HEDIN, U., SWEDENBORG, J., ANDERSSON, U. e HANSSON, G.K. Cytokine expression in advanced human atherosclerotic plaques: dominance of pro-inflammatory (Th1) and macrophage-stimulating cytokines. *Atherosclerosis*, v.145, n.1, p.33-43. **1999**.

GABAY, C. e KUSHNER, I. Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation. *N Engl J Med*, v.340, n.6, p.448-54. **1999**.

GINGER, M.L., PRESCOTT, M.C., REYNOLDS, D.G., CHANCE, M.L. e GOAD, L.J. Utilization of leucine and acetate as carbon sources for sterol and fatty acid biosynthesis by Old and New World Leishmania species, Endotrypanum monterogeii and Trypanosoma cruzi. *Eur J Biochem*, v.267, n.9, p.2555-66. **2000**.

GOLDSTEIN, J.L., HO, Y.K., BASU, S.K. e BROWN, M.S. Binding site on macrophages that mediates uptake and degradation of acetylated low density lipoprotein, producing massive cholesterol deposition. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v.76, n.1, p.333-7. **1979**.

HANSSON, G.K. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *N Engl J Med*, v.352, n.16, p.1685-95. **2005**.

HANSSON, G.K. e LIBBY, P. The immune response in atherosclerosis: a double-edged sword. *Nat Rev Immunol*, v.6, n.7, p.508-519. **2006**.

HART, D.T. e COOMBS, G.H. Leishmania mexicana: energy metabolism of amastigotes and promastigotes. *Exp Parasitol*, v.54, n.3, p.397-409. **1982**.

- HOFKER, M.H., VAN VLIJMEN, B.J. e HAVEKES, L.M. Transgenic mouse models to study the role of APOE in hyperlipidemia and atherosclerosis. *Atherosclerosis*, v.137, n.1, p.1-11. **1998**.
- HUBE, F. e HAUNER, H. The role of TNF-alpha in human adipose tissue: prevention of weight gain at the expense of insulin resistance? *Horm Metab Res*, v.31, n.12, p.626-31. **1999**.
- HUBER, S.A., SAKKINEN, P., DAVID, C., NEWELL, M.K. e TRACY, R.P. T helper-cell phenotype regulates atherosclerosis in mice under conditions of mild hypercholesterolemia. *Circulation*, v.103, n.21, p.2610-6. **2001**.
- JONASSON, L., HOLM, J., SKALLI, O., BONDJERS, G. e HANSSON, G.K. Regional accumulations of T cells, macrophages, and smooth muscle cells in the human atherosclerotic plaque. *Arteriosclerosis*, v.6, n.2, p.131-8. **1986**.
- KHOVIDHUNKIT, W., KIM, M.S., MEMON, R.A., SHIGENAGA, J.K., MOSER, A.H., FEINGOLD, K.R. e GRUNFELD, C. Effects of infection and inflammation on lipid and lipoprotein metabolism: mechanisms and consequences to the host. *J Lipid Res*, v.45, n.7, p.1169-96. **2004**.
- KIECHL, S., EGGER, G., MAYR, M., WIEDERMANN, C.J., BONORA, E., OBERHOLLENZER, F., MUGGEO, M., XU, Q., WICK, G., POEWE, W. e WILLEIT, J. Chronic infections and the risk of carotid atherosclerosis: prospective results from a large population study. *Circulation*, v.103, n.8, p.1064-70. **2001**.
- KUO, C.C., GOWN, A.M., BENDITT, E.P. e GRAYSTON, J.T. Detection of Chlamydia pneumoniae in aortic lesions of atherosclerosis by immunocytochemical stain. *Arterioscler Thromb*, v.13, n.10, p.1501-4. **1993**.
- KUO, C.C., GRAYSTON, J.T., CAMPBELL, L.A., GOO, Y.A., WISSLER, R.W. e BENDITT, E.P. Chlamydia pneumoniae (TWAR) in coronary arteries of young adults (15-34 years old). *Proc Natl Acad Sci U S A*, v.92, n.15, p.6911-4. **1995**.
- KWON, T.W., KIM DO, K., YE, J.S., LEE, W.J., MOON, M.S., JOO, C.H., LEE, H. e KIM, Y.K. Detection of enterovirus, cytomegalovirus, and Chlamydia pneumoniae in atheromas. *J Microbiol*, v.42, n.4, p.299-304. **2004**.
- LEE, R.T. e LIBBY, P. The unstable atheroma. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, v.17, n.10, p.1859-67. **1997**.

- LEINONEN, M. e SAIKKU, P. Evidence for infectious agents in cardiovascular disease and atherosclerosis. *Lancet Infect Dis*, v.2, n.1, p.11-7. **2002**.
- LI, H., CYBULSKY, M.I., GIMBRONE, M.A., JR. e LIBBY, P. Inducible expression of vascular cell adhesion molecule-1 by vascular smooth muscle cells in vitro and within rabbit atheroma. *Am J Pathol*, v.143, n.6, p.1551-9. **1993**.
- LIBBY, P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature*, v.420, n.6917, p.868-74. **2002**.
- LUSIS, A.J. Atherosclerosis. *Nature*, v.407, n.6801, p.233-41. **2000**.
- MAGEN, E., BORKOW, G., BENTWICH, Z., MISHAL, J. e SCHARF, S. Can worms defend our hearts? Chronic helminthic infections may attenuate the development of cardiovascular diseases. *Med Hypotheses*, v.64, n.5, p.904-9. **2005**.
- MARON, R., SUKHOVA, G., FARIA, A.M., HOFFMANN, E., MACH, F., LIBBY, P. e WEINER, H.L. Mucosal administration of heat shock protein-65 decreases atherosclerosis and inflammation in aortic arch of low-density lipoprotein receptor-deficient mice. *Circulation*, v.106, n.13, p.1708-15. **2002**.
- MEIR, K.S. e LEITERSDORF, E. Atherosclerosis in the apolipoprotein-E-deficient mouse: a decade of progress. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, v.24, n.6, p.1006-14. **2004**.
- MENDALL, M.A., GOGGIN, P.M., MOLINEAUX, N., LEVY, J., TOOSY, T., STRACHAN, D., CAMM, A.J. e NORTHFIELD, T.C. Relation of Helicobacter pylori infection and coronary heart disease. *Br Heart J*, v.71, n.5, p.437-9. **1994**.
- MEURMAN, J.H., SANZ, M. e JANKET, S.J. Oral health, atherosclerosis, and cardiovascular disease. *Crit Rev Oral Biol Med*, v.15, n.6, p.403-13. **2004**.
- MILLER, Y.I., CHANG, M.K., BINDER, C.J., SHAW, P.X. e WITZTUM, J.L. Oxidized low density lipoprotein and innate immune receptors. *Curr Opin Lipidol*, v.14, n.5, p.437-45. **2003**.
- MOGHADASIAN, M.H., FROHLICH, J.J. e MCMANUS, B.M. Advances in experimental dyslipidemia and atherosclerosis. *Lab Invest*, v.81, n.9, p.1173-83. **2001**.
- MURRAY, L.J., BAMFORD, K.B., O'REILLY, D.P., MCCRUM, E.E. e EVANS, A.E. Helicobacter pylori infection: relation with

cardiovascular risk factors, ischaemic heart disease, and social class. *Br Heart J*, v.74, n.5, p.497-501. **1995**.

MUSSA, F.F., CHAI, H., WANG, X., YAO, Q., LUMSDEN, A.B. e CHEN, C. Chlamydia pneumoniae and vascular disease: an update. *J Vasc Surg*, v.43, n.6, p.1301-7. **2006**.

NAKASHIMA, Y., PLUMP, A.S., RAINES, E.W., BRESLOW, J.L. e ROSS, R. ApoE-deficient mice develop lesions of all phases of atherosclerosis throughout the arterial tree. *Arterioscler Thromb*, v.14, n.1, p.133-40. **1994**.

NAKASHIMA, Y., RAINES, E.W., PLUMP, A.S., BRESLOW, J.L. e ROSS, R. Upregulation of VCAM-1 and ICAM-1 at atherosclerosis-prone sites on the endothelium in the ApoE-deficient mouse. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, v.18, n.5, p.842-51. **1998**.

NIETO, C.G., BARRERA, R., HABELA, M.A., NAVARRETE, I., MOLINA, C., JIMENEZ, A. e SERRERA, J.L. Changes in the plasma concentrations of lipids and lipoprotein fractions in dogs infected with *Leishmania infantum*. *Vet Parasitol*, v.44, n.3-4, p.175-82. **1992**.

NOLL, G. Pathogenesis of atherosclerosis: a possible relation to infection. *Atherosclerosis*, v.140 Suppl 1, p.S3-9. **1998**.

PAIGEN, B., MORROW, A., BRANDON, C., MITCHELL, D. e HOLMES, P. Variation in susceptibility to atherosclerosis among inbred strains of mice. *Atherosclerosis*, v.57, n.1, p.65-73. **1985**.

PAIGEN, B., MORROW, A., HOLMES, P.A., MITCHELL, D. e WILLIAMS, R.A. Quantitative assessment of atherosclerotic lesions in mice. *Atherosclerosis*, v.68, n.3, p.231-40. **1987**.

PALINSKI, W., ORD, V.A., PLUMP, A.S., BRESLOW, J.L., STEINBERG, D. e WITZTUM, J.L. ApoE-deficient mice are a model of lipoprotein oxidation in atherogenesis. Demonstration of oxidation-specific epitopes in lesions and high titers of autoantibodies to malondialdehyde-lysine in serum. *Arterioscler Thromb*, v.14, n.4, p.605-16. **1994**.

PORTUGAL, L.R., FERNANDES, L.R., CESAR, G.C., SANTIAGO, H.C., OLIVEIRA, D.R., SILVA, N.M., SILVA, A.A., LANNES-VIEIRA, J., ARANTES, R.M., GAZZINELLI, R.T. e ALVAREZ-LEITE, J.I. Infection with *Toxoplasma gondii* increases atherosclerotic lesion in ApoE-deficient mice. *Infect Immun*, v.72, n.6, p.3571-6. **2004**.

PUCADYIL, T.J., TEWARY, P., MADHUBALA, R. e CHATTOPADHYAY, A. Cholesterol is required for *Leishmania*

- donovani infection: implications in leishmaniasis. *Mol Biochem Parasitol*, v.133, n.2, p.145-52. **2004**.
- RADER, D.J. e WILSON, J.M. Gene therapy for lipid disorders. In: HARBER, E. (Ed.). *Molecular cardiovascular medicine*. New York: Scientific american 97-114, **1995**.
- RAMIREZ, J.A. Isolation of *Chlamydia pneumoniae* from the coronary artery of a patient with coronary atherosclerosis. The *Chlamydia pneumoniae/Atherosclerosis Study Group*. *Ann Intern Med*, v.125, n.12, p.979-82. **1996**.
- RASSU, M., CAZZAVILLAN, S., SCAGNELLI, M., PERON, A., BEVILACQUA, P.A., FACCO, M., BERTOLONI, G., LAURO, F.M., ZAMBELLO, R. e BONOLDI, E. Demonstration of *Chlamydia pneumoniae* in atherosclerotic arteries from various vascular regions. *Atherosclerosis*, v.158, n.1, p.73-9. **2001**.
- REARDON, C.A., BLACHOWICZ, L., LUKENS, J., NISSENBAUM, M. e GETZ, G.S. Genetic background selectively influences innominate artery atherosclerosis: immune system deficiency as a probe. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, v.23, n.8, p.1449-54. **2003**.
- REARDON, C.A., BLACHOWICZ, L., WHITE, T., CABANA, V., WANG, Y., LUKENS, J., BLUESTONE, J. e GETZ, G.S. Effect of immune deficiency on lipoproteins and atherosclerosis in male apolipoprotein E-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, v.21, n.6, p.1011-6. **2001**.
- REEVES, P.G., NIELSEN, F.H. e FAHEY, G.C., JR. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J Nutr*, v.123, n.11, p.1939-51. **1993**.
- RIZZO, M. e BERNEIS, K. Low-density lipoprotein size and cardiovascular risk assessment. *Qjm*, v.99, n.1, p.1-14. **2006**.
- ROIVAINEN, M., VIIK-KAJANDER, M., PALOSUO, T., TOIVANEN, P., LEINONEN, M., SAIKKU, P., TENKANEN, L., MANNINEN, V., HOVI, T. e MANTTARI, M. Infections, inflammation, and the risk of coronary heart disease. *Circulation*, v.101, n.3, p.252-7. **2000**.
- ROSELAAR, S.E., KAKKANATHU, P.X. e DAUGHERTY, A. Lymphocyte populations in atherosclerotic lesions of apoE <sup>-/-</sup> and LDL receptor <sup>-/-</sup> mice. Decreasing density with disease progression. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, v.16, n.8, p.1013-8. **1996**.

- ROSS, R. Arteriosclerosis, an overview. In: HABER, E. (Ed.). *Molecular cardiovascular medicine*. New York: Scientific american 11-30, **1995**.
- ROSS, R. Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med*, v.340, n.2, p.115-26. **1999**.
- SACKS, D. e NOBEN-TRAUTH, N. The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice. *Nat Rev Immunol*, v.2, n.11, p.845-58. **2002**.
- SAETTA, A., FANOURLAKIS, G., AGAPITOS, E. e DAVARIS, P.S. Atherosclerosis of the carotid artery: absence of evidence for CMV involvement in atheroma formation. *Cardiovasc Pathol*, v.9, n.3, p.181-3. **2000**.
- SAIKKU, P. Epidemiology of *Chlamydia pneumoniae* in atherosclerosis. *Am Heart J*, v.138, n.5 Pt 2, p.S500-3. **1999**.
- SAKAGUCHI, S. Naturally arising Foxp3-expressing CD25+CD4+ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self. *Nat Immunol*, v.6, n.4, p.345-52. **2005**.
- SANTOS, R.D. [III Brazilian Guidelines on Dyslipidemias and Guideline of Atherosclerosis Prevention from Atherosclerosis Department of Sociedade Brasileira de Cardiologia]. *Arq Bras Cardiol*, v.77 Suppl 3, p.1-48. **2001**.
- SCARTEZINI, M., LOPES, L.M., IHARA, S.S.M., PICHETH, G., LPOES, I.E.L. e MARTINEZ, T.L.R. Metabolismo dos lípidos e lipoproteínas. In: MARTINEZ, T. (Ed.). *Condutas clínicas na dislipidemias*. Belo Horizonte: Health25-40, **1997**.
- SCOTT, J. Pathophysiology and biochemistry of cardiovascular disease. *Curr Opin Genet Dev*, v.14, n.3, p.271-9. **2004**.
- SHI, Y. e TOKUNAGA, O. *Chlamydia pneumoniae* and multiple infections in the aorta contribute to atherosclerosis. *Pathol Int*, v.52, n.12, p.755-63. **2002**.
- SKALEN, K., GUSTAFSSON, M., RYDBERG, E.K., HULTEN, L.M., WIKLUND, O., INNERARITY, T.L. e BOREN, J. Subendothelial retention of atherogenic lipoproteins in early atherosclerosis. *Nature*, v.417, n.6890, p.750-4. **2002**.
- STASSEN, F.R., VEGA-CORDOVA, X., VLIAGEN, I. e BRUGGEMAN, C.A. Immune activation following cytomegalovirus infection: more important than direct viral effects in cardiovascular disease? *J Clin Virol*, v.35, n.3, p.349-53. **2006**.

- STEIN, E.A. e MYERS, G.L. Lipid, Lipoproteins and apolipoproteins. In: BURTIS, C.A., ER (Ed.). Tietz textbook of clinical chemistry. Pennsylvania: Saunders1002-1093, **1994**.
- SUNNEMARK, D., HARRIS, R.A., FROSTEGARD, J. e ORN, A. Induction of early atherosclerosis in CBA/J mice by combination of Trypanosoma cruzi infection and a high cholesterol diet. *Atherosclerosis*, v.153, n.2, p.273-82. **2000**.
- TEUPSER, D., PERSKY, A.D. e BRESLOW, J.L. Induction of atherosclerosis by low-fat, semisynthetic diets in LDL receptor-deficient C57BL/6J and FVB/NJ mice: comparison of lesions of the aortic root, brachiocephalic artery, and whole aorta (en face measurement). *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, v.23, n.10, p.1907-13. **2003**.
- TUPIN, E., NICOLETTI, A., ELHAGE, R., RUDLING, M., LJUNGGREN, H.G., HANSSON, G.K. e BERNE, G.P. CD1d-dependent activation of NKT cells aggravates atherosclerosis. *J Exp Med*, v.199, n.3, p.417-22. **2004**.
- ULBRICH, H., ERIKSSON, E.E. e LINDBOM, L. Leukocyte and endothelial cell adhesion molecules as targets for therapeutic interventions in inflammatory disease. *Trends Pharmacol Sci*, v.24, n.12, p.640-7. **2003**.
- URBINA, J.A., CONCEPCION, J.L., RANGEL, S., VISBAL, G. e LIRA, R. Squalene synthase as a chemotherapeutic target in Trypanosoma cruzi and Leishmania mexicana. *Mol Biochem Parasitol*, v.125, n.1-2, p.35-45. **2002**.
- VANDERLAAN, P.A., REARDON, C.A. e GETZ, G.S. Site specificity of atherosclerosis: site-selective responses to atherosclerotic modulators. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, v.24, n.1, p.12-22. **2004**.
- VIEIRA, L.Q., GOLDSCHMIDT, M., NASHLEANAS, M., PFEFFER, K., MAK, T. e SCOTT, P. Mice lacking the TNF receptor p55 fail to resolve lesions caused by infection with Leishmania major, but control parasite replication. *J Immunol*, v.157, n.2, p.827-35. **1996**.
- VLIEGEN, I., DUIJVESTIJN, A., GRAULS, G., HERNGREEN, S., BRUGGEMAN, C. e STASSEN, F. Cytomegalovirus infection aggravates atherogenesis in apoE knockout mice by both local and systemic immune activation. *Microbes Infect*, v.6, n.1, p.17-24. **2004**.
- VON BOEHMER, H. Mechanisms of suppression by suppressor T cells. *Nat Immunol*, v.6, n.4, p.338-44. **2005**.

WHO, World Health Organization. Cardiovascular diseases.  
[www.who.int/cardiovascular\\_diseases](http://www.who.int/cardiovascular_diseases).

WHO, World Health Organization. The special programme for  
research and training in tropical diseases.  
[www.who.int/tdr/diseases/leish](http://www.who.int/tdr/diseases/leish).

ZHANG, S.H., REDDICK, R.L., PIEDRAHITA, J.A. e MAEDA, N.  
Spontaneous hypercholesterolemia and arterial lesions in mice  
lacking apolipoprotein E. *Science*, v.258, n.5081, p.468-71. **1992**.

## **8.ANEXO**

8.1.Parecer do Comitê de ética em experimentação animal  
- CETEA