

Ministério da Saúde

FIOCRUZ

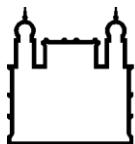
Fundação Oswaldo Cruz

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ**  
**Mestrado em Biologia Celular e Molecular**

**Análise da eficácia de drogas inibidoras da síntese de colesterol (estatinas)  
no controle da infecção por micobactérias**

**LÍVIA SILVA LOBATO**

**RIO DE JANEIRO**  
**2014**



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ**  
**Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular**

**LÍVIA SILVA LOBATO**

**Análise da eficácia de drogas inibidoras da síntese de colesterol (estatinas)  
no controle da infecção por micobactérias**

Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz  
como parte dos requisitos para obtenção do título de  
Mestre em Biologia Celular e Molecular

**Orientador (es):** Prof. Dr. Flávio Alves Lara  
Prof. Dra. Maria Cristina Vidal Pessolani

**RIO DE JANEIRO**

Julho de 2014

Ficha catalográfica elaborada pela  
Biblioteca de Ciências Biomédicas/ ICICT / FIOCRUZ - RJ

L796 Lobato, Livia Silva

Análise da eficácia de drogas inibidoras da síntese de colesterol (estatinas) no controle da infecção por micobactérias / Livia Silva Lobato. – Rio de Janeiro, 2014.

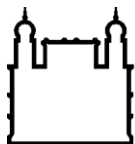
xvi, 105 f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, 2014.

Bibliografia: f. 91-101

1. Hanseníase. 2. Atorvastatina. 3. Sinvastatina. 4. Rifampicina. 5. Colesterol. I. Título.

CDD 616.9294



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**

**Fundação Oswaldo Cruz**

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ**  
**Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular**

**LÍVIA SILVA LOBATO**

**Análise da eficácia de drogas inibidoras da síntese de colesterol  
(estatinas) no controle da infecção por micobactérias**

**Orientador (es):** Prof. Dr. Flávio Alves Lara.  
Prof. Dra. Maria Cristina Vidal Pessolani.

**Aprovada em:** 24/07/2014

**EXAMINADORES:**

Prof. Dra Leila Mendonça Lima – Instituto Oswaldo Cruz – Fiocruz – Presidente.  
Prof. Dr. Rogério Lopes Rufino Alves – Universidade do Estado do Rio de Janeiro.  
Prof. Dra. Roberta Olmo Pinheiro – Instituto Oswaldo Cruz – Fiocruz.

**SUPLENTE:**

Prof. Dra. Luciana Silva Rodrigues – Universidade do Estado do Rio de Janeiro/  
Revisora.  
Prof. Dra. Cristiana Santos de Macedo – Centro de Desenvolvimento Tecnológico  
em Saúde (CDTS) – Fiocruz.

Rio de Janeiro, Julho de 2014.

“Porque desde a antiguidade não se ouviu, nem com ouvidos se percebeu, nem com os olhos se viu Deus além de ti, que trabalha para aquele que Nele espera.”

*(Isaías 64:4)*

Aos meus pais e minha irmã,  
Ao meu marido Diogo e ao meu filho Henrique  
por tudo que representam para mim!

## **AGRADECIMENTOS**

À Deus, aquele que me aparou nos momentos difíceis, e jamais me abandonou. Aquele que renova a minha fé, a quem devo minha gratidão e todo o meu louvor por me amar sem merecer, e me ajudar a concluir mais esta etapa. Toda honra e toda a glória sejam dadas a Ele!

À minha mãe Noelma e ao meu pai Maurício por sempre me incentivarem e me apoiarem incondicionalmente, por serem o meu alicerce, o meu exemplo de vida. Obrigada por nunca terem medido esforços durante toda a minha criação. À vocês, minha eterna gratidão!

À minha irmã Liliane, pela sua amizade e carinho. Por tentar me ensinar sempre a levar a vida de uma forma mais leve e alegre.

Ao meu amado esposo, companheiro de todas as horas, que sempre acreditou em mim! Obrigada por toda a sua paciência e compreensão, por nunca ter medido esforços para me ajudar. Muito obrigada por existir na minha vida e construir comigo nossa linda família.

Ao meu filho Henrique, que mesmo ainda estando no meu ventre tem sido a minha fonte inspiradora, a minha alegria e o meu motivo para prosseguir.

Aos meus familiares e membros da Igreja Cristã Maranata, por todas as orações, apoio e carinho.

Ao Dr. Flávio Alves Lara por me orientar durante esses dois longos anos de mestrado. Obrigada pela oportunidade e por todo aprendizado.

À Dra. Maria Cristina Vidal Pessolani por me co-orientar, por acreditar em mim, pelos conselhos e dedicação.

À Dra. Patricia Samarco Rosa por me auxiliar em parte deste trabalho e me acolher com tanto carinho em Bauru.

Ao Dr. Rafael e o Msc. Marlei pela colaboração firmada, e por todo aprendizado.

Aos meus queridos amigos e colegas do laboratório de Microbiologia Celular (LAMICEL): Leonardo, João, Thiago, André, Arthur, Adriano, Júlio, Fabrício, Rodrigo, Karina, Paula, Sabrina, Camila, Thabatta, e Cristiane. Em especial à Fernanda, Robertha, Chyntia, Débora, Rychelle, Jéssica, Luciana, Marcinha e

Cristiana. Muito obrigada por toda amizade, pelas gargalhadas, e por todo auxílio desde antes da seleção do mestrado até aqui!

Aos colegas dos laboratórios vizinhos pelo o uso/empréstimo de diversos materiais e equipamentos.

A todos do pavilhão de Hanseníase que contribuíram de alguma forma para a realização desse trabalho.

Às agências de fomento CAPES, IOC, FAPERJ pelo suporte financeiro que possibilitaram o andamento e finalização dessa dissertação



## SUMÁRIO

<b>Lista de abreviaturas .....</b>	<b>xi</b>
<b>Lista de figura .....</b>	<b>xiv</b>
<b>Lista de tabelas .....</b>	<b>xv</b>
<b>Resumo .....</b>	<b>xvi</b>
<b>Abstract .....</b>	<b>xvii</b>
<b>Capítulo 1: Introdução .....</b>	<b>01</b>
1.1 – As micobactérias.....	02
1.2 – Tuberculose .....	04
1.2.1 – Prevalência e distribuição geográfica .....	04
1.2.2 – O agente etiológico.....	06
1.2.3 – Transmissão e diagnóstico.....	07
1.2.4 – Prevenção.....	08
1.2.5 – Tratamento.....	09
1.3 – Hanseníase .....	11
1.3.1 – Prevalência e distribuição geográfica .....	11
1.3.2 – O agente etiológico .....	13
1.3.3 – As formas clínicas da hanseníase .....	16
1.3.4 – Transmissão e diagnóstico.....	18
1.3.5 – Tratamento.....	19
1.3.5.1 – A rifampicina.....	20
1.4 – Os corpúsculos lipídicos e as micobactérias.....	22
1.5 – As estatinas .....	26
1.5.1 – A sinvastatina .....	29
1.5.2 – A atorvastatina.....	29
<b>Capítulo 2: Objetivos .....</b>	<b>33</b>
2.1 – Objetivo geral.....	34
2.2 – Objetivos específicos .....	34

<b>Capítulo 3: Artigo .....</b>	<b>36</b>
<b>Capítulo 4: Discussão .....</b>	<b>79</b>
<b>Capítulo 5: Conclusões .....</b>	<b>88</b>
<b>Capítulo 6: Referências Bibliográficas .....</b>	<b>91</b>
<b>Capítulo 7: Anexos.....</b>	<b>99</b>
I – Carta de aceite do Comitê de Ética.....	100
II – Carta de submissão do artigo .....	101

## Lista de abreviaturas

<b>Ag85B</b>	antígeno 85B
<b>BAAR</b>	bacilo álcool-ácido resistente
<b>BB</b>	“borderline bordeline”
<b>BCG</b>	bacilo de Calmette-Guérin
<b>BL</b>	“borderline” lepromatoso
<b>BSA</b>	albumina sérica bovina
<b>BT</b>	“borderline” tuberculoide
<b>cDNA</b>	ácido desoxirribonucleico complementar
<b>CLs</b>	corpúsculos lipídicos
<b>COX</b>	ciclooxigenase
<b>CYP</b>	citocromo P450
<b>DIM</b>	dimicocerosato
<b>DMAPP</b>	dimetilalil difosfato
<b>DNA</b>	ácido desoxirribonucleico
<b>dNTP</b>	desoxirribonucleotídeos trifosfatados
<b>ELISA</b>	ensaio imunoenzimático
<b>ENH</b>	eritema nodoso hansênico
<b>eNOS</b>	óxido nítrico sintase endotelial
<b>ESAT-6</b>	antígeno de secreção precoce de 6-kDa
<b>ESX-1</b>	sistema de secreção 1
<b>GAPDH</b>	gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase
<b>GFP</b>	proteína verde fluorescente
<b>h</b>	horas
<b>HMG-CoA</b>	hidroxi-metil-glutaril-coenzima A
<b>IL-</b>	interleucina
<b>IPP</b>	pentenilpirofosfato
<b>kg</b>	quilograma
<b>LAM</b>	lipoarabinomanana
<b>LDL</b>	lipoproteína de baixa densidade
<b>LL</b>	lepromatoso lepromatoso
<b>M.</b>	<i>Mycobacterium</i>

<b>MB</b>	multibacilar
<b>MEP</b>	via alternativa à via do mevalonato (2c-metil-d-eritritol 4-fosfato)
<b>mg</b>	miligrama
<b>ML</b>	<i>Mycobacterium leprae</i>
<b>MOI</b>	multiplicidade de infecção
<b>mRNA</b>	ácido ribonucleico mensageiro
<b>MTB</b>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
<b>MTT</b>	sal metiltetrazólio
<b>OMS</b>	Organização Mundial da Saúde
<b>PAMP</b>	padrões moleculares associados a patógenos
<b>PB</b>	paucibacilar
<b>PBS</b>	tampão salina fosfato
<b>PCR</b>	reação em cadeia da polimerase
<b>PDIM</b>	ftiocerol dimicocerosato
<b>PGE<sub>2</sub></b>	prostaglandina E <sub>2</sub>
<b>PGL-I</b>	glicolípídeo fenólico I
<b>PGLs</b>	glicolípídeo fenólico
<b>PGN</b>	peptidoglicano
<b>PMA</b>	acetato de forbol-miristila
<b>PNCT</b>	Programa Nacional de Controle da Tuberculose
<b>PNL</b>	forma neural pura da hanseníase
<b>PPD</b>	derivado proteico purificado
<b>PQT</b>	poliquimioterapia
<b>RAB7</b>	proteína de ligação a GTP relacionada a RAS 7
<b>RLEP</b>	elemento repetitivo de <i>M. leprae</i>
<b>RNA</b>	ácido ribonucleico
<b>RPL13a</b>	proteína ribossomal 60s 113a
<b>RR</b>	reação reversa
<b>SUS</b>	Sistema Único de Saúde
<b>TB</b>	tuberculose
<b>TB-MDR</b>	tuberculose resistente a múltiplas drogas
<b>TB-XDR</b>	tuberculose extremamente resistente a drogas

<b>TGP</b>	transaminase glutâmico pirúvica
<b>Th</b>	linfócitos T auxiliares (T helper)
<b>TLR</b>	receptor do tipo Toll
<b>TNF</b>	fator de necrose tumoral

## Lista de figuras

<b>Figura 1.1:</b> Porcentagem de casos de tuberculose previamente tratados que desenvolveram tuberculose resistente a múltiplas drogas (WHO, 2013). .....	<b>6</b>
<b>Figura 1.2:</b> Mapa representativo da prevalência global da hanseníase reportadas à oms, no início do ano de 2012.....	<b>12</b>
<b>Figura 1.3:</b> Modelo esquemático da parede celular do <i>M. leprae</i> .....	<b>14</b>
<b>Figura 1.4:</b> Cultivo de <i>M. leprae</i> em pata de camundongo.....	<b>15</b>
<b>Figura 1.5:</b> Formas clínicas da hanseníase de acordo com a classificação de Ridley e Jopling (1966).....	<b>17</b>
<b>Figura 1.6:</b> Representação esquemática geral da estrutura dos corpúsculos lipídicos (CLs).....	<b>23</b>
<b>Figura 1.7:</b> : Análise histopatológica de fragmentos de pele obtidos por biópsia de pacientes com hanseníase multibacilar (LL) corados pela técnica de Wade.....	<b>25</b>
<b>Figura 1.8</b> Via simplificada da via do mevalonato: .....	<b>27</b>
<b>Figura 1.9</b> Estruturas químicas das principais estatinas .....	<b>28</b>

## Lista de tabelas

<b>Tabela 1.1:</b> Comparação das características dos genomas de <i>M. leprae</i> e <i>M. tuberculosis</i> (Adaptado de Cole, 2001) .....	<b>16</b>
<b>Tabela 1.2:</b> Características farmacológicas da sinvastatina e da atorvastatina. (Adaptado de Neuvonen, Niemi, Backman 2006 & Sirtori C.R., 2014.) .....	<b>31</b>

## INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Análise da eficácia de drogas inibidoras da síntese de colesterol (estatinas) no controle da infecção por micobactérias

### RESUMO

Lívia Silva Lobato

O *Mycobacterium leprae*, agente causador da hanseníase, e o *M. tuberculosis*, agente etiológico da tuberculose, são micobactérias que infectam e se multiplicam no interior das células do hospedeiro. O surgimento de cepas resistentes tem se tornado algo cada vez mais comum e preocupante, evidenciando a necessidade de um rápido desenvolvimento de estratégias capazes de controlar o avanço dessas doenças. Atualmente o envolvimento dos lipídeos derivados do hospedeiro e o seu papel nas doenças infecciosas tem sido alvo de vários estudos. Estes estudos apontam principalmente o colesterol como molécula chave na interação bactéria-célula durante infecções causadas por micobactérias e outros patógenos. Dados do nosso grupo demonstraram que o *M. leprae* é capaz de induzir a biogênese de corpúsculos lipídicos na célula hospedeira e que tais organelas são recrutadas para o fagossoma contendo a micobactéria, sendo a inibição deste recrutamento importante na redução da viabilidade intracelular do *M. leprae*. Também tem sido descrito que o colesterol está relacionado à persistência do *M. tuberculosis* nos pulmões e a resistência deste bacilo à rifampicina. No presente estudo, investigamos o efeito de duas estatinas usadas no controle da hipercolesterolemia, a atorvastatina e a sinvastatina, na viabilidade intracelular do *M. bovis* BCG, *M. tuberculosis* H37Rv e *M. leprae* Thai-53. Em nosso modelo de infecção *in vitro* utilizando macrófagos derivados de monócitos humanos de linhagem THP-1, foi possível observar uma diminuição da viabilidade intracelular micobacteriana após incubação com as estatinas individualmente, sem efeito citotóxico sobre a célula hospedeira. Quando as estatinas foram combinadas com a rifampicina, foi observado um efeito aditivo entre essas drogas, aumentando a morte bacteriana. Adicionalmente, quando utilizamos um modelo de infecção *in vivo*, foi possível confirmar o efeito da atorvastatina contra o *M. leprae*. Observamos que a atorvastatina foi capaz de reduzir o infiltrado inflamatório no coxim plantar de BALB/c infectados, bem como a carga bacilar de forma proporcional à diminuição dos níveis de colesterol plasmático desses animais. Desta maneira, nossos dados sugerem que as estatinas, associadas à rifampicina, podem contribuir para redução do tempo de tratamento da hanseníase, necessitando, no entanto, a realização de ensaios clínicos para confirmação de tais dados.



## INSTITUTO OSWALDO CRUZ

### Analysis of efficacy of inhibiting cholesterol synthesis drugs (statins) in the control of mycobacterial infection

#### ABSTRACT

Lívia Silva Lobato

*Mycobacterium leprae* and *M. tuberculosis*, causative agents of leprosy and tuberculosis respectively, are mycobacteria that infect and multiply within the host cell. The emergence of resistant strains has become increasingly common, and there is need for development of novel strategies to control the progression of these diseases. Currently the involvement of lipids in biological processes and their role in infectious diseases has been the subject of several studies that demonstrate the importance of host-derived lipids, particularly cholesterol, in the bacterium-cell interaction during mycobacterial infections. Data from our group demonstrated that *M. leprae* is able to induce the biogenesis of lipid droplets in the host cell, and that these organelles are recruited to the mycobacterial phagosome. The inhibition of this recruitment is important for reduction of *M. leprae* viability. It has also been reported that cholesterol is related to the persistence of *M. tuberculosis* in the lungs and rifampin resistance of this bacillus. In the present study atorvastatin and simvastatin, two statins used in the control of hypercholesterolemia, were analyzed in terms of their effects on viability of intracellular *M. bovis* BCG, *M. tuberculosis* H37Rv and *M. leprae* Thai-53. In our in vitro model of infection using THP-1 human monocytic cells, we observed a decrease in bacterial viability after incubation with either statins, with no cytotoxic effects on the host cell. When statins were associated with rifampicin, an additive effect between these drugs was also observed. Additionally, we confirmed the effect of atorvastatin against *M. leprae* using an *in vivo* infection model. This statin was able to reduce the inflammatory infiltrate and bacterial load into the BALB/c footpads, proportionally to the decrease in plasmatic cholesterol levels of these animals. Finally, our data suggest that the association statins-rifampicin may contribute to reduce the time of leprosy treatment, requiring however, the conduction of clinical trials to confirm these data.

## **Capítulo 1: Introdução**

## 1.1 As micobactérias

As micobactérias são microorganismos pertencentes ao filo Actinobacteria, que se apresentam sob a forma de bastonetes retos ou ligeiramente curvados, embora também possam aparecer sob a forma de hifas que se fragmentam em elementos cocóides ou bastões (1). Possuem de 0,3 a 0,5  $\mu\text{m}$  de diâmetro e seu comprimento é variável (2). Habitam uma grande variedade de reservatórios ambientais, incluindo água, solo, animais e humanos (3), podendo infectar várias espécies de animais incluindo roedores, pássaros, peixes e humanos.

Este filo contém diversos gêneros patogênicos importantes dentre eles o gênero *Mycobacterium*, que inclui mais de 70 espécies. Muitas das características deste gênero como resistência a drogas, coloração e patogenicidade estão diretamente relacionadas às características únicas observadas na parede celular dessas micobactérias. A presença de uma grande quantidade de lipídeos sob a forma de ácidos micólicos (ácidos graxos saturados de elevado peso molecular) cria uma camada serosa que as tornam resistentes a adversidades como o ressecamento e desinfetantes químicos, dificultando assim a prevenção e controle da sua transmissão (4). Esta característica lipídica também é responsável por contribuir para uma maior integridade estrutural das micobactérias fornecendo a estes microorganismos uma álcool-ácido resistência (5). Apesar de apresentarem uma fraca marcação pela coloração de Gram e serem classificadas como bactérias gram-positivas, trabalhos recentes demonstraram a existência de uma membrana externa ao envelope micobacteriano (4).

Este gênero também é conhecido por conter bactérias que contém em seu DNA uma alta proporção de guanina e citosina (62 a 70%), conferindo a elas uma maior estabilidade, e também por possuir espécies que estão intimamente relacionadas no que tange as suas sequências de 16S rRNA (6).

As micobactérias podem ser classificadas segundo o seu tempo de crescimento, sendo agrupados em duas categorias: os que possuem crescimento lento, onde mesmo em condições ideais de cultura só é possível a visualização de colônias após 7 dias, apresentando tempo de geração entre 13 a 20 horas; e as

espécies que possuem crescimento rápido, que sob as mesmas condições necessitam de menos de sete dias para alcançar um crescimento visível, possuindo um tempo de geração de 2 a 5 horas (7). Existem, ainda, micobactérias que não são capazes de se reproduzir *in vitro*, necessitando de um ambiente intracelular para sua sobrevivência e multiplicação, como é o caso do *M. lepraemurium* e o *M. leprae*. Estas bactérias possuem um prolongado ciclo de crescimento, o que impossibilita a realização de ensaios de viabilidade como a contagem de unidades formadoras de colônias (CFU), e sua obtenção em grandes quantidades para utilização em estudos moleculares *in vitro* (8).

As espécies pertencentes ao gênero *Mycobacterium* apresentam uma grande diversidade quanto ao seu estilo de vida e patogenicidade. A maioria delas vive e se replica livremente em ecossistemas naturais, e raramente são relacionadas a doenças. Somente algumas espécies tornaram-se bem sucedidas no que diz respeito à sua capacidade infectiva, sendo capazes de sobreviver no interior de fagócitos mononucleares, como é o caso do *M. leprae* e *M. tuberculosis*, espécies causadoras da hanseníase e da tuberculose, respectivamente.

## 1.2 A tuberculose

A tuberculose (TB) é uma doença infecciosa que, apesar de antiga, ainda nos dias atuais se apresenta como um grande problema de saúde mundial, sendo classificada como a segunda principal causa de morte por doenças infecciosas em todo o mundo, perdendo apenas para o vírus da imunodeficiência humana (HIV).

### 1.2.1 Prevalência e distribuição geográfica

Somente no ano de 2012, aproximadamente 8.6 milhões de pessoas em todo o mundo desenvolveram TB, o equivalente a 122 casos por 100.000 habitantes, e cerca de 1.3 milhões morreram desta enfermidade, sendo 320.000 indivíduos coinfectados pelo *M. tuberculosis* e pelo HIV. A maioria dos casos registrados neste ano (2012) ocorreram em sua maioria na Ásia (58%) e no continente Africano (27%), e em menores proporções na região do Mediterrâneo Oriental (8%), na Europa (4%) e nas Américas (3%) (9).

Os cinco países com o maior número de casos incidentes em 2012 foram a Índia (2.0 milhão de 2.4 milhões), a China (0.9 a 1.1 milhões), a África do Sul (de 0.4 a 0.6 milhões), a Indonésia (0.4 a 0.5 milhões) e o Paquistão (0.3 a 0.5 milhões). Foi também neste ano que a taxa de prevalência mundial caiu 37% desde 1990. No entanto, apesar da diminuição da taxa de prevalência, previsões atuais sugerem que as metas internacionais estabelecidas pela Organização Mundial de Saúde (OMS) em reduzir pela metade as taxas de prevalência da TB em 2015 não serão cumpridas (9).

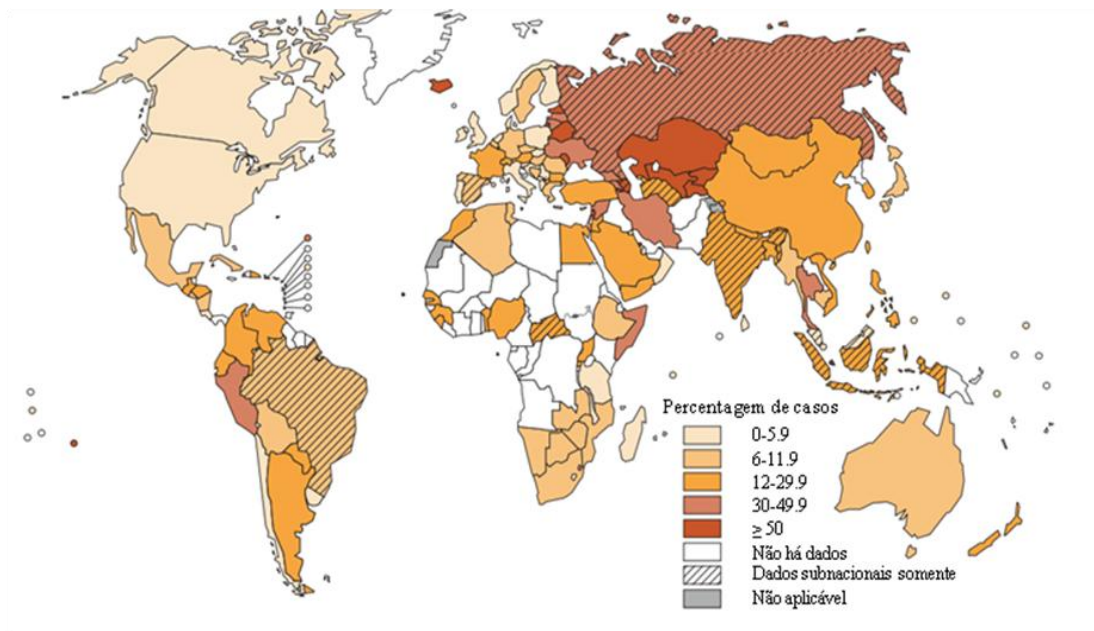
O Brasil tem registrado anualmente 72 mil novos casos de TB. Apesar de nos últimos anos o país apresentar uma queda na incidência, a doença ainda preocupa as autoridades públicas. De acordo com a OMS, o Brasil está em 17º lugar em número de casos de TB entre os 22 países que possuem alta carga epidemiológica, e ocupa a 22º posição em taxa de incidência, prevalência e mortalidade entre estes 22 países. Em 2010 foram registradas 4.6 mil mortes em decorrência da TB, enquanto que no estado do Rio de Janeiro, em 2011, a taxa de incidência foi a segunda mais elevada do país, com quase 60 indivíduos por 100.000 habitantes. (10).

Além dessa triste estimativa, a resistência do bacilo às drogas utilizadas é uma realidade que tem causado grande preocupação em diversos países. Desde a criação em 1994 do Projeto Global de Vigilância à Resistência a Drogas Anti-

tuberculose, dados de 136 países em todo o mundo têm sido sistematicamente coletados e analisados para um maior monitoramento quanto a resistência a múltiplas drogas (MDR).

A MDR aos fármacos utilizados no tratamento da TB geralmente ocorre quando o esquema prescrito não é o correto ou quando ocorre falha ou interrupção no uso dos medicamentos. A tuberculose resistente a múltiplas drogas (TB-MDR) é caracterizada pelo surgimento aleatório de uma resistência simultânea à isoniazida (H) e rifampicina (R), o que implica num tratamento mais demorado com a utilização de fármacos ativos de segunda linha, que normalmente possuem um custo mais elevado e maiores efeitos tóxicos (11). Segundo os dados obtidos no relatório citado acima, estima-se que 3,6% dos novos casos, ou 20,2% dos casos de TB já tratados anteriormente, irão evoluir para TB-MDR. De acordo com informações da Organização Mundial de Saúde, em 2012 os países do leste europeu foram os que apresentaram os mais altos níveis de TB-MDR (Figura 1.1) (9).

Caso ainda ocorram falhas na prescrição ou no tratamento para TB-MDR, uma nova resistência pode surgir e esta doença é, então, classificada como tuberculose extremamente resistente a fármacos (TB-XDR). Neste caso, a TB-XDR além da TB-MDR, é também resistente a qualquer das fluoroquinolonas e, a pelo menos, um dos três agentes quimioterápicos considerados de segunda linha (canamicina, amicacina e capreomicina) (11). Este fato é extremamente preocupante visto que até o final de 2012, a existência de TB-XDR foi relatada por 92 países.



**Figura 1.1: Porcentagem de casos de tuberculose previamente tratados que desenvolveram tuberculose resistente a múltiplas drogas.** Os países do leste europeu e, especialmente, os países asiáticos continuam apresentando os mais altos níveis de tuberculose resistente a múltiplas drogas. (Adaptado de OMS, 2013).

### 1.2.2 O agente etiológico

A natureza contagiosa do *M. tuberculosis* foi inicialmente descrita por Hipócrates e Galeno. Porém, somente em 1882 o médico alemão Heinrich Hermann Robert Koch comunicou a descoberta desta bactéria que ainda hoje é denominada bacilo de Koch em sua homenagem. Em 1890, durante o 10º Congresso Internacional de Medicina realizado em Berlim, Robert Koch anunciou a descoberta de um composto que inibiria o crescimento do bacilo da tuberculose em cobaias quando administrado antes ou após a sua exposição. Este composto, formulado a partir de extratos de cultura em meio líquido recebeu o nome de tuberculina. No entanto, estudos clínicos utilizando a tuberculina revelaram que somente algumas pessoas alcançavam a cura, a uma taxa similar aos pacientes não tratados. Embora o resultado obtido não tenha sido o esperado, atualmente a tuberculina tem funcionado como um composto importante no diagnóstico da tuberculose, onde seu derivado purificado é

utilizado na realização do Teste de Mantoux, também conhecido como Teste Tuberculínico ou PPD (12).

O *M. tuberculosis* é um patógeno intracelular facultativo de crescimento lento, e virulência variável. Possui um tempo de geração que varia de 12 a 24 horas sob condições ideais, e acredita-se que a lentidão no seu ciclo celular está parcialmente relacionada à sua limitação na absorção de nutrientes devido à impermeabilidade da sua parede celular. O *M. tuberculosis* possui uma parede celular com estrutura complexa composta por ácidos graxos de cadeia longa, glicolipídios e outros componentes que auxiliam a sua sobrevivência dentro dos fagócitos. Seu genoma contém aproximadamente 4.000 genes (13), sendo cerca de 200 deles responsáveis por codificar enzimas relacionadas ao metabolismo de ácidos graxos. Possivelmente esta especialização genética está relacionada à sua capacidade de conseguir se multiplicar nos tecidos do hospedeiro, onde os ácidos graxos se destacam como a maior fonte de carbono do *M. tuberculosis* (14).

### **1.2.3 Transmissão e diagnóstico**

A infecção pelo *M. tuberculosis* ocorre a partir de uma transmissão direta, pessoa a pessoa, onde a inalação de perdigotos expelidos por uma pessoa com TB ativa pode ou não desencadear um quadro de evolução favorável à doença. Tal fato dependerá de diversos fatores genéticos e imunológicos do indivíduo como: idade avançada, desnutrição, tabagismo, infecção pelo HIV, neoplasias, diabetes e outras doenças. Algumas características cepa-específicas, como níveis mais altos de expressão de fatores de virulência ou a carga infectante, também podem interferir nesse processo (15). O risco de adoecimento é maior nos dois primeiros anos após infecção (16), porém mesmo nos casos onde a defesa imune do hospedeiro impede o desenvolvimento do quadro clínico após infecção, o bacilo pode ficar latente por longos períodos de tempo, manifestando-se quando as condições lhe forem propícias.

Indivíduos que possuem contato próximo com casos infecciosos (familiares, profissionais de saúde, comunidade carcerária) possuem um elevado risco de infecção (17). Sintomas como tosse persistente por 3 semanas ou mais, produtiva ou



não (com muco e eventualmente sangue), febre, sudorese noturna, anorexia e perda de peso ocorrem quando a doença se instala efetivamente na forma pulmonar, dando início ao processo inflamatório (18). Em condições naturais, o pulmão é o primeiro órgão a ser afetado, no entanto o *M. tuberculosis* pode invadir a corrente sanguínea e os vasos linfáticos, se disseminando pelo corpo podendo assim se implantar em qualquer região, causando uma doença extrapulmonar.

O diagnóstico de TB pode ser confirmado através de exames bacteriológicos, histopatológicos, imunológicos ou moleculares. A escolha do método diagnóstico mais apropriado irá variar com a forma clínica apresentada e com as características do paciente, sempre levando em conta os conceitos de especificidade e sensibilidade.

#### **1.2.4 Prevenção**

A partir da década de 30 diversos avanços no combate à doença começaram a surgir, dos quais destacamos o desenvolvimento da vacina BCG (bacilo Calmette Guérin), a baciloscopia e a utilização de novas técnicas cirúrgicas pulmonares. Dez anos depois, a descoberta de uma quimioterapia antibiótica específica, e a comprovação de sua eficácia facilitou o tratamento da TB que passou a ser ambulatorial, sem a necessidade de internação.

Atualmente, a prevenção da TB pode ser feita através de vacinação, que visa a proteção de indivíduos saudáveis e profilaxia, impedindo a progressão da infecção. Desde o século passado, a vacina BCG tem sido utilizada na prevenção contra TB permanecendo até o presente momento como a vacina mais utilizada em todo o mundo (19). Conhecida por causar uma reação no local da infecção primária na forma de uma pequena úlcera, a vacina BCG foi formulada a partir de uma cepa atenuada de *M. bovis*, o agente etiológico da TB bovina que raramente infecta o homem. Apesar de não ser capaz de evitar a infecção tuberculosa e possuir eficácia variável, a vacina BCG pode gerar uma proteção contra as manifestações graves, promovendo uma imunidade por um período de 10 a 15 anos. O seu uso é recomendado nos países com alta prevalência da TB e, em recém-nascidos (20). Até hoje nenhuma outra vacina está disponível para o tratamento da TB, e nem mesmo novos candidatos estão perto do estágio de uso comercial (21).

### 1.2.5 Tratamento

Apesar de grave, a TB é uma doença tratável e curável. Atualmente, os esquemas terapêuticos utilizados no Brasil são padronizados e adequados às diferentes situações clínicas. O Programa Nacional de Controle da Tuberculose (PNCT) é responsável pelas normas de prevenção, diagnóstico, tratamento e distribuição dos medicamentos de forma gratuita à todos os pacientes cadastrados e acompanhados nas Unidades de Saúde. O tratamento adotado atualmente tem em geral a duração de seis meses e se baseia na utilização das seguintes drogas: rifampicina (R), isonazida (H), pirazinamida (Z), etambutol (E) e estreptomicina (S).

Esses fármacos de primeira linha geralmente resultam em um esquema terapêutico bem sucedido. A H e a R são os medicamentos de maior poder bactericida, sendo ativos nas populações bacilares sensíveis, quer intracavitárias, nos granulomas ou intracelulares, diferindo da Z e S que, apesar de bactericidas, atuam somente contra algumas populações de bacilos. (22) O E é uma droga bacteriostática normalmente utilizada em associação com medicamentos mais potentes para prevenir a emergência de bacilos resistentes (23)

Três características do TB são importantes na estruturação do tratamento quimioterápico: a aerobiose estrita, a multiplicação lenta e a alta proporção de mutantes resistentes (14). Porém, de forma geral, as drogas utilizadas na quimioterapia tem como objetivo interferir no sistema enzimático do bacilo, ou bloquear a sua síntese proteica. A R, por exemplo, bloqueia a RNA-transferase no momento da replicação do DNA, enquanto que a H interfere na formação do ácido gama-aminobutírico (GABA), fundamental precursor da síntese de aminoácidos e nucleotídeos. Desta forma, o esquema medicamentoso utilizado tem o seu efeito destrutivo potencializado, já que atua em diferentes estágios do metabolismo do bacilo (25).

Em 2009, o PNCT, juntamente com o seu Comitê Técnico Assessor, determinou que devido ao aumento da resistência primária à H (de 4,4 para 6,0%), o E também deveria fazer parte do esquema terapêutico básico durante a fase intensiva do tratamento (dois primeiros meses). A apresentação farmacológica deste esquema passou a ser um combinado de doses fixas de quatro medicamentos (R 150 mg, H 75 mg, Z 400mg e E 275 mg). Essa recomendação e apresentação farmacológica são

preconizadas pela Organização Mundial da Saúde, sendo utilizada na maioria dos países para adultos e adolescentes visando não somente diminuir a resistência aos fármacos, mas também minimizar o tempo de tratamento. No que diz respeito às crianças que possuem menos de 10 anos, a Organização Mundial da Saúde mantém a recomendação para a utilização do esquema R, H, e Z (22). O tratamento desenvolvido sobre o regime ambulatorial pode ser diretamente observado (TOD), ou seja, com acompanhamento da ingestão dos medicamentos pelo paciente por um profissional de saúde, desde o início de seu tratamento até a sua cura completa. As pessoas tratadas com TOD apresentam uma maior probabilidade de cura, e uma menor possibilidade de desenvolver a TB-MDR do que aquelas que não tem acesso a esta estratégia (24).

### **1.3 A hanseníase**

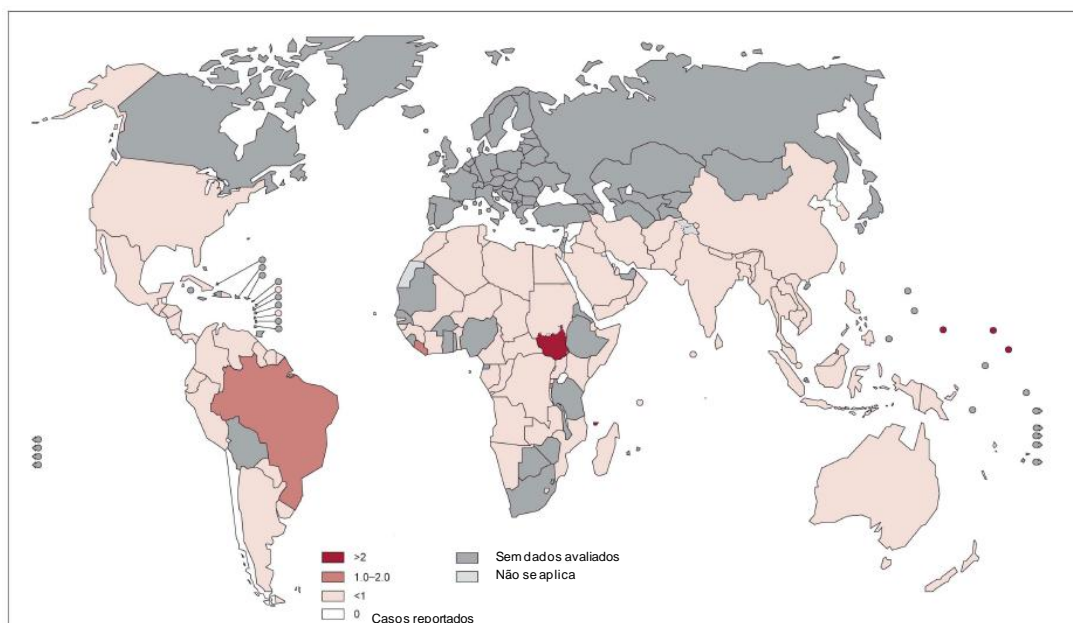
Descrita com uma das doenças mais antigas da humanidade, a hanseníase é uma doença infecciosa crônica, caracterizada por lesões na pele e no sistema nervoso periférico (26). Dados da literatura indicam que esta doença originou-se na África, se disseminando para a Índia e Europa, e de lá se espalhando pelos restante dos continentes (27).

Nas Américas, a hanseníase chegou com os colonizadores franceses, espanhóis e portugueses, tendo o tráfico de escravos como o maior fator de disseminação da doença (28). No entanto, a existência dos primeiros casos de hanseníase no Brasil passou a ser notificada somente no século XVII. Como naquela época o tratamento era inexistente, os pacientes que apresentavam lesões ulcerantes na pele, deformidades e perda de extremidades corporais viviam sob a condição de isolamento compulsório, sendo excluídos da sociedade por considerarem ser esta doença uma marca do pecado (29).

Inicialmente era conhecida como *lepra*, termo derivado do latim *lepros* que significa escamoso. A doença teve seu nome modificado a partir da aprovação do decreto nº 165, de 14 de maio de 1976 quando o Brasil extinguiu oficialmente esta nomenclatura substituindo-a por *hanseníase* em homenagem ao médico norueguês Gerhard Henrik Armauer Hansen que, em 1873, descobriu o agente etiológico da doença: *M. leprae*.

#### **1.3.1 Prevalência e distribuição geográfica**

Atualmente a hanseníase ainda constitui um problema mundial de saúde pública. Dados da OMS baseados em informações oficiais de 105 territórios e países demonstraram que em 2012 a prevalência global da hanseníase foi de 181.941 casos (Figura 1.2), sendo neste mesmo ano detectados 219.075 novos casos em todo o mundo (30).



**Figura 1.2: Mapa representativo da prevalência global da hanseníase.** Dados reportados à OMS, no início do ano de 2012. O Brasil apresenta lugar de destaque com 1-2 casos por 10 mil habitantes, juntamente com a Micronésia e Sudão do Sul com mais de 2 casos por 10 mil habitantes. (Adaptado de OMS, 2012) (9).

Sendo amplamente distribuída no hemisfério sul, a hanseníase está presente nos continentes africano, asiático e americano, onde 18 países desta região são responsáveis por cerca de 90% do total de novos casos. Mesmo com todas as estratégias adotadas pela OMS, e a implantação do esquema de poliquimioterapia (PQT) na década de 80, ainda hoje existem três países com elevada incidência da hanseníase (1 a 2 casos por 10 mil habitantes): o Sudão do Sul, a Micronésia e o Brasil, este último com cerca de 34.000 novos casos por ano. Apesar destes dados, o controle global da hanseníase tem melhorado significativamente devido a campanhas de combate à doença realizadas na maioria dos países endêmicos. No entanto, novos casos continuam a ocorrer em quase todas as regiões endêmicas.

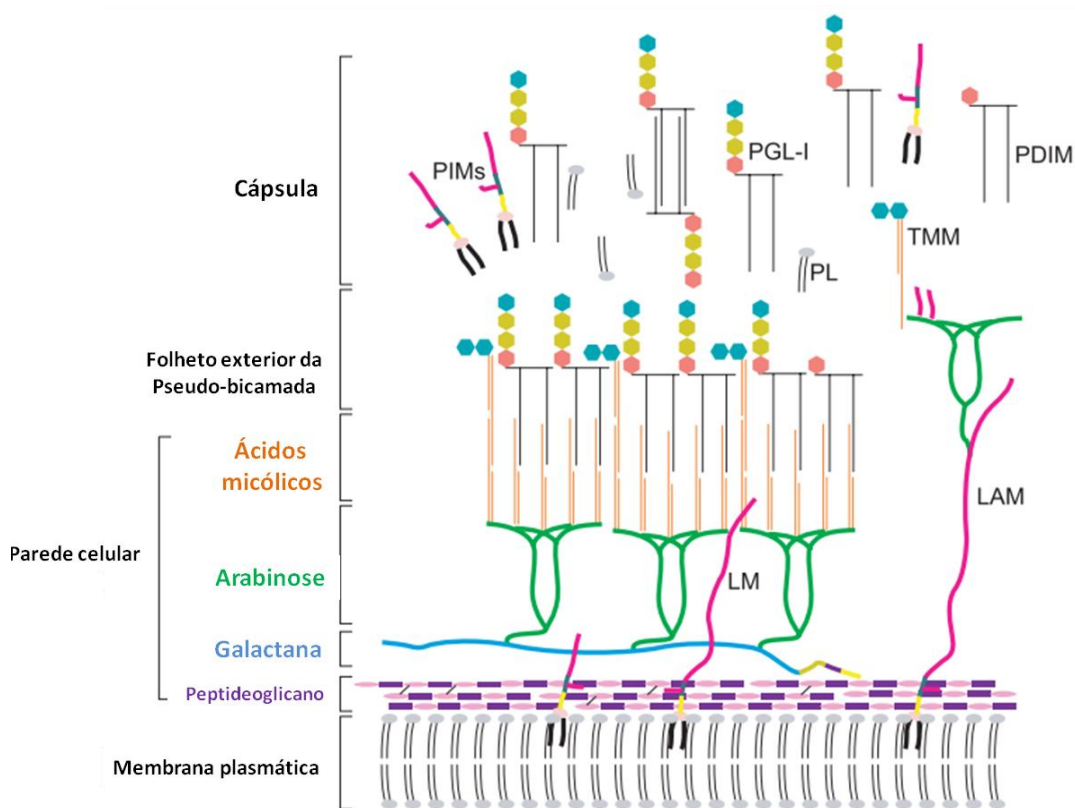
A hanseníase possui uma distribuição desigual no Brasil, o que está fortemente correlacionado com os baixos níveis de desenvolvimento socioeconômico. Somente no ano de 2012, foram detectados no Brasil 33.955 novos casos, dentre os quais, 6.865 novos casos foram detectados na região norte, 13.953 na região nordeste, 6.008 na região sudeste, 1.376 casos na região sul e 5.754 na

região centro-oeste. Dos 6.008 novos casos detectados na região sudeste, 1719 casos foram detectados no estado do Rio de Janeiro. Ainda com relação ao estado do Rio de Janeiro, diversos municípios apresentam um coeficiente geral de detecção considerado muito alto para os parâmetros do Ministério da Saúde, sendo os municípios de Guapimirim, Parati, e Cardoso Moreira considerados hiperendêmicos. Esses dados demonstram a necessidade de reforçar a vigilância epidemiológica nas áreas brasileiras mais endêmicas, dando continuidade ao cumprimento de atividades que controlem a transmissão da hanseníase.

### **1.3.2 O agente etiológico**

O *M. leprae* é um patógeno intracelular obrigatório que infecta preferencialmente macrófagos da pele e células de Schwann (31). Este bacilo não possui motilidade, é microaerófilo, suas extremidades são arredondadas, e mede de 1,5 a 8 µm de comprimento por 0,2 a 0,5 µm de largura. Devido à abundância de lipídios em sua parede, é corado em vermelho pela fucsina, não se descolorando quando submetido a lavagem com solução alcoólica-ácida (Método de Ziehl-Neelsen), sendo portanto considerado um bacilo álcool-ácido resistente (BAAR) (32).

Sua parede celular é composta de peptidoglicana ligada à uma camada de galactana, a qual se ligam cadeias ramificadas de arabinana formando, juntamente com a camada de peptidoglicana, uma zona eletrondensa em torno da membrana plasmática do *M. leprae* (Figura 1.3). Os ácidos micólicos são ligados nas extremidades das cadeias de arabinana formando o folheto interno de uma falsa bicamada lipídica, conforme pode ser observado na figura 1.3. O folheto externo é composto por monomicolatos de trealose, formando uma zona electrotransparente junto com os ácidos micoserósicos de fitoceryl dimicocerosato (PDIM) e glicolipídeos fenólicos (PGLs) (33). O lipídio dominante da parede celular do bacilo é o glicolipídeo fenólico I (PGL-I), responsável pela especificidade imunológica do *M. leprae* (34). Desde sua descoberta, em 1981, o PGL-I é de extrema importância para ensaios e desenvolvimento de métodos para diagnóstico precoce de infecção (8), visto que estudos anteriores demonstraram que este lipídio pode ser encontrado em tecidos, no sangue circulante e na urina de pacientes multibacilares.



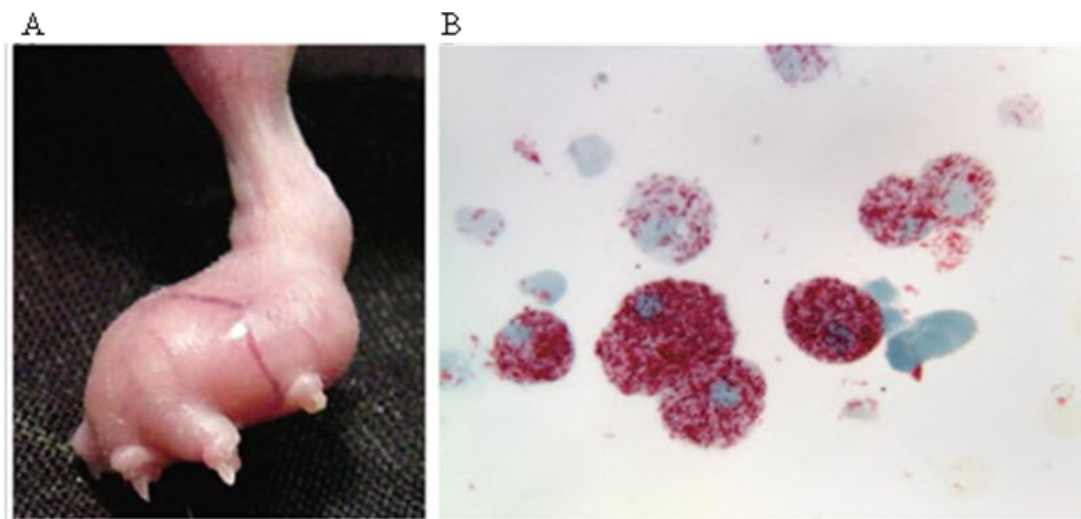
**Figura 1.3. Modelo esquemático da parede celular do *M. leprae*.** A membrana plasmática é envolvida por uma parede celular composta por peptidoglicana ligada covalentemente a arabinogalactana. Ácidos micólicos estão ligados aos resíduos terminais de arabinose. A camada mais externa apresenta: glicolípídeo fenólico 1 (PGL-1), monomicolato trealose (TMM), fitocsterol dimicocerosato (PDIM), monossídeos fosfatidilinositol e fosfolípídeos (PL). (Adaptado de Vissa e Brennan, 2001) (8).

É um microorganismo de crescimento lento, que se multiplica por divisão binária e possui um tempo de geração que varia entre 11 e 13 dias. Não é cultivável *in vitro*, no entanto pode ser mantido vivo, possuindo certa estabilidade por algumas semanas, desde que cultivado em culturas axênicas (35).

Em 1960, Charles Shepard obteve êxito ao demonstrar que, através de coxim plantar de camundongos BALB/C infectados com  $10^3$  a  $10^4$  bacilos obtidos a partir de biópsias humanas, podia sustentar uma infecção localizada com cerca de um milhão de bacilos promovendo uma multiplicação limitada do *M. leprae* por 9 a 12 meses (36).

Devido a esta limitação do cultivo *in vitro* do *M. leprae*, o tatu de nove bandas, *Dasypus novemcinctus*, também tem sido utilizado como fonte de *M. leprae* por ser um hospedeiro endêmico natural desta micobactéria. Neste modelo observa-se o crescimento do bacilo de forma disseminada por 12 a 18 meses, causando um comprometimento dos nervos periféricos, linfonodos, baço, e especialmente do fígado. A susceptibilidade do tatu à infecção permite a obtenção de  $10^{10}$  a  $10^{11}$  bacilos por grama de fígado e baço respectivamente (37) (38).

Recentemente, uma outra fonte de obtenção de bacilos tem sido utilizada para estudos: a infecção de camundongos atímicos *Foxn1<sup>nu/nu</sup>* (nude) (Figura 1.4). Esses animais são mais susceptíveis a infecção por *M. leprae* no coxim plantar que seus parentais BalbC, visto que possuem um alto grau de imunodeficiência devido a ausência de linfócitos T, permitindo assim a obtenção de uma grande quantidade de bacilos viáveis para fins experimentais. Cerca de  $2 \times 10^7$  bacilos são inoculados no coxim plantar de camundongos nude, permitindo uma recuperação de  $1-5 \times 10^9$  bacilos viáveis em um período de 6 meses (35) (39).



**Figura 1.4: Cultivo de *M. leprae* em pata de camundongo.** A) Pata edemaciada de camundongo nude 6 meses após infecção com  $5 \times 10^7$  de *M. leprae*. B) Macrófagos altamente infectados provenientes da pata do camundongo.. Aumento x1000. Adaptado de Scollard, 2006 (33).



O genoma do *M. leprae* foi sequenciado em 2001, por Cole e colaboradores revelando que apenas 49.5% do seu genoma (1604 genes) continham genes funcionais que codificam proteínas, 27% eram pseudogenes e 23.5% eram regiões não codificantes (40). Dentre todas as micobactérias conhecidas, o *M. leprae* certamente é aquela que, ao longo da evolução, se tornou mais dependente das funções metabólicas básicas do seu hospedeiro. Este fato pode ser atribuído em parte à evolução reducional sofrida por este microorganismo, o que resultou em um genoma menor, rico em genes inativos ou inteiramente deletados do genoma.

O sequenciamento do genoma do *M. leprae* revelou uma deficiência deste bacilo em seu potencial metabólico (40), o que pode justificar a hipótese desta micobactéria se utilizar dos lipídios derivados de seu hospedeiro como fonte de carbono e energia, alterando o metabolismo lipídico durante infecções em seu benefício, conforme já descrito na literatura.

Quando comparado ao genoma do *M. tuberculosis*, observa-se também que o *M. leprae* sofreu uma perda maciça de genes, o que poderia explicar o seu longo tempo de geração e sua dificuldade de cultivo *in vitro* (Tabela 1.1.).

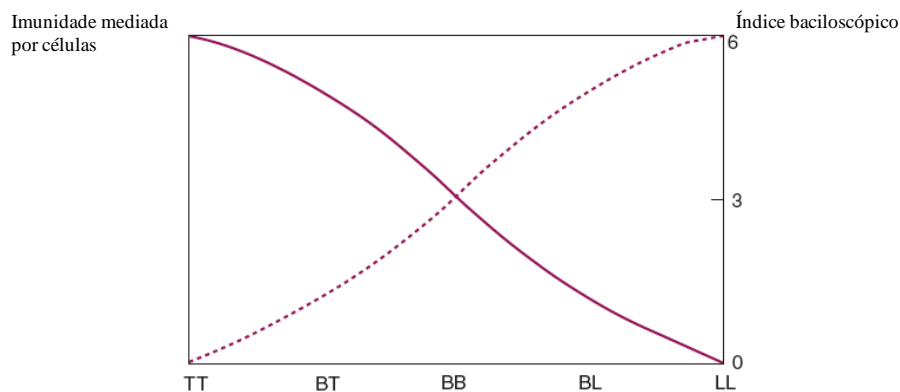
**Tabela 1.1: Comparação das características dos genomas de *M. leprae* e *M. tuberculosis* (adaptado de Cole *et al.* 2001)(40).**

Características	<i>M. leprae</i>	<i>M. tuberculosis</i>
Tamanho (pb)	3.268.203	4.411.532
Proteínas codificadas (%)	49,5	90,8
Genes codificantes (no.)	1.604	3.959
Pseudogenes (no.)	1.116	6
Conteúdo G+C (%)	57,79	65,61

### 1.3.3 Formas clínicas da hanseníase

A hanseníase possui uma grande variedade de manifestações clínicas e histopatológicas. Inicialmente, a doença pode se manifestar através de uma forma clínica indeterminada (I), quando a resposta imune do paciente frente ao bacilo ainda não é definida a ponto de possibilitar uma classificação. Esses indivíduos podem

evoluir para a cura espontânea ou para um espectro de forma clínicas que irão variar de acordo com a carga bacilar e a resposta imunológica do hospedeiro em relação ao patógeno (Ridley & Jopling, 1966). De acordo com a classificação proposta por Ridley & Jopling, a hanseníase apresenta dois polos opostos e três formas intermediárias (Figura 1.5). Em um dos polos do espectro, se encontra a hanseníase tuberculoide (TT), onde a doença se manifesta de forma limitada, com poucas lesões e bacilos, além da expressão predominante de citocinas do tipo Th1, característica de uma imunidade fortemente mediada por células. No pólo oposto a este espectro, estão os pacientes com hanseníase lepromatosa (formas LL) apresentando múltiplas lesões e uma infecção disseminada com alta carga bacilar, além da expressão de citocinas do tipo Th2, tipicamente associadas com a imunidade humoral, e ausência de imunidade mediada por células (41). Este pólo possui como característica histopatológica marcante a presença de macrófagos e células de Schwann altamente infectados, com aspecto espumoso devido ao acúmulo de lipídeos (42) (43). Existem ainda as formas clínicas intermediárias, denominadas “borderline” (BT, BB e BL), que são definidas de acordo com suas respectivas proximidades ao polo tuberculoide ou ao polo lepromatoso.



**Figura 1.5: Formas clínicas da hanseníase de acordo com a classificação de Ridley e Jopling (1966).** A linha tracejada indica o índice baciloscópico, que como pode ser observado é bem elevado em pacientes do polo LL e indetectável no pacientes do polo tuberculóide. Já a linha preta indica a imunidade mediada por células, que é elevada no polo TT e muito baixa no polo LL. Classificações: TT (Tuberculóide-Tuberculóide), BT (Borderline-Tuberculóide), BB (Borderline-Borderline), BL (Borderline Lepromatoso), LL (Lepromatoso-Lepromatoso). (Adaptado de Walker e Lockwood , 2006) (41).

Para facilitar os esquemas terapêuticos, a OMS instituiu uma subdivisão operacional dos pacientes em dois grupos: multibacilares (MB) e paucibacilares (PB). De acordo com esta classificação, os pacientes multibacilares compreendem as formas clínicas BB, BL e LL, enquanto que os pacientes paucibacilares compreendem as formas clínicas TT e BT (44).

A hanseníase pode, ainda, causar episódios de inflamação aguda que podem acometer o paciente ao longo do curso natural da doença, ao longo do seu tratamento, ou até mesmo após a sua cura. Esses episódios reacionais são categorizados em dois tipos: eritema nodoso hansênico (ENH) que pode atingir indivíduos com BL e LL, e reação reversa (RR) que pode atingir preferencialmente pacientes BL, BT, BB, principalmente durante o tratamento (41). Ambas as reações constituem, de maneira geral, uma reativação do processo inflamatório que pode culminar em lesões na pele e neurite aguda e até mesmo complicações sistêmicas (33) (45).

### **1.3.4 Transmissão e Diagnóstico**

Apesar da hanseníase ser uma doença antiga, o seu modo de transmissão ainda não é bem compreendido. Acredita-se que a porta de entrada desta micobactéria seja através do trato respiratório superior (46), e sua propagação ocorra através do contato direto entre os indivíduos. Os pacientes com doença ativa, em especial os MB, são considerados a principal fonte de infecção (47).

O período de incubação da doença é longo, variando de 2 a 20 anos (48), e suas primeiras manifestações clínicas podem ocorrer entre dois a dez anos após a infecção. Isso ocorre pois o *M. leprae* possui alta infectividade e baixa patogenicidade, isto é, é capaz de infectar muitas pessoas, no entanto, somente algumas delas manifestam a doença. Acredita-se que mais de 90% da população seja resistente à infecção pelo *M. leprae* e não apresente sintomas clinicamente detectáveis (49). Esse fato propicia sua transmissão para muitos contatos na comunidade antes de receberem o diagnóstico, e por este motivo, é muito importante que se faça o diagnóstico o mais rápido possível e se inicie imediatamente o tratamento.

O diagnóstico da hanseníase é essencialmente clínico e laboratorial. Na ausência de recursos laboratoriais, o diagnóstico passa a ser essencialmente clínico,

baseando-se em sinais e sintomas (anestesia, nervos espessados e lesões cutâneas), no exame da pele e nervos periféricos e no histórico epidemiológico. Em certos casos se faz necessário o uso de ferramentas complementares, como exames baciloscópicos e histopatológicos, para auxiliar a confirmação do diagnóstico.

Dentre os recursos laboratoriais atualmente disponíveis para o diagnóstico da hanseníase destacamos: 1) o ensaio imunoenzimático (ELISA) que é capaz de detectar anticorpos contra o antígeno PGL-I, no qual os níveis de produção do IgM anti-PGL-I indicam exposição ao *M. leprae* e correlaciona-se com a baciloscopia; 2) a reação em cadeia de polimerase (PCR) que apresenta alta especificidade e sensibilidade, possibilitando a identificação inequívoca de quantidades mínimas de ácidos nucleicos do bacilo presentes em fragmentos de tecido, linfa ou sangue periférico de pacientes, auxiliando casos de difícil diagnóstico onde as lesões de pele são inexistentes ou quando a baciloscopia é negativa. A identificação molecular do *M. leprae* consiste na amplificação de regiões específicas do DNA do bacilo. Para isso, diferentes genes-alvo do patógeno têm sido utilizados e comparados, tais como o elemento repetitivo *RLEP*, *Ag85B* e o *16S* RNA ribossomal (50) (51) (52). Outra aplicação importante da técnica de PCR é a determinação da viabilidade do *M. leprae* em amostras biológicas (51).

### **1.3.5 Tratamento**

O primeiro avanço no tratamento da hanseníase ocorreu na década de 40, com o desenvolvimento da dapsona, o primeiro quimioterápico efetivo contra o *M. leprae*. A dapsona é um fármaco que age inibindo a divisão bacteriana pela competição com ácido *para*-amino-benzóico (PABA), diminuindo ou bloqueando a síntese de ácido fólico (53). De acordo com as avaliações clínicas de Adams & Waters (1966) e Friedmann (1973), o uso único e indiscriminado da dapsona provocou o surgimento de cepas bacterianas possivelmente resistentes à droga em meados de 1960 (54) (55).

Nesta época, a disponibilidade de novas drogas antimicrobianas tornou possível o tratamento através da combinação de outras drogas com atividade anti-tuberculose como a rifampicina e a clofazimina (56) (57).

Com o objetivo de evitar o surgimento de cepas quimioresistentes, eliminar a população micobacteriana viável em um curto período de tempo, reduzir o número de recidivas e abandono do tratamento, a OMS, em 1982, implantou o tratamento de

multidrogaterapia (MDT) ou poliquimioterapia (PQT) que consiste em três drogas: dapsona, rifampicina e clofazimina.

O uso da PQT gerou resultados positivos, tanto em pacientes PB quanto MB (8) fazendo com que o número total de casos registrados diminuísse drasticamente. No entanto, mesmo após a drástica redução do número de pacientes MB em tratamento com a aplicação dessa potente combinação de fármacos, o número de novos casos registrados não alcançou uma redução significativa, além de não eliminar a resistência às drogas. Nas últimas décadas, a OMS identificou isolados clínicos de *M. leprae* resistentes a rifampicina, dapsona ou ofloxacina, reportando um aumento no número de casos ao longo dos anos (58).

Atualmente, o tratamento da hanseníase no Brasil é ambulatorial. O Ministério da Saúde distribui a medicação mensalmente sob a forma de cartelas, sendo a informação sobre a classificação do paciente doente fundamental para escolha do esquema de tratamento adequado. Para pacientes PB é recomendada a poliquimioterapia paucibacilar (PQT-PB) composta por uma dose única mensal de 600mg de rifampicina (duas cápsulas de 300 mg com supervisão) e uma dose diária de 100mg de dapsona auto-administrada com duração de 6 meses. Já para os pacientes classificados como MB se utiliza a poliquimioterapia multibacilar (PQT-MB), composta por uma dose única mensal de 600mg de rifampicina (com supervisão) e 300mg de clofazimina (com supervisão), além de doses diárias autoadministradas de: 50 mg de clofazimina e 100mg de dapsona com uma duração de 12 meses ou um período máximo de 18 meses. No caso de crianças, a dose dos medicamentos do esquema padrão é ajustada de acordo com a idade e peso. Já para pessoas com intolerância a um dos medicamentos, são indicados esquemas alternativos como o uso de minociclina e ofloxacina por exemplo. A alta por cura é dada após a administração do número de doses preconizado pelo esquema terapêutico, dentro do prazo recomendado.

#### **1.3.5.1 A rifampicina**

A rifampicina é uma das drogas utilizadas na PQT, derivada de um composto semi-sintético da rifampicina B, produzida como resultado de processo de fermentação do *Streptomyces mediterranei*. É um antibiótico de largo espectro capaz de atravessar membranas lipídicas, criando um ambiente ácido que favorece a

atividade antimicrobiana, propriedade útil no caso de bactérias intracelulares. O principal mecanismo de ação deste fármaco se dá pela inibição da atividade da RNA polimerase através da formação de um complexo fármaco-enzima estável que acarreta na supressão do início da formação da cadeia de síntese de RNA.

As bactérias podem desenvolver rapidamente resistência à rifampicina, não sendo recomendado o seu uso isoladamente a fim de se evitar o surgimento de resistência micobacteriana em pacientes com TB (59).

Seu uso no tratamento da hanseníase iniciou-se em 1970 (60), onde se mostrou extremamente potente quando comparado a outros antibióticos de propriedade micobactericida, isolados ou associados (61). Além disso, a rifampicina também é indicada no tratamento de diversas formas de TB, e no tratamento de portadores nasofaríngeos de *Neisseria meningitidis*, de indivíduos que mantiveram contato com portadores de meningite meningocócica, ou de crianças pequenas e sem imunização específica que tiveram contato familiar com meningite pelo *Haemophilus influenzae*.

Administrada oralmente, a rifampicina possui uma biodisponibilidade de 90%, sendo o estômago o seu principal local de absorção (62). Suas concentrações plasmáticas máximas são atingidas entre duas a quatro horas após sua ingestão, sendo melhor absorvida quando o paciente está em jejum. Após absorção no trato gastrointestinal, a rifampicina sofre rápida eliminação na bile, com consequente circulação entero-hepática. A meia-vida deste fármaco pode variar entre uma hora e meia a cinco horas até que ele seja então excretado pela urina ou via fecal (60 a 65% de eliminação) (63) (64).

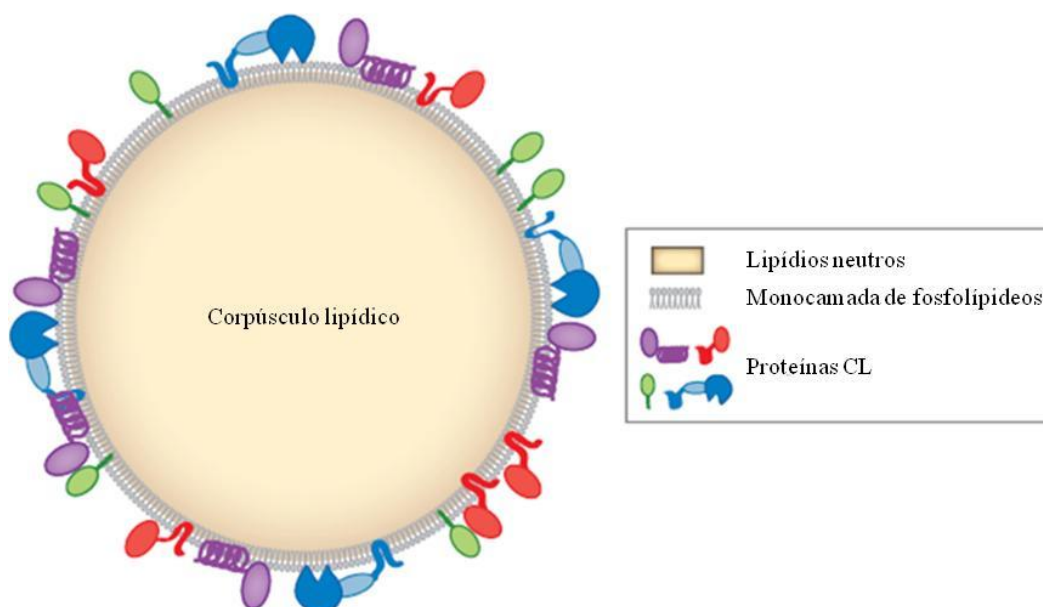
Os efeitos colaterais mais graves causados por este fármaco são observados quando o seu uso ocorre de maneira intermitente. São eles: a síndrome pseudogripal, insuficiência respiratória, insuficiência renal, anemia hemolítica, entre outros. Além disso, o seu uso pode causar eritema e prurido cutâneo, dores abdominais, diarreias, vômitos e náuseas.

## 1.4 Os corpúsculos lipídicos e as micobactérias

As primeiras descrições e especulações a cerca dos corpúsculos lipídicos datam do século XIX (65) (66) onde, nesta época, tais estruturas eram consideradas meros depósitos lipídicos denominados lipossomos. Recentemente, os corpúsculos lipídicos foram redefinidos como sendo organelas dinâmicas de estocagem de lipídeos intracelulares, funcionalmente ativas, encontradas em todos os tipos celulares. Possuem uma composição heterogênea que varia dependendo da célula, mas em geral são ricos em fosfolipídeos, triglicerídeos e éster de colesterol (67).

O interesse na biologia dos corpúsculos lipídicos (CLs) surgiu refletindo a necessidade de um conhecimento maior desta organela relacionada a uma série de funções como: regulação dos níveis de colesterol livre intracelular (visto que os lipídeos em excesso na célula são rapidamente convertidos em lipídeos neutros e estocados nos CLs para geração de energia), síntese de membranas, replicação viral, degradação de proteínas e resposta a infecção(68).

Os corpúsculos lipídicos são estruturas arredondadas, com diâmetro que varia de 0.1 – 100  $\mu\text{m}$ , compostos basicamente por uma fase orgânica de lipídeos neutros, separados do citosol aquoso por uma monocamada de fosfolipídeos (Figura 1.6). Apresentam várias proteínas com funções diversas, dentre elas destacamos as proteínas que compõe a família PAT (perilipina, adipofilina e TIP47) por possuírem papel fundamental na formação e manutenção desses corpúsculos (69). Além dessas proteínas, os corpúsculos lipídicos possuem enzimas relacionadas ao metabolismo de ácidos graxos e citocinas, sugerindo a participação destas organelas na regulação do metabolismo lipídico, tráfego vacuolar intracelular, sinalização intracelular e produção de mediadores inflamatórios (70) (71). Essas organelas também são sítios reconhecidos de estocagem do ácido araquidônico (AA), o precursor da síntese de mediadores inflamatórios (eicosanoides) e enzimas formadoras de eicosanoides como a cicloxigenase (COX) e lipoxigenase (LO) (71).



**Figura 1.6: Representação esquemática geral da estrutura dos corpúsculos lipídicos (CLs).** Lípidios neutros: triacilgliceróis, diacilgliceróis, ésteres de esteróis, colesterol livre; Monocamada de fosfolípidios: Fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina e fosfatidilinositol; Proteínas do CLs: Perilipinas, adipofilina ou ADRP, Tip47, S3-12, OXPAT, FIT ; (Adaptado de Tobias C. Walther & Robert V. Farese Jr. 2012) (74).

Várias bactérias estocam lipídios sob a forma de corpúsculos lipídicos, incluindo predominantemente o grupo dos *Actinomycetos* (por exemplo: *Mycobacterium*, *Rhodococcus*, *Streptomyces* e *Nocardia*) (72). Os CLs também podem ser observados em eucariotos como *Saccharomyces cerevisiae*, e parasitos como *Toxoplasma gondii* (73). Sua presença também já foi descrita em *Drosophila sp.*, plantas e em células de mamíferos como os adipócitos, hepatócitos, enterócitos, leucócitos, células musculares esqueléticas entre outros (74).

Durante as infecções causadas por algumas micobactérias tem sido observado que a indução e o acúmulo de CLs na célula hospedeira está intimamente relacionada ao seu sucesso de infecção. Dados da literatura demonstram que *M. tuberculosis*, *M. bovis* BCG, e *M. leprae* utilizam desses lipídios da célula hospedeira de forma a favorecer a sua persistência intracelular e disseminação.



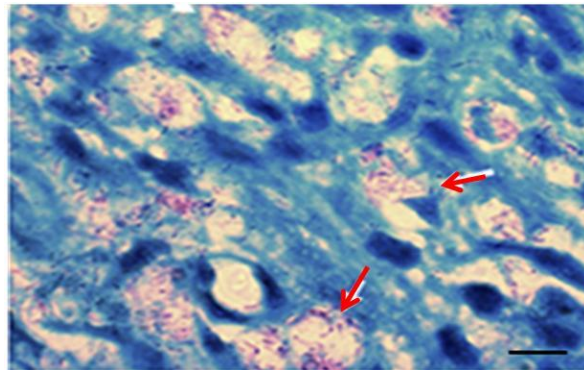
Estudos realizados por D'Ávila e colaboradores (2006) demonstraram que a indução da biogênese de CLs pela infecção por *M. bovis* BCG em leucócitos, varia de forma dose e tempo dependente, através de sinalização de receptores do tipo Toll-2 (TLR-2). Neste trabalho, também observou-se que estes CLs formados no interior de macrófagos ativados eram predominantemente sítios de produção de prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>), sendo possível observar uma co-localização da enzima ciclooxigenase 2 (COX-2) com estas organelas. Além disso, neste estudo constatou-se que a inibição da formação dos CLs durante a infecção pelo *M. bovis* BCG, causava um aumento na produção de TNF- $\alpha$  e uma diminuição de IL-10, sugerindo que a produção de PGE<sub>2</sub> possa ser uma estratégia importante na persistência e multiplicação bacteriana.

De forma semelhante, a habilidade do *M. tuberculosis* em manter uma infecção crônica persistente tem sido relacionada à sua capacidade de modulação do metabolismo lipídico da célula hospedeira. Recentemente, um cassete de genes ligado ao catabolismo de colesterol em *M. tuberculosis* (75) foi identificado, sendo que muitos destes genes foram caracterizados como essenciais à sobrevivência deste patógeno em macrófagos (76). Brzostek e colaboradores (2009) demonstraram que o *M. tuberculosis* é capaz de acumular colesterol na camada mais externa de sua parede celular e que esse acúmulo diminui a permeabilidade da mesma à rifampicina, importante droga anti-tuberculose. Além disso, esse acúmulo mascarou parcialmente os antígenos de superfície deste patógeno, sugerindo um processo de mimetismo molecular com consequente evasão do sistema imune do hospedeiro.

Além desses achados, outros papéis dos lipídios têm sido descritos durante as infecções causadas por micobactérias. Gatfield & Pieters (2000), demonstraram que os lipídios são essenciais durante o processo de internalização de micobactérias em macrófagos. Outros trabalhos demonstram que os lipídios podem modular a fusão fagolisossomal e consequentemente favorecer a persistência da micobactéria no fagossoma (77), servindo como uma importante fonte de carbono para várias micobactérias (78) (79) (80).

Na hanseníase a presença de macrófagos com aparência espumosa tem sido descrita como uma característica histológica marcante em biópsias de lesões de pele e nervos de pacientes multibacilares. Essas células, também denominados células de

Virchow, são caracterizadas por possuírem uma grande quantidade de lipídios em fagossomas altamente infectados (Figura 1.7) (81) (82) (83).



**Figura 1.7: Análise histopatológica de fragmento de pele obtido por biópsia de pacientes com hanseníase multibacilar (LL) corados pela técnica de Wade.** As setas destacam a presença de macrófagos altamente infectados com aspecto espumoso devido ao acúmulo intracelular de lipídios. Barra de escala: 20  $\mu$ m. (Mattos *et al.*, 2010).(83)

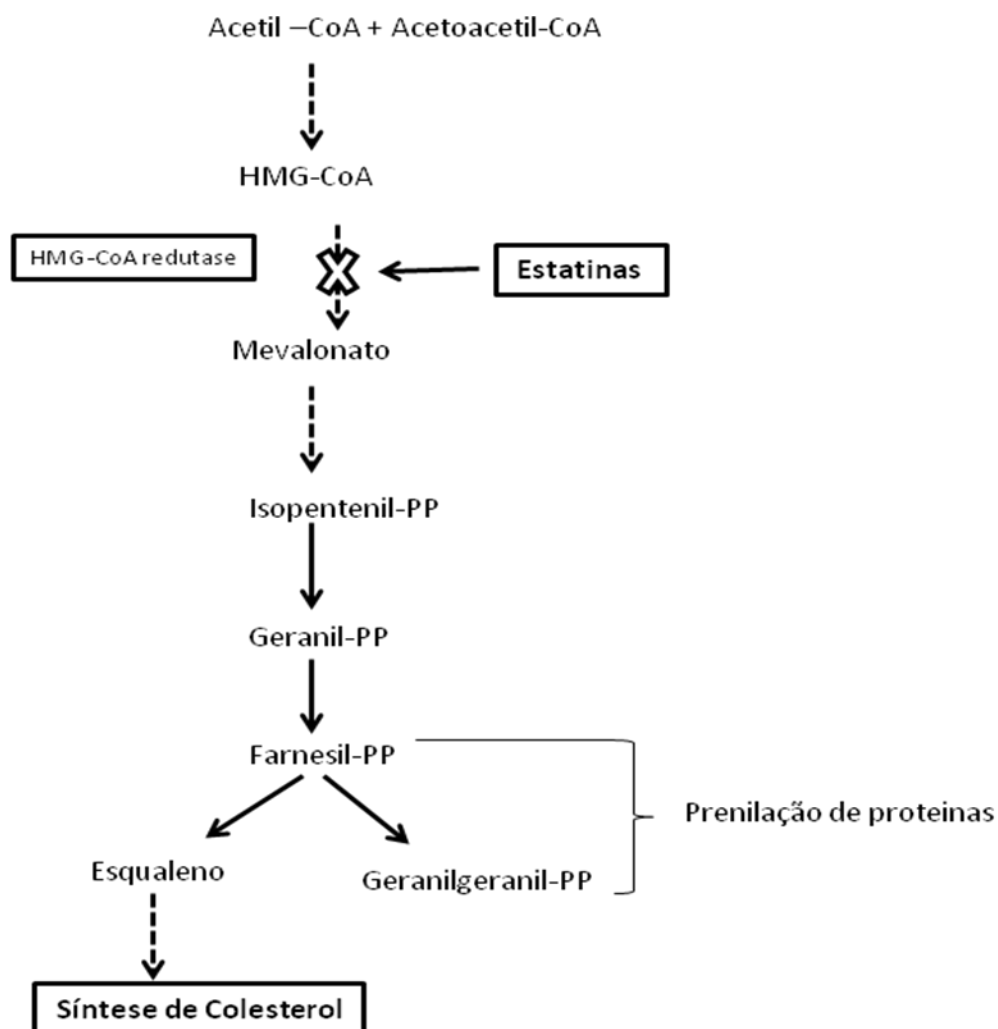
Recentemente nosso grupo demonstrou que o *M. leprae* é capaz de induzir a biogênese de corpúsculos lipídicos tanto em macrófagos como em células de Schwann (83) (84). Também foi observado que tais corpúsculos eram recrutados para o fagossoma contendo a micobactéria, e que a inibição deste recrutamento reduzia significativamente a viabilidade intracelular do *M. leprae* (84). Mattos e colaboradores (2014) também observaram através experimentos *in vitro* e *in vivo* que durante infecções pelo *M. leprae* há a indução da expressão de receptores LDL e enzimas chaves envolvidas na síntese *de novo*, demonstrando que esta bactéria induz o acúmulo de colesterol por meio da estimulação desta via de síntese. Ainda neste trabalho, Mattos e colaboradores observaram que a inibição síntese *de novo* pelo uso de lovastatina, ou a depleção de colesterol exógeno diminui a sobrevivência intracelular deste bacilo, demonstrando assim o importante papel do CLs na sobrevivência das micobactérias.

## 1.5 As estatinas

As estatinas, inibidores da hidroximetilglutaril-coenzima A (HMG-CoA) redutase, são fármacos de escolha para o tratamento da hipercolesterolemia devido à sua comprovada eficácia (85). A HMG-CoA redutase é uma enzima que catalisa a conversão de HMG-CoA em ácido mevalônico, uma etapa limitante na síntese de colesterol no fígado e em outros tecidos (Figura 1.8). Atuando na inibição desta enzima chave, este fármaco diminui a síntese de colesterol nos hepatócitos (86), estimulando a expressão de receptores de LDL e aumentando a remoção do colesterol associado à LDL da circulação.

Os efeitos benéficos dessa classe de fármacos são geralmente atribuídos a sua capacidade de reduzir a síntese de colesterol endógeno por inibição competitiva pelo sítio ativo da enzima. Tal reação pode influenciar diretamente outros eventos celulares além da síntese de colesterol, uma vez sendo o mevalonato, produto da HMG-CoA redutase, o precursor não somente do colesterol mas também de outros isoprenoides não esteroidais (87). Assim, as estatinas podem gerar vários efeitos pleiotrópicos relacionados indiretamente aos lipídios ou a vias de sinalização intracelular.

Os efeitos relacionados ao metabolismo lipídico incluem a inibição da biossíntese do colesterol, uma maior absorção e degradação de lipoproteínas de baixa densidade (LDL), a inibição da secreção de lipoproteínas, inibição da oxidação do LDL, e a inibição da expressão de receptores “scavenger”. Já com relação à ação das estatinas sobre as vias de sinalização, estas podem modular uma série de processos que conduzem à redução de acúmulo de colesterol esterificado em macrófagos, aumento da enzima óxido nítrico sintase endotelial (eNOS), redução do processo inflamatório, restauração da atividade plaquetária e do processo de coagulação (88).



**Figura 1.8: Esquema simplificado da via do mevalonato.** A figura acima indica o local de ação das estatinas e os produtos finais desta reação, incluindo o colesterol e os isoprenóides responsáveis por regular diferentes etapas envolvidas no metabolismo e na inflamação (Adaptado de Sirtori C.R., 2014). (89)

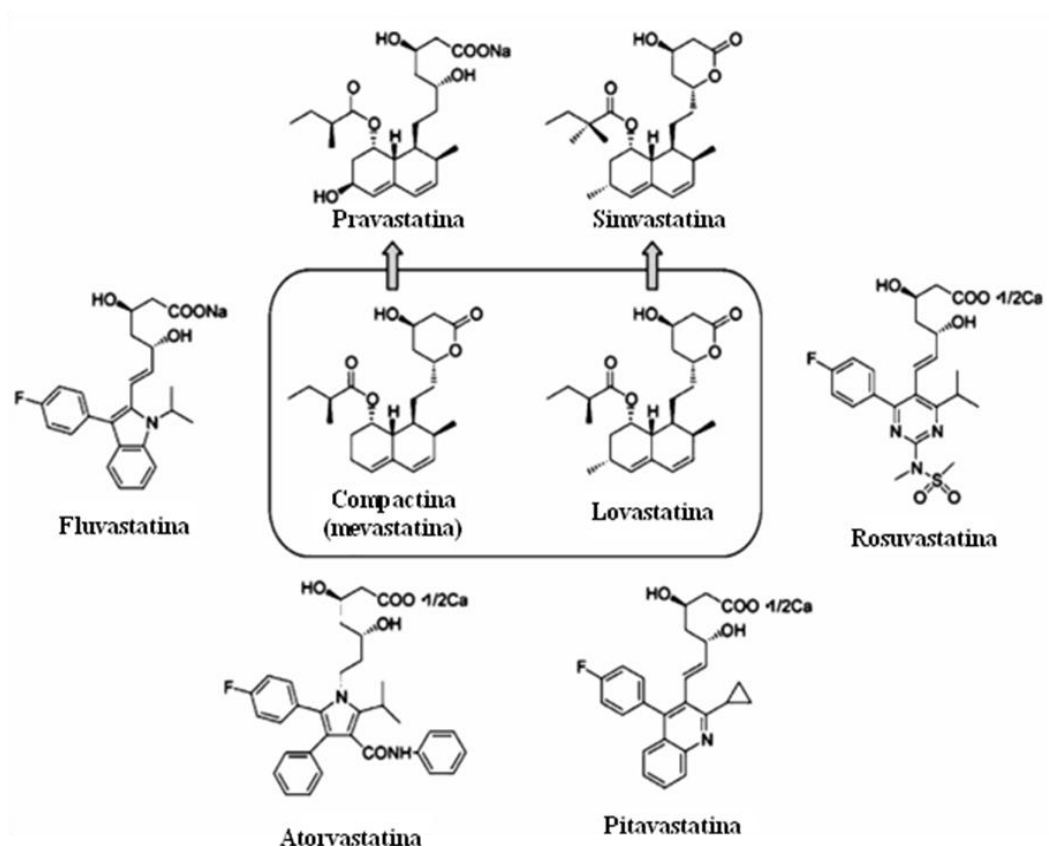
Em 1976, a primeira estatina foi isolada a partir de uma cultura de *Penicillium citrinum*, recebendo o nome de compactina ou mevastatina (90). Apesar de apresentar-se como um bom inibidor da síntese de colesterol, seu potencial tóxico a excluiu do uso clínico. Em seguida, em 1980, a lovastatina foi isolada a partir da cultura do *Aspergillus terreus*, apresentando as mesmas propriedades da compactina, porém com menor toxicidade (91).

A partir de então, outras estatinas foram obtidas através de modificações na sua estrutura química, e em 1987 a *Food and Drug Administration* (FDA) aprovou o

uso da atorvastatina, a fluvastatina e a cerivastatina, todas mostrando o efeito inibidor sobre a síntese de colesterol.

No entanto, em 2001 a cerivastatina foi retirada do mercado devido à incidência de mais de 100 casos de rabdomiólise fatal relacionada ao dano severo da musculatura esquelética (92). Este fato foi associado ao uso de doses elevadas ou conjugadas ao genfibrosil (fármaco utilizado no tratamento das hipertrigliceridemias (93)

Atualmente existem no mercado seis tipos de estatinas com diferentes perfis farmacocinéticos e farmacodinâmicos: lovastatina (Mevacor®), Sinvastatina (Zocor®), pravastatina (Pravacol®), atorvastatina (Líptor®), fluvastatina (Lescol®), e rosuvastatina(Crestor®).



**Figura 1.9: Estrutura química das principais estatinas.** Todas, exceto compactina (originalmente ML-236B, mevastatina), estão disponíveis atualmente para o tratamento em humanos. A lovastatina e Sinvastatina são compostos de anel fechado atuando como pró-drogas. Já a fluvastatina, atorvastatina, rosuvastatina e pitavastatina são compostos quimicamente sintetizados. (Adaptado de Sirtori, 2014) (89)

### **1.5.1 Sinvastatina**

Administrada sobre a forma de pró-fármaco inativo com anéis de lactona, a sinvastatina necessita ser ativada através de hidrólise *in vivo* para beta-hidroxiácido se tornando, então, ativa no organismo. Sua obtenção se dá através da fermentação de um fungo *Aspergillus terreus*, diferentemente de outras estatinas que são obtidas de forma sintética. De forma geral, todas as estatinas têm o fígado como órgão-alvo, porém a porcentagem da dose retida por este órgão pode variar (94).

A sinvastatina é bem absorvida, sofre um amplo metabolismo de primeira passagem no fígado, e sua metabolização é feita através da isoenzima 3A4 do citocromo P450 (CYP450). Os beta-hidroxiácidos ligam-se a 95% das proteínas plasmáticas humanas, e sua biodisponibilidade para a circulação sistêmica é de aproximadamente 5%, não apresentando alteração no perfil plasmático administrado em jejum. Sua excreção é feita em sua grande parte pela bile, já que a sua excreção renal não pode ser considerada significativa. (94)

Este fármaco geralmente é bem tolerado, sendo a maioria dos seus efeitos adversos de natureza leve e transitória. Os mais comuns são distúrbios digestivos e os menos comuns, fraqueza e cefaléia.

### **1.5.2: Atorvastatina**

Em 2003, a atorvastatina, comercializada pela Pfizer, tornou-se o fármaco mais vendido do mundo. Sua boa aceitação deve-se à sua baixa toxicidade e potência: um indivíduo adulto obtêm uma redução de até 40% nos seus níveis de colesterol sérico com uma dose diária de 10 mg. O mesmo resultado é obtido com uma dose diária de 80mg de fluvastatina ou 40mg de lovastatina. (95)

Assim como as outras estatinas, a atorvastatina reduz os níveis plasmáticos de colesterol e de lipoproteínas através da inibição reversível da HMG-CoA redutase e consequentemente da síntese de colesterol, aumentando o número de receptores de LDL hepáticos na superfície celular, a absorção e o catabolismo do LDL. (95)

É um fármaco sintético indicado para o tratamento da hipercolesterolemia, prevenção da síndrome coronária aguda e complicações cardiovasculares em pacientes com pressão alta, diabetes, HDL baixo ou história familiar de doença

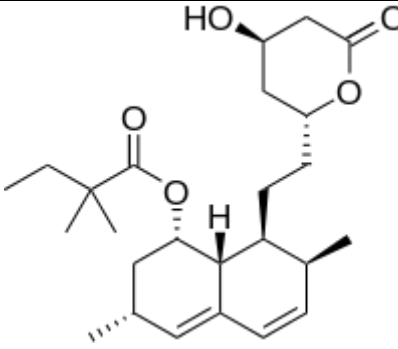
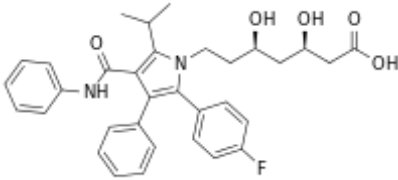
cardíaca precoce. Sua dose de uso pode variar de 10 a 80 mg por dia, de acordo com o histórico de cada paciente.

É rapidamente absorvida após administração oral, e sua concentração plasmática máxima é atingida dentro de 1 a 2 horas. A extensão da sua absorção e a concentração plasmática aumentam proporcionalmente à dose utilizada. Sua biodisponibilidade absoluta é de aproximadamente 12% e sua disponibilidade sistêmica é de aproximadamente 30% (Tabela 1.2), fato este atribuído ao metabolismo hepático de primeira passagem. Possui uma meia-vida de eliminação plasmática de aproximadamente 14 horas, e sua eliminação ocorre principalmente através da bile após metabolismo hepático e/ou extra-hepático (95).

Atorvastatina é geralmente bem tolerada, e seus efeitos colaterais são de natureza transitória. Dentre eles os mais comuns destacam-se: mal-estar, febre, náusea, diarreia, dores nas articulações e extremidade, mialgia dentre outros. No entanto apesar de bem tolerada deve se evitar o seu uso no caso de pacientes que apresentam hipersensibilidade a qualquer componente da fórmula, ou possuem doenças hepáticas com alterações nos níveis de transaminases séricas que excedam três vezes o limite superior da normalidade (95).

A administração concomitante de atorvastatina com inibidores do citocromo P450 3A4 ou indutores do citocromo P450 3A4, podem interferir nos níveis séricos de outras medicações como, por exemplo, a ciclosporina, eritromicina e rifampicina (95).

**Tabela 1.2: Características farmacológicas da sinvastatina e da atorvastatina.** (Adaptado de Neuvonen, Niemi, Backman 2006 & Sirtori C.R., 2014.)(89)

<b>Propriedades Farmacocinéticas</b>	<b>Sinvastatina</b>	<b>Atorvastatina</b>
Estrutura Química		
Pró-farmaco lactona	Sim	Não
Lipofilicidade da forma lactona ou forma ácida	++++	+++
Absorção oral (%)	60-85	30
Biodisponibilidade (%)	<5	12
Extração hepática (%)	>ou=80	70
Ligação a proteínas (%)	>95	>98
IC <sub>50</sub> HMG-CoA redutase (nM) <sup>a</sup>	1-2 (metabolito ativo)	1.16
Metabolismo CYP450	3A4 (2C8, 2D6)	3A4 (2C8)
Dose inicial diária (mg)	10-40	10-80

**a** = Resultados obtidos a partir de cultura de hepatócitos.



Uma vez que tem sido descrito que durante as infecções causadas pelo *M. leprae* ocorre uma modulação do metabolismo lipídico da célula hospedeira, com a indução da formação de CLs que estariam favorecendo a sobrevivência deste bacilo, acreditamos que a utilização de drogas inibidoras da via de síntese de colesterol celular possa ser uma estratégia valiosa para auxiliar o controle da hanseníase, bem como de outras micobacterioses.

## **Capítulo 2: Objetivos**

## Objetivo Geral

Estudar a eficácia das estatinas, inibidores da HMG-CoA redutase, enzima chave da via de síntese do colesterol, no controle da infecção por micobactérias.

## Objetivos Específicos

1.1 Investigar o possível efeito citotóxico das estatinas no modelo de infecção *in vitro* utilizando macrófagos derivados de monócitos humanos de linhagem THP-1, nos diferentes tempos de infecção utilizados neste estudo;

1.2 Avaliar a viabilidade intracelular de *M. bovis* BCG (cepa Pasteur), *M. tuberculosis* e *M. leprae* através do modelo de infecção *in vitro* de macrófagos derivados de monócitos humanos de linhagem THP-1 diante da exposição a diferentes estatinas;

1.3 Avaliar o efeito da associação das estatinas à rifampicina na viabilidade intracelular de *M. bovis* BCG (cepa Pasteur), *M. tuberculosis* e *M. leprae* no modelo de infecção *in vitro* de macrófagos derivados de THP-1.

1.4 Verificar se há reversão do efeito bactericida das estatinas através do tratamento de culturas infectadas com *M. tuberculosis* ou *M. leprae* com mevalonato, um dos precursores do colesterol, associado às estatinas;

1.5 Investigar se as estatinas estariam interferindo na viabilidade do *M. leprae* através da indução da produção de óxido nítrico na célula hospedeira;

1.6 Determinar a eficácia das estatinas na diminuição dos níveis celulares de colesterol no modelo de infecção *in vitro* pelo *M. leprae*;

1.7 Avaliar se as estatinas estariam interferindo no processo de invasão micobacteriana;

1.8 Investigar se as estatinas estariam favorecendo o aprisionamento micobacteriano no interior de fagossomos maduros, diminuindo a viabilidade bacilar por este mecanismo;

1.9 Analisar o efeito das estatinas no modelo de infecção *in vivo* em camundongos BALB/c infectados pelo *M. leprae*;

1.10 Analisar o efeito das estatinas sobre o colesterol plasmático e transaminases hepáticas no modelo de infecção *in vivo* em camundongos BALB/c infectados pelo *M. leprae*.

## **Capítulo 3: Artigo**

## **Statins increase rifampin mycobactericidal effect.**

Lívia Silva Lobato<sup>1</sup>, Patrícia Sammarco Rosa<sup>2</sup>, Jessica da Silva Ferreira<sup>1</sup>, Arthur da Silva Neumann<sup>1</sup>, Marlei Gomes da Silva<sup>3</sup>, Dejair Caitano do Nascimento<sup>2</sup>, Cleverson Teixeira Soares<sup>2</sup>, Silvia Cristina Barbosa Pedrini<sup>2</sup>, Diego Sá Leal de Oliveira<sup>1</sup>, Cláudia Peres Monteiro<sup>2</sup>, Geraldo Moura Batista Pereira<sup>1</sup>, Marcelo Ribeiro-Alves<sup>4</sup>, Mariana Andrea Hacker<sup>5</sup>, Milton Ozório Moraes<sup>5</sup>, Maria Cristina Vidal Pessolani<sup>1</sup>, Rafael Silva Duarte<sup>3</sup> and Flávio Alves Lara<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Laboratório de Microbiologia Celular, Oswaldo Cruz Institute, Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro-RJ, Brazil; <sup>2</sup>Lauro de Sousa Lima Institute, Department of Biology, Bauru-SP, Brazil; <sup>3</sup>Laboratório de Micobactérias, Instituto de Microbiologia Professor Paulo de Góes, <sup>4</sup>Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brazil; <sup>4</sup>Centro de Pesquisa Clínica em HIV/AIDS, Evandro Chagas Clinical Research Institute, Oswaldo Cruz Foundation, <sup>5</sup>Laboratório de Hanseníase, Oswaldo Cruz Institute, Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro-RJ, Brazil;

Situação: Manuscrito no prelo. Aguardando publicação na revista *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*

Aceito em: 04/07/2014

## **Estatinas aumentam o efeito micobactericida da rifampicina**

Atualmente diversos estudos têm demonstrado um papel importante dos lipídeos derivados do hospedeiro, principalmente do colesterol, durante infecções causadas por micobactérias.

A hanseníase é uma patologia humana caracterizada por lesões no sistema nervoso periférico, desencadeadas por uma infecção crônica causada pelo *M. leprae* em células de Schwann (CS) e macrófagos da pele. Uma das características histopatológicas marcantes da hanseníase é a presença de macrófagos altamente infectados pelo *M. leprae* com aspecto espumoso em decorrência do acúmulo de lipídeos (84).

A origem destes lipídeos foi recentemente analisada de forma mais detalhada pelo nosso grupo e foi demonstrado que, tanto em macrófagos como em células de Schwann, o *M. leprae* é capaz de induzir a biogênese de corpúsculos lipídicos na célula hospedeira (84) (85). Também foi observado que tais corpúsculos eram recrutados para o fagossoma contendo a micobactéria, e que a inibição deste recrutamento reduzia significativamente a viabilidade do *M. leprae* intracelular (85).

Com base nestes achados resolvemos utilizar a via de biosíntese de colesterol da célula hospedeira como provável alvo terapêutico no controle da hanseníase e da tuberculose. Desta forma, optamos pela utilização de um modelo de infecção *in vitro* a partir de macrófagos derivados de monócitos de linhagem THP-1, tratados ou não com drogas inibidoras da síntese *de novo* de colesterol, as estatinas. Inicialmente investigamos o possível efeito citotóxico das estatinas em nosso modelo de infecção *in vitro*, e posteriormente avaliamos a viabilidade intracelular de *M. bovis* BCG (cepa Pasteur), *M. tuberculosis* e *M. leprae* diante da exposição a diferentes estatinas isoladamente ou em associação à rifampicina. Observamos que as estatinas não foram capazes de causar um efeito citotóxico em nosso modelo de estudo, no entanto, foi possível verificar uma diminuição da viabilidade bacilar das três micobactérias testadas. Esse efeito bactericida observado, foi parcialmente revertido quando as culturas infectadas com *M. tuberculosis* ou *M. leprae* foram tratadas com mevalonato, um dos precursores do colesterol, evidenciando a importância desta via na sobrevivência micobacteriana.

Ensaio *in vitro* subsequentes demonstraram que a diminuição da viabilidade micobacteriana não estaria relacionada a um aumento na produção de óxido nítrico pela célula hospedeira, nem mesmo com uma possível interferência no processo de invasão dos macrófagos, mas sim pela diminuição dos níveis celulares de colesterol.

Em seguida, investigamos se as estatinas estariam favorecendo o aprisionamento micobacteriano no interior de fagossomos maduros conforme sugerido por Parihar e colaboradores (2013) (96) em estudo utilizando *M. tuberculosis*. De forma similar ao que foi relatado na literatura observamos um aumento na associação bactéria-endossoma tardio em culturas tratadas com estatinas, evidenciando um papel importante do colesterol no processo liberação do conteúdo fagossomal para o citosol da célula hospedeira.

Outra abordagem utilizada por nosso grupo para a confirmação dos resultados obtidos *in vitro*, foi a realização de um estudo *in vivo* com camundongos BALB/c infectados com *M. leprae*, tratados com rifampicina e atorvastatina, isoladamente ou associadas. Por meio destes ensaios, além da análise da viabilidade bacilar em coxim plantar desses animais, o colesterol plasmático e transaminases hepáticas foram também avaliados. Nossos resultados confirmaram a diminuição da viabilidade micobacteriana diante do uso das estatinas em conformidade com o observado nos experimentos *in vitro*. Além disso, as estatinas foram capazes de reduzir o colesterol plasmático destes animais, sem no entanto causar danos hepáticos. Análises histopatológicas da lesão destes animais ainda foi realizada, o que nos permitiu concluir que o tratamento com atorvastatina associada à rifampicina foi capaz de promover uma diminuição do infiltrado inflamatório, redução dos níveis baciloscópicos e fragmentação bacilar dentro dos macrófagos similar ao observado com altas doses de rifampicina. O conjunto de dados obtidos ao longo do mestrado originou o artigo a seguir.



## **Statins increase rifampin mycobactericidal effect.**

### **Authors:**

Lívia Silva Lobato<sup>1</sup>, Patrícia Sammarco Rosa<sup>2</sup>, Jessica da Silva Ferreira<sup>1</sup>, Arthur da Silva Neumann<sup>1</sup>, Marlei Gomes da Silva<sup>3</sup>, Dejair Caitano do Nascimento<sup>2</sup>, Cleverson Teixeira Soares<sup>2</sup>, Silvia Cristina Barbosa Pedrini<sup>2</sup>, Diego Sá Leal de Oliveira<sup>1</sup>, Cláudia Peres Monteiro<sup>2</sup>, Geraldo Moura Batista Pereira<sup>1</sup>, Marcelo Ribeiro-Alves<sup>4</sup>, Mariana Andrea Hacker<sup>5</sup>, Milton Ozório Moraes<sup>5</sup>, Maria Cristina Vidal Pessolani<sup>1</sup>, Rafael Silva Duarte<sup>3</sup> and Flávio Alves Lara<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Laboratório de Microbiologia Celular, Oswaldo Cruz Institute, Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro-RJ, Brazil; <sup>2</sup>Lauro de Sousa Lima Institute, Department of Biology, Bauru-SP, Brazil; <sup>3</sup>Laboratório de Micobactérias, Instituto de Microbiologia Professor Paulo de Góes, <sup>4</sup>Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brazil; <sup>4</sup>Centro de Pesquisa Clínica em HIV/AIDS, Evandro Chagas Clinical Research Institute, Oswaldo Cruz Foundation, <sup>5</sup>Laboratório de Hanseníase, Oswaldo Cruz Institute, Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro-RJ, Brazil;

**Correspondence address:** to Flavio Alves Lara., Ph.D. Mailing address: Pavilhão Haseníase, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Av. Brasil, 4365, sala 27. 21040-360 Rio de Janeiro, RJ, BRAZIL Phone: (5521) 2562-1552 E-mail: flavioalveslara2000@gmail.com

## ABSTRACT

*Mycobacterium leprae* and *Mycobacterium tuberculosis* antimicrobial resistance has been followed with great concern during the last years, while the need for new drugs able to control leprosy and tuberculosis, mainly due to XDR-TB, is pressing. Our group has recently described that *M. leprae* is able to induce lipid body biogenesis and cholesterol accumulation in macrophages and Schwann cells, facilitating its viability and replication. Considering these previous results, we investigated the efficacy of two statins on the intracellular viability of mycobacteria within the macrophage, and atorvastatin effect on BALB/c mice *M. leprae* infection. We observed that intracellular mycobacteria viability decreased markedly after incubation with both statins, but atorvastatin showed the best inhibitory effect when combined with rifampin. Using Shepard's model we observed atorvastatin efficacy in control *M. leprae* and inflammatory infiltrate in the BALB/c footpad, in a serum cholesterol level dependent way. We conclude that statins contribute to macrophage-bactericidal activity against *M. bovis*, *M. leprae* and *M. tuberculosis*. It is likely that statins association with the actual multidrug therapy could effectively reduce mycobacteria viability and tissue lesion in Leprosy and Tuberculosis patients, although epidemiological studies are still needed for confirmation.

**Key words:** Leprosy, Atorvastatin, Simvastatin, Rifampin, Rifampicin and Cholesterol.

## INTRODUCTION

Tuberculosis (TB) and leprosy are chronic infections caused by *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tb*) and *Mycobacterium leprae* (*M. leprae*), the most important facultative and an obligate intracellular pathogen respectively, which target macrophages for replication and persistence, while *M. leprae* also infects Schwann cells in nerves. Tuberculosis is the most frequent bacterial infection among humans, resulting in 1.4 million deaths around the world in 2011(1). Leprosy may evolve to permanent nerve damage and incapacities and in 2011 it was diagnosed in 219,075 patients worldwide, but it is usually not fatal. On the other hand, *M. leprae* infection was responsible for 12,225 cases of motor disability and deformity, the hallmarks of the infection (2).

Leprosy and TB are treatable bacterial infections, with effective combined multi-drug therapy, but very long treatment is applied: 12 or 6 months for leprosy (depending on the clinical form) and 6 months for TB. In fact the introduction of the multidrug therapy (MDT) represented a great achievement in the disease control, which has been declining in incidence in the past 20 years around the world (2). Nevertheless, adherence to treatment is an important issue where the emergence of multi-drug resistance (MDR) cases is increasing fast, especially in TB. However, *M. leprae* resistance has been followed with great concern during the last few years (3). Over the last decades WHO has identified clinical isolates of *M. leprae* resistant to rifampin, dapsona or ofloxacin, and has reported that their number is growing (4).

It is well known that after *M. leprae* or *M. tb* phagocytosis by host cells an alteration of cellular lipid metabolism takes place, resulting in an increase in cholesterol and aliphatic lipid uptake and *de novo* synthesis(5-7). Parihar and colleagues have recently demonstrated that cholesterol reduction by statins reduce *M. tb* viability *in vitro* and *in vivo* (8), a strategy already proposed in the literature (9). This metabolic remodeling by the mycobacterial infection is responsible for an increase in different classes of lipids in a systemic way, as demonstrated in leprosy patient serum metabolomics studies, where a correlation was established between the bacilloscopy index (BI, the bacillary load in skin biopsies expressed in a logarithmic scale from 0 to 6) and the abundance of some polyunsaturated fatty acids and phospholipids such as arachidonic acid, eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid (10). Our group also demonstrated cholesterol-ester increase in multibacillary skin biopsies when compared to paucibacillary ones (11). Additionally, it has been shown that *M. leprae* suppresses lipid degradation through inhibition of hormone-sensitive lipase expression, contributing to lipid accumulation in infected cells (12), and that this process plays a central role in bacterial survival (11). Although only two lipases and one phospholipase was encoded by its genome, recent proteomic analyses indicate an active glyoxylate cycle in *M. leprae*, where fatty acid beta-oxidation is generating succinate for the synthesis of carbohydrates (13) (14). For that reason the metabolism of host lipids represent an important mechanism for this bacterium to cause and sustain infection. This is best illustrated by *M. tuberculosis*, which presents a large number of coding genes involved with lipogenesis and lipolysis (15). Controversially, many of these

genes are pseudogenes in *M. leprae* genome (14). Probably enzymes from the host cells are complementing the bacterial genes, as suggested by a study describing the induction by infection of cellular lipases and phospholipases in lepromatous patient's tissues (16). Although cholesterol metabolism is still not completely understood in *M. leprae*, accumulation in the *M. tb* cell wall was previously described to be responsible for decreasing tritiated rifampin permeability *in vitro* (17), as well as being involved in mycobacterial avoidance of macrophage vacuolar fusion and consequently immune response (18), and represents the most important carbon source inside IFN- $\gamma$ -activated macrophages *in vitro* (19).

Based on an accumulation of data involving the essential role of cholesterol and lipids in intracellular survival of mycobacteria, in this study we investigated the use of statins to control *M. leprae* infection both *in vitro* and *in vivo*. Statins involve a class of drugs largely used in the treatment of cholesterol-induced atherosclerotic cardiovascular disease. They are structural analogs of mevalonate able to inhibit the rate-limiting enzyme HMG-CoA reductase that in mammals is responsible for cholesterol synthesis. Mainly used in hypercholesterolemia treatment, statins are now recognized as immunomodulatory drugs, presenting satisfactory pleiotropic effects in immune disorders (20) (21). By reducing cholesterol availability in the intracellular environment, we anticipate a reduction in mycobacterial persistence and multiplication in host cells.

In our present work, we tested the activity and additive effect of rifampin treatment in association with two statins: atorvastatin and simvastatin, in the control of *M. leprae* and *M. tb* in a macrophage *in vitro*

infection model and *in vivo* in Shepard's mouse footpad *M. leprae* infection model. We demonstrated that both statins induce a bactericidal effect in *M. tuberculosis* and *M. leprae* infection. The bactericidal effect observed in cells infected by *M. leprae* is related to phagosomal arrest, and its combination with rifampin drastically reduces cellular infiltration in the leprosy mouse footpad model.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Cell culture**

THP-1 cells were obtained from *American Type Culture Collection* (ATCC), and maintained in RPMI medium 1640 (LCG Bioscience, SP, Brazil) supplemented with 10% fetal bovine serum (CULTILAB, Campinas, SP, Brazil), without antibiotics. Cultures were kept at 37 °C or 33 °C within a humidified 5 % CO<sub>2</sub> atmosphere. The differentiation of monocytes to macrophages was achieved by exposing the cells to 200 ng/ml phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) (Sigma, St. Louis, USA) for 24 h.

### **Mycobacteria strains and staining**

Live *Mycobacterium leprae* prepared from the footpads of athymic nu/nu mice was produced at Lauro de Sousa Lima Institute, Bauru-SP, Brazil. *M. leprae* was purified from iodine hygienized hind footpads. Briefly, skin and bones were removed, tissue was minced into small pieces with scissors and digested with a solution of 170 units of collagenase type I, 2 units of dispase (Life Technologies, NY, USA), 5 mg/mL of ampicillin (Sigma, St. Louis, USA) and 150 units of DNase (Life Technologies, NY, USA) for 2 h at 33 °C. Digested tissue was homogenized by vortex and washed, three times in water, one time in NaOH 0.1 N and one time in RPMI medium, by centrifugation at 10,000 g/5 min, and counted by acid-fast staining (Ziehl-Neelsen Kit, Becton Dickinson). Part of the *M. leprae* suspension was sterilized by gamma irradiation at Acelétron Facility (Rio de Janeiro, Brazil). *Mycobacterium bovis* BCG Pasteur (ATCC 35734) and *Mycobacterium*

*tuberculosis* H37Rv were grown at 37 °C in Middlebrook 7H9 base ADC enrichment medium (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ), supplemented with 0.2 % glycerol and 0.05 % Tween 80 (Sigma).

### ***Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis* BCG Pasteur viability determination**

*M. tuberculosis* and *M. bovis* BCG viability was measured after  $2 \times 10^5$  THP-1 cells infection differentiated into macrophages and after 24 h infected with *M. tuberculosis* or *M. bovis* BCG at an MOI of 10:1 or 50:1 respectively during 72 h at 37 °C. The cultures were washed and lysed by 0.1 % Triton X-100 in PBS during 10 minutes. Intracellular live bacterial number was assessed by serial dilution of the lysate and seeding on Middlebrook 7H10 with 10 % OADC, with determination of the CFUs after one-month incubation at 37 °C.

### ***M. leprae* viability determination**

We use two methods to determine *M. leprae* viability. The first one is a fluorimetric live/dead staining protocol described elsewhere (22) using LIVE/DEAD Bactlight Bacterial viability Kit (Life Technologies, CA, USA) performed according the manufacturer's instructions to be sure that the viability of bacilli from the nude mouse preparation was always above 85%, otherwise it was discarded. The second method is a molecular approach described elsewhere (23) to determine *M. leprae* viability in cellular cultures, where the levels of labile *M. leprae* mRNA were normalized by its highly stable DNA. Briefly,  $2 \times 10^5$  THP-1 cells were differentiated into macrophages



within 24 h incubation with 200 nM of PMA. After this time, cells were washed and allowed to rest. After 24h of rest, cells were infected with *M. leprae* with a MOI of 10:1. After testing at different times of infection, we observe that seven days of infection generates the most consistent results on viability analysis. After one week of infection, *M. leprae* RNA were extracted using TRIzol reagent (Invitrogen, CA, USA) in Fast Prep FP 24 tubes (MP Biomedicals, CA, USA). DNA was removed from RNA preparations using the DNA-free turbo kit (Ambion, CA, USA). *M. leprae* RNA was reverse transcribed using random primer and superscript III following manufacturer's instructions (Invitrogen, CA, USA). The levels of *M. leprae* 16S rRNA mRNA and DNA were determined from cultured macrophages by real-time RT-PCR, using the same primer pairs as sense 5'GCA TGTCTTGTGGTGGAAAGC'3 and anti-sense 5'CACCCCACCAACAAGCTGAT'3. All samples presented cycle threshold (CT) values between 20 and 28. 100% viability was arbitrarily assumed as  $2^{-\Delta CT}$  of infected control samples, and all others values were normalized as a percentage of this. The reactions were performed in an ABI StepOne Plus Sequence Detection System (Applied Biosystems, CA, USA).

### **Lipid extraction and analysis**

$8 \times 10^5$  THP-1 cells were differentiated into macrophages as described above, infected with *M. leprae* at a MOI of 10:1, and exposed to 2  $\mu$ M of simvastatin during 1 week. Cultures were washed twice with PBS, detached and homogenized by three freeze-thaw cycles. Total cholesterol content was determined using Amplex® Red Cholesterol Assay Kit (Invitrogen, CA, USA)

according to the manufacturer's instructions. Total cholesterol levels were represented as microgram of total cholesterol per milligram of protein.

### **Fluorescence microscopy**

THP-1 cells were plated in 24-well plates containing coverslips at a density of  $2 \times 10^5$  cell / well and treated with statins during 24 hours. To measure the infection rate in statin treated cells, cultures were exposed to irradiated *M. leprae* stained with PKH26 Red Fluorescence, as described elsewhere (24) at a MOI 10:1 for 5 h, a time known to be sufficient to infect one third of the THP-1 cells by *M. leprae* with this MOI. After that, medium was removed by PBS wash and cells were fixed in paraformaldehyde 4 % (w/v) at 4 °C for 20 minutes. Images were taken in a Zeiss AxioObserver fluorescence microscope, where 10 fields from three biological replicates were analyzed.

For immunocytochemistry by confocal microscopy, cultures were infected with live *M. leprae* at a MOI 1:10 for 24 h, a time known to be sufficient to observe *M. tuberculosis* evasion from the phagosome (25). Slides were permeabilized and blocked by 30 minutes incubation with 0.01 % Triton X-100 and 10 % of fetal bovine serum in PBS pH 7.2. Cells were incubated for 2 h with rabbit IgG anti-LAM antibodies (1:50 vol/vol) kindly donated by Dr. John S. Spencer (BEI Resources Repository, NIAID, NIH) to identify *M. leprae*, and mouse IgG anti-human RAB7 (1:500 vol/vol; Abcam, MA, USA) to identify late endosomes. Secondary antibodies conjugated with Alexa 488 (IgG anti-mouse) and Alexa 555 (IgG anti rabbit) (Invitrogen, CA, USA) were incubated with the samples for 2 h. Slides were observed in a

Zeiss LSM 710 confocal laser scanning microscope (Carl Zeiss, Heidenheim, Germany). We analyzed 100 cells from three biological replicates, plotting the percentage of late phagosome (Rab7+ vesicles) containing *M. leprae*.

### ***In vivo* atorvastatin efficacy test against *M. leprae* in Shepard's BALB/c mouse model.**

A suspension containing  $1 \times 10^4$  live *M. leprae* in 10  $\mu$ L was inoculated in each hind footpad of BALB/c mice as described in Shepard's model. One month after inoculation, mice were divided in 6 groups. The control group was inoculated and not treated; two other groups were treated with atorvastatin added to the daily feed at doses of 40 and 80 mg/kg body weight/day, respectively. The other three groups received rifampin at 10 mg/kg; rifampin at 1 mg/kg by gavage weekly; or rifampin at 1mg/kg body weight and atorvastatin 80 mg/kg body weight /day in the feed, respectively. Mice were treated for 5 months. Six months after inoculation mice were sacrificed and both footpads were excised, one was macerated for bacillary counting, the contralateral was fixed in 10 % buffered formalin, paraffinized and sectioned for histopathological examination with hematoxylin-eosin and Fite-Faraco staining for acid fast bacilli (AFB).

### **Determination of cholesterol and liver components in mouse plasma**

All BALB/c mice were sacrificed under anesthesia, and plasma was collected in heparin directly from the heart. Cholesterol, aspartate aminotransferase (AS) and alanine aminotransferase (ALT) were measured

using the assay kit Bioclin/Quibasa (Belo Horizonte, MG, Brazil) according to the manufacturer's instructions.

### **Statistical Analysis**

All numerical data were statistically analyzed using nonparametric Kruskal-Wallis test and Dunns as post-test to compare relevant groups, with GraphPad Prism® software.

### **Ethic Statement**

Animal protocols were in agreement with the animal care guidelines of the National Institutes of Health and were approved by the Animal Welfare Committee of Sagrado Coração University (São Paulo, Brazil).

## RESULTS

### Intracellular mycobacteria viability are reduced by statins

Since host cholesterol accumulation in *M. tuberculosis* cell wall is involved in rifampin permeability decrease *in vitro* (17), we hypothesize that cholesterol *de novo* synthesis inhibition could not only kill mycobacteria by carbon deprivation, but also make it more vulnerable to rifampin.

We first observed the potential of atorvastatin and simvastatin on the control of *in vitro* THP-1 mycobacterial infection. After 72 h of infection, both atorvastatin and simvastatin were able to inactivate intracellular BCG in a dose-dependent fashion (Figure 1A). With the higher dose (2  $\mu$ M) both drugs were able to reduce by about 75 % the number of viable intracellular bacilli, and atorvastatin showed an additive effect in combination with rifampin 1  $\mu$ g/mL. *M. tb* displayed a very similar response to statins compared with BCG, presenting viability reduction in a dose-dependent manner (Figure 1B). One distinction between BCG and *M. tb* was that in the pathogenic strain the additive effect of statins with rifampin was seen in both combinations (rifampin 1  $\mu$ g/mL plus 0.2  $\mu$ M of atorvastatin or simvastatin) with  $p < 0.05$ .

We determined *M. leprae* viability by RT-PCR, the most sensitive method available, being chosen due to its capacity to determine the viability of a small amount of bacilli ( $10^6$ ) (23). After 1 week of infection at 33 °C, *M. leprae* RNA copy number, which is rapidly degraded after bacilli inactivation, was quantified after normalization. As shown in Figure 1C, both atorvastatin and simvastatin caused a bactericidal effect in a dose dependent fashion. Here again only atorvastatin showed an additive effect when combined with

rifampin (rifampin 0.1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  plus atorvastatin 0.2  $\mu\text{M}$ ). None of these effects are related with statin's cytotoxicity (Figure S1).

### **Statin treatment does not alter mycobacterial invasion.**

To observe if statins were able to reduce cholesterol levels in our model, and through that mechanism prevent mycobacterial infectivity instead of its viability, we treated infected THP-1 cells for 1 week with 2  $\mu\text{M}$  of simvastatin. Our group has already described that *M. leprae* infected macrophages accumulate cholesterol as lipid bodies through TLR2/6 signaling (7). Here we observed that simvastatin was able to prevent *M. leprae* infected cells from accumulating cholesterol, restoring normal cholesterol levels (Figure 2A). Since the importance of 9-O-acetyl GD3, a cholesterol anchored ganglioside located in cellular lipid rafting, to *M. leprae* invasion in Schwann cells was already demonstrated by our group (26), we investigate if changes in cholesterol levels observed in treated cells could interfere in the ability of *M. leprae* to infect cells. We observed the rate of infection between untreated and statin treated cells using irradiated PKH26 stained *M. leprae*, and determined that there was no difference in the rate of infection between the two (Figure 2 B-F). Thus, we conclude that the lower number of viable mycobacteria after treatment with statins is not due to either THP-1 cell mortality or by differences in the infection rate.

### **Statins increase association between *M. leprae* and late endosomes**

Cholesterol also plays a role in the ability of mycobacteria to escape the phagosome as it serves as an anchor for ESAT-6, a secreted

mycobacterial protein able to disrupt cellular membranes and to consequently release engulfed mycobacteria to the cytosol (Robottom-Ferreira et al., unpublished data) (27). Other authors showed that only in cholesterol depleted macrophages *Mycobacterium avium* containing phagosomes fuse with lysosomes, generating phagolysosomes (18). In addition, it was recently demonstrated that macrophages isolated from simvastatin-treated mice more efficiently kill *M. tb* through phagosomal maturation and autophagy (8). It has been shown that rab-7 dissociation from *M. tb* phagosomes, which occurs around 6 h, is important for the maintenance of the phagosomal environment, which matures to a phagolysosome after fusion with lysosomes (25). Corroborating the literature, we show a close association of the transient phagosomal membrane protein rab-7 with *M. leprae* lipoarabinomannan (LAM) within the phagosomal space, 24h after statin treatment of infected cells. We observed that rab-7 and LAM were co-localized within the phagosome 24 h after *M. leprae* infection only in THP-1 cells treated with statins (Figure 3A arrows and insets). Simvastatin induced higher mycobacterial LAM/rab-7 co-localization than atorvastatin, in agreement with its higher bactericidal activity against *M. leprae* shown in Figure 1C. However, since atorvastatin had a similar activity when used at a higher dose (2  $\mu$ M), and only this drug presented an additive effect in association with rifampin, we chose it for the *in vivo* tests.

### **Atorvastatin synergizes with rifampin in its antibacterial effect *in vivo*.**

Due to the previous studies showing that host cholesterol deposition in the mycobacterial cell wall inhibits rifampin permeability (17), our hypothesis

is that the application of statins in tuberculosis and leprosy treatment involves its association with the actual multidrug therapy. For this reason, we evaluated if atorvastatin was able to potentiate rifampin's effect *in vivo*. To test this, we infected BALB/c mouse footpads and, after one month of infection, the mice were subjected to five different treatments for five months (Figure 4). After six months, atorvastatin alone at the higher dose (80 mg/kg/day) effectively reduced *M. leprae* replication (Figure 4A, triangles). In addition, only groups treated with higher dose of atorvastatin showed a significant reduction in plasma cholesterol levels (Figure 4B). More interestingly, atorvastatin combined with rifampin (1 mg/kg/week) induced a larger decrease than rifampin alone ( $p < 0.01$ ). We also demonstrate that none of the treatment schemes increased muscle tissue damage or led into detectable hepatotoxic effects (Figure 4C-D). We examined if atorvastatin at the higher dose could not only prevent infection, but also eliminate an established four month Foxn1nu (nude) mouse infection. After one month of treatment, we observed that 2 of 3 treated nude mice had a higher number of dead bacilli recovered from their footpads (data not shown).

Representative histological characteristics from contralateral footpads from the same groups of mice analyzed in Figure 4 are shown in Figure 5. As indicated by asterisks and at higher magnification, the untreated group of animals (Figure 5A-B) presents a predominantly macrophage inflammatory infiltrate in the dermis, around blood vessels and involving skeletal muscle fibers. The macrophages showed features of activated cells, with eosinophilic cytoplasm and round or oval nuclei, containing one or more nucleoli. There were a small number of lymphocytes, rare neutrophils and eosinophils mixed



with the macrophages. The bacilloscopic index (determined by Fite-Faraco stain) was high, 5/6+, with fragmented bacilli inside irregularly distributed macrophages in the entire extension of the inflammatory infiltrate. In some areas of Figure 5F (rifampin 1mg/kg/week) the infiltrate is composed of granulomas in regression, characterized by vacuolated macrophages and nuclei without nucleolus, as well as lymphocytes. Figure 5G-H (rifampin 1 mg/kg/week plus atorvastatin 80 mg/kg/day) and I-J (rifampin 10 mg/kg/week) shows a small and discrete inflammatory infiltrate, consisting predominantly of loosely arranged macrophages located in the dermis, perivascular area and involving the skeletal muscles fibers. The granulomas are more regressive and some muscle fibers show recovered areas. The bacilloscopic index (Fite-Faraco stain) was lower, only 2+, with multifragmented weakly stained bacilli inside macrophages. This supports an important and previously described beneficial pleiotropic effect of statins and their possible immunomodulatory role, which could be involved in tissue damage reduction promoted by statin treatment in tuberculosis animal infection (8, 21), a desired effect in the control of immune-related tissue inflammation and damage in leprosy.

## DISCUSSION

Our group has recently described the mechanism by which *M. leprae* induces lipid droplet formation in macrophages and Schwann cells (5, 7, 28), showing that host-derived cholesterol represents the major lipid component inside these organelles. The importance of lipids in *M. leprae* energetic metabolism is further supported by the high prevalence of genes involved in lipid anabolism and catabolism, despite the huge reductive evolution that occurred in its genome, producing essentially a minimal gene set for survival (14). It was already described by *in vitro* studies that host cholesterol accumulation in the *M. tuberculosis* cell wall is related to the decrease in rifampin permeability (17); this is a possible explanation of the additive effect observed between statins and rifampin. The hypothesis that mycobacterial HMG-CoA reductase would be inhibited by statins is not valid, since *M. tuberculosis* similarity to the human enzyme is below 40 %. Moreover, this enzyme is not expressed in *M. leprae*, which displayed a similar sensitivity to statins as *M. tuberculosis* and BCG. More importantly, higher concentrations of atorvastatin and simvastatin used in this work (2  $\mu$ M) failed to kill *M. tuberculosis* H37Rv cultivated in 7H9 medium. On the other hand, the results observed in THP-1 infected cells could not be ascribed to statins cytotoxicity, since cellular viability was not altered in all employed conditions (Supp. Figure 1). Concerning the isolated effect of statins against mycobacteria inside macrophages, other events must be taken into consideration. For example, the metabolism of *Mycobacterium tuberculosis* isolated from infected mouse lungs is stimulated by fatty acids and is unresponsive to

carbohydrates (29), and the generation of *M. tb* knockout mutants to some enzymes involved in cholesterol metabolism, such as *kshA*, *kshB*, *fadA5*, *ChoD* and *kstD* lead to inefficient mouse and macrophage infection, demonstrating the pivotal relevance of this pathway to tuberculosis infection and persistence inside the host (30-33). Since statins were already described as generators of oxidative stress in hepatocytes (34), we measured nitrite production and observed no significant difference between all conditions in our study (Supp. Figure 2). Therefore, we also discarded the possibility that statins would kill mycobacteria by increasing the oxidative stress in our model. Another hypothesis, different from carbon restriction, might explain the mycobactericidal effect of statins, such as the statin's capacity to disrupt signaling cascades originated at lipid rafts, a phenomenon already described in T lymphocytes (35). Recently, Parihar and collaborators described that statins could control *M. tb* infection, and suggested that this effect would be due to phagolysosomal arrest of *M. tb* (8). We conclude that atorvastatin and simvastatin display similar effects in our study, achieving effective mycobactericidal activity against BCG, *M. tb* and *M. leprae* reverted by mevalonate, the product of HMG-CoA reductase, as shown in Figure 1. We successfully observed *M. leprae* and mature endosome association increasing after statin treatment (Figure 3). It has been clearly shown that the mechanism used by *M. tuberculosis* to escape from the endosome compartment involves the expression of a complex of proteins including ESX-1, which is involved in the transport of proteins able to bind cholesterol-rich membranes such as ESAT-6, which is involved in membrane destabilization and rupture (27). Statins efficiently prevent *M. tb*-induced inhibition of

macrophage phagosomal maturation (8). ESAT-6 is also expressed by *M. leprae* during THP-1 infection (Robottom-Ferreira et al., unpublished data). Although simvastatin was not able to reduce the infected cell's cholesterol levels below the control, we hypothesize that the avoidance of cholesterol accumulation induced by *M. leprae* in THP-1 treated cells is sufficient to inhibit ESAT-6 disruption of the phagosome, which had matured in late endosome with the mycobacteria arrested inside (Figure 3 insets).

Our *in vivo* study corroborates the *in vitro* findings, with significant differences from the control groups observed only in mice receiving the highest dose (80 mg/kg) in their daily diet. An equivalent dose in humans would be 390 mg/day for a 60 kg adult (36). This very high dose of atorvastatin could only be achieved if we were to use daily gavage or intraperitoneal injections as the administration route, but this would be impractical for a 5 month period of treatment. This subject will be addressed in a future work.

Taken together, our results show that statins are able to inactivate *M. leprae* and *M. tb* *in vitro*, as well as potentiate the antimicrobial effect of rifampin to both pathogens. We can see that the combination of atorvastatin-rifampin presents very different results than the with each drug used separately, increasing rifampin mycobactericidal activity (Figure 1 and Figure 4 A), while decreasing the inflammatory response and tissue damage (Figure 5 G-H). We believe that this decrease in *M. leprae* viability contributed to the reduction in the inflammatory infiltrate observed in figure 5, but this decrease alone does not explain everything, since the viability observed in both

conditions, rifampin alone and rifampin-atorvastatin, shows only a small difference, while the inflammatory infiltrate reduction is much more evident.

The inflammatory infiltrate reduction observed in Figure 5 could be explained by the well know pleiotropic effect of the statins, already described in other models (20, 21, 37-39). Recent studies have demonstrated that statins may be beneficial in the treatment of T cell-mediated autoimmune diseases (40), due to the involvement of cholesterol in the maintenance of lipid raft structures and its importance in T-cell activation (41). By reducing isoprenoids, statins also inhibit protein prenylation, blocking small GTPase Ras superfamily tethering and activity (42), leading to the inhibition of T cell activation (43), antigen uptake, processing and presentation by antigen presenting cells, as well as their maturation (44).

The immunomodulatory pleiotropic effect of the combination of statin-rifampin could be particularly beneficial to the inhibition of leprosy reactional episodes during treatment. The combination of statins with MDT could perhaps reduce the occurrence of reactional episodes, which are characterized by an intense and sudden activation of the host immune response with high levels of TNF- $\alpha$ , affecting about half of the patients under treatment (45). The use of statins to control mycobacteriosis could be a low cost, efficient and fast way to provide an entirely new class of drugs to aid tuberculosis and leprosy treatment efforts, been of extreme importance if used in association with the MDT regime against MDR or XDR mycobacterial strains.

## **Acknowledgements**

We would like to express our gratitude to BEI Resources Repository, NIAID, NIH for providing the *M. leprae* anti-LAM antibody. We thank Karina Garcia and Evandro Gomes de Souza, from Acéletron (Acelétrica Comércio e Representações Ltda., Rio de Janeiro, RJ) for technical assistance with *M. leprae* irradiation. We also thank Andre Pedrosa, Dr. Yraima Cordeiro and Dr. John S. Spencer for critical reading of the manuscript.

## REFERENCES

1. **WHO.** 2012. Global Tuberculosis Report, WHO (Geneva).
2. **WHO.** 2012. Weekly epidemiological record. WHO (Geneva).
3. **Williams DL, Gillis TP.** 2012. Drug-resistant leprosy: monitoring and current status. *Leprosy review* **83**:269-281.
4. **WHO.** 2011. Surveillance of drug resistance in leprosy: 2010. *Releve epidemiologique hebdomadaire / Section d'hygiene du Secretariat de la Societe des Nations = Weekly epidemiological record / Health Section of the Secretariat of the League of Nations* **86**:237.
5. **Mattos KA, Lara FA, Oliveira VG, Rodrigues LS, D'Avila H, Melo RC, Manso PP, Sarno EN, Bozza PT, Pessolani MC.** 2011. Modulation of lipid droplets by *Mycobacterium leprae* in Schwann cells: a putative mechanism for host lipid acquisition and bacterial survival in phagosomes. *Cellular microbiology* **13**:259-273.
6. **Kim MJ, Wainwright HC, Locketz M, Bekker LG, Walther GB, Dittrich C, Visser A, Wang W, Hsu FF, Wiehart U, Tsenova L, Kaplan G, Russell DG.** 2010. Caseation of human tuberculosis granulomas correlates with elevated host lipid metabolism. *EMBO molecular medicine* **2**:258-274.
7. **Mattos KA, D'Avila H, Rodrigues LS, Oliveira VG, Sarno EN, Atella GC, Pereira GM, Bozza PT, Pessolani MC.** 2010. Lipid droplet formation in leprosy: Toll-like receptor-regulated organelles involved in eicosanoid formation and *Mycobacterium leprae* pathogenesis. *J Leukoc Biol* **87**:371-384.
8. **Parihar SP, Guler R, Khutlang R, Lang DM, Hurdayal R, Mhlanga MM, Suzuki H, Marais AD, Brombacher F.** 2013. Statin therapy reduces *Mycobacterium tuberculosis* infection in human macrophages and in mice by enhancing autophagy and phagosome maturation. *The Journal of infectious diseases*.
9. **Pohl PC, Klafke GM, Junior JR, Martins JR, da Silva Vaz I, Jr., Masuda A.** 2012. ABC transporters as a multidrug detoxification

- mechanism in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Parasitology research* **111**:2345-2351.
10. **Al-Mubarak R, Vander Heiden J, Broeckling CD, Balagon M, Brennan PJ, Vissa VD.** 2011. Serum metabolomics reveals higher levels of polyunsaturated fatty acids in lepromatous leprosy: potential markers for susceptibility and pathogenesis. *PLoS neglected tropical diseases* **5**:e1303.
  11. **Mattos KA, Oliveira VC, Berredo-Pinho M, Amaral JJ, Antunes LC, Melo RC, Acosta CC, Moura DF, Olmo R, Han J, Rosa PS, Almeida PE, Finlay BB, Borchers CH, Sarno EN, Bozza PT, Atella GC, Pessolani MC.** 2014. *Mycobacterium leprae* intracellular survival relies on cholesterol accumulation in infected macrophages: a potential target for new drugs for leprosy treatment. *Cellular microbiology* **16**:797-815.
  12. **Tanigawa K, Degang Y, Kawashima A, Akama T, Yoshihara A, Ishido Y, Makino M, Ishii N, Suzuki K.** 2012. Essential role of hormone-sensitive lipase (HSL) in the maintenance of lipid storage in *Mycobacterium leprae*-infected macrophages. *Microbial pathogenesis* **52**:285-291.
  13. **Marques MA, Neves-Ferreira AG, da Silveira EK, Valente RH, Chapeaurouge A, Perales J, da Silva Bernardes R, Dobos KM, Spencer JS, Brennan PJ, Pessolani MC.** 2008. Deciphering the proteomic profile of *Mycobacterium leprae* cell envelope. *Proteomics* **8**:2477-2491.
  14. **Cole ST, Eiglmeier K, Parkhill J, James KD, Thomson NR, Wheeler PR, Honore N, Garnier T, Churcher C, Harris D, Mungall K, Basham D, Brown D, Chillingworth T, Connor R, Davies RM, Devlin K, Duthoy S, Feltwell T, Fraser A, Hamlin N, Holroyd S, Hornsby T, Jagels K, Lacroix C, Maclean J, Moule S, Murphy L, Oliver K, Quail MA, Rajandream MA, Rutherford KM, Rutter S, Seeger K, Simon S, Simmonds M, Skelton J, Squares R, Squares S, Stevens K, Taylor K, Whitehead S, Woodward JR, Barrell BG.**



2001. Massive gene decay in the leprosy bacillus. *Nature* **409**:1007-1011.
15. **Cole ST, Brosch R, Parkhill J, Garnier T, Churcher C, Harris D, Gordon SV, Eiglmeier K, Gas S, Barry CE, 3rd, Tekaia F, Badcock K, Basham D, Brown D, Chillingworth T, Connor R, Davies R, Devlin K, Feltwell T, Gentles S, Hamlin N, Holroyd S, Hornsby T, Jagels K, Krogh A, McLean J, Moule S, Murphy L, Oliver K, Osborne J, Quail MA, Rajandream MA, Rogers J, Rutter S, Seeger K, Skelton J, Squares R, Squares S, Sulston JE, Taylor K, Whitehead S, Barrell BG.** 1998. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature* **393**:537-544.
  16. **Cruz D, Watson AD, Miller CS, Montoya D, Ochoa MT, Sieling PA, Gutierrez MA, Navab M, Reddy ST, Witztum JL, Fogelman AM, Rea TH, Eisenberg D, Berliner J, Modlin RL.** 2008. Host-derived oxidized phospholipids and HDL regulate innate immunity in human leprosy. *The Journal of clinical investigation* **118**:2917-2928.
  17. **Brzostek A, Pawelczyk J, Rumijowska-Galewicz A, Dziadek B, Dziadek J.** 2009. *Mycobacterium tuberculosis* is able to accumulate and utilize cholesterol. *Journal of bacteriology* **191**:6584-6591.
  18. **de Chastellier C, Thilo L.** 2006. Cholesterol depletion in *Mycobacterium avium*-infected macrophages overcomes the block in phagosome maturation and leads to the reversible sequestration of viable mycobacteria in phagolysosome-derived autophagic vacuoles. *Cellular microbiology* **8**:242-256.
  19. **Pandey AK, Sasseti CM.** 2008. Mycobacterial persistence requires the utilization of host cholesterol. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**:4376-4380.
  20. **Yamashita M, Otsuka F, Mukai T, Otani H, Inagaki K, Miyoshi T, Goto J, Yamamura M, Makino H.** 2008. Simvastatin antagonizes tumor necrosis factor- $\alpha$  inhibition of bone morphogenetic proteins-2-induced osteoblast differentiation by regulating Smad signaling and

- Ras/Rho-mitogen-activated protein kinase pathway. *The Journal of endocrinology* **196**:601-613.
21. **Pedersen TR.** 2010. Pleiotropic effects of statins: evidence against benefits beyond LDL-cholesterol lowering. *American journal of cardiovascular drugs : drugs, devices, and other interventions* **10 Suppl 1**:10-17.
  22. 2003. [High therapeutic effect and safety of fluvastatin]. *Pharmazie in unserer Zeit* **32**:516-517.
  23. **Martinez AN, Lahiri R, Pittman TL, Scollard D, Truman R, Moraes MO, Williams DL.** 2009. Molecular determination of *Mycobacterium leprae* viability by use of real-time PCR. *Journal of clinical microbiology* **47**:2124-2130.
  24. **Lahiri R, Randhawa B, Krahenbuhl JL.** 2005. Effects of purification and fluorescent staining on viability of *Mycobacterium leprae*. *International journal of leprosy and other mycobacterial diseases : official organ of the International Leprosy Association* **73**:194-202.
  25. **Seto S, Matsumoto S, Ohta I, Tsujimura K, Koide Y.** 2009. Dissection of Rab7 localization on *Mycobacterium tuberculosis* phagosome. *Biochemical and biophysical research communications* **387**:272-277.
  26. **Ribeiro-Resende VT, Ribeiro-Guimaraes ML, Lemes RM, Nascimento IC, Alves L, Mendez-Otero R, Pessolani MC, Lara FA.** 2010. Involvement of 9-O-Acetyl GD3 ganglioside in *Mycobacterium leprae* infection of Schwann cells. *The Journal of biological chemistry* **285**:34086-34096.
  27. **de Jonge MI, Pehau-Arnaudet G, Fretz MM, Romain F, Bottai D, Brodin P, Honore N, Marchal G, Jiskoot W, England P, Cole ST, Brosch R.** 2007. ESAT-6 from *Mycobacterium tuberculosis* dissociates from its putative chaperone CFP-10 under acidic conditions and exhibits membrane-lysing activity. *Journal of bacteriology* **189**:6028-6034.
  28. **Mattos KA, Oliveira VG, D'Avila H, Rodrigues LS, Pinheiro RO, Sarno EN, Pessolani MC, Bozza PT.** 2011. TLR6-driven lipid

- droplets in *Mycobacterium leprae*-infected Schwann cells: immunoinflammatory platforms associated with bacterial persistence. *Journal of immunology* **187**:2548-2558.
29. **Ahmad Z, Sharma S, Khuller GK.** 2005. Inhalable alginate nanoparticles as antitubercular drug carriers against experimental tuberculosis. *International journal of antimicrobial agents* **26**:298-303.
  30. **Hu Y, van der Geize R, Besra GS, Gurcha SS, Liu A, Rohde M, Singh M, Coates A.** 2010. 3-Ketosteroid 9 $\alpha$ -hydroxylase is an essential factor in the pathogenesis of *Mycobacterium tuberculosis*. *Molecular microbiology* **75**:107-121.
  31. **Nesbitt NM, Yang X, Fontan P, Kolesnikova I, Smith I, Sampson NS, Dubnau E.** 2010. A thiolase of *Mycobacterium tuberculosis* is required for virulence and production of androstenedione and androstadienedione from cholesterol. *Infection and immunity* **78**:275-282.
  32. **Klink M, Brzezinska M, Szulc I, Brzostek A, Kielbik M, Sulowska Z, Dziadek J.** 2013. Cholesterol oxidase is indispensable in the pathogenesis of *Mycobacterium tuberculosis*. *PloS one* **8**:e73333.
  33. **Brzezinska M, Szulc I, Brzostek A, Klink M, Kielbik M, Sulowska Z, Pawelczyk J, Dziadek J.** 2013. The role of 3-ketosteroid 1(2)-dehydrogenase in the pathogenicity of *Mycobacterium tuberculosis*. *BMC microbiology* **13**:43.
  34. **Abdoli N, Heidari R, Azarmi Y, Eghbal MA.** 2013. Mechanisms of the statins cytotoxicity in freshly isolated rat hepatocytes. *Journal of biochemical and molecular toxicology* **27**:287-294.
  35. **Lu HZ, Li BQ.** 2009. Effect of HMG-CoA reductase inhibitors on activation of human  $\gamma\delta$ T cells induced by *Mycobacterium tuberculosis* antigens. *Immunopharmacology and immunotoxicology* **31**:485-491.
  36. **Reagan-Shaw S, Nihal M, Ahmad N.** 2008. Dose translation from animal to human studies revisited. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **22**:659-661.

37. **Benati D, Ferro M, Savino MT, Olivieri C, Schiavo E, Nuccitelli A, Pasini FL, Baldari CT.** 2010. Opposite effects of simvastatin on the bactericidal and inflammatory response of macrophages to opsonized *S. aureus*. *Journal of leukocyte biology* **87**:433-442.
38. **Wu BQ, Luo JM, Wang YH, Shi YF, Liu H, Ba JH, Zhang TT.** 2013. Inhibitory effects of simvastatin on staphylococcus aureus lipoteichoic acid-induced inflammation in human alveolar macrophages. *Clinical and experimental medicine*.
39. **Zhang S, Rahman M, Zhang S, Qi Z, Thorlacius H.** 2011. Simvastatin antagonizes CD40L secretion, CXC chemokine formation, and pulmonary infiltration of neutrophils in abdominal sepsis. *Journal of leukocyte biology* **89**:735-742.
40. **Vollmer T, Key L, Durkalski V, Tyor W, Corboy J, Markovic-Plese S, Preiningerova J, Rizzo M, Singh I.** 2004. Oral simvastatin treatment in relapsing-remitting multiple sclerosis. *Lancet* **363**:1607-1608.
41. **Triantafilou M, Miyake K, Golenbock DT, Triantafilou K.** 2002. Mediators of innate immune recognition of bacteria concentrate in lipid rafts and facilitate lipopolysaccharide-induced cell activation. *Journal of cell science* **115**:2603-2611.
42. **Greenwood J, Steinman L, Zamvil SS.** 2006. Statin therapy and autoimmune disease: from protein prenylation to immunomodulation. *Nature reviews. Immunology* **6**:358-370.
43. **Ghittoni R, Patrussi L, Pirozzi K, Pellegrini M, Lazzerini PE, Capecchi PL, Pasini FL, Baldari CT.** 2005. Simvastatin inhibits T-cell activation by selectively impairing the function of Ras superfamily GTPases. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **19**:605-607.
44. **Ghittoni R, Napolitani G, Benati D, Olivieri C, Patrussi L, Laghi Pasini F, Lanzavecchia A, Baldari CT.** 2006. Simvastatin inhibits the MHC class II pathway of antigen presentation by impairing Ras superfamily GTPases. *European journal of immunology* **36**:2885-2893.

45. **Sarno EN, Grau GE, Vieira LM, Nery JA.** 1991. Serum levels of tumour necrosis factor-alpha and interleukin-1 beta during leprosy reactional states. *Clinical and experimental immunology* **84**:103-108.

## FIGURES AND LEGENDS

### Figure 1: Statins increase rifampin mycobactericidal effect

THP-1 cells were differentiated to macrophages with PMA and after 24 h of rest the cultures were treated with different regimes and were concomitantly infected with: A) *M. bovis* (BCG Pasteur); B) *M. tuberculosis* H37Rv; or C) *M. leprae* Thai-53. The viability (%) in relation to the controls was measured after 72 h from the infection by CFU (A and B) or after one week by real-time PCR (C). It was observed that despite simvastatin displayed a stronger mycobactericidal effect, only atorvastatin showed additive effect when associated to rifampin against all three mycobacteria tested. The effects were reverted by mevalonate at 150  $\mu$ M (MEV). The values were generated from four normalized independent biological replicates, where two (\*\*) or three (\*\*\*) asterisks mean  $p < 0.01$  or  $p < 0.001$ , respectively. # means that treatment was not statistically different from control.

### Figure 2: THP-1 mycobacterial infection and cholesterol levels after treatment with statins.

Total cellular free cholesterol and cholesteryl esters levels were measured by fluorometric method after 1 week of infection with concomitant treatment. Atorvastatin treatment decreases cholesterol levels even in the presence of *M. leprae*. Data is representative of three independent biological replicates, where \*\* ( $p < 0.01$ ) indicates the only condition that was significantly different from all the others. MEV represents 150  $\mu$ M of mevalonate; PKH-stained *M. leprae* were used to infect THP-1 cells during 5h without treatment (B), or after 24 h pretreatment with 2  $\mu$ M of atorvastatin (C), simvastatin (D) or rifampin 10  $\mu$ g/mL (E). Nuclei were stained in blue by DAPI. The quantification of the percentage infected cells is shown in (F), where it can be observed that the treatments did not interfere with infection rate. Forty representative images from three biological replicates were used to perform this analysis. Scale bar corresponds to 20  $\mu$ m.

**Figure 3: Confocal analysis of *M. leprae* phagosomal arrest in THP-1 statin treated cells.**

A) Immunolocalization of rab-7, a late-endosome marker (Alexa 488) and *M. leprae* lipoarabinomannan (LAM) (Alexa 633), in THP-1 cells after 24 h of *M. leprae* infection with 2  $\mu$ M atorvastatin or simvastatin treatment, demonstrating antigens association by arrows and in higher magnitude by insets. A merge image of both channels signals produced by isotype control antibodies are also presented. B) The percentage of intracellular LAM signal associated with Rab7 is shown, demonstrating a higher mycobacterial arrest in mature phagosomes due to exposure to simvastatin. Images are representative from 360 randomly chosen cells of four experiments from two independent biological replicates. Scale bars correspond to 10  $\mu$ m in figures and 5  $\mu$ m in insets. Asterisk indicates a difference with  $p < 0.05$ .”

**Figure 4: Atorvastatin activity in BALB/c *M. leprae* infection.**

BALB/c mice footpads were infected with  $10^4$  *M. leprae* bacilli. After one month different groups of animals were untreated (circles), or treated with 40 mg/kg/day (squares) or 80 mg/kg/day (triangles) of atorvastatin, the association of 80mg/kg/day of atorvastatin with 1 mg/kg/week of rifampin (inverted triangles), 1 mg/kg/week of rifampin alone (diamonds) or treated with 10 mg/kg/week of rifampin (open circles). A) Number of bacilli in footpad suspensions after six months of infection followed by five months of treatment. Plasma Cholesterol (B), glutamic oxaloacetic (C) and pyruvic (D) transaminase activity was measured in the same groups of mice. The values were generated from two independent biological replicates, where one and two asterisks mean  $p < 0.05$  and  $p < 0.0001$ , respectively.

**Figure 5: Histopathological analysis of footpads from *M. leprae* infected mice after different treatment regimes.**

Contralateral footpads from the same groups of mice analyzed in Figure 4 were fixed, paraffinized, sectioned and stained with hematoxylin and eosin after six months of infection and five months of treatment. A-B) Untreated controls; C-D) representative images of a lesion area from an

animal treated with 80 mg/kg/day of atorvastatin; E-F) treatment with rifampin 1 mg/kg/week (sub-therapeutic dose); G-H) association of atorvastatin 80 mg/kg/day and rifampin 1 mg/kg/week; I-J) rifampin 10 mg/kg/week. Asterisks show inflammatory cellular infiltrates, virtually absent in G and I. Scale bars mean 100  $\mu$ m in A, C, E, G, I and 25 $\mu$ m in B, D, F, H and J.

**Figure 1 (supplementary): THP-1 cytotoxic measurement by MTT reduction after statins treatment.**

Thiazolyl blue tetrazolium bromide (MTT) reduction was used as a cellular viability parameter to compare all treatment regimes used along the present work. THP1 cells were seeded on 96-well plates at a density of  $5 \times 10^4$  cells /well and incubated in the presence or absence of statins at varying concentrations during 72 h (A) or 1 week (B). After incubation, MTT (Sigma) solution was added to each well and the plates were incubated in the dark for 4 h at 37 °C. No significant differences were observed after treatment in the four normalized independent biological replicate experiments

**Figure 2 (supplementary): Statins do not increase NO production in THP-1 cells.**

The nitric oxide was measured from culture supernatants of THP-1 macrophages infected with *M. leprae* and concomitantly exposed to the different treatments during 24 hours. The formation of sodium nitrite ( $\text{NaNO}_2$ ) in the supernatant was detected by following absorbance of the Griess reagent (Sigma) at 570 nm.



Figure 1:

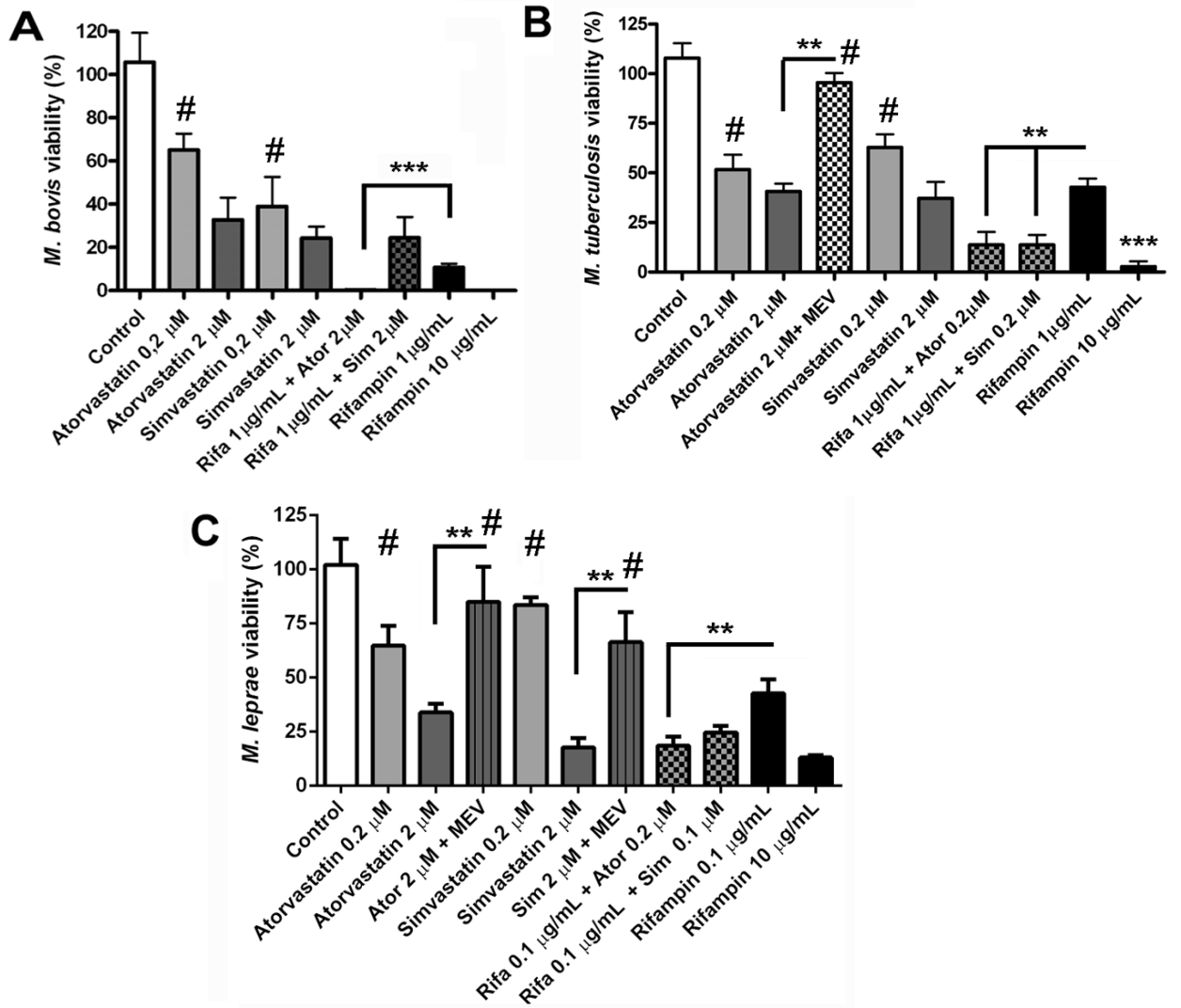


Figure 2:

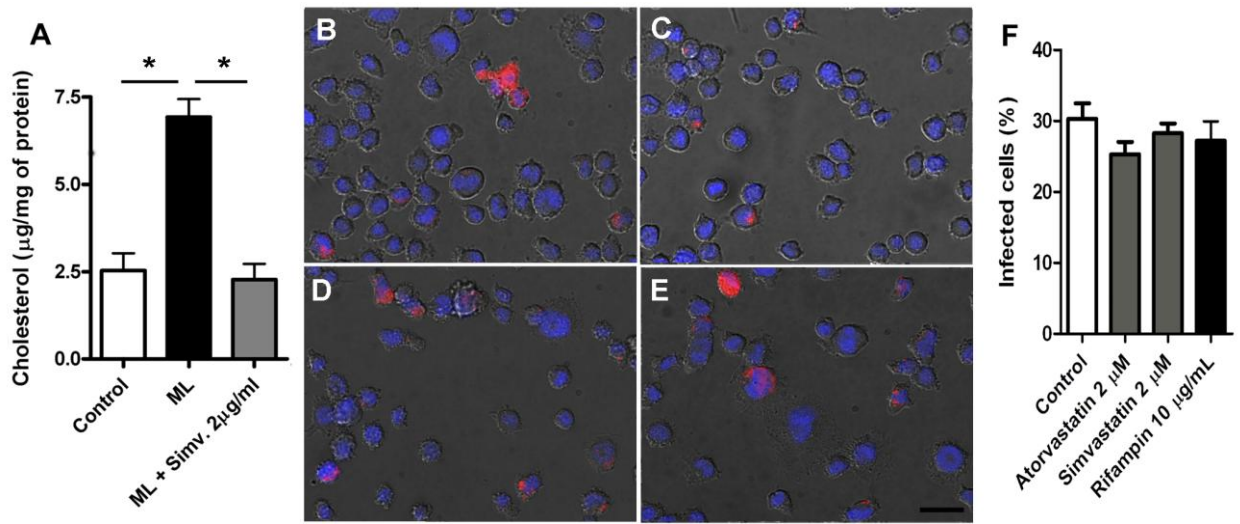


Figure 3:

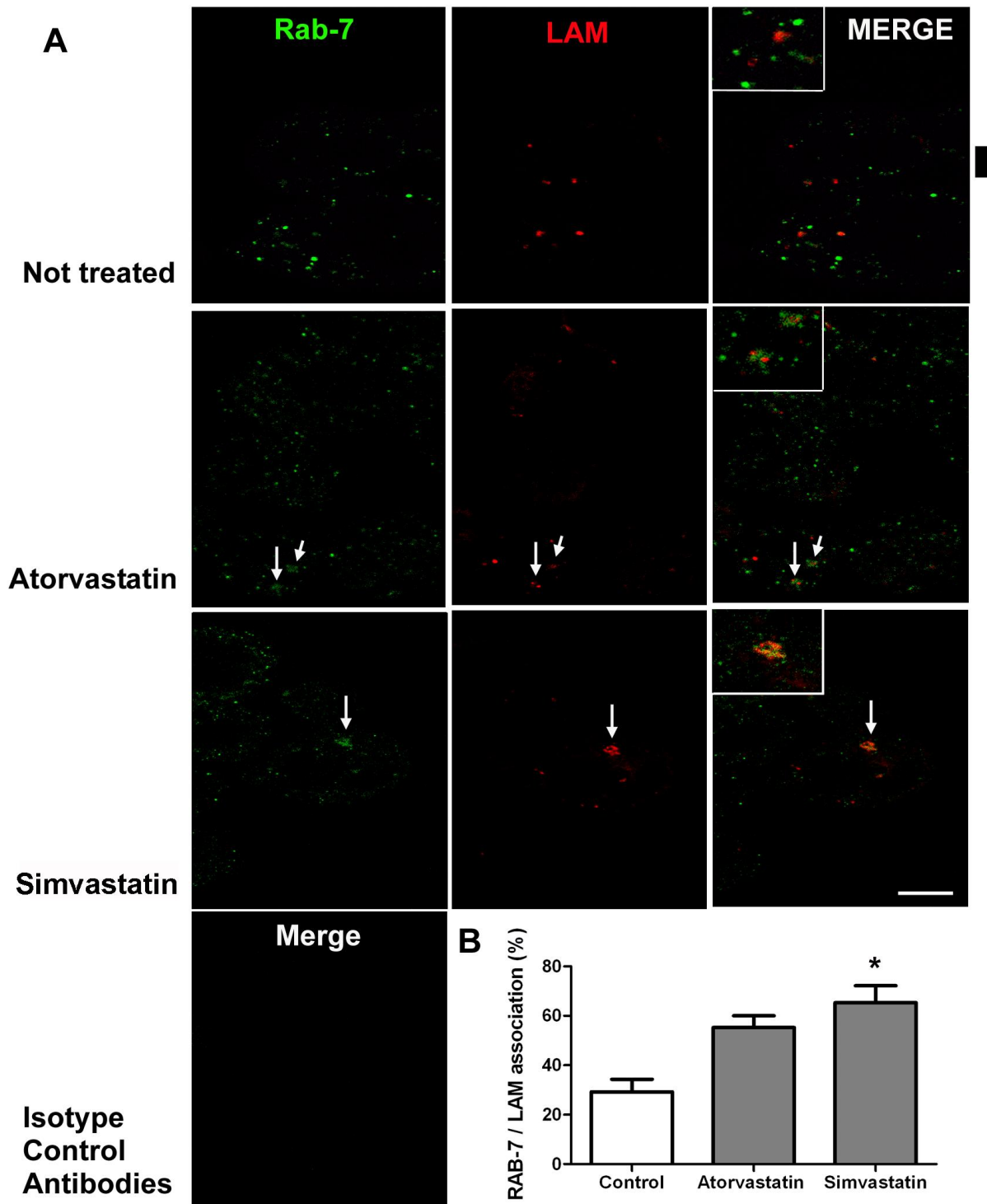


Figure 4:

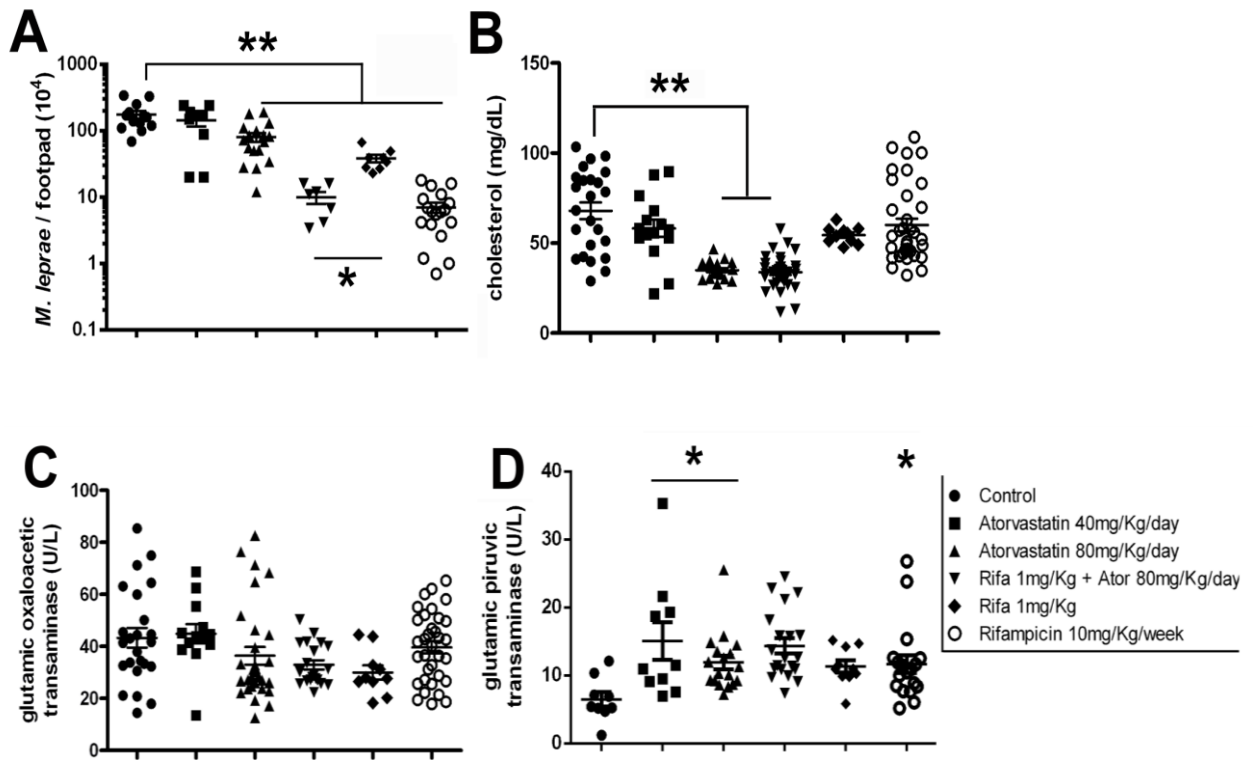


Figure 5:

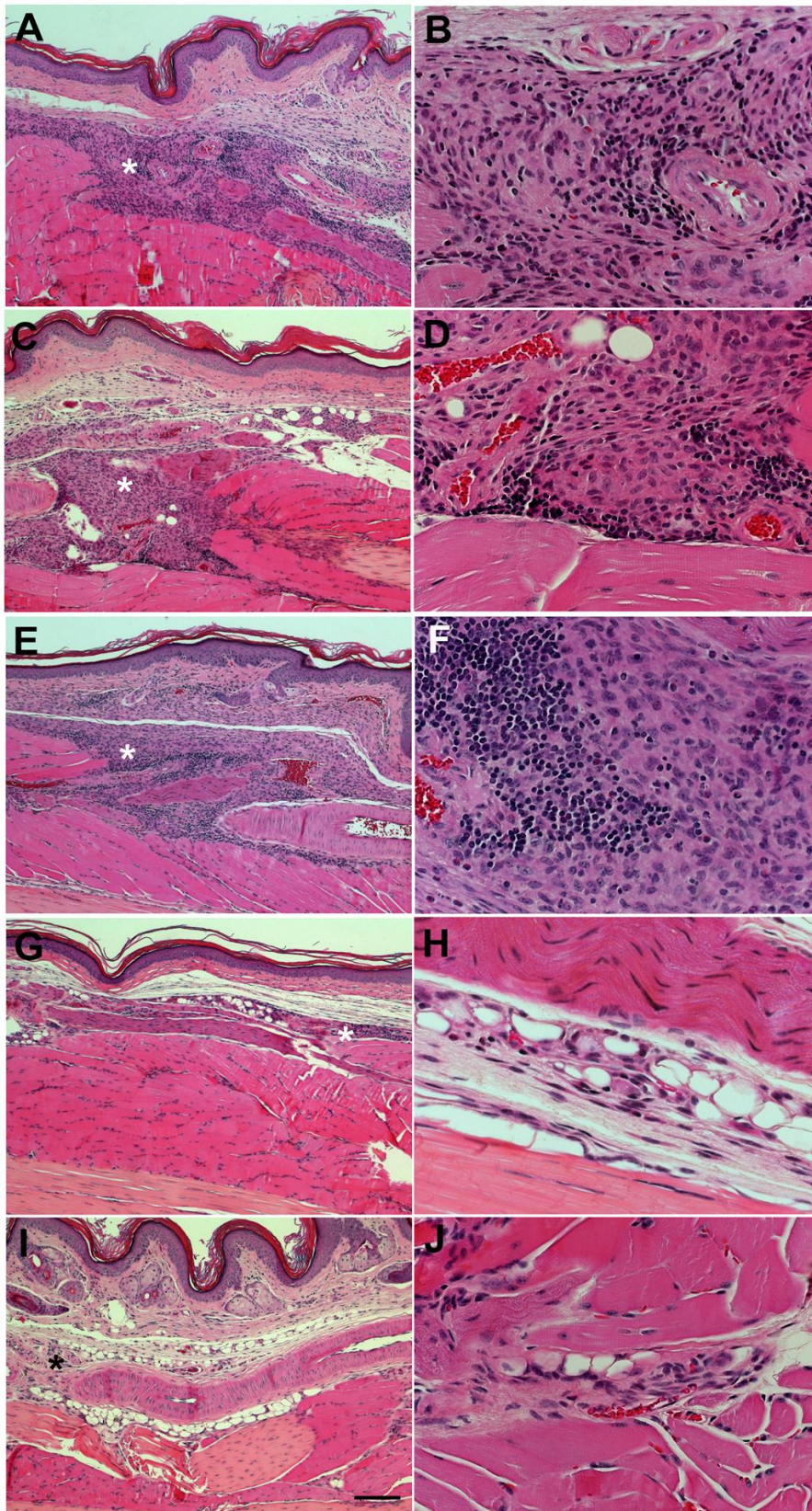


Figure 1 (supplementary):

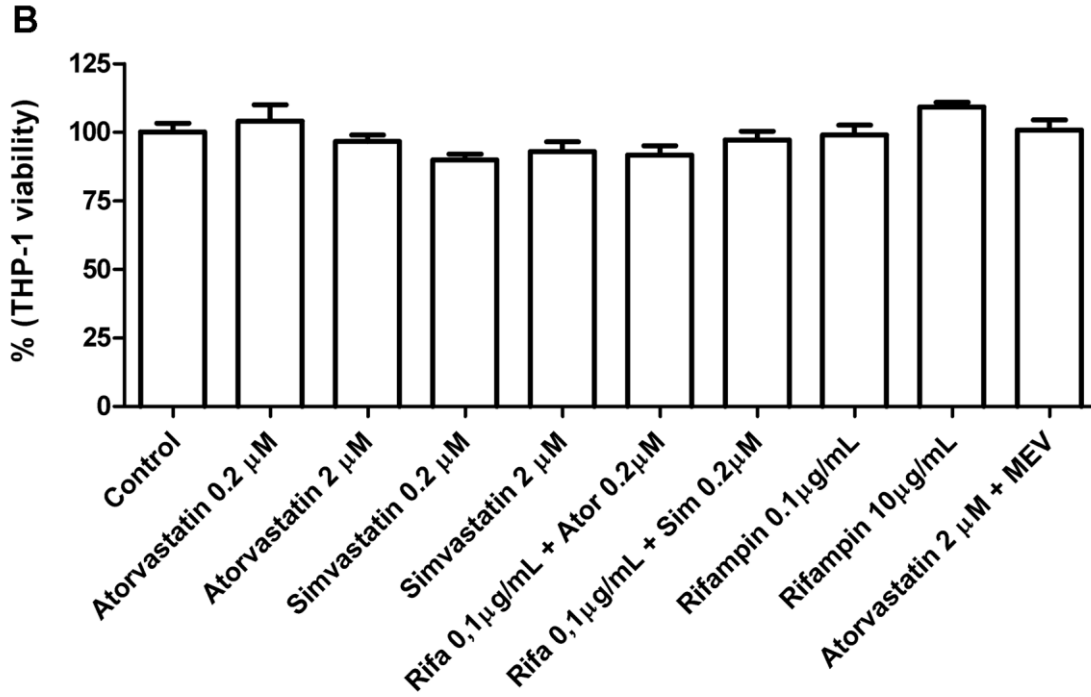
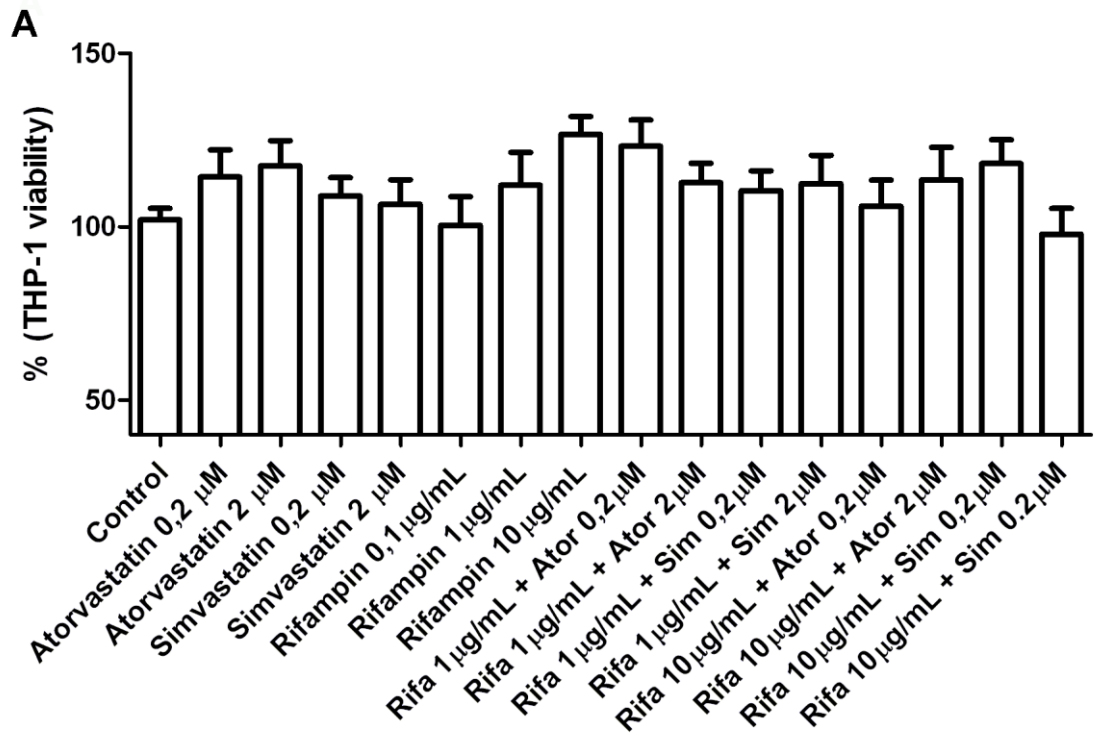
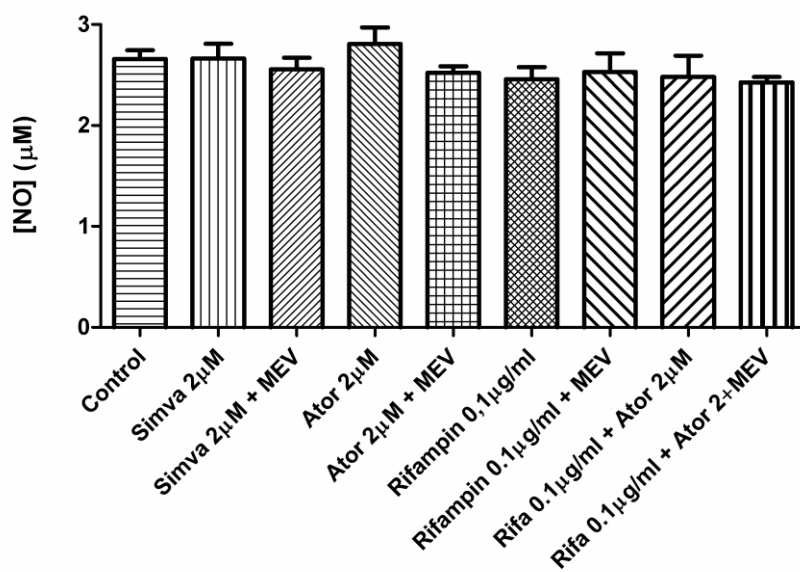


Figure 2 (supplementary):



## **Capítulo 4: Discussão**



Atualmente a poliquimioterapia utilizada no combate à hanseníase consiste em um tratamento demorado, que apresenta altos níveis de evasão, responsáveis por muitos casos de recidivas da doença. No nosso país, somente em 2011 foram detectados 33.955 casos novos de hanseníase, correspondendo a um coeficiente de detecção geral de 17,6/100 mil habitantes (30), demonstrando que esta doença, ainda hoje, pode ser considerada um problema de saúde pública nacional.

Além dessa triste realidade, o surgimento de cepas resistentes tem se tornado cada vez mais comum. Este fato evidencia a importância e a necessidade de se desenvolver novas estratégias que garantam uma maior eficácia no controle das doenças infecciosas causadas por agentes micobacterianos.

Recentemente, o envolvimento dos lipídios nos processos biológicos e o seu papel nas doenças infecciosas tem sido alvo de vários estudos, demonstrando que os lipídios possuem um papel importante durante as infecções causadas por micobactérias.

Conforme mencionado anteriormente, o *M. leprae* é um patógeno que possui tropismo por macrófagos da pele, residindo e se multiplicando no interior de fagossomos ricos em lipídios (82). Esses macrófagos, quando altamente infectados, adquirem um aspecto espumoso característicos de lesões de pele de pacientes LL, sugerindo a ocorrência de uma importante alteração no metabolismo lipídico durante a infecção pelo *M. leprae*. Inicialmente, acreditava-se que esses lipídios acumulados eram de origem micobacteriana, como o ftiocerol dimicocerosato (PDIM), o dimicocerosato (DIM) e o glicolípido fenólico I (PGL-I) (42) (31) (34). No entanto, recentemente se descobriu que estes lipídios eram derivados do seu hospedeiro (97) (83). Mattos e colaboradores (2011) demonstraram através de experimentos *in vitro* que o *M. leprae* é capaz de induzir a biogênese de corpúsculos lipídicos em suas células hospedeiras e que tais corpúsculos eram recrutados para o fagossoma contendo a micobactéria, sendo a inibição deste recrutamento responsável pela redução da viabilidade intracelular do *M. leprae*. Apesar do conhecimento de que o *M. leprae* gera um aumento dos níveis de colesterol, estocado sob a forma de éster de colesterol, (84) (98), ainda pouco se sabe sobre como essa bactéria metaboliza esse lipídio, e qual seria o seu papel na patogenia da doença.

Diante dos dados da literatura acima citados, e da importância do colesterol no crescimento e persistência tanto do *M. tuberculosis* quanto do *M. leprae*, o

objetivo deste trabalho foi avaliar a eficácia da modulação da síntese de colesterol utilizando como ferramenta terapêutica para o controle destas micobacterioses as estatinas.

As estatinas são fármacos responsáveis pela inibição da síntese de novo de colesterol, sendo prescrito a mais de 10 anos no tratamento da hipercolesterolemia. São medicamentos seguros cujo principal efeito adverso relatado é a miopatia, sendo relatado como raro (99). Em nossos estudos optamos por utilizar duas estatinas com perfis farmacocinéticos distintos: a atorvastatina e a sinvastatina. A escolha dessas drogas baseou-se não somente na sua heterogenicidade estrutural, mas também no seu baixo custo, e na sua biodisponibilidade.

O efeito destes fármacos diante das infecções micobacterianas foi avaliado isoladamente e em associação a rifampicina, uma droga utilizada no tratamento da hanseníase e da tuberculose. A escolha deste modelo baseou-se em trabalhos anteriores que demonstraram que o *M. tuberculosis* é capaz de acumular colesterol do hospedeiro *in vitro*, favorecendo a diminuição da permeabilidade de membrana desta micobacteria à rifampicina (80). Assim, hipotetizamos que talvez fosse possível observar uma potencialização do efeito da rifampicina quando utilizada em associação às estatinas durante infecções pelo *M. leprae* e pelo *M. tuberculosis*.

Com o objetivo de maternos todos os nossos dados o mais próximo possível do observado *in vivo*, optamos por manter em nossas condições de estudo *in vitro* um meio de cultura de células suplementado com uma quantidade de soro fetal bovino de 10% durante todos os experimentos, uma vez que esta é a condição que melhor representa os níveis de colesterol fisiológicos que os macrófagos são expostos em um ser humano saudável.

Além disso, escolhemos utilizar macrófagos humanos derivados de uma linhagem monocítica de células THP-1 para a realização de nossos ensaios *in vitro*, visto que este modelo tem sido usado com sucesso em diversos estudos envolvendo interação patógeno-hospedeiro durante infecções por diferentes micobactérias, apresentando um alto grau de infecção.

Nossos ensaios iniciais de viabilidade micobacteriana *in vitro* revelaram que apesar das diferenças farmacológicas, ambas estatinas apresentaram efeitos semelhantes no que diz respeito a sua atividade micobactericida contra o *M. bovis* BCG, *M. tuberculosis* e *M. leprae* durante infecção em macrófagos. Por outro lado, a

atorvastatina foi o fármaco que apresentou melhor efeito aditivo quando utilizado juntamente com a rifampicina nas infecções por *M. bovis* BCG e *M. leprae*. Acreditamos que estas observações possam estar associadas ao fato da sinvastatina ser um pró-fármaco que necessita ser ativado através das carboxilesterases celulares. Soma-se a isso o fato da rifampicina ser desintoxicada por este mesmo grupo de enzimas expressas por células THP-1 (100) o que poderia reduzir a disponibilidade desta enzima no citosol de células THP -1, diminuindo a ativação da sinvastatina por competição quando utilizadas conjuntamente *in vitro*. Por outro lado, o mesmo pode não ocorrer *in vivo*, sendo necessários mais estudos neste sentido.

Quando avaliamos a viabilidade do *M. tuberculosis* e *M. leprae* em presença de mevalonato, foi possível observar que a utilização deste precursor do colesterol foi capaz de reverter o efeito causado pela atorvastatina em sua maior dose. Estes dados demonstram que a inibição desta via pode estar contribuindo eficientemente na redução da viabilidade, sugerindo que a privação de colesterol está exercendo um papel significativo na eliminação destes bacilos.

Trabalhos publicados recentemente mostraram que as estatinas são capazes de exercer efeitos pró-apoptóticos, imunomoduladores e anti-angiogênicos, inibindo o crescimento de uma variedade de tipos de câncer como o câncer de mama, o gástrico, o pancreático, neuroblastomas, melanomas entre outros (101). Com base nessas informações e sabendo que o *M. leprae* é um patógeno intracelular obrigatório, tornou-se necessário o conhecimento de possíveis efeitos citotóxicos das estatinas sobre o modelo celular utilizado neste estudo, sendo a viabilidade celular avaliada através de ensaios de MTT. Para isso, culturas de macrófagos foram tratadas com estatinas e/ou rifampicina, mantendo as mesmas concentrações utilizadas anteriormente nas culturas, por 72h ou 1 semana. Nossos resultados mostraram que a redução da viabilidade bacilar pelo efeito bactericida das estatinas não está relacionado à morte celular, visto que em nenhum dos tratamentos foi possível verificar uma diminuição no número de células viáveis em relação à condição controle.

Ainda neste contexto, mensuramos a produção de óxido nítrico a partir de sobrenadantes de culturas infectadas com *M. leprae* e tratadas com estatinas e/ou rifampicina para se estimar, de forma indireta por meio do método de Griess (102), se a diminuição da viabilidade bacteriana estaria relacionada com o aumento do

estresse oxidativo provocado pelas estatinas. No entanto, verificamos que não houveram alterações significativas entre todas as condições utilizadas nesse estudo, mostrando que o tratamento com as estatinas não estaria alterando as condições de estresse oxidativo do nosso modelo *in vitro*.

Todos os isoprenoides derivam de um precursor formado por cinco carbonos, o pentenilpirofosfato (IPP), ou de seu isômero dimetilalilpirofosfato (DMAPP), que podem ser sintetizados por duas vias independentes: a via clássica do mevalonato e a sua via alternativa 2C-metil-D-eritritol 4-fosfato (MEP) (103). Todos os mamíferos e fungos sintetizam a molécula de IPP e DMAPP através da via do mevalonato (104).

Algumas bactérias gram-positivas como o estafilococcus, estreptococcus, e enterococcus, além das micobactérias, também utilizam a via do mevalonato, enquanto que a maioria das bactérias incluindo as cianobactérias, sintetizam IPP e DMAPP usando a via MEP. Somente uma pequena parte das bactérias utilizam as duas vias (103). Estudos realizados por Putra e colaboradores (1998), revelaram que o *M. tuberculosis* não é capaz de incorporar mevalonato radioativo, sugerindo que a via MEP é a via de síntese primordial desse patógeno (103).

Com base nessas informações nossos dados sugerem que um dos mecanismos envolvidos no controle do *M. leprae* pelas estatinas estaria baseado na privação do colesterol da célula hospedeira e não do patógeno em si, já que o efeito causado pelas estatinas foi o mesmo tanto em *M. leprae* quanto em *M. tuberculosis*, que não possui o alvo da via enzimática destas drogas. Assim, acreditamos que as estatinas utilizadas não estão inibindo a enzima HMG-CoA destas bactérias.

Para avaliar se as estatinas utilizadas em nosso modelo experimental estariam reduzindo efetivamente os níveis celulares de colesterol, extratos totais de colesterol foram obtidos a partir de culturas de macrófagos infectados com *M. leprae* por 1 semana para subsequente dosagem em fluorímetro. Nossos dados demonstraram que o tratamento das culturas com estatinas diminuiu os níveis de colesterol celular, mesmo na presença de *M. leprae*, sendo esses níveis parcialmente revertidos aos valores referentes à condição controle quando em presença do mevalonato.

O gangliosídeo 9-O-acetil GD3 é um glicolípido acetilado presente na membrana celular de vários tipos de células de vertebrados (105), normalmente relacionado ao desenvolvimento, diferenciação e regeneração do sistema nervoso. Dados do nosso grupo demonstraram um envolvimento deste gangliosídeo ao

ancoramento de colesterol durante as infecções causadas por *M. leprae* em células de Schwann. Também já tem sido descrito que o colesterol presente na membrana de macrófagos durante a infecção por *M. tuberculosis* possui um papel muito importante durante os processos de invasão micobacteriana. Com base nessas informações, fomos observar se pequenas alterações nos níveis celulares de colesterol seriam capazes de diminuir a taxa de infectividade pelo *M. leprae*. Para isso, culturas de macrófagos derivados de THP-1 foram tratados com estatinas por 24 horas, e posteriormente estimuladas com *M. leprae* irradiado marcado com PKH2 fluorescente por 5 horas. Após este período, a associação do *M. leprae*, que em estudos anteriores se mostraram sempre compatíveis com as taxas de infecção, foi mensurada por microscopia de fluorescência. A porcentagem de bactérias associadas às células hospedeiras revelou-se similar tanto nas culturas das células tratadas com estatinas quanto nas culturas das células controles, demonstrando que apesar da diminuição dos níveis de colesterol gerado pelo uso das estatinas, a redução da viabilidade micobacteriana observada nessas culturas não está relacionada com a diminuição da taxa de infecção em macrófagos.

De forma a complementar à nossa hipótese de que a diminuição da viabilidade do *M. leprae* estaria relacionada à sua privação do acesso ao *pool* de colesterol da célula hospedeira, verificamos se as estatinas poderiam estar favorecendo um maior aprisionamento bacteriano no interior dos fagolisossomos, conforme sugerido por Parihar e colaboradores (2013) em estudo utilizando *M. tuberculosis* em associação a macrófagos de indivíduos que faziam uso diário de estatinas. De forma similar ao que foi descrito com relação ao *M. tuberculosis*, observamos através de experimentos de microscopia confocal um aumento na associação bactéria-endossoma tardio em culturas tratadas com estatinas. Esses dados corroboram com dados recentes da literatura que demonstram que tanto o *M. tuberculosis* quanto o *M. leprae* são capazes de perfurar o fagossomo da célula hospedeira através de um mecanismo dependente da expressão de ESAT-6, um importante fator de virulência micobacteriano (106) capaz de se ligar a membranas ricas em colesterol. Essa proteína é uma das mais importantes do sistema ESX-1, que, em altas concentrações, possui propriedade lítica (107), sendo responsável pela perfuração do fagossomo e consequente liberação do conteúdo fagossomal para o citosol da célula hospedeira.

Outra abordagem utilizada por nosso grupo para a confirmação dos resultados obtidos *in vitro*, foi a utilização de um modelo de estudo *in vivo*. Seguindo o modelo experimental proposto por Shepard em 1960 (36), utilizamos camundongos BALB/c infectados com *M. leprae* por 1 mês, posteriormente tratados com rifampicina e atorvastatina, isoladamente ou associadas durante 5 meses. Elegemos a atorvastatina como a estatina a ser utilizada nos experimentos *in vivo*, pois foi a droga que apresentou melhor efeito aditivo à rifampicina. As doses utilizadas *in vivo* foram convertidas para utilização em camundongos, e calculadas com base nas concentrações de BSA, conforme descrito por Reagan-Shaw e colaboradores (2008). Após 6 meses de infecção, estes animais foram eutanasiados para realização de contagem bacilar em coxim plantar, análise histopatológica, dosagem de transaminases hepáticas e colesterol plasmático. Todos os procedimentos foram realizados sob prévia aprovação do comitê de ética referente a este trabalho (nº. 219/11 - Bauru).

É importante ressaltar que a PQT utilizada no tratamento da hanseníase é potencialmente hepatotóxica, assim como o tratamento prolongado com estatinas no combate a hipercolesterolemia. Diante disso, a atividade de enzimas hepáticas foi verificada a partir do plasma destes animais para avaliar toxicidade hepática após o tratamento. A quantificação da atividade plasmática da transaminase glutâmico pirúvica (TGP), revelou que todos os tratamentos, inclusive a rifampicina isoladamente, ocasionaram um leve aumento nos níveis desta enzima quando comparadas ao controle, porém nenhum deles apresentou um aumento capaz de caracterizar um efeito potencialmente hepatotóxico. Uma análise histopatológica ainda foi realizada a partir da pata contralateral destes camundongos utilizando a coloração hematoxilina-eosina. Esta avaliação nos permitiu concluir que, na área da lesão, o tratamento com atorvastatina associada à rifampicina em sua menor dose (1mg/Kg/semana) foi capaz de promover uma diminuição do infiltrado inflamatório, redução dos níveis baciloscópicos e fragmentação bacilar dentro dos macrófagos similar ao observado com altas doses de rifampicina (10mg/Kg/semana).

Finalmente, em concordância com os resultados *in vitro*, verificamos que a associação atorvastatina/rifampicina apresentou uma maior diminuição no número de bacilos presentes em coxim plantar desses animais em comparação aos animais tratados com a mesma dose de rifampicina somente.

Acreditamos que a atuação das estatinas na diminuição da viabilidade bacteriana não está restritamente relacionada à inibição da síntese de colesterol, visto que as análises histológicas demonstraram uma redução do infiltrado inflamatório provavelmente devido ao efeito pleiotrópico das estatinas. A inibição da via do mevalonato, além de inibir a biossíntese de colesterol, também afeta a síntese de isoprenoides e o tráfego intracelular de proteínas associadas à membrana como as proteínas G, uma família de proteínas importantes na transdução de sinais durante processos inflamatórios. Estudos recentes têm evidenciado que as estatinas podem possuir efeitos benéficos no tratamento de doenças auto-imune mediadas por células T (108) devido ao envolvimento do colesterol na manutenção das plataformas lipídicas, conhecida como “lipid rafts”, e sua importância na ativação de células T (109).

As evidências encontradas neste estudo, juntamente com os dados da literatura acima citados, nos fazem acreditar que os efeitos imunomodulatórios das estatinas quando associadas à rifampicin a podem ser extremamente benéficos durante o tratamento da hanseníase, auxiliando na diminuição dos episódios reacionais dos pacientes, bem como no tratamento da tuberculose, podendo gerar uma diminuição da lesão pulmonar desses indivíduos. Também esperamos que o uso das estatinas futuramente possa servir para aperfeiçoar a PQT vigente, que além de ser muito longa, apresenta alta toxicidade aos pacientes. Estes dois fatores reunidos são responsáveis pelo abandono do tratamento por parte dos pacientes, resultando em falha terapêutica e possível surgimento de resistência do bacilo ao tratamento. O baixo custo destas drogas e sua eficiência poderão impactar de forma crítica a política de combate e controle à hanseníase e tuberculose vigente no Brasil. Sabemos que um estudo clínico criterioso precisa ser realizado para dar prosseguimento a este trabalho, no entanto, acreditamos que o uso das estatinas poderia contribuir significativamente para redução de tempo de tratamento, uma menor toxicidade hepática do paciente e conseqüentemente num menor índice de evasão ao tratamento.

Como seguimento desse estudo, pretendemos realizar ensaios clínicos em colaboração com pesquisadores da Universidade Estadual do Rio de Janeiro, a fim de avaliarmos o efeito da sinvastatina no tratamento de pacientes portadores de tuberculose, e futuramente propor as estatinas como uma nova estratégia de tratamento tanto da hanseníase quanto da tuberculose. Além disso, investigaremos

também, em colaboração com o Instituto Lauro de Souza Lima em Bauru, o impacto da ingestão de colesterol na dieta de camundongos BALB/c, no curso da infecção e durante tratamento da hanseníase. Esperamos com isso, verificar se a diminuição da ingestão de colesterol através da dieta poderia ser utilizada como uma estratégia complementar, gerando um encurtamento no tratamento a um baixo custo para o Sistema Único de Saúde (SUS).



## **Capítulo 5: Conclusões**

Com base nos resultados demonstrados nesse estudo, podemos concluir que:

- O tratamento com estatinas não foi capaz de alterar a viabilidade celular no modelo de infecção *in vitro* utilizado em nenhum dos tempos de infecção utilizados neste estudo.
- A sinvastatina e atorvastatina foram capazes de reduzir, de forma eficiente, a viabilidade intracelular de *M. bovis* BCG (cepa Pasteur), *M. tuberculosis* e *M. leprae* no modelo de infecção *in vitro* macrófagos derivados de THP-1.
- Tanto a sinvastatina quanto a atorvastatina apresentaram efeito aditivo à rifampicina, no entanto a atorvastatina apresentou uma diminuição mais expressiva da viabilidade celular do *M. leprae* quando associada à rifampicina nos modelos de infecção *in vitro*
- O tratamento de culturas infectadas por *M. tuberculosis* e *M. leprae* com mevalonato associado às estatinas reverteu, de forma parcial, o efeito bactericida gerado pelas estatinas.
- As estatinas não interferiram na viabilidade micobacteriana através da indução da produção de óxido nítrico em macrófagos infectados pelo *M. leprae*.
- Tanto a sinvastatina quanto a atorvastatina diminuíram, de forma eficiente, os níveis de colesterol celular, impedindo o seu aumento após infecção pelo *M. leprae*;
- As estatinas utilizadas não interferiram no processo de invasão micobacteriana;
- Ambas estatinas, utilizadas no estudo, favoreceram o aprisionamento micobacteriano no interior de fagossomos maduros, evidenciado pela

colocalização do *M. leprae* (marcação com anti-LAM) e endossoma tardio (marcação com anti-Rab7);

- Atorvastatina foi capaz de reduzir o infiltrado inflamatório e o dano tecidual quando combinada à rifampicina no modelo de infecção *in vivo* em camundongos BALB/c infectados pelo *M. leprae*;
- Atorvastatina foi capaz de reduzir os níveis de colesterol plasmático, sem elevar os valores das transaminases em relação aos animais controle, não sendo possível caracterização de lesão hepática nos camundongos BALB/c infectados pelo *M. leprae* e tratados com atorvastatina.

## **Capítulo 6: Referências Bibliográficas**

1. Tortora GJ, Funke BR, Case CL. Microbiologia –Artmed. Rio de Janeiro. 2005.
2. Wayne LG. The "atypical" mycobacteria: recognition and disease association. Rev Microbiol. 1985.12(3):185-22.
3. van Ingen J, Boeree MJ, Dekhuijzen PN, van Soolingen D. Environmental sources of rapid growing nontuberculous mycobacteria causing disease in humans. Clin Microbiol Infect. 2009. 15(10):888-93.
4. Hoffmann C, Leis A, Niederweis M, Plitzko JM, Engelhardt H. Disclosure of the mycobacterial outer membrane: cryo-electron tomography and vitreous sections reveal the lipid bilayer structure. Proc Natl Acad Sci U S A. 2008. 105(10):3963-7.
5. Zuber B, Chami M, Houssin C, Dubochet J, Griffiths G, Daffé M. Direct visualization of the outer membrane of mycobacteria and corynebacteria in their native state. J Bacteriol. 2008. 190(16):5672-801.
6. Tortoli E. The new mycobacteria: an update. FEMS Immunol Med Microbiol. 2006. 48(2):159-78.
7. Goodfellow M, Wayne LG. Taxonomy and nomenclature. In: The biology of the mycobacteria. C. Ratledge JL. Standofrd; 1982. Vol. 1. P. 472 – 521.
8. Vissa, VD, Brennan, PJ. The genome of *Mycobacterium leprae*: a minimal mycobacterial gene set. Genome Biol., 2001. 2(8): Reviews1023.
9. Organização Mundial da Saúde. Global leprosy situation 2012. Wkly Epidemiol Rec 2012;87:317-28.
10. Ministério da Saúde (Brasil), Secretaria de Vigilância em Saúde, Boletim Epidemiológico, nº 1- 2012. Tuberculose no Brasil: realidade e perspectivas. Brasília: Ministério da Saúde, 2011.
11. WHO. Global Leprosy Situations, beginning of 2009. Weekly Epidemiol Rec 2009; 84: 333-340.

12. Kaufmann SH. Recent findings in immunology give tuberculosis vaccines a new boost. *Trends Immunol.* 2005 Dec;26(12):660-7
13. Domenech P, Barry CE 3rd, Cole ST. *Mycobacterium tuberculosis* in the post-genomic age. *Curr Opin Microbiol.* 2001 Feb;4(1):28-34.
14. Coura, J.R. *Síntese das doenças infecciosas e parasitárias.* Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005
15. Kritski AL, Conde MB, Souza GRM. *Tuberculose do ambulatório à enfermaria.* 3ª Ed. São Paulo (SP): Atheneu; 2005.
16. Styblo K. *Epidemiology of Tuberculosis.* Tuberculosis Association Select Papers. Vol. 24, The Hague: Royal Netgerlands; 1991.
17. Schaaf HS, Zumla A., editores. *Tuberculosis: a comprehensive clinical reference.* Kent (UK). Elsevier; 2009.
18. Ferraz JC, Melo FB, Albuquerque MF, Montenegro SM, Abath FG. Immune factors and immunoregulation in tuberculosis. *Braz J Med Biol Res.* 2006. 39(11):1387-97. Review.
19. McShane H, *Tuberculosis vaccines: beyond bacille Calmette-Guerin.* *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2011. 366(1579):2782-9.
20. Colditz GA, Brewer TF, Berkey CS, Wilson ME, Burdick E, Fineberg HV, Mosteller F. Efficacy of BCG vaccine in the prevention of tuberculosis. Meta-analysis of the published literature. *JAMA.* 1994. 271(9):698-702.
21. Luca S, Mihaescu T. History of BCG Vaccine. *Maedica (Buchar).* 2013. 8(1):53-8.
22. *Recomendações para o controle da tuberculose no Brasil.* Ministério da Saúde. Brasília/DF, 2010 Disponível em: Portal da Saúde [www.saude.gov.br](http://www.saude.gov.br)
23. Organização Mundial de Saúde , 2006. Disponível em <http://www.who.int/en>.
24. Thorn, P. *La tuberculosis: información y consejos para vencer la enfermedad.* StopTB Partnership. Disponível em:

<http://www.stoptb.org/assets/documents/resources/publications/acsm/TB%20TIPS%20SPN%20WEB.pdf>>.

25. Campos HS. Medicamentos efetivos sobre o *Mycobacterium tuberculosis*, padronizados no Brasil - Tratamento da tuberculose. Sociedade de Pneumologia e Tisiologia do Estado do Rio de Janeiro. Pulmão RJ 2007;16(1):21-31
26. Britton, W. J., Lockwood, D. N. Leprosy. *Lancet* 2004. (9416):1209-19
27. Robbins G, Tripathy VM, Misra VN, Mohanty RK, Shinde VS, Gray KM, et al. Ancient skeletal evidence for leprosy in India. *PloS one*. 2009.4(5):e5669.
28. Monot M., et al. Comparative genomic and phylogeographic analysis of *Mycobacterium leprae*. *Nat Genet*. 2009.41(12):1282-9.
29. Opromolla D. Noções de hansenologia. Centro de Estudos Dr. Reynaldo Quagliato. Hospital Lauro de Souza Lima, Bauru, SP. 1981.
30. Organização Mundial de Saúde, 2012. Disponível em <http://www.who.int/en>.
31. Kaplan G, Cohn ZA. Regulation of cell-mediated immunity in lepromatous leprosy. *Lepr Rev* 1986; 57(2):199-202
32. Rees RFW. The microbiology of leprosy. In: Hastings, R. C. (ed.) *Leprosy*. Churchill Livingstone Inc. New York. 1985
33. Scollard DM, Adams LB, Gillis TP, Krahenbuhl JL, Truman RW, Williams DL. The continuing challenges of leprosy. *Clin Microbiol Rev*. 2006.19(2):338-81
34. Brennan, P.J. e Nikaido, H. The envelope of mycobacteria. *Annu. Ver. Biochem.*, v. 64, p. 29-63, 1995.
35. Truman RW, Krahenbuhl JL. Viable *M leprae* as a research reagent, *International journal of leprosy and other mycobacterial diseases* 2001.69(1):1-12.

36. Shepard, C.C. & McRae, D.H. A method for counting acid-fast bacteria. *Int. J. Lepr.* 1968. 36, 78.
37. Kirchheimer W & Storrs E. Attempts to establish the armadillo (*Dasypos novemcinctus*, Linn) as a model for the study of leprosy I Report of lepromatoid leprosy in an experimentally infected armadillo. *Int J Lepr* 1971.39:693-702.
38. Truman R. Leprosy in wild armadillos. *Lepr Rev.* 2005. 76(3):198-208.
39. Lahiri R, Randhawa B, Krahenbuhl J. Application of a viability-staining method for *Mycobacterium leprae* derived from the athymic (nu/nu) mouse foot pad. *Journal of medical microbiology* 2005.54(3):235.
40. Cole, S.T. Massive gene decay in the leprosy bacillus. *Nature*, 2001. v. 409, p. 1007-11.
41. Walker SL, Lockwood DN. The clinical and immunological features of leprosy. *Br Med Bull* 2006. 77-78: 103-121.
42. Sakurai I, Skinsnes OK. Lipids in leprosy. I. Histochemistry of lipids in murine leprosy. *Int J Lepr Mycobact Dis Off Organ Int Lepr Assoc.* dezembro de 1970.38(4):379–88.
43. Job, C.K. (1970) *Mycobacterium leprae* in nerve lesions in lepromatous leprosy: an electron microscopic study. *Arch Pathol* 189:195–207.
44. WHO. Laboratory techniques for leprosy 1987; p62.
45. Nery JA, Vieira LM, de Mattos HJ, Sarno EN (1998) Reactional states in multibacillary Hansen disease patients during multidrug therapy. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 40: 363-370.
46. Patrocínio LG, Goulart IM, Goulart LR, Patrocínio JA, Ferreira FR, Fleury RN. Detection of *Mycobacterium leprae* in nasal mucosa biopsies by the polymerase chain reaction. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2005.44(3):311-6.



47. Job CK, Jayakumar J, Kearney M, Gillis TP. Transmission of leprosy: a study of skin and nasal secretions of household contacts of leprosy patients using PCR. *Am J Trop Med Hyg.* 2008.78(3):518–21.
48. Noordeen SK. Elimination of leprosy as a public health problem. *Indian J Lepr.* 1994. 66(1):1-10.
49. Godal T, Myrvang B, Samuel DR, Foss WF, Lofgren M. Mechanisms of “reactions” in borderline tuberculoid (BT) leprosy. A preliminary report. *Acta Pathol Microbiol Scand* 1973. 236: 45-53
50. Martinez AN, Britto CFPC, Nery JAC, Sampaio EP, Jardim MR, Sarno EN et al. Evaluation of real-time and conventional PCR targeting complex 85 genes for detection of *Mycobacterium leprae* DNA in skin biopsy samples from patients diagnosed with leprosy. *Journal of clinical microbiology* 2006.44(9):3154.
51. Martinez AN, Lahiri R, Pittman TL, Scollard D, Truman R, Moraes MO, et al. Molecular determination of *Mycobacterium leprae* viability by use of real-time PCR. *J Clin Microbiol.* julho de 2009. 47(7):2124–30.
52. Martinez AN, Ribeiro-Alves M, Sarno EN, Moraes MO. Evaluation of qPCR-based assays for leprosy diagnosis directly in clinical specimens. *PLoS Negl Trop Dis* 2011.5(10):e1354.
53. Seydel JK, Richter M, Wemps E. Mechanism of action of the folate blocker diaminodiphenylsulfone (dapson, DDS) studied in *E. coli* cell-free enzyme extracts in comparison to sulfonamides (SA). *Int J Lepr Other Mycobact Dis.* 1980.48(1):18-29
54. Adams AR, Waters MF. Dapsone-resistant lepromatous leprosy in England. *Br Med J.* 1966.8;2(5518):872
55. Friedmann PS, Williams D I. Dapsone-Resistant Leprosy. *J R Soc Med.* 1973. 66: 623-624.
56. Browne, S. G., and L. M. Hogerzeil. “B 663” in the treatment of leprosy. Preliminary report of a pilot trial. *Lepr. Rev.* 1962.33:6–10

57. Levy, L., C. C. Shepard, and P. Fasal. 1976. The bactericidal effect of rifampicin on *M. leprae* in man: a) single doses of 600, 900 and 1200 mg; and b) daily doses of 300 mg. *Int. J. Lepr. Other Mycobact. Dis.* 44:183–187
58. WHO. 2011. Surveillance of drug resistance in leprosy: 2010. Relevé épidémiologique hebdomadaire / Section d'hygiène du Secrétariat de la Société des Nations = Weekly epidemiological record / Health Section of the Secretariat of the League of Nations 86:237.
59. A Hanseníase e a sua Quimioterapia Boechat, N.; Pinheiro, L. C. S. *Rev. Virtual Quim.*, 2012, 4 (3), 247-256
60. Wemambu SNC, Turk JL, Waters SNC, Rees RJW. Erythema Nodosum Leprosum: a clinical manifestation of Arthus phenomenon. *Lancet* 1970; 2:933-935
61. Bahong J, Levy L, Grosset J. Chemotherapy of Leprosy: Progress since Orlando Congress and the prospects. *International Workshop on Leprosy Research*. 1996
62. Mariappan TT, Singh S. Regional gastrointestinal permeability of rifampicin and isoniazid (alone and their combination) in the rat. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2003.7(8):797-803.
63. Silva, P. *Farmacologia – Quimioterapia da tuberculose e micobactérias atípicas*. 5.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998. p.1060-1064.
64. Junior, W.A.P. Quimioterapia da tuberculose, complexo *Mycobacterium avium* e hanseníase. In: Goodman & Gilman: *As Bases Farmacológicas da Terapêutica*. Tradução Brunton, L.L. et al. 11 ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill Interamericana do Brasil, 2007. p.1083-1102.
65. Farese RV Jr, Walther TC. Lipid droplets finally get a little R-E-S-P-E-C-T. *Cell*. 2009. 139(5):855-60
66. Wilson E. *The Cell in Development and Inheritance*. New York: Macmillan; 1896.

67. Bozza PT & Viola JP. Lipid droplets in inflammation and cancer. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2010, 82, 243-250.
68. D'ávila, Heloissa; Toledo, Daniel A. M.; Melo, Rossana, C. N. Lipid bodies: inflammatory organelles implicated in host-Trypanosoma cruzi interplay during innate immune responses. *Mediators of Inflammation*, v. 2012, 2012
69. Londos, C.; Sztalryd, C.; Tansey, J.T.; Kimmel, A.R. Role of PAT proteins in lipid metabolism. *Biochimie*, v. 87, p. 45-49, 2005.
70. D'Ávila, H., Maya-Monteiro, C.M., Bozza, P.T. Lipid bodies in innate immune response to bacterial and parasite infections. *Int. Immunopharmacol.* 2008. 8:1308-1315.
71. Bozza, PT, Bakker-Abreu I, Navarro-Xavier, R.A, Bandeira-Melo C. Lipid body function in eicosanoid synthesis: An update. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 2011; 85 (5): 205-13.
72. Alvarez HM, Steinbüchel A. Triacylglycerols in prokaryotic microorganisms. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2002. (4):367-76.
73. Coppens, I. Contribution of host lipids to Toxoplasma pathogenesis. *Cellular Microbiology*, v. 8, p. 1-9, 2006.
74. Tobias C. Walther & Robert V. Farese, Jr. Lipid Droplets And Cellular Lipid Metabolism *Annu Rev Biochem.* 2012; 81: 687–714
75. Van der Wel N, Hava D, Houben D, Fluitsma D, van Zon M, Pierson J, et al. M tuberculosis and M leprae translocate from the phagolysosome to the cytosol in myeloid cells *Cell* 2007(7):1287-98.
76. Rengarajan, J., Bloom, B.R. & Rubin, E.J. Genome-wide requirements for Mycobacterium tuberculosis adaptation and survival in macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* (2005). 8327-8332.
77. de Chastellier, C. and Thilo, L. Cholesterol depletion in Mycobacterium avium-infected macrophages overcomes the block in phagosome maturation and leads to the reversible sequestration of viable mycobacteria in

- phagolysosome-derived autophagic vacuoles. *Cell. Microbiol* 2006, 8: 242-256.
78. Av-Gay Y, Sobouti R. Cholesterol is accumulated by mycobacteria but its degradation is limited to non-pathogenic fast-growing mycobacteria. *Can J Microbiol.* 2000;46(9):826–31.
79. Pandey AK, Yang Y, Jiang Z, Fortune SM, Coulombe F, Behr MA, et al. NOD2, RIP2 and IRF5 play a critical role in the type I interferon response to *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS Pathog* 2008
80. Brzostek A, Pawelczyk J, Rumijowska-Galewicz A, Dziadek B, Dziadek J. *Mycobacterium tuberculosis* is able to accumulate and utilize cholesterol. *J Bacteriol.*2009;191(21):6584–91.
81. Virchow, R. *Die krankhaften Geschwülste*. Berlin, August, Germany, Hirschwald, 208, 1863.
82. Chatterjee KR, Das Gupta NN, De ML. Electron microscopic observations on the morphology of *Mycobacterium leprae*. *Exp Cell Res* 1959;18: 521-27.
83. Mattos, K.A. et al. (2010a) Lipid droplet formation in leprosy: Toll-like receptor-regulated organelles involved in eicosanoid formation and *Mycobacterium leprae* pathogenesis. *J. Leukoc. Biol* 87, 371-384.
84. Mattos KA, Oliveira VC, Berrêdo-Pinho M, Amaral JJ, Antunes LC, Melo R et al. *Mycobacterium leprae* intracellular survival relies on cholesterol accumulation in infected macrophages: a potential target for new drugs for leprosy treatment. *Cell Microbiol.* 2014 Jun;16(6):797-815. 2014.
85. Schachter M. Chemical, pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of statins: an update. *Fundam Clin Pharmacol.* 2005 Feb;19(1):117-25
86. Hobbs H.H., Brown MS, Goldstein JL.1992 Molecular genetics of the LDL receptor gene in familial hypercholesterolemia. *Hum Mutat.* 1992;1(6):445-66.

87. Nezie, L. *et al.*, effects of Simvastatin on proinflammatory cytokins production during lipopolysaccharide-induced inflammation in rats. *Gen Physiol Biophys* 2009; 28 Spec No: 119-26.
88. Bellosta S., Ferri N., Bernini F., Paoletti R., Corsini A., Non-lipid-related effects of statins, *Ann.Med.*,32: 164-176, 2000.
89. Sirtori CR *et al.*, The pharmacology of statins. *Pharmacol Res.* 2014 Oct;88:3-11. doi: 10.1016/j.phrs.2014.03.002. Epub 2014.
90. Mano, R. Os inibidores da HMG-CoA redutase – As vastatinas
91. Yamamoto A, Sudo H, Endo A. Therapeutic effects of ML-236B in primary hypercholesterolemia. *Atherosclerosis.* 1980 Mar;35(3):259-66
92. Bakri R, Wang J, Wierzbicki AS, Goldsmith D. Cerivastatin monotherapy-induced muscle weakness, rhabdomyolysis and acute renal failure. *INT J Cardiol.* 2003.(1):107-9
93. Whigan DB, Ivashkiv E, Cohen AI. Determination of pravastatin sodium and its isomeric metabolite in human urine by HPLC with UV detection. *J Pharm Biomed Anal.* 1989.7(7):907-12.
94. Zocor. [bula]. São Paulo. Medley.
95. Líptor [bula]. São Paulo. Laboratórios Pfizer Ltda.
96. Parihar SP *et al.*, statin therapy reduces the mycobacterium tuberculosis burden in human macrophages and in mice by enhancing autophagy and phagosome maturation. *J infect dis.* 2014; 209(5):754-63
97. Cruz D, Watson AD, Miller CS, Montoya D, Ochoa M-T, Sieling PA, *et al.* Host-derived oxidized phospholipids and HDL regulate innate immunity in human leprosy. *J Clin Invest.* agosto de 2008;118(8):2917–28.
98. Mattos KA, Lara FA, Oliveira VGC, Rodrigues LS, D’Avila H, Melo RCN, *et al.* Modulation of lipid droplets by *Mycobacterium leprae* in Schwann cells: a putative mechanism for host lipid acquisition and bacterial survival in phagosomes. *Cell Microbiol.* fevereiro de 2011;13(2):259–73.

99. Reddy, P. *et. al*, Serum concentrations and clinical effects of atorvastatin in patients taking grapefruit juice daily. *Br J Clin Pharmacol* 2011. 72(3):434-41.
100. Thomayant Prueksaritanont, Bennett Ma, and Nathan Yu. The human hepatic metabolism of simvastatin hydroxy acid is mediated primarily by CYP3A, and not CYP2D6. *Br J Clin Pharmacol*. Jul 2003; 56(1): 120–124.
101. Vallianou NG, Kostantinou A, Kougias M, Kazazis C. Statins and cancer. *Anticancer Agents Med Chem*. 2014 Jun;14(5):706-12
102. Green, L.C.; Wagner, D.A.; Glogowski, J.;Skipper, P.L.; Wishnok, J.S.; Tannenbaum, S.R. Analyses of nitrate, nitrite and [15N]nitrate in biological fluids. *Analytical Biochemistry*, v.126, p. 131-138, 1982.
103. Heuston S., Begley M., Gahan, C.G.M., Hill C. Isoprenoid biosynthesis in bacterial pathogens. *Microbiology* (2012), 158, 1389-1401;
104. Kuzuyama, T., & Seto, H., Two distinct pathways for essential metabolic precursors for isoprenoid biosynthesis. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci*, 2012, .88(3), 41-52.
105. Thompson T. E., Tillack T. W. (1985) *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* 14, 361–386
106. Van der Wel N, Hava D, Houben D, Fluitsma D, van Zon M, Pierson J, et al. *M tuberculosis* and *M leprae* translocate from the phagolysosome to the cytosol in myeloid cells *Cell* 2007(7):1287-98.
107. de Jonge MI, Pehau-Arnaudet G, Fretz MM, Romain F, Bottai D, Brodin P, et al. ESAT-6 from *Mycobacterium tuberculosis* dissociates from its putative chaperone CFP-10 under acidic conditions and exhibits membrane-lysing activity. *J Bacteriol* 2007;189(16):6028-34.
108. Vollmer T *et. al.*, Oral simvastatin treatment in relapsing-remitting multiple sclerosis. *Lancet*. 2004. 363(9421):1607-8
109. Triantafilou M, Miyake K, Golenbock DT, Triantafilou K. Mediators of innate immune recognition of bacteria concentrate in lipid rafts and facilitate

lipopolysaccharide-induced cell activation. *Journal of cell science*.  
2002.115:2603-2611

## **Capítulo 7: Anexos**

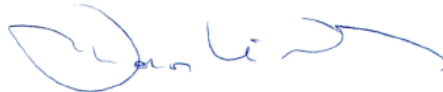


**COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA**

**CERTIFICADO**

Baseado em parecer competente este Comitê de Ética em Pesquisa analisou o Projeto "INIBIÇÃO DO METABOLISMO DE COLESTEROL COMO METODO AUXILIAR NO CONTROLE DA HANSENIASE", Protocolo nº219/11, tendo como responsável o Pesquisador **DEJAIR CAITANO DO NASCIMENTO** e o considerou **APROVADO**.

Bauru, 13 de dezembro de 2011.



**Prof. Dr. Marcos da Cunha Lopes Virmond**  
Presidente Comitê de Ética em Pesquisa – USC



Revision

Manuscript #	AAC01826-13R3
Current Revision #	3
Other Versions	<a href="#">AAC01826-13</a> <a href="#">AAC01826-13R1</a> <a href="#">AAC01826-13R2</a>
Submission Date	2014-07-04 20:19:30
Current Stage	
Title	Statins increase rifampin mycobactericidal effect.
Running Title	Statins increase rifampin mycobactericidal effect.
Manuscript Type	Full-Length Text
Journal Section	Mechanisms of Action: Physiological Effects
Corresponding Author	Dr. Flavio Alves Lara (Fundação Oswaldo Cruz) Miss Lina Silva Lobato, Dr. Patricia Gammarco Rosa, Miss Jessica Silva Ferreira, Mr. Arthur da Silva Neumann, Mariel Gomes da Silva, Dr. Dejalr Caltano do Nascimento, Dr. Cleverton Teixeira Soares, Dr. Silvia Cristina Barbosa Pedrini, Mr. Diego Sá Leal de Oliveira, Dr. Cíndia Peres Monteiro, Dr. Geraldo Moura Batista Pereira, Marcelo Ribeiro-Alves, Mr. Mariana Andrea Hacker, Milton Moraes, Dr. Maria Cristina Pessolani, Dr. Rafael Silva Duarte
Contributing Authors	Mycobacterium leprae and Mycobacterium tuberculosis antimicrobial resistance has been followed with great concern during the last years, while the need for new drugs able to control leprosy and tuberculosis, mainly due to XDR-TB, is pressing. Our group has recently described that M. leprae is able to induce lipid body biogenesis and cholesterol accumulation in macrophages and Schwann cells, facilitating its viability and replication. Considering these previous results, we investigated the efficacy of two statins on the intracellular viability of mycobacteria within the macrophage, and atorvastatin effect on BALB/c mice M. leprae infection. We observed that intracellular mycobacteria viability decreased markedly after incubation with both statins, but atorvastatin showed the best inhibitory effect when combined with rifampin. Using Shepard's model we observed atorvastatin efficacy in control M. leprae and inflammatory infiltrate in the BALB/c footpad, in a serum cholesterol level dependent way. We conclude that statins contribute to macrophage-bactericidal activity against M. bovis, M. leprae and M. tuberculosis. It is likely that statins association with the actual multidrug therapy could effectively reduce mycobacteria viability and tissue lesion in Leprosy and Tuberculosis patients, although epidemiological studies are still needed for confirmation.
Abstract	
Editor	<a href="#">Dr. Eric Nuermberger</a>
Original MS Preferred Reviewers	David Scollard (National Hansen's Disease Programs), Patrick Brennan (Colorado State University), Christopher Scazzetti (University of Massachusetts), Jaroslaw Dziadek (Polish Academy of Sciences)
Original MS Non-Preferred Reviewers	Norihisa Ishii (National Institute of Infectious Diseases)
Keywords	leprosy, tuberculosis, atorvastatin, simvastatin, Mycobacterium, rifampicin
Research Areas	Antimicrobial Chemotherapy, Mycobacteriology
Conflict of Interest	No conflict of interest.
Funding Sources	FAPERJ: APQ-1 E-26/111.718/2012
Decision	<a href="#">Accept</a> / 2014-07-08
Color Charges	Yes, I agree to pay the color charges.

Manuscript Items

1. Author Cover Letter (last updated: 07/04/2014 19:56:20) [PDF \(64KB\)](#)
2. "Response to Reviewer Comments" (last updated: 07/04/2014 19:56:20) [PDF \(79KB\)](#)
3. Merged File containing manuscript text and 5 Figure files. (last updated: 07/04/2014 20:17:16) [PDF \(3572KB\)](#) 
  - a. Manuscript Text File (last updated: 07/04/2014 19:56:20) [PDF \(213KB\)](#)
  - b. Figure 1 (last updated: 07/04/2014 20:11:48) [PDF \(354KB\)](#)  
Figure
  - c. Figure 2 (last updated: 07/04/2014 20:11:48) [PDF \(2132KB\)](#)  
Figure
  - d. Figure 3 (last updated: 07/04/2014 20:11:49) [PDF \(74KB\)](#)  
Figure
  - e. Figure 4 (last updated: 07/04/2014 20:17:16) [PDF \(677KB\)](#)  
Figure
  - f. Figure 5 (last updated: 07/04/2014 20:11:50) [PDF \(177KB\)](#)  
Treatment toxicity control and NO production in THP-1 cells.
4. Supplementary figures 1 and 2 (last updated: 07/04/2014 19:57:02) [PDF \(330KB\)](#)  
Cellular viability and NO production.

[Previous Decision Letter \(blind reviews at bottom of letter\)](#)

More Manuscript Info and Tools

[Send Manuscript Correspondence](#)

[Decision Summary](#)

[Check Status](#)