

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA

SECRETARIA
DE
PÓS-GRADU-
I. B.

MARCELLE CAROLINA COLHONE

AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DE BAIXA E ALTA
TENSÃO DE OXIGÊNIO EM MODELO *IN VITRO* DA
LEISHMANIOSE

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
MARCELLE CAROLINA COLHONE
[assinatura]
e aprovada pela Comissão Julgadora.

Dissertação apresentada ao Institut
de Biologia da Universidac
Estadual de Campinas pa
obtenção de título de Mestre e
Parasitologia

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Selma Giorgio

Campinas, SP.
2004

UNIDADE	BC
Nº CHAMADA	
	TE/UNICAMP
	C.681a
V	EX
TOMBO BC/	61215
PROC.	16-217-04
C	<input type="checkbox"/>
D	<input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	11,00
DATA	18-11-04
Nº CPD	

B.1.6 I. 335786


**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP**

- C681a** Colhone, Marcelle Carolina
 Avaliação dos efeitos de baixa e alta tensão de oxigênio em modelo *in vitro* da Leishmaniose / Marcelle Carolina Colhone. --
 Campinas, SP:[s.n.], 2004.
- Orientadora: Selma Giorgio
 Tese (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia.
- I. Leishmaniose. 2. Macrófagos. 3. Óxido nítrico. I. Giorgio, Selma.
 II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Campinas, 24 de junho de 2004

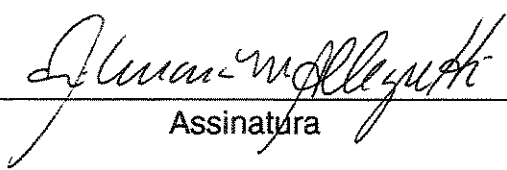
Banca Examinadora

Profa. Dra.
Selma Giorgio



Assinatura

Profa. Dra.
Silmara Marques Allegretti



Assinatura

Profa. Dra.
Fernanda Ramos Gadelha



Assinatura

Profa. Dra.
Ana Maria Aparecida Guaraldo

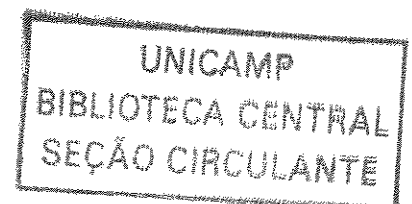
Assinatura

Prof. Dr
Odair Benedito Ribeiro

Assinatura

2004.01.10.2

Dedico este trabalho aos meus pais Lúgino
Maria de Lourdes, às minhas irmãs Cássia
Michelle e ao meu namorado Thiago, pelo apoio
compreensão e por sempre acreditarem em mim.



Agradecimentos

À Profa. Dra. Selma Giorgio pela orientação, oportunidades concedidas e pelo exemplo de dedicação e responsabilidade.

Aos Professores e funcionários do Departamento de Parasitologia, pelo auxílio dispensado durante a realização deste trabalho.

À Profa. Dra. Urara Kawazoe pela participação na banca prévia e por todas as sugestões oferecidas.

À Profa. Dra. Fernanda Ramos Gadelha, Profa. Dra. Silmara Marques Allegretti, Profa. Dra. Ana Maria Aparecida Guaraldo e ao Prof. Dr. Odair Benedito Ribeiro, pela participação na banca examinadora e pelas valiosas sugestões a este trabalho.

À Profa. Dra. Fernanda Ramos Gadelha e ao Giorgio pelo auxílio nas técnicas moleculares.

Aos amigos do laboratório, Maira, Adriana, Wagner, Diana e Marcos Eduardo, por todo o auxílio e apoio necessários para a realização deste trabalho.

A CAPES e ao FAEP pela concessão da bolsa para o desenvolvimento deste trabalho.

Parte dos resultados obtidos nesta dissertação foram utilizados para a elaboração do seguinte artigo:

COLHONE, M. C.; ARRAIS-SILVA, W. W.; PICOLI, C. & GIORGIO, S. Effect of hypoxia on macrophage infection by *Leishmania amazonensis* **Parasitol.**, 90(4), 2004 (no prelo).

LISTA DE ABREVIACOES

IFN- γ	Interferon gama
IL	Interleucina
LPS	Lipopolissacarídeo de origem bacteriana
iNOS	óxido nítrico sintase, forma induzível
HSP70	Proteína do choque térmico, 70kDa
NO	xido nítrico
pO ₂	Pressão parcial de oxigênio
HBO	Oxigenao Hiperbárica

RESUMO

O fluxo sanguíneo alterado, isquemia, proliferação celular e a presença de microrganismos resultam em queda acentuada de pressão parcial de oxigênio (hipóxia) no tecido lesado. Macrófagos se adaptam a hipóxia, alterando seu metabolismo, produção de linfocinas pro-inflamatórias e atividade fagocítica. No presente trabalho comparamos os efeitos da hipóxia (5% de O₂) e da normóxia (21% de O₂) na infecção de macrófagos com o protozoário parasita *Leishmania amazonensis*. Macrófagos de duas diferentes origens (linhagem celular murina J774 e macrófagos peritoneais murinos) expostos a hipóxia mostraram redução na porcentagem de células infectadas e no número de parasitas intracelulares por célula. A cinética da infecção indicou que a hipóxia não deprime a fagocitose de *L. amazonensis*, mas induz macrófagos a reduzirem o parasitismo intracelular. Além disso, a hipóxia não age sinergicamente com interferon gama (IFN- γ) e lipopolissacarídeo (LPS) em macrófagos para induzir morte do parasita. Experimentos também demonstram ausência de correlação entre a produção de óxido nítrico e o controle da infecção em macrófagos sob condições hipóxicas.

Proteínas do choque térmico de 70kDa (HSP70) é induzida por hipóxia em muitos tipos de células e contribui para sua sobrevivência durante exposição a condições hipóxicas. Análises da expressão de HSP70 em linhagem celular murina J774, expostas à hipóxia, mostram uma notável redução na expressão de HSP70. Macrófagos infectados com *L. amazonensis* também reduziram a expressão de HSP70.

Macrófagos infectados com amastigotas de *L. amazonensis* sob condições hiperbáricas (HBO) (2 horas, 2,5 ATA, 100% O₂) apresentaram significativa redução na porcentagem de células infectadas e no número de parasitas intracelulares por células.

Todos os resultados fornecem evidências de que a hipóxia, que ocorre em várias condições patológicas, e a HBO, podem alterar a susceptibilidade de macrófagos a infecção com *Leishmania*.

ABSTRACT

The altered blood flow, ischemia, cell proliferation and the presence of microorganisms cause hypoxia (low pO_2) in injured tissues. Macrophages adapt to hypoxia and alter their metabolism, pro-inflammatory lymphokines production and phagocytosis activity. In the present study we compared the effect of 5% oxygen tension (hypoxia) and a normal tension of 21% oxygen (normoxia) on macrophage infection by the protozoan parasite *Leishmania amazonensis*. Macrophages from two different sources (murine cell line J774 and murine peritoneal macrophages) exposed to hypoxia showed a reduction of the percentage of infected cells and of the number of intracellular parasites per cell. The kinetic of infection indicated that hypoxia did not depress *L. amazonensis* phagocytosis but induced macrophages to reduce intracellular parasitism. Furthermore, hypoxia did not act synergistically with gamma interferon (IFN- γ) and bacterial lipopolisaccharides (LPS) in macrophages to induce parasite killing. Experiments also indicated no correlation between nitric oxide production and control of infection in macrophages under hypoxic condition.

Heat shock protein 70 (HSP70) is induced by hypoxia in the most of mammalian cell types and contributes to their ability to survive during hypoxic episodes. Analyses of the Hsp70 in murine cell line J774 exposed to hypoxia indicated a notable reduction in HSP70 expression. Macrophages infected with *L. amazonensis* also showed a reduction in HSP70 expression.

Macrophages infected with *L. amazonensis* amastigotes under hyperbaric condition (HBO) (2 hours, 2,5 ATA, 100% O₂) showed a significant decrease of the percentage of infected cells and number of intracellular parasites per cell.

Taken together our results provided the first evidence that hypoxia, which occurs in various pathological conditions, and HBO treatment, can alter macrophage susceptibility to a parasite infection.

SUMÁRIO

1. Introdução.....	1
1.1. Aspectos da patologia das lesões cutâneas.....	3
1.2. Resposta imune do hospedeiro.....	6
1.3. Relevância fisiológica da hipóxia.....	8
1.4. A hipóxia e as alterações fenotípicas dos macrófagos.....	10
1.5. Hiperóxia e oxigenação hiperbárica.....	15
2. Objetivos.....	19
3. Materiais e Métodos.....	20
3.1. Animais.....	21
3.2. Meio de Cultura.....	21
3.3. Obtenção e manutenção do parasita.....	21
3.4. Obtenção e cultura de macrófagos peritoneais murinos.....	22
3.5. A linhagem celular murina J774.....	22
3.6. Infecção das culturas de macrófagos com <i>L. Amazonensis</i>	23
3.7. Ativação das culturas de macrófagos com IFN- γ e LPS.....	23
3.8. Ambiente hipóxico.....	24
3.9. Cultivo em hipóxia de macrófagos peritoneais murinos e macrófagos J774.....	24
3.10. Avaliação da viabilidade dos macrófagos e do parasita.....	26
3.11. Análise da produção de nitrito.....	27
3.12. Cultivo de macrófagos em oxigenação hiperbárica (HBO).....	27

3.13. Choque térmico de macrófagos.....	28
3.14. Técnica do Western Blotting para a análise da expressão da enzima iNOS e da proteína de choque térmico HSP70 em macrófagos.....	28
3.15. Análise estatística.....	30
4. Resultado.....	31
4.1. Avaliação dos efeitos da hipóxia na infecção de macrófagos peritoneais murinos com formas amastigotas de <i>L. amazonensis</i>	31
4.2. Avaliação dos efeitos da hipóxia na infecção de macrófagos tumorais murinos da linhagem J774 com formas amastigotas de <i>L. amazonensis</i>	40
4.3. Avaliação do efeito da hipóxia em macrófagos peritoneais ativados com IFN- γ e LPS e infectados com a forma amastigota de <i>L. amazonensis</i>	44
4.4. Análise da viabilidade de macrófagos peritoneais murinos e da linhagem tumoral J774 infectados com formas amastigotas de <i>L. amazonensis</i> em condições hipóxicas.....	47
4.5. Análise da produção de óxido nítrico (NO).....	50
4.6. Efeitos da hipóxia na expressão da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS).....	52
4.7. Efeitos da hipóxia na expressão de proteínas do choque térmico.....	54
4.8. Avaliação dos efeitos da HBO na infecção de macrófagos peritoneais murinos com formas amastigotas de <i>L. amazonensis</i>	60
5. Discussão.....	63
6. Conclusões.....	75
7. Referências Bibliográficas.....	76

1. INTRODUÇÃO

Em 1903 Leishman e Donovan separadamente descreveram na Índia um protozoário presente em tecidos esplênicos de pacientes. A doença passou a ser chamada de leishmaniose visceral e o parasita denominado *Leishmania donovani* (HERWALTD, 1999).

Nos hospedeiros mamíferos, representados na natureza por várias ordens e espécies, a *Leishmania* assume a forma amastigota, arredondada e imóvel, que se multiplica obrigatoriamente dentro de células do sistema monocítico fagocitário. À medida que as formas amastigotas vão se multiplicando, os macrófagos se rompem liberando parasitas que são fagocitados por outros macrófagos (GONTIJO & CARVALHO, 2003). Todas as espécies do gênero são transmitidas pela picada de fêmeas infectadas de dípteros da subfamília Phlebotominae, pertencentes aos gêneros *Lutzomyia* – no Novo Mundo, e *Phlebotomus* – no Velho Mundo. Nos flebotomíneos as *leishmanias* vivem no meio extracelular, na luz do trato digestivo. Ali, as formas amastigotas, ingeridas durante o repasto sangüíneo, se diferenciam em formas flageladas, morfológica e bioquimicamente distintas das amastigotas, sendo posteriormente inoculadas na pele dos mamíferos durante a picada (GONTIJO & CARVALHO, 2003).

Há aproximadamente 21 espécies de *Leishmania*, transmitidas por cerca de 30 espécies de flebotomíneos. *Leishmania* tem desenvolvido uma variedade de mecanismos adaptativos não somente para viver dentro do vetor, mas também para escapar da resposta imune do hospedeiro vertebrado, inclusive dentro do macrófago (CUNNINGHAM, 2002).

Nos hospedeiros vertebrados o parasita pode causar um espectro de doenças variando de uma doença cutânea limitada (leishmaniose cutânea) a uma doença visceral progressiva (leishmaniose visceral) que pode ser fatal (BERMAN, 1997). As formas e a severidade da doença dependem grandemente da espécie do parasita infectante e também do estado imune do hospedeiro (KANE & MOSSER, 2000).

Segundo estimativas da Organização Mundial da Saúde (OMS) há aproximadamente um milhão e meio de novos casos de leishmaniose cutânea e quinhentos mil novos casos de leishmaniose visceral reportados a cada ano (www.who.int). A leishmaniose é endêmica em regiões tropicais da África, Américas, no subcontinente indiano, Mediterrâneo e no sudoeste da região asiática (HANDMAN, 2000). A incidência de leishmaniose cutânea e mucocutânea (leishmaniose tegumentar americana-LTA) no Brasil tem aumentado, nos últimos 20 anos, em praticamente todos os Estados. Surtos epidêmicos têm ocorrido nas regiões Sudeste, Centro-oeste, Nordeste e, mais recentemente, na região Amazônica. Nos últimos anos, o Ministério da Saúde registrou média anual de 35 mil novos casos de LTA no país. Não só no Brasil, assim como em outros países do Novo Mundo, a LTA constitui problema de Saúde Pública (GONTIJO & CARVALHO, 2003).

O controle das leishmanioses esbarra no fato dela ser uma zoonose, sendo os animais silvestres e domésticos potenciais reservatórios do parasita. O crescimento urbano desordenado tem gerado muitas dificuldades no combate ao flebótomo (HANDMAN, 2000). A resistência a drogas (antimoniais pentavalentes, como o glucantime) utilizadas tradicionalmente na terapia contra as leishmanioses,

aliada aos efeitos colaterais destes compostos fazem com que alternativas ao tratamento sejam estudadas (HERWALDT, 1999).

Devido à facilidade na utilização dos modelos *in vivo* e *in vitro* de infecção com *Leishmania*, a eficiência de vários compostos e de protocolos de vacinação tem sido testados. A OMS classifica as vacinas experimentais contra leishmaniose em gerações. Na primeira geração estão as vacinas compostas por parasitas mortos e BCG (Bacilo Calmette-Guérin), por outro lado, as chamadas vacinas de segunda geração utilizam processos mais sofisticados como o desenvolvimento de parasitas avirulentos, microrganismos modificados geneticamente ou subunidades com capacidade antigênica (WHO, 2001). Contudo, ainda não há drogas mais eficientes ou vacinas disponíveis contra a leishmaniose (revisto por HANDMAM, 2000).

1.1- Aspectos da patologia das lesões cutâneas

A *Leishmania* que utilizamos neste trabalho é a *L. amazonensis* que causa principalmente lesões cutâneas (WEIGLE & SARAIVA, 1996).

A leishmaniose cutânea é causada por um grupo de espécies geneticamente relacionadas, cada espécie tem manifestações características e áreas de endemicidade; entretanto, nenhuma destas manifestações clínicas são únicas para uma espécie em particular, porque há considerável sobreposição entre o espectro clínico da doença (WEIGLE & SARAIVA, 1996). Da mesma forma, em uma dada área, várias espécies de *Leishmania* podem ser transmitidas (ARMIJOS et al., 1990). Lesões mucosas são as mais características do parasita

Leishmania pertencente ao subgênero *Viannia*, particularmente *L. (V.) braziliensis* e *L. (V.) panamensis*, mas também podem ser causadas por *L. (V.) guyanensis* e *L. (L.) amazonensis*. Leishmaniose cutânea difusa é uma forma rara de leishmaniose causada por *L. (L.) mexicana* nas Américas do Norte e Central e por *L. (L.) amazonensis* e *L. (L.) venezuelensis* na América do Sul (WEIGLE & SARAIVA, 1996). Embora a leishmaniose cutânea seja geralmente indolor, autolimitante, e sem conseqüências sérias, é uma infecção de grande importância em saúde pública (ASHFORD, 1999).

O curso clínico da leishmaniose cutânea é complexo devido à variabilidade do período de incubação, infecção subclínica, cura espontânea, propagação metastática, reativação, reinfecções e lesões crônicas (WEIGLE & SARAIVA, 1996).

Durante o período de incubação, que pode permanecer por semanas ou vários anos, uma série de eventos celulares ocorrem, culminando na primeira manifestação clínica, que é um pequeno nódulo papular indolor (SANCHEZ et al., 1992; WEIGLE & SARAIVA, 1996). Este nódulo é produzido por uma massa dérmica contendo macrófagos vacuolados carregados de *Leishmania* e infiltrado linfocítico (GUTIERREZ et al., 1991; BIDDLESTONE et al., 1994). O nódulo desenvolve necrose central, possivelmente devido à pressão da epiderme. O infiltrado dérmico se estende visivelmente, a área de necrose central aumenta, desenvolvendo lesões que são clássicas de *L. (Viannia)*, úlcera oval ou circular em relevo, endurecida, com bordas bem definidas com presença de amastigotas (HEPBURN et al., 1993). Abundantes linfócitos, histiócitos e granulomas estão presentes nas lesões causadas por *L. (Viannia)* (GUTIERREZ et al., 1991).

Lesões causadas por *L. amazonensis*, utilizada em nossos estudos, usualmente apresenta uma lesão única ulcerada que é muito suscetível ao tratamento e pode curar-se espontaneamente. Contudo, a diversidade de apresentação clínica desta espécie parece variar de lugar, possivelmente devido a diferenças na sua virulência (WEIGLE & SARAVIA, 1996). *L. amazonensis* foi recentemente isolada de pacientes com diversas formas de leishmaniose, incluindo cutânea, mucosa, difusa e leishmaniose visceral (BARRAL et al., 1991; BARRAL et al., 1986 e SAMPAIO et al., 1985). Nas leishmanioses cutâneas causadas por *L. amazonensis* ou por *L. braziliensis* a inflamação ativa (migração de células mononucleares), a destruição tecidual (induzida por células inflamatórias) e as tentativas de reparação tecidual (proliferação de pequenos vasos sangüíneos) ocorrem simultaneamente (WEIGLE & SARAVIA, 1996). Em lesões cutâneas crônicas de cura mais lenta, amastigotas nos macrófagos e o infiltrado inflamatório levam a formação de um nódulo dérmico que se expande formando uma área de necrose central. Essas lesões são extensas e as manifestações clínicas diversas, com aumento da morbidade, facilmente confundida com doenças crônicas de pele como a psoríase, os eczemas, a varicela e os carcinomas de pele (WEIGLE & SARAVIA, 1996). Na leishmaniose cutânea difusa causada pela *L. amazonensis* observa-se o aparecimento de nódulos no rosto e membros, com abundância de macrófagos infectados, ausência de linfócitos, e formação de granulomas e focos necróticos (GRIMALDI & TESH, 1993; WEIGLE & SARAVIA, 1996). Ainda, o tratamento apresenta dificuldades, porque, a leishmaniose cutânea difusa é refratária à medicação convencional com antimoniato (BECKER et al., 1999). O paciente mesmo quando

alcança alguma melhora clínica pode manifestar recaídas (CONVIT et al., 1989). Similar a *L. (Viannia), L. amazonensis* pode se disseminar hematogenicamente, apesar de evidências de uma resposta imune celular específica (COSTA et al., 1986).

1.2- Resposta imune do hospedeiro

Como *Leishmania* é um parasita que invade macrófagos, não é surpresa que o controle da infecção dependa de mecanismos efetores promovidos pelos macrófagos para matar o parasita (ALEXANDER & RUSSELL, 1992). Os macrófagos são fagócitos profissionais e células multifuncionais que dependendo do seu estado de ativação e da sua localização, apresentam antígenos, secretam uma variedade de fatores regulatórios, enzimas e citocinas, e tem atividades anti-tumoral e microbicida (AYALA et al., 1996; McCORMICK et al., 2000). Outras células também parecem estar envolvidas nos mecanismos de controle da infecção, como por exemplo, células natural killer (NK) (MULLER et al., 2001) e células dendríticas (REIS e SOUZA et al., 1999).

Imediatamente após a inoculação dos parasitas no hospedeiro vertebrado, um processo inflamatório local é iniciado, envolvendo acúmulo local de células para impedir o dano tecidual e para iniciar a cura da lesão. Inicialmente, a lesão é infiltrada por granulócitos (neutrófilos e eosinófilos), seguidos por macrófagos inflamatórios, que dentre poucos dias predomina na lesão. Linfócitos são raramente detectados no estágio inicial da infecção (BEIL et al., 1992; SUNDERKOTTER et al., 1993).

Macrófagos e células dendríticas são as principais fontes de interleucina 12 (IL12) imediatamente após infecção com *Leishmania* (GORAK et al., 1998). A produção de IL12 por macrófagos e células dendríticas induz a produção de interferon gama (IFN- γ) por células NK e células T. IFN- γ em associação ao fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) produzido pelo próprio macrófago infectado induzem a ativação do macrófago para produzir moléculas que serão tóxicas ao parasita (KANE & MOSSER, 2000).

Os dois mediadores mais bem descritos e envolvidos na morte do parasita por macrófagos ativados com IFN- γ e TNF- α são os radicais do oxigênio como o superóxido (O_2^-) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e os intermediários reativos de nitrogênio como o óxido nítrico (NO) e o peroxinitrito que são formados durante o “burst” respiratório (KANE & MOSSER, 2000; LINARES et al., 2001). Macrófagos susceptíveis a infecção com *Leishmania* produzem esses radicais de oxigênio em quantidades relativamente baixas comparadas com macrófagos ativados que secretam altos níveis de espécies reativas de oxigênio. Os macrófagos murinos ativados por citocinas mostram aumentar a expressão da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS) produzindo grandes quantidades de NO (KANE & MOSSER, 2000).

As células T helper (Th) também têm um importante papel na resposta imune. A expansão de clones Th1 protege durante a infecção, enquanto a expansão de células Th2 exacerba a doença (CUNNINGHAM, 2002). A estimulação de linfócitos T CD4 (Th1), as linfocinas ativadoras de macrófagos e os intermediários reativos de nitrogênio (expressão da enzima iNOS) produzidos por macrófagos ativados e tóxicas ao parasita são os principais componentes da

reposta imune em camundongos resistentes a esses parasitas (C57BL/6) (revisto por AUGUSTO et al., 1996 e SOLBACH & LASKAY, 2000). Por outro lado, IL4 regula a diferenciação de células Th2, que confere susceptibilidade a *Leishmania* pela baixa regulação de IL12, produção de IFN- γ , e inibição da produção de NO pelo macrófago (CUNNINGHAM, 2002).

1.3- Relevância fisiológica da hipóxia

Em tecidos normais, a tensão de oxigênio (ou pressão parcial de oxigênio, pO_2) varia de 20 a 70 mmHg (2,5% a 9% de O_2). Em tecido cutâneo, por exemplo, a pO_2 é de 50-60 mmHg, no fígado a pO_2 venosa esta entre 30-35 mmHg (4-5% O_2) e em tecido muscular é aproximadamente 25 mmHg (LEWIS et al., 1999; ZHOU et al., 2000). Em varias patologias observam-se períodos prolongados de reduzido fluxo sanguíneo, vasoconstrição e proliferação celular, resultando em queda acentuada da pO_2 tecidual. A perfusão deficiente causa a formação de microambientes hipóxicos, característicos de neoplasias, arteriosclerose, fraturas ósseas, artrite reumatóide e reações inflamatórias em geral (NIINIKOSKI & HUNT, 1972; HUNT et al., 1983; LEWIS et al., 1999). Em tecido dérmico lesado experimentalmente, as medidas de pO_2 indicaram gradientes hipóxicos de 5-28 mmHg com a área central da lesão, composta de fibrina, plasma, infiltrado leucocitário e tecido conectivo apresentando os níveis mais baixos de pO_2 , (REMENSNYDER & MAJNO, 1968). Os níveis de oxigênio diminuem nos primeiros dias após a injúria do tecido (NIINIKOSKI & HUNT, 1972).

Células adaptam suas atividades metabólicas de inúmeras maneiras quando expostas a hipóxia, por exemplo, macrófagos podem se adaptar, isto é, modificam o seu fenótipo na ausência de oxigênio por desviar a via glicolítica anaeróbica para produzir ATP, como também é visto em células tumorais sob condições hipóxicas (LEWIS et al., 1999). As respostas celulares a hipóxia variam de mudanças nos fluxos de íons na membrana plasmática e alterações na proliferação a indução de genes específicos e apoptose (HELFMAN & FALANGA, 1993; YUN et al., 1997a; LEWIS et al., 1999). As células musculares e neuronais expostas a hipóxia têm a atividade dos canais de potássio (K^+) e cálcio (Ca^{++}) estimulada e a sobrevivência aumentada em períodos de anoxia (GANFORNINA & LOPEZ-BARNEO, 1991; CORNFIELD et al., 1994). A produção de TGF- β (Fator de crescimento e transformação), bFGF (fator de crescimento de fibroblastos) e VEGF (fator de crescimento endotelial vascular) por células expostas a hipóxia estão relacionados ao processo de angiogênese durante o desenvolvimento de tumores e a cura de lesões teciduais (FALANGA et al., 1991; YUN et al., 1997a). Vários estudos indicam que macrófagos provenientes da lesão são capazes de induzir angiogêneses (KOCH et al., 1986) e sugerem que a ativação de macrófagos por fatores específicos microambientais é essencial para atividade proangiogênica em tais tecidos lesados (THAKRAL et al., 1979). A angiogênese é importante para restaurar a perfusão vascular no tecido lesado e facilitar o ingresso de neutrófilos e macrófagos que serão importantes no processo de cura (CROWTHER et al., 2001).

A hipótese mais aceita é que a hipóxia induz a morte celular, e que esta ocorra, principalmente, por apoptose. JACOBSON & RAFF (1995) e SHIMIZU et al. (1996) demonstraram que a hipóxia induz apoptose em fibroblastos humanos SV-40 transformados e sem mitocôndrias. Observações semelhantes foram feitas em linhagem WEH 17.7 (linfoma T), em células de adenocarcinoma e em neurônios (YUN et al., 1997a). Entretanto, também se observa seleção e resistência das células. Estes efeitos opostos da hipóxia na morte celular (indução x proteção) são atribuídos às mudanças adaptativas ou fenotípicas sofridas em ambiente hipóxico. Em células de Kupffer e células do epitélio intestinal, por exemplo, foi relatado que não houve significativa diminuição da viabilidade sob condições hipóxicas (TOWFIGH et al., 2000; XU et al., 1999). Também em células do tecido bucal de cães foi relatado que a hipóxia não causou significativas mudanças na viabilidade destas células, sugerindo que esta condição não induziu morte celular (AMEMIYA et al., 2003).

1.4- A hipóxia e as alterações fenotípicas dos macrófagos

A hipóxia afeta uma variedade de processos celulares e é o principal fator que contribui para vários processos patológicos. Análises da expressão e modificações na pós-tradução de proteínas em resposta a hipóxia revelou que uma complexa regulação é feita em múltiplos compartimentos celulares para competir com a reduzida disponibilidade de oxigênio para assim manter a função celular.

Macrófagos, que se acumulam no centro ou nas adjacências de áreas hipóxicas e pouco vascularizadas de tecidos lesados (LEWIS et al., 1999), são capazes de funcionar sob condições hipóxicas. Estas células alteram a expressão gênica e adaptam a atividade metabólica. Hipóxia pode induzir mudanças na atividade secretora e induzir a liberação de citocinas pró-angiogênicas e inflamatórias pelos macrófagos *in vitro* e *in vivo* (LEWIS et al., 1999).

Há vários efeitos da hipóxia nos fenótipos e nas funções de macrófagos. Experimentos com células murinas da linhagem RAW 264.7 ou com macrófagos humanos expostos a baixas concentrações de oxigênio mostram que essas células sobrevivem e melhor se adaptam quando expostas a hipóxia *in vitro* sob prolongados períodos de tempo (YUN et al., 1997b; TSUKAMOTO et al., 1996). Além disso, a hipóxia também aumentou a atividade de várias enzimas glicolíticas em macrófagos alveolares murinos. Estudos sugerem que macrófagos podem se adaptar a ausência de oxigênio por alterar a via glicolítica, semelhante às células tumorais sob condições de pO_2 reduzida (LEWIS et al., 1999). A exposição de macrófagos alveolares a um período crônico de hipóxia (96 horas) reduziu a atividade da citocromo oxidase, uma enzima envolvida na fosforilação oxidativa, e aumentou a atividade da piruvato kinase e de outras enzimas glicolíticas (BUTTERICK et al., 1981).

A atividade fagocítica de macrófagos também pode ser alterada em baixas concentrações de oxigênio. Macrófagos alveolares e células de Kupffer expostas a hipóxia *in vitro* e *in situ* mostraram capacidade reduzida para fagocitar partículas de poliestireno e carbono coloidal (SIMON et al., 1981; LE KOPPELE et al., 1991). LEEPER-WOODFORD & MILLS (1992) mostraram que a hipóxia aguda (1,7% O_2)

alterou a função fagocítica em macrófagos alveolares de coelhos diminuindo a entrada de hemácias fixadas com glutaraldeído, sem diminuir significativamente a viabilidade e a aderência das células alveolares. A função fagocítica de macrófagos alveolares pode ser recuperada através do retorno destas células as condições ótimas de oxigênio como mostrado por SHENNIB et al., 1984.

Macrófagos submetidos a hipóxia devem ser ativados mais facilmente do que macrófagos mantidos em normóxia, porque sintetizam maior quantidade de iNOS e de várias citocinas (ALBINA et al., 1995). Em macrófagos a iNOS é responsável pela produção de NO em associação a ativadores como o IFN- γ e TNF- α na presença de LPS (lipopolissacarídeo) ou ainda uma combinação de ambas citocinas (FUKUTO & CHAUDHURI, 1995; STUEHR, 1997).

Resumidamente podemos concluir que a hipóxia é uma situação a que os macrófagos se adaptam, modificam seu fenótipo, alterando seu metabolismo, a produção de linfocinas pró-inflamatórias, de proteínas do choque térmico e da enzima iNOS e as atividades exocíticas, endocíticas e fagocíticas, mas não há dados na literatura sobre alteração fenotípica de macrófagos submetidos a hipóxia e infecção.

Outra alteração fenotípica que células, em geral, sofrem em ambiente hipóxico refere-se a expressão de proteínas do choque térmico (HSPs) (HAMMERER-LERCHER et al., 2001; CHI & KARLINER, 2004)

HSPs tem sua expressão aumentada devido a vários estresses patológicos tais como isquemia, estresse oxidativo, hipóxia, exposição a metais pesados e choque térmico. Durante tais injúrias celulares, HSPs são responsáveis por reparar ou degradar proteínas denaturadas (HIGHTOWER, 1991; PELHAM, 1986;

HAMMERER-LEUCHER et al., 2001). Essa citoproteção mantém a conformidade das proteínas e a homeostase, desse modo aumentando a habilidade da célula para sobreviver ao estresse metabólico ou oxidativo. Na ausência do estresse, muitas HSPs exercem importante papel nos processos celulares normais (HAMMERER-LEUCHER et al., 2001). Elas facilitam o desdobraimento, reunião e separação, assim como a translocação de outras proteínas. Há diferentes famílias de HSP classificadas de acordo com seus pesos moleculares em kilodalton (kDa). Uma das HSPs melhor caracterizada é a proteína de 72 kDa da família da HSP70 que tem sido associada à proteção celular e sobrevivência de macrófagos a baixas concentrações de oxigênio (HAMMERER-LEUCHER et al., 2001; YUN et al., 1997b). A expressão de HSP70 em macrófagos durante hipóxia foi pouco estudada. YUN et al. (1997b) observaram que células RAW têm expressão diminuída em relação a macrófagos selecionados.

Em outros sistemas celulares a expressão de HSP70 durante a hipóxia foi bastante estudada. HSP70 é induzida em resposta a hipóxia/reoxigenação em células e tecidos incluindo cérebro de ratos (FERRIERO et al., 1990), cultura de cardiomiócitos de ratos (IWAKI et al., 1993), células epiteliais humanas (TURMAN et al., 1997) e astrócitos primários de ratos (UEHARA et al., 1999), desse modo aumentando sua sobrevivência durante períodos de baixa concentração de oxigênio (KUMAR & KLEIN, 2004). Contudo, em células endoteliais que são tolerantes a hipóxia, períodos prolongados de baixa concentração de oxigênio reduz a expressão de HSP70 enquanto não altera a viabilidade e estimula a atividade e a expressão de enzimas glicolíticas (GRAVEN & FARBER, 1997; GRAVEN et al., 1993; OEHLER et al., 2000). Bloqueio no aumento da HSP70

conduz a um aumento da susceptibilidade das células a hipóxia/reoxigenação (NAKANO et al., 1997).

Quando células são expostas a hipóxia crônica, a resposta protetora pode falhar, resultando em apoptose (KUMAR & KLEIN, 2004). Estudos *in vivo* e *in vitro* sugerem que as HSPs tem um importante papel na regulação da apoptose. Uma das hipóteses proposta é que HSP70 é capaz de inibir a apoptose por impedir a liberação da citocromo c da mitocôndria (CHRISTIANS et al., 2002). Além disso, há evidências sugerindo que além de HSP70, HSP90 e outras HSPs de baixo peso molecular podem também fornecer um papel anti-apoptótico por agir possivelmente em associação com HSP70 (LIN et al., 2001; KAMRADT et al., 2001).

Embora um grande número de informações já tenha sido avaliado, são necessárias ainda muitas informações sobre os mecanismos pelo qual hipóxia afeta a expressão de proteínas (KUMAR & KLEIN, 2004).

A *L. amazonensis*, a espécie que utilizamos em nossos estudos, provoca lesões cutâneas em humanos e em linhagens murinas susceptíveis, caracterizadas por um grande número de amastigotas em divisão, migração de células inflamatórias (McELRATH et al., 1987), infecções secundárias com bactérias aeróbicas e anaeróbicas e mudanças no fluxo sanguíneo tecidual (EL-ON et al., 1992; GIORGIO et al., 1998), que devem resultar em isquemia local e hipóxia. Alguns estudos, realizados em sistema *in vitro*, têm mostrado que macrófagos sofrem mudanças após a infecção, como por exemplo, o aumento da resistência a apoptose, a diminuição da expressão de moléculas de MHC (complexo de histocompatibilidade principal) e a inibição da produção de

intermediários reativos de oxigênio e nitrogênio (OVERATH & AEBISCHER, 1999). Entretanto, as avaliações destes parâmetros em células infectadas cultivadas em baixa pO_2 , situação que deve ocorrer nas lesões, não foram realizadas. Como também não foi avaliado se assim como os macrófagos normais, que em hipóxia alteram o seu metabolismo, a produção de citocinas, de proteínas de choque térmico e da enzima iNOS, e as suas atividades fagocíticas, macrófagos infectados, cultivados em baixa pO_2 , sofrem as mesmas alterações.

1.6- Hiperóxia e Oxigenação Hiperbárica

A terapia hiperbárica é definida como um modelo de tratamento médico na qual pacientes ficam totalmente fechados em uma câmara respirando 100% de oxigênio a uma pressão maior que uma atmosfera absoluta (atm). A hiperóxia (pO_2 340-760 mmHg; 45-100% O_2) e a oxigenação hiperbárica ($pO_2 > 760$ mmHg) (HBO) tem sido utilizadas para o tratamento de infecções *in vivo* e em alguns estudos *in vitro*. Apesar de eficaz para o tratamento de várias patologias como a osteomielite, as úlceras crônicas e lesões traumáticas, a suplementação de oxigênio, ainda é controversa na terapia de outras doenças infecciosas (GARNER et al., 1989; GENNARI & ALEXANDER, 1996; MOON & CAMPORESI, 1999). A terapia através da oxigenação hiperbárica tem sido ampliada para tratamentos de artrites e doenças auto-imunes e tem demonstrado ser efetiva em alguns casos (INAMOTO et al., 1991). Pacientes com lupus eritematoso sistêmico tratados com HBO apresentaram graduais diminuições nos níveis de imunoglobulinas no soro

durante o tratamento. Isto sugere que a HBO pode alterar a função imune (INAMOTO et al., 1991).

Desde a década de 60 câmaras hiperbáricas são usadas como adjuvante na terapia com antibióticos e cirurgias de tecidos moles. Análises de dados publicados na literatura mostraram que as taxas de sobrevivência e a recuperação de pacientes são mais elevadas com o uso de oxigenação hiperbárica (CLARK & MOON, 1999). O racional para o uso de oxigenação hiperbárica, baseia-se no fato de que tecidos infectados ou lesados apresentam micro áreas hipóxicas que se expandem devido à perfusão deficiente e ao aumento do consumo de oxigênio por células e microrganismos infectantes em proliferação. A oxigenação hiperbárica eleva os níveis sistêmicos e locais do oxigênio necessário para a produção de ATP, a síntese de proteínas, e a produção de espécies reativas das quais o oxigênio é o substrato. A oxigenação hiperbárica também induz a migração de fibroblastos e a produção e hidroxilação de colágeno nos tecidos lesados, aumentando a cicatrização (CLARK & MOON, 1999).

A formação celular de espécies reativas do oxigênio, que aumenta durante a exposição a hiperóxia, é considerada principal fator na toxicidade do oxigênio (BRUNKER & BROWN, 1971), podendo ser tóxico a vários microrganismos. Em fungos, por exemplo, a exposição à elevada tensão de O₂ pode afetar a viabilidade ou o crescimento, dependendo do tempo de exposição e da pressão em que espécies de *Candida* e *Rhizopus* são cultivadas (GUDEWICZ et al., 1987). O ambiente hiperóxico também é tóxico para vários parasitas como *Giardia lamblia*, *Entamoeba histolytica*, *Pneumocystis carinii* e *Schistosoma mansoni* (GILLIN & DIAMOND, 1981; PESANTI, 1984; MJOKI et al., 1988; NARE et al., 1990).

Leishmania apesar de possuir defesas antioxidantes, tais como a expressão de superóxido dismutase, glutathione peroxidase e “thiol-specific antioxidant protein” (WEBB et al, 1998), é lisada por intermediários reativos de oxigênio e nitrogênio (revisto por AUGUSTO et al., 1996). Apenas um trabalho relata que formas promastigotas de *Leishmania* foram mais susceptíveis a anfotericina B quando em ambiente hiperóxico (MUHVICH et al., 1993). Os autores não estudaram os efeitos da HBO em amastigotas e em macrófagos infectados. Vários antibióticos, fungicidas e drogas antiparasitárias, principalmente os nitrocompostos, tem atividade aumentada *in vitro* e *in vivo* em ambiente hiperóxico e durante a oxigenação hiperbárica (PARK et al., 1992).

Os efeitos colaterais da hiperóxia e oxigenação hiperbárica em humanos, animais e em células de mamíferos são controversos (GARNER et al., 1989; MONN & CAMPORESI, 1999). Macrófagos peritoneais de camundongos tratados em HBO apresentam atividades citostáticas e síntese de peroxinitrito diminuídas (KURATA et al., 1995). Diminuições na secreção de citocinas (IL1, IL6) em resposta a LPS foram observadas em macrófagos humanos de pacientes tratados em HBO (WEISZ et al., 1997). Também em macrófagos esplênicos murinos foi observado que a HBO inibiu a secreção de interleucina 1 (IL1) mas não afetou a atividade fagocítica destes (INAMOTO et al., 1991). Contudo, macrófagos alveolares em culturas hiperóxicas mostraram índices de fagocitose baixos, mas quando retornam a ambiente normóxico produzem mais intermediários reativos de oxigênio e fagocitam mais eficientemente (DEDHIA et al., 1993). Na literatura não há dados relacionados a macrófagos infectados com *Leishmania* e submetidos a HBO.

Resumidamente, o efeito adjuvante de oxigenação hiperbárica na ação de drogas como os nitrocompostos, o efeito positivo no tratamento de infecções por bactérias e fungos, a observação de poucos efeitos tóxicos em pacientes, animais e células, e a susceptibilidade de *Leishmania* a intermediários reativos de oxigênio e nitrogênio, são fatores que sugerem uma atividade terapêutica da hiperóxia nessa parasitose.

2. OBJETIVOS

Analisar o papel terapêutico e/ou deletério da hipóxia e da oxigenação hiperbárica (HBO) em modelos *in vitro* de uma infecção intracelular, como a leishmaniose.

Especificamente pretendemos:

1. Avaliar mudanças fenotípicas de macrófagos murinos submetidos a ambiente com reduzida pO_2 tais como: resistência/susceptibilidade a infecção com *L. amazonensis*, resposta a citocina IFN- γ e LPS, produção de iNOS e expressão de HSP70.
2. Analisar se os macrófagos murinos em HBO apresentam susceptibilidade/resistência diversa daquela observada em normóxia à infecção com *L. amazonensis*.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Lista de compostos utilizados e procedências

Meio RPMI 1640	Sigma* e CultiLab, Campinas, SP, Brasil
Bicarbonato de Sódio	Sigma
Soro Fetal Bovino (SFB) inativado	CultiLab, Campinas, SP, Brasil
HEPES (ácido hidroxietil piperazina etanosulfúrico)	Sigma e CultiLab, Campinas, SP, Brasil
Interferon gama (IFN- γ)	R&D Systems, Inc.
Lipopolissacarídeos de <i>E. coli</i> (LPS)	Sigma
Gentamicina	Sigma
Cell Growth Determination Kit, MTT Based	Sigma
Pepstatin A	Protease Inhibitor Cocktail Set III – Calbiochem
SDS (Sódio Dodecil Sulfato)	°Amersham Pharmacia Biotech
Reagente de Griess	Sigma

* Sigma Chemical Co., St Louis, Missouri, USA

° Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, USA

3.1- Animais

Camundongos isogênicos da linhagem BALB/c/Unicamp, fêmeas com idade entre 6 e 12 semanas e SPF (Specific Patogen Free), fornecidos pelo Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica – CEMIB/UNICAMP foram mantidos no Biotério do Departamento de Parasitologia do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas durante o decorrer dos experimentos.

3.2- Meio de Cultura

O meio de cultura utilizado nas culturas de parasitas e macrófagos foi o RPMI 1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) inativado a 56°C durante 1 hora, 20mM de bicarbonato de sódio, 10mM de tampão HEPES e 25 µg/ml de Gentamicina.

3.3- Obtenção e manutenção do parasita

O parasita utilizado em nosso trabalho foi a *Leishmania amazonensis* (MHOM/BR/73/M2269).

Formas amastigotas foram mantidas em camundongos BALB/c através da inoculação via subcutânea de 2×10^6 parasitas no coxim plantar de uma das patas traseiras. Os amastigotas foram retirados de lesões, desenvolvidas nas patas desses animais, através de raspagens com bisturi estéril em solução salina suplementada com gentamicina. A suspensão obtida foi filtrada em gaze estéril para retirada de resíduos (protocolo adaptado de CANTOS et al., 1993). O número de amastigotas foi contado em câmara de Neubauer.

3.4- Obtenção e cultura de macrófagos peritoneais murinos

Camundongos isogênicos BALB/c foram sacrificados por deslocamento cervical. Com auxílio de seringa estéril descartável, injetou-se 15 ml de solução salina estéril suplementada com gentamicina no peritônio do camundongo; o abdômen do animal foi massageado e a pele rebatida. Novamente introduziu-se a seringa na cavidade peritoneal do animal para retirada do exsudato, armazenando-o em frasco imerso em banho de gelo. O número de células foi contado em câmara de Neubauer, considerando-se que 50 a 60% das células obtidas constituíam-se de macrófagos (BARBIERI et al., 1993). Um volume de exsudato necessário para obter 5×10^5 macrófagos aderidos por lamínula foi transferido para placas de cultura de 24 poços (Corning, TRP), contendo lamínulas redondas de 13mm de diâmetro (Glass Técnica), incubando-o por 2 horas a 37°C. Após a adesão dos macrófagos nas lamínulas o exsudato foi retirado e adicionou-se meio RPMI 1640. A cultura foi incubada em estufa úmida a 5% CO₂, O₂ atmosférico a 37°C durante 24 horas.

3.5- A linhagem celular murina J774

Os macrófagos da linhagem J774 (RALPH & NAKOINZ, 1977) foram cultivados no laboratório nas condições descritas por LINARES et al., 2000. Resumidamente, as células foram cultivadas em meio RPMI 1640, em frascos plásticos de 25 ou 75 cm² (Corning, TRP) mantidas em estufa a 5% CO₂, O₂ atmosférico a 37°C e repicadas a cada 7 dias.

3.6- Infecção das culturas de macrófagos com *Leishmania amazonensis*

As culturas de macrófagos peritoneais murinas foram infectadas com 3 amastigotas para cada macrófago e incubadas por 1 hora a temperatura ambiente. Após este período o meio de cultura foi retirado e adicionou-se meio de cultura fresco. As culturas foram incubadas em estufa úmida a 5% CO₂, O₂ atmosférico a 37°C. As culturas de macrófagos J774 cultivadas em frascos plásticos foram infectadas na proporção 10:1 (parasita: célula) (ARRAIS-SILVA, 2003, COLHONE et al., 2004) e incubadas em estufa úmida a 5% CO₂, O₂ atmosférico a 37°C por 24 horas. Para a avaliação do número de células, de parasitas e a porcentagem de infecção, as lamínulas com os macrófagos aderidos e infectados foram fixadas em metanol (10 min) e coradas com Giemsa (10 min) (Sigma) (GIORGIO & BARÃO, 1998) e avaliados em microscópio óptico.

3.7- Ativação das culturas de macrófagos com IFN- γ e LPS

As culturas de macrófagos peritoneais murinos (5×10^5 cel/ml) e as culturas de macrófagos J774 (1×10^7 cel/ml) foram incubadas com a linfocina recombinante IFN- γ (20ng/ml e 500ng/ml, respectivamente) e LPS (10ng/ml e 300ng/ml, respectivamente) durante 24 horas. Após lavagem das culturas com meio RPMI, as células foram infectadas e submetidas aos diferentes tratamentos como descrito no item 3.9 e 3.12, fixadas e coradas com Giemsa.

3.8- Ambiente hipóxico

O ambiente hipóxico foi estabelecido lavando-se durante 15 minutos uma câmara incubadora (Billups-Rothenberg, modelo MIC 101) com mistura gasosa padrão primário (White Martins – Campinas) com 2% de Oxigênio, 5% CO₂ e balanceada com Nitrogênio. Em seguida, as mangueiras de entrada e saída de gás eram fechadas e a câmara mantida em estufa a 5% CO₂, O₂ atmosférico a 37°C.

Para aferir o grau de hipóxia dentro da câmara foi utilizado um analisador de gás (testoryt/confort), com uma solução absorvente de oxigênio (Oxsorbent – EUA). Após a lavagem da câmara, a entrada de gás foi fechada e a saída foi acoplada a extremidade do analisador. Por meio de compressão de uma pêra acionada por 18 vezes sucessivas, o ar de dentro da câmara entrou em contato com a solução absorvente dentro do analisador e depois de homogeneizada a solução, mediu-se a concentração de oxigênio que, em nossos experimentos, foi de 5%. A tensão de oxigênio no meio de cultura sob condições hipóxicas foi de 37mmHg e 150mmHg sob condições normóxicas. O pH do meio foi 7.4 e não mudou significativamente durante o curso dos experimentos.

3.9- Cultivo em hipóxia de macrófagos peritoneais murinos e macrófagos J774

As culturas de macrófagos peritoneais foram infectadas com *L. amazonensis* em ambiente hipóxico (câmara incubadora modular com 5% de O₂, 5% CO₂, balanceado com N₂) por 1 hora. Após o tempo de infecção, as culturas foram retiradas da hipóxia e o meio de cultura foi substituído por meio de cultura

fresco. As culturas foram novamente submetidas ao ambiente hipóxico (5% de O₂, 5% CO₂, balanceado com N₂) por 24 e 48 horas. As culturas de macrófagos que foram expostas durante 24 horas a hipóxia, após esse período permaneceram por mais 24 horas em normóxia. Culturas controles de macrófagos peritoneais foram mantidas em ambiente normóxico (estufa incubadora com 21% O₂, 5% CO₂) durante todo o decorrer dos experimentos. Culturas de macrófagos peritoneais não infectadas foram pré-expostas às condições hipóxicas (5% de O₂, 5% CO₂, balanceado com N₂) por 24 horas. Após a retirada do meio de cultura e adição de meio novo, as culturas foram mantidas em normóxia (estufa incubadora com 21% O₂, 5% CO₂) por 24 horas. Após o período de recuperação, as culturas foram infectadas e mantidas em ambiente normóxico por mais 24 horas.

Macrófagos J774 infectados ou não com amastigotas de *L. amazonensis* foram mantidos em meio de cultura RPMI 1640 a 37°C em normóxia (estufa incubadora com 21% O₂, 5% CO₂) ou hipóxia (câmara incubadora modular com 5% de O₂, 5% CO₂, balanceado com N₂) por 24 horas. Após este período, as células aderidas foram soltas com auxílio de um “scrapper”, e contadas em câmara de Neubauer, para determinação da viabilidade. As células então transferidas para um tubo foram centrifugadas a 1500 rpm por 10 minutos, lavadas com PBS (tampão salina-fosfato) e centrifugadas novamente. O sobrenadante foi descartado e o “pellet” congelado para posterior uso nos experimentos de “imunoblot”.

3.10- Avaliação da viabilidade dos macrófagos e do parasita

A viabilidade dos macrófagos peritoneais, macrófagos J774 e formas amastigotas de *L. amazonensis* foi determinada através do teste do MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide). Macrófagos e formas amastigotas do parasita foram cultivados em placas de cultura de 96 poços (Corning, TRP) em meio RPMI 1640 e mantidos em hipóxia ou normóxia durante 24h. Em cada poço foi adicionado o MTT (10µl em 100µl do meio de cultura), e as placas foram então incubadas a 37°C por 4h. Após este período, foi retirado todo o meio de cultura e adicionado 100µl de isopropanol por 1 hora a temperatura ambiente e em constante agitação. A viabilidade celular foi medida em diferentes comprimentos de ondas conforme metodologia descrita por MOSMANN (1983).

A viabilidade dos parasitas também foi avaliada através da lise de macrófagos infectados pelo SDS (BERTOLET & MAUEL, 2000). Culturas de macrófagos J774 infectados com amastigotas de *L. amazonensis* foram mantidos em ambiente hipóxico ou normóxico durante 24 horas. Após este período, as células foram soltas e retirou-se 1ml do meio de cultura, transferiu-se para um tubo com adição de 0,01% de SDS. As culturas permaneceram em normóxia (estufa incubadora com 21% O₂, 5% CO₂, 37°C) por 10 minutos. Após este período, o tubo foi agitado rapidamente em vortéx e os amastigotas recuperados dos macrófagos foram então transferidos para placas de culturas de 96 poços (Corning, TRP) e posteriormente incubados por 3 dias a 26°C (condições de cultura de promastigotas). A transformação em promastigotas foi analisada por contagem das formas flageladas. Também foram feitas culturas controles não submetidas à ação do SDS. O número de amastigotas intracelulares viáveis

recuperadas das culturas de macrófagos foi determinado por coloração com eritrosina B (Sigma).

3.11- Análise da produção de nitrito

Macrófagos peritoneais murinos foram cultivados em meio RPMI a uma concentração de 5×10^5 célula/ml. Os sobrenadantes das culturas celulares (ativadas ou não com IFN- γ e LPS conforme item 3.7) em ambiente hipóxico ou normóxico foram coletados após 24 horas de cultura e congelados a -20°C . A produção de óxido nítrico foi dosada indiretamente através da concentração de seu metabólito no meio de cultura (nitrito), pelo método de Griess (GREEN et al., 1984). Resumidamente, os sobrenadantes foram descongelados e um volume de 100 μl foi colocado em placa de 96 poços (Corning, TRP), adicionando-se igual quantidade de reagente de Griess. As placas foram incubadas a temperatura ambiente por 15 minutos e a quantificação colorimétrica foi realizada em 540 nm em leitor de ELISA. A curva padrão foi feita com nitrito.

3.12- Cultivo de macrófagos em oxigenação hiperbárica (HBO)

Os experimentos com oxigenação hiperbárica foram realizados em uma câmara hiperbárica (Research Chamber, model HB 1300B, Sechrist Inc., Anaheim, CA – USA) pressurizada com 100% de O_2 medicinal (White Martins – Campinas) até a pressão de 2,5 ATA. Macrófagos peritoneais murinos infectados com amastigotas de *L. amazonensis* foram cultivados a 37°C em normóxia (estufa incubadora com 21% O_2 , 5% CO_2) ou submetidas às condições hiperbáricas (HBO). Após o tempo de infecção (item 3.6), as culturas permaneceram em

normóxia por 1 hora antes de serem submetidas a HBO. Após este período, as culturas de macrófagos infectados com *L. amazonensis* foram submetidas durante 2 horas a HBO. Culturas controles permaneceram em normóxia. Posteriormente, as culturas que passaram pela HBO e as culturas controles foram mantidas em condições normóxicas (estufa incubadora com 21% O₂, 5% CO₂) por 24 horas. A porcentagem de infecção e o número de amastigotas por macrófagos foram determinados em lâminas coradas com Giemsa.

3.13- Choque térmico de macrófagos

Culturas de macrófagos J774 foram mantidas em suspensão e incubadas em banho-maria a 44°C por 30 minutos e, em seguida, mantidas a 37°C por 6 horas (modificado de SZABO et al., 1996). Depois do choque térmico e posterior recuperação, as células aderidas foram soltas com ajuda de “scraper”, recolhidas em um tubo e contadas em câmara de Neubauer, com determinação da viabilidade. As células no tubo foram centrifugadas a 1500 rpm por 10 minutos, lavadas com PBS e centrifugadas novamente. O sobrenadante foi descartado e o “pellet” congelado para posterior uso nos experimentos de “imunoblot”.

3.14- Técnica do Western Blotting para a análise da expressão da enzima iNOS e da proteína de choque térmico HSP70 em macrófagos

As concentrações de proteínas dos macrófagos J774 foram inicialmente determinadas pelo método de Bradford (BioRad, E.U.A).

Amostras congeladas (-20°C) de macrófagos J774 submetidos a diferentes tratamentos (choque térmico, ativação, infecção e hipóxia) foram ressuspensas

em tampão de lise (0,0625M Tris-HCl, pH 6,8; 10% glicerol; 2% SDS; 2% beta-mercaptoetanol; 1mM PMSF (fluoreto de fenilmetanossulfonila); 1,3% EDTA (ácido etilenodiamino tetra-ácido) e 2µg/ml Pepstatin A). As amostras foram então fervidas a 95°C por 3 minutos e imediatamente colocadas em gelo. Amostras com concentração protéica de 25 e 50µg foram aplicadas em gel de SDS-poliacrilamida 10% para detecção de HSP70 e iNOS respectivamente. A eletroforese foi efetuada a 120mA constantes, 220V por 4 horas (fonte Thermo EC, Amersham Pharmacia Biotech). Posteriormente, as proteínas foram transferidas do gel para membrana de nitrocelulose (Hybond-ECL, Amersham Pharmacia Biotech) a 120mA, 200V durante 1 hora e 30 minutos. Após transferência, a membrana de nitrocelulose foi bloqueada durante 1 hora com 5% de leite em pó desnatado em PBS e então incubada com anticorpo monoclonal de camundongo anti-HSP70 (1:600) (Sigma) ou anti-iNOS (1:100) (Sigma) “overnight” a 4°C. A membrana de nitrocelulose foi lavada com PBS-tween20 (0,1%) durante 30 minutos em constante agitação e posteriormente incubada com anticorpo de coelho anti-IgG de camundongo conjugado a peroxidase (Sigma) (diluição 1:400 para blotting com HSP70 e diluição de 1:90 para blotting com iNOS) durante 2 horas. Novamente a membrana de nitrocelulose foi lavada com PBS-tween20 (0,1%) por 30 minutos em constante agitação, revelada com DAB (3,3'-Diaminobenzidine) (Sigma) e H₂O₂ 30% (peróxido hidrogênio, Sigma) e bloqueada com água destilada. A membrana de nitrocelulose com as bandas reveladas foi digitalizada em Scanner (Hewlett Packard) e as imagens armazenadas em arquivos “Tif”. A análise da intensidade das bandas nos imunoblots foi realizada em densitômetro óptico Image Master Total Lab versão 1.00 (Amersham Pharmacia Biotech).

3.15- Análise estatística

Foi utilizada a análise de 1 via (ANOVA) seguida pelo teste t-Student. Os valores foram considerados estatisticamente diferentes quando o valor de p era menor ou igual a 0,05. O teste estatístico foi realizado no software GraphPad InStat versão 3.0 (1997).

4. RESULTADOS

4.1- Avaliação dos efeitos da hipóxia na infecção de macrófagos peritoneais murinos com formas amastigotas de *L. amazonensis*.

Com o objetivo de avaliar o efeito do ambiente hipóxico (5% de O₂) na infecção de macrófagos peritoneais murinos com *L. amazonensis*, as células foram mantidas durante 24 e 48 horas tanto em ambiente normóxico (21% de O₂) como hipóxico. Observamos que a porcentagem de infecção dos macrófagos peritoneais murinos mantidos em ambiente hipóxico durante 24 horas foi significativamente menor (cerca de 60%) quando comparada à porcentagem de infecção de culturas mantidas em ambiente normóxico (cerca de 90%). Houve, assim, uma redução de células infectadas de cerca de 30% quando as culturas foram mantidas em hipóxia (fig. 1). Em relação ao número de amastigotas intracelulares, também observou-se uma redução significativa nas culturas de macrófagos em hipóxia (Fig. 2). A média de amastigotas por macrófago foi de 3 para culturas em hipóxia comparado a média de 4 amastigotas por macrófagos para culturas em normóxia (Fig. 2).

Estes resultados sugerem que macrófagos mantidos durante 24 horas em hipóxia reduzem a porcentagem de infecção e conduzem a destruição de amastigotas intracelulares de *L. amazonensis* pelo macrófago.

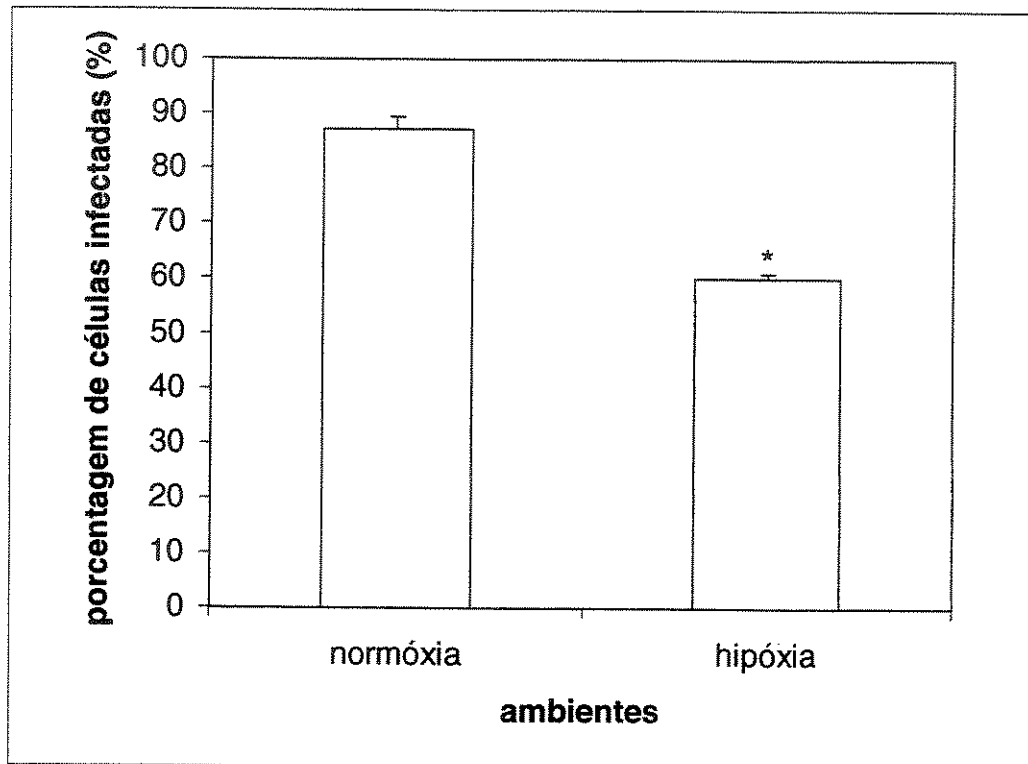


Figura 1. Efeito de um período de hipóxia de 24h em macrófagos peritoneais murinos infectados com amastigotas de *L. amazonensis*. Macrófagos peritoneais (5×10^5 cel/ml) foram infectados com amastigotas na proporção 3:1 (parasita: célula) e mantidos em ambiente hipóxico (5% de O_2 , 5% CO_2 , balanceado com N_2) ou normóxico (20,8% O_2 , 5% CO_2 e N_2 atmosférico) durante 24h. Após este período, as culturas permaneceram em normóxia por mais 24 horas. A porcentagem de células infectadas foi determinada em lâminulas coradas com Giemsa. Dados de um experimento representativo. Diferenças significativas entre condições normóxicas e hipóxicas. *P < 0,05.

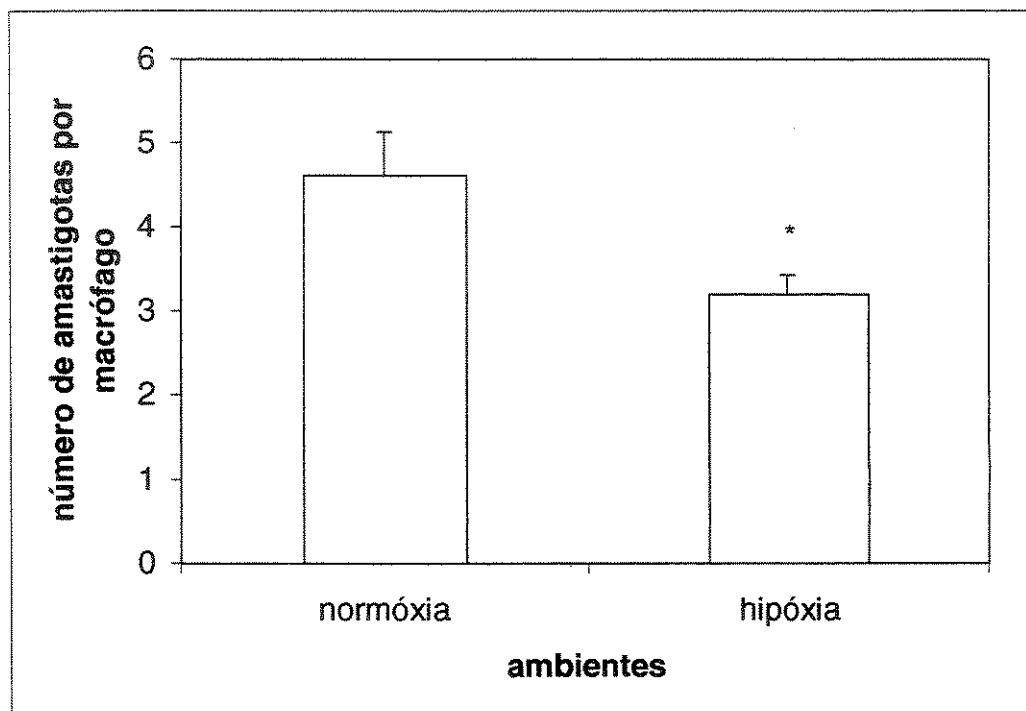


Figura 2. Efeito de um período de hipóxia de 24h em macrófagos peritoneais murinos infectados com amastigotas de *L. amazonensis*. Macrófagos peritoneais (5×10^5 cel/ml) foram infectados com amastigotas na proporção 3:1 (parasita: célula) e mantidos em ambiente hipóxico (5% de O_2 , 5% CO_2 , balanceado com N_2) ou normóxico (20,8% O_2 , 5% CO_2 e N_2 atmosférico) durante 24h. O número de amastigotas por célula foi determinado em lâminulas coradas com Giemsa. Dados de um experimento representativo. Diferenças significativas entre condições normóxicas e hipóxicas. * $P < 0,05$.

Culturas de macrófagos peritoneais que foram expostas às condições hipóxicas por tempo mais longo, 48 horas, também mostraram diminuição na porcentagem de células infectadas e no número de amastigotas por célula. Culturas de células em condições hipóxicas apresentaram uma significativa redução da porcentagem de infecção de cerca de 32% quando comparadas às culturas mantidas em ambiente normóxico (Fig. 3). O número de amastigotas por macrófagos também foi significativamente menor em ambiente hipóxico, observando-se uma diminuição de cerca de 33% quando comparado ao ambiente normóxico (Fig. 4).

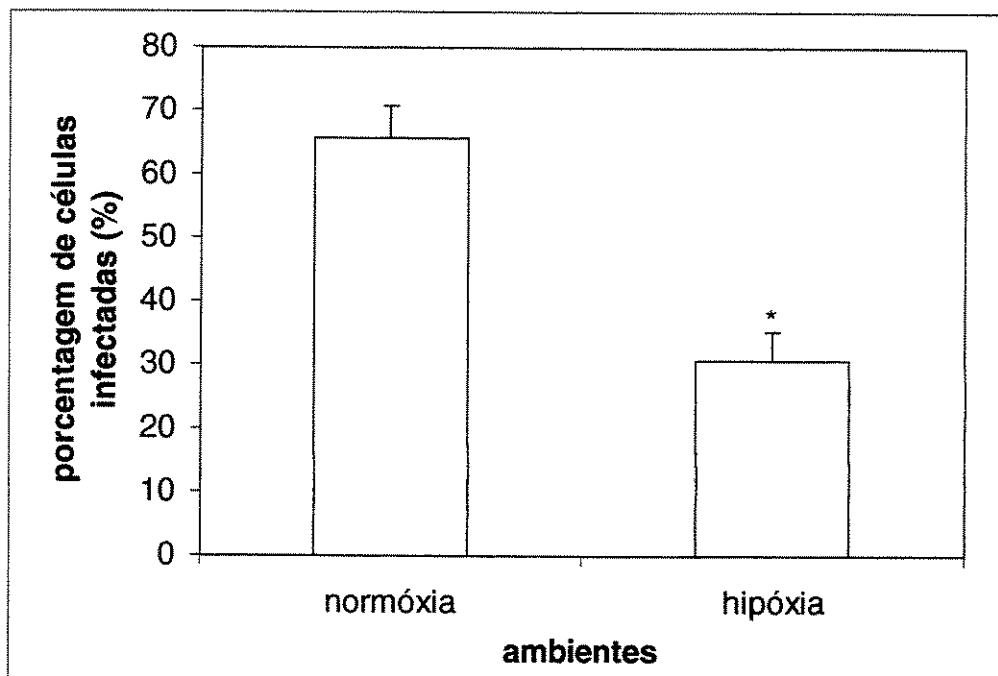


Figura 3. Efeito de um período de hipóxia de 48h em macrófagos peritoneais murinos infectados com amastigotas de *L. amazonensis*. Macrófagos peritoneais (5×10^5 cel/ml) foram infectados com amastigotas na proporção 3:1 (parasita: célula) e mantidos em ambiente hipóxico ou normóxico durante 48h. A porcentagem de células infectadas foi determinada em lamínulas coradas com Giemsa. Dados de um experimento representativo. Diferenças significativas entre condições normóxicas e hipóxicas. * $P < 0,05$.

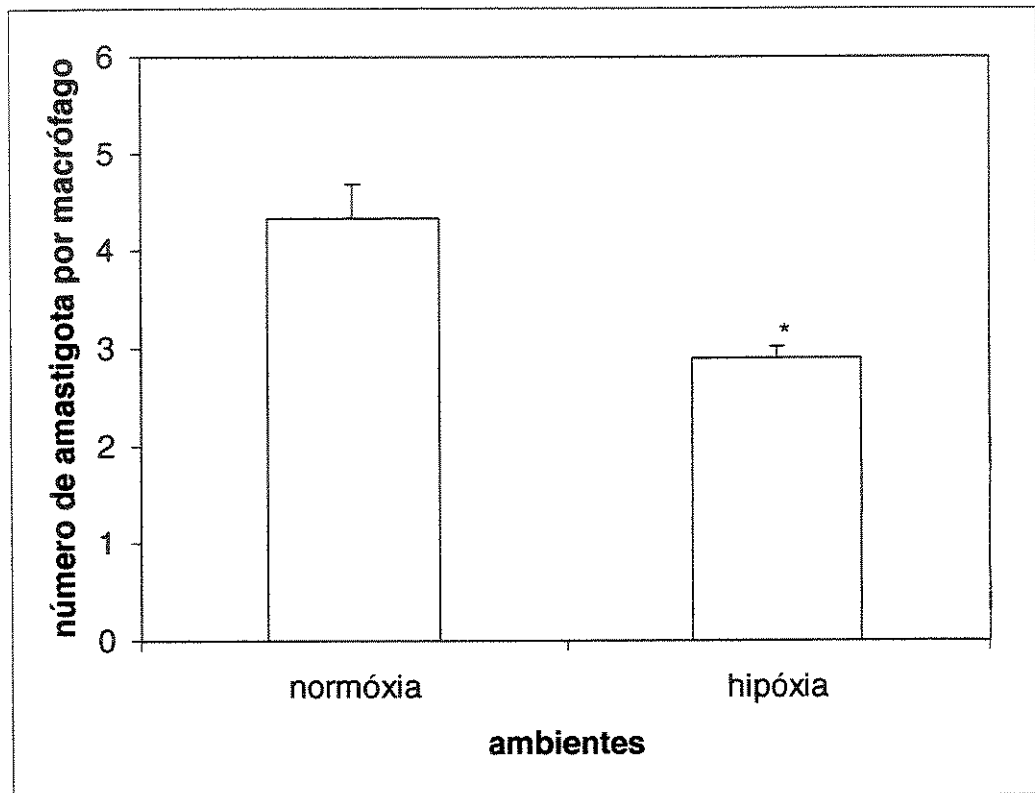


Figura 4. Efeito de um período de hipóxia de 48h em macrófagos peritoneais murinos infectados com amastigotas de *L. amazonensis*. Macrófagos peritoneais ($5 \times 10^5/\text{ml}$) foram infectados com amastigotas na proporção 3:1 (parasita: célula) e mantidos em ambiente hipóxico ou normóxico durante 48h. O número de amastigotas por célula foi determinado em lâminulas coradas com Giemsa. Dados de um experimento representativo. Diferenças significativas entre condições normóxicas e hipóxicas. * $P < 0,05$.

Para avaliar se a redução da infecção observada em culturas de macrófagos submetidos a hipóxia (Fig. 1 e 4) foi devido a uma menor fagocitose de parasitas por macrófagos peritoneais submetidos às condições hipóxicas, a porcentagem de infecção das culturas submetidas a hipóxia e normóxia foi analisada após 15 minutos de contato dos macrófagos com *L. amazonensis*. Como mostra a figura 5, uma similar porcentagem de macrófagos peritoneais contendo parasitas intracelulares imediatamente após infecção é observada em ambas culturas mantidas em ambientes hipóxicos e normóxicos.

Esses resultados indicam que a fagocitose do parasita é semelhante para macrófagos cultivados sob condições normóxicas ou hipóxicas.

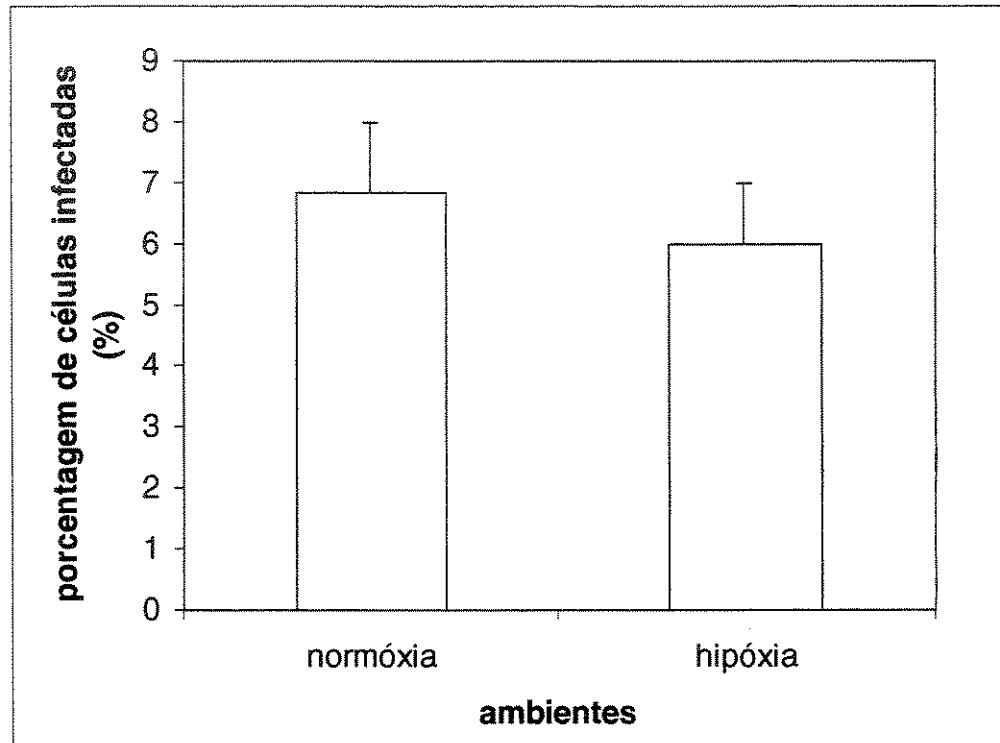


Figura 5. Efeito da hipóxia em macrófagos peritoneais murinos infectados com amastigotas de *L. amazonensis*. Macrófagos peritoneais (5×10^5 cel/ml) foram infectados com amastigotas na proporção 3:1 (parasita: célula) em ambiente hipóxico ou normóxico durante 15 min. A porcentagem de células infectadas foi determinada em lamínulas coradas com Giemsa. Dados de um experimento representativo.

Para avaliar se a hipóxia poderia ser um fator que altera a capacidade fagocítica e metabólica dos macrófagos, avaliamos se estas células pré-expostas a hipóxia teriam sua capacidade fagocítica alterada. Observamos que culturas de macrófagos que foram pré-expostos a hipóxia durante 24 horas e posteriormente infectados mostraram uma porcentagem de infecção significativamente similar às culturas de macrófagos que foram mantidas em ambiente normóxico (Fig. 6).

Nossos dados descartam assim a hipótese de que um possível efeito tóxico da baixa concentração de oxigênio utilizada (5% de O₂) em culturas de macrófagos estaria relacionado à redução da porcentagem de infecção observada em células em hipóxia.

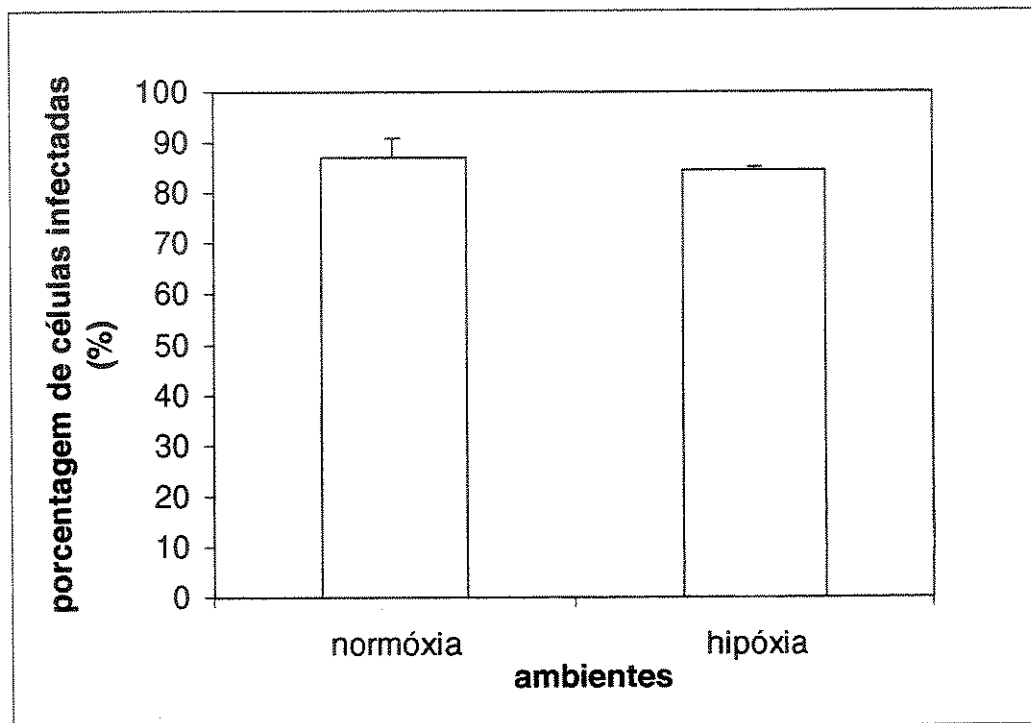


Figura 6. Pré-exposição de macrófagos peritoneais murinos ao ambiente hipóxico.

Macrófagos peritoneais ($5 \times 10^5/\text{ml}$) não infectados foram pré-expostos às condições hipóxicas durante 24h. Após este período, permaneceram mais 24h em normóxia. As culturas foram então infectadas com amastigotas de *L. amazonensis* e mantidas em condições normóxicas durante 24h. A porcentagem de células infectadas foi determinada em lâminulas coradas com Giemsa. Dados de um experimento representativo.

4.2- Avaliação dos efeitos da hipóxia na infecção de macrófagos tumorais murinos da linhagem J774 com formas amastigotas de *L. amazonensis*.

A redução na porcentagem de infecção com *L. amazonensis* de macrófagos em hipóxia não foi observada somente em culturas primárias, mas também em células transformadas. Resultados semelhantes foram obtidos em experimentos com a linhagem tumoral de macrófagos J774. Como mostra a figura 7, baixa porcentagem de macrófagos infectados (cerca de 16%) foi observada em culturas exposta a hipóxia durante 24 horas. As culturas de células incubadas com o parasita sob condições normóxicas mostraram uma porcentagem significativamente maior de células infectadas (cerca de 40%) (Fig. 7).

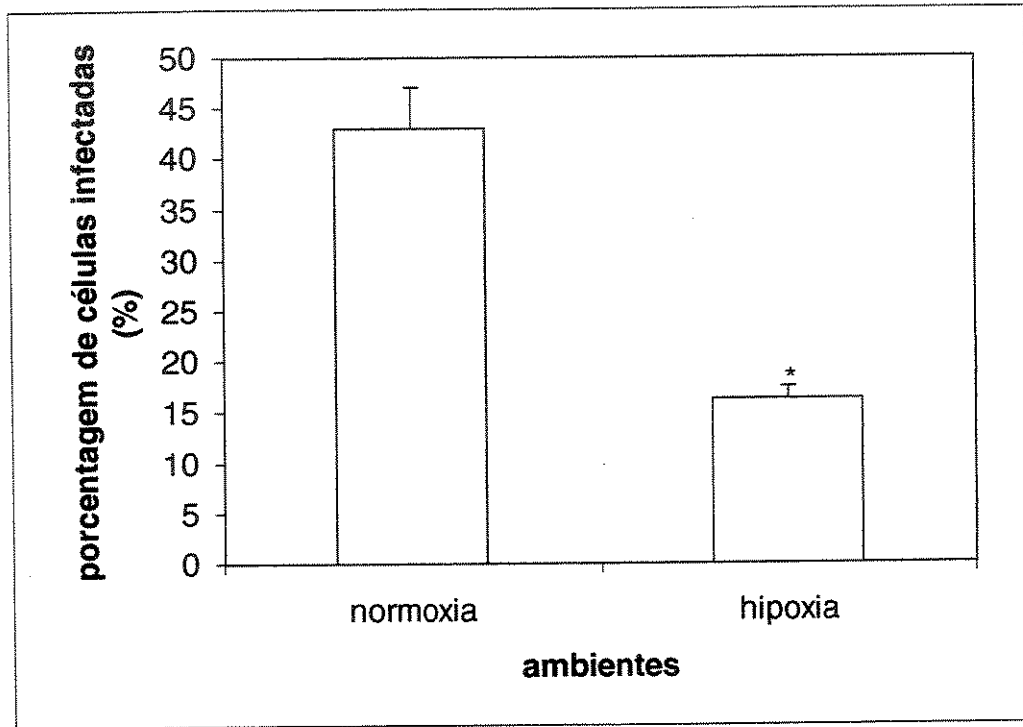


Figura 7. Efeito da hipóxia em macrófagos J774 infectados com amastigotas de *L. amazonensis*. Macrófagos J774 (10^5 células/ml) foram infectados com amastigotas na proporção 10:1 (parasita: célula) em ambiente hipóxico ou normóxico durante 24h. A porcentagem de células infectadas foi determinada em lâminulas coradas com Giemsa. Dados de um experimento representativo. Diferenças significativas entre condições normóxicas e hipóxicas. * $P < 0,05$.

Resultados semelhantes, isto é diminuições na porcentagem de infecção encontrado em macrófagos sob hipóxia foram obtidos em nosso laboratório com a linhagem monocítica humana U937 (COLHONE et al., 2004), assim nossos dados sugerem que macrófagos, primários e de linhagens, murinos ou humanos submetidos a hipóxia são mais resistentes à infecção com *L. amazonensis*.

A redução na porcentagem de infecção e no número de parasita observada em macrófagos submetidos a hipóxia (Fig. 1,3,7 e 2,4) sugerem morte intracelular do parasita. Para avaliar esta hipótese analisamos a viabilidade de amastigotas recuperados após lise com SDS (0,01%) de macrófagos infectados. Como mostra a Tabela 1, uma significativa redução foi observada não somente na viabilidade de amastigotas liberadas de culturas de macrófago sob hipóxia, mas também na sua habilidade de transformação em formas promastigotas de *L. amazonensis*.

Todos os resultados demonstram que a hipóxia conduz a destruição de amastigotas intracelulares de *L. amazonensis* pelo macrófago sem alterar a função fagocítica destas células.

Tabela 1. Avaliação da viabilidade de amastigotas de *L. amazonensis* extraídos de macrófagos.

Ambientes	Número de amastigotas viáveis *	Número de promastigotas transformadas ‡
Normóxia	$2,6 \times 10^5$ /ml	$5,3 \times 10^5$ /ml
Hipóxia	$1,8 \times 10^5$ /ml †	$2,5 \times 10^5$ /ml †

* Macrófagos murinos J774 sob ambiente normóxico ou hipóxico foram infectados com *L. amazonensis*. Após 24h as culturas foram lavadas e lisadas como descrito em Materiais e Métodos. O número de amastigotas intracelulares viáveis recuperadas das culturas de macrófagos foi determinado por coloração com eritrosina B.

‡ Amastigotas recuperadas de macrófagos foram incubadas por 3 dias a 26°C (condições de cultura de promastigotas) e a transformação em promastigotas foi analisada por contagem das formas flageladas. Os valores apresentados são os valores das médias cujo desvio padrão foi consistentemente menor que 10%.

† Diferença significativa entre condições normóxicas e hipóxicas. $P \leq 0,01\%$

4.3- Avaliação do efeito da hipóxia em macrófagos peritoneais ativados com IFN- γ e LPS e infectados com a forma amastigota de *L. amazonensis*.

Nosso próximo passo foi avaliar se a hipóxia modificaria a resposta de macrófagos previamente ativados para matar parasitas. Para tanto, utilizamos um tratamento para ativação de macrófagos, previamente descrito na literatura (LINARES et al., 2000).

Macrófagos peritoneais ativados com IFN- γ e LPS durante 24h são capazes de reduzir a porcentagem de infecção em ambiente normóxico (redução de cerca de 45%). Contudo, a hipóxia não foi capaz de potencializar o efeito leishmanicida observado em macrófagos ativados com IFN- γ e LPS (Fig. 8). Observamos que macrófagos peritoneais ativados com IFN- γ e LPS em hipóxia reduzem a porcentagem de células infectadas tão efetivamente quanto macrófagos ativados com IFN- γ e LPS em normóxia (Fig. 8).

Em relação ao número de amastigotas por células observou-se que culturas de macrófagos sob condições hipóxicas mostraram significativa diminuição no número de parasita por célula (cerca de 30%) quando comparado às culturas de macrófagos sob condições normóxicas (Fig. 9). Pode-se observar ainda que macrófagos não ativados sob condições hipóxicas diminuem o número de parasita por célula semelhantemente a macrófagos ativados em condições normóxicas (Fig. 9).

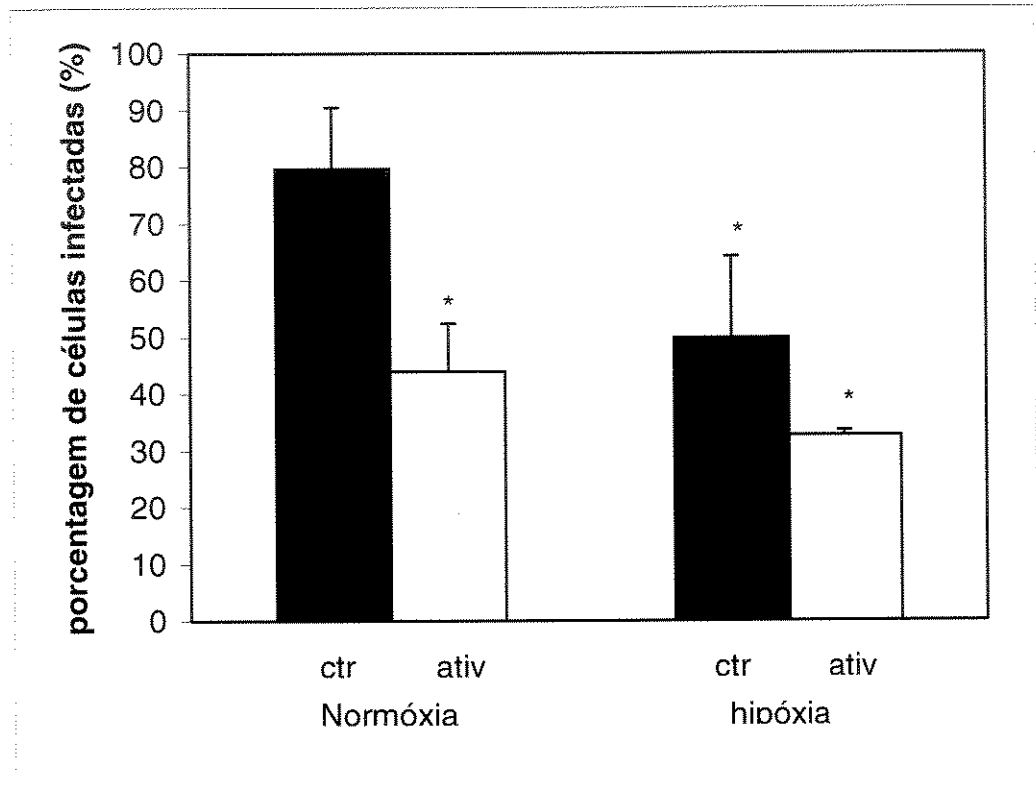


Figura 8. Ativação de macrófagos peritoneais murinos com IFN- γ e LPS infectados com amastigotas de *L. amazonensis* em ambiente hipóxico. Macrófagos peritoneais (5×10^5 /ml) foram tratados com meio RPMI (ctr) ou ativados com IFN- γ (20ng/ml) e LPS (10ng/ml) (ativ), durante 24h. Após este período, macrófagos foram infectados com amastigotas na proporção de 3:1 (parasita: célula) e mantidos em normoxia ou hipoxia durante 24h. A porcentagem de células infectadas foi determinada em lamínulas coradas com Giemsa. Os valores representam a média de dois experimentos \pm desvio médio padrão. *P < 0,05.

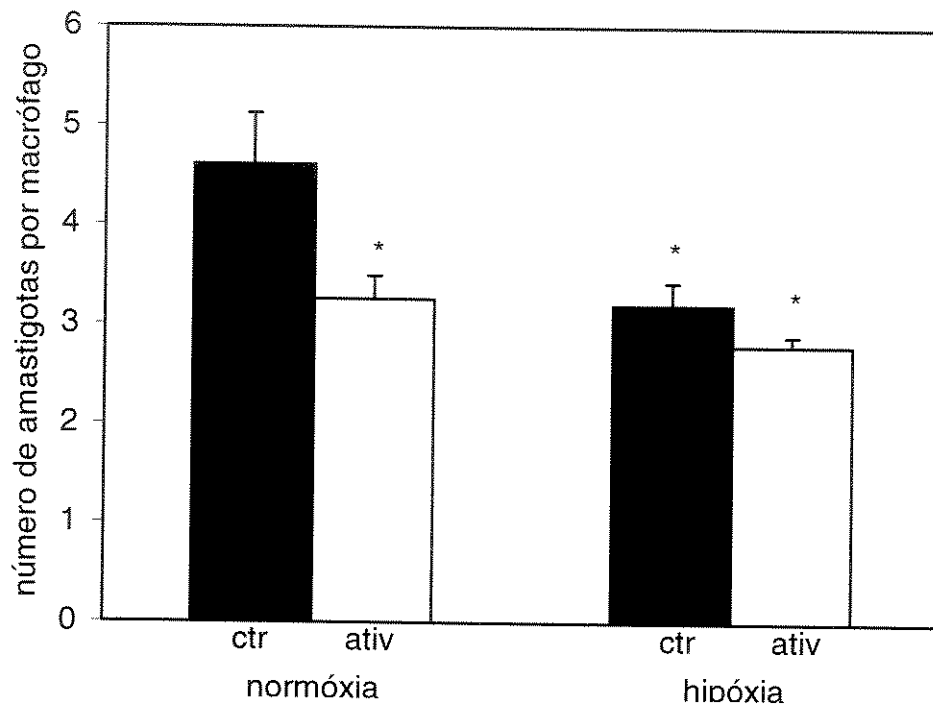


Figura 9. Ativação de macrófagos peritoneais murinos com IFN- γ e LPS infectados com amastigotas de *L. amazonensis* em ambiente hipóxico. Macrófagos peritoneais (5×10^5 /ml) foram tratados com meio RPMI por 24h (ctr) ou ativados por 24h com IFN- γ (20ng/ml) e LPS (10ng/ml) (ativ). Após este período, macrófagos foram infectados com amastigotas na proporção de 3:1 (parasita: célula) e mantidos em ambiente normóxico (normoxia) ou hipóxico (hipoxia) durante 24h. O número de amastigotas por célula foi determinado em lamínulas coradas com Giemsa. Dados de um experimento representativo. *P < 0,05.

4.4- Análise da viabilidade de macrófagos peritoneais murinos e da linhagem tumoral J774 infectados com formas amastigotas de *L. amazonensis* em condições hipóxicas.

Considerando que o número de macrófagos infectados é reduzido em hipóxia (fig. 1,3 e 7), decidimos avaliar se isto deve-se a uma diminuição do número de célula em cultura sob hipóxia e não há um efeito da hipóxia em mecanismos leishmanicidas dos macrófagos. Para tanto, utilizamos o ensaio do MTT para analisar a viabilidade dos macrófagos peritoneais murinos e macrófagos da linhagem tumoral J774 mantidos em ambientes hipóxicos e normóxicos. Nestes experimentos observamos que não há diferenças significativas na viabilidade e no número de macrófagos peritoneais cultivados em normóxia e hipóxia (Fig 10 e 11). Portanto demonstramos que macrófagos peritoneais mantidos em hipóxia não sofrem efeitos extremos tóxicos relacionados à baixa concentração de oxigênio.

Em relação à linhagem J774 a viabilidade medida pelo MTT foi significativamente menor em ambiente hipóxico (cerca de 30%) (Fig. 10) quando comparada com células em ambiente normóxico, mas o número de células foi significativamente semelhante para culturas mantidas tanto em hipóxia como em normóxia (fig. 10 e 11).

É interessante notar que quando macrófagos J774 foram infectados com amastigotas de *L. amazonensis* e mantidos em ambiente hipóxico durante 24h observou-se um aumento significativo da viabilidade da cultura (cerca de 50%) quando comparado às culturas mantidas em ambiente normóxico. A maior viabilidade encontrada em células J774 infectadas em hipóxia pode ser explicada pelo fato de formas amastigotas se encontrarem mais ativas em cerca de 60% em

ambientes hipóxicos do que em ambientes normóxicos, uma vez que apresentam um número significativamente semelhante de parasitas quando comparados os ambientes hipóxicos e normóxicos (fig. 10 e 11).

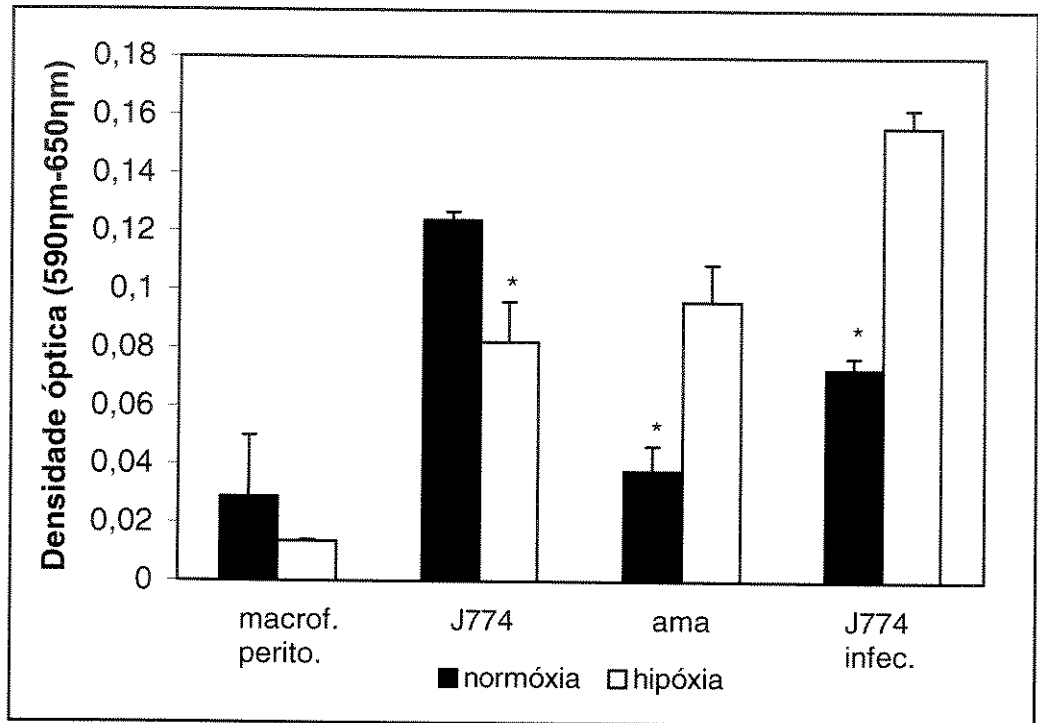


Figura 10. Efeito da hipóxia em macrófagos peritoneais murinos e macrófagos J774 infectados com amastigotas de *L. amazonensis*. Macrófagos peritoneais ($2,5 \times 10^4/100\mu\text{l}$) (macróf perito), macrófagos J774 ($2,5 \times 10^4/100\mu\text{l}$) (J774) não infectados e infectados (J774 infec) e formas amastigotas de *L. amazonensis* ($10^6/100\mu\text{l}$) (ama) foram submetidos a normóxia ou hipóxia durante 24h. A viabilidade foi avaliada pelo teste do MTT. Os valores representam a média de dois experimentos \pm erro médio padrão. Diferenças significativas entre condições normóxicas e hipóxicas. * $P < 0,05$.

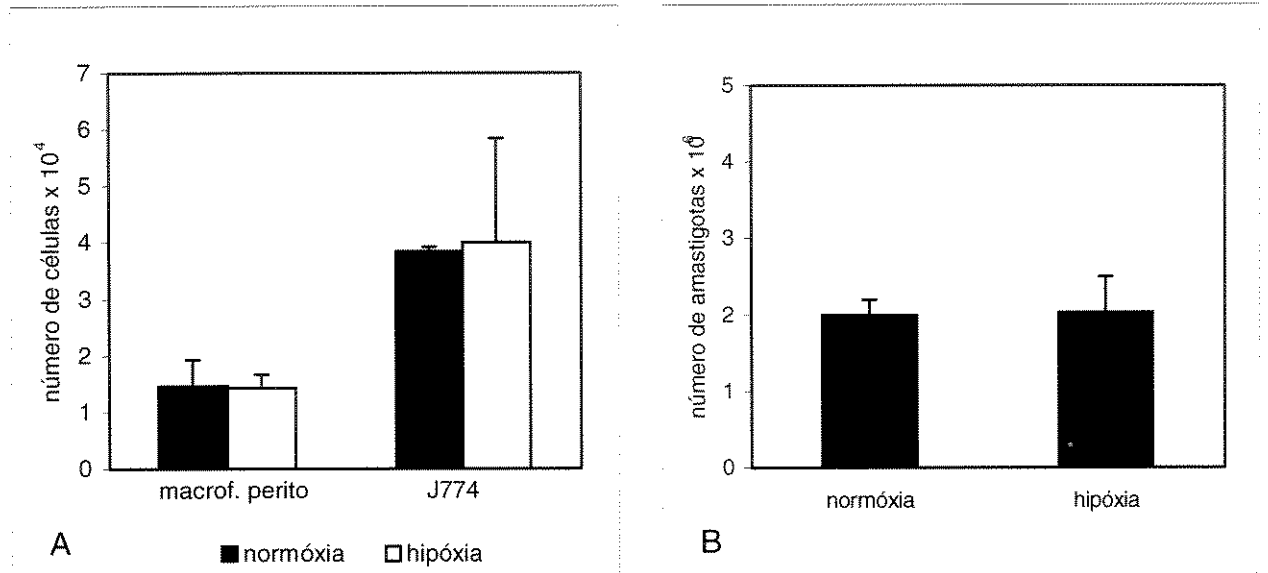


Figura 11. Efeito da hipóxia em macrófagos peritoneais murinos, macrófagos J774 e formas amastigotas de *L. amazonensis*. A. Macrófagos peritoneais ($2,5 \times 10^4/100\mu\text{l}$) (macrof perito) e macrófagos J774 ($2,5 \times 10^4/100\mu\text{l}$) (J774) não infectados foram submetidos a normóxia ou hipóxia durante 24h. B. Formas amastigotas de *L. amazonensis* ($10^6\text{ama}/100\mu\text{l}$) foram submetidas a normóxia ou hipóxia durante 24h. Os números de células e parasitas foram contados após 24h em câmara de Neubauer. Os valores representam a média de dois experimentos \pm erro médio padrão.

4.5- Análise da produção de óxido nítrico (NO)

Considerando-se que o NO é uma das principais moléculas envolvidas nos efeitos leishmanicidas de macrófagos ativados com INF- γ e LPS (LINARES et al., 2000), avaliamos sua produção em macrófagos submetidos a hipóxia e que reduziram a carga parasitária. Avaliamos a concentração de nitrito em sobrenadantes de culturas de macrófagos peritoneais infectados com amastigotas de *L. amazonensis* e expostos às condições hipóxicas ou normóxicas. Como mostra a figura 12, baixos níveis de nitrito são produzidos por macrófagos infectados e submetidos às condições normóxicas e hipóxicas ($1,5\mu\text{M} \pm 0,06\mu\text{M}$ e $1,5\mu\text{M} \pm 0,005\mu\text{M}$). Como esperado, quando culturas de macrófagos infectadas foram ativadas com IFN- γ e LPS, um significativo aumento na produção de nitrito pode ser observado no sobrenadante destas células em condições normóxicas ($6,6\mu\text{M} \pm 0,02\mu\text{M}$) (Fig. 12). Entretanto, macrófagos infectados em condições hipóxicas produzem significativamente menos nitrito do que culturas de macrófagos infectados e ativados em normóxia ($6,6\mu\text{M} \pm 0,02\mu\text{M}$), o mesmo sendo observado para macrófagos ativados e infectados com *L. amazonensis* em hipóxia ($5,1\mu\text{M} \pm 0,06\mu\text{M}$) (Fig. 12).

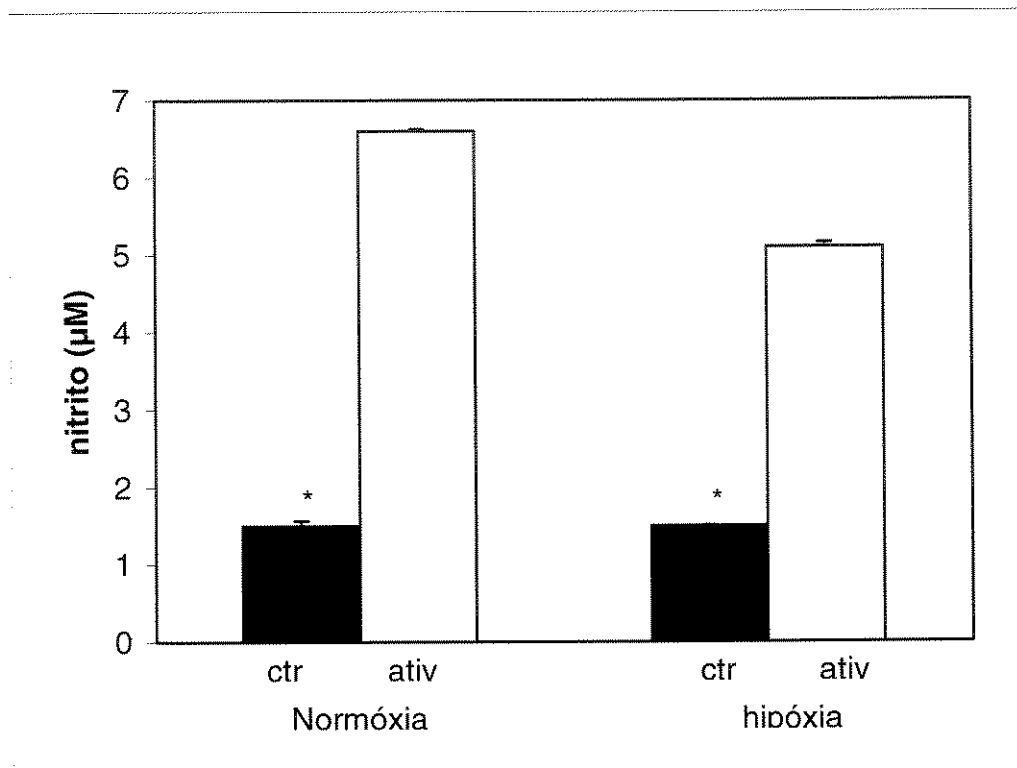


Figura 12. Produção de nitrito em culturas de macrófagos peritoneais murinos ativados ou não com IFN- γ e LPS. Macrófagos peritoneais ($5 \times 10^5/\text{ml}$) foram tratados com meio RPMI por 24h (ctr) ou ativados por 24h com IFN- γ e LPS (ativ). Após este período, macrófagos infectados com amastigotas na proporção de 3:1 (parasita: célula) foram mantidos em ambiente normóxico (normoxia) ou hipóxico (hipóxia) durante 24h. O sobrenadante das amostras de células foram utilizados para análises da concentração de nitrito através do método de Griess conforme item 3.11 de Materiais e Métodos. Dados de um experimento representativo. * $P < 0,05$.

4.6 Efeitos da hipóxia na expressão da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS).

Uma vez que a produção de NO, medida pela análise de nitrito no sobrenadante de culturas, mostrou-se reduzida em macrófagos em hipóxia (Fig. 12), avaliamos se a enzima iNOS também teria sua expressão alterada em ambiente hipóxico. Em macrófagos a iNOS é responsável pela produção de NO (FUKUTO & CHAUDHURI, 1995; STUEHR, 1997). Com o objetivo de avaliar possíveis alterações na expressão da enzima iNOS (130 kDa) em culturas de células expostas a baixas concentrações de oxigênio, macrófagos J774 foram ativados com IFN- γ e LPS, infectados com amastigotas de *L. amazonensis* e mantidas em condições hipóxicas e normóxicas, e suas proteínas submetidas ao “Western Blotting” e analisadas por densidade óptica relativa.

Como mostra a figura 13 (coluna 1) culturas de macrófagos J774 sem ativação e mantidos em condições normóxicas não expressam a enzima iNOS. Entretanto, quando culturas de macrófagos foram ativadas com IFN- γ e LPS durante 24 horas em normóxia ou hipóxia observou-se indução na expressão de iNOS (Fig. 13, colunas 2 e 7). Mas, culturas de macrófagos que foram somente expostas às condições hipóxicas sem a presença dos ativadores não mostraram induzir iNOS (Fig. 13, coluna 3). As células infectadas e mantidas em condições normóxicas e hipóxicas também não expressam iNOS, mesmo na presença dos ativadores IFN- γ e LPS (Fig. 13, colunas 4, 6 e 5, respectivamente).

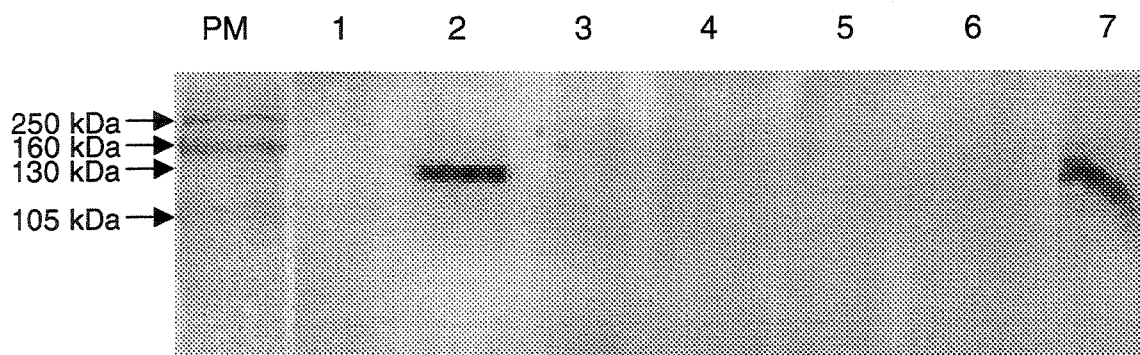


Figura 13. Imunoblot de proteínas (iNOS). Macrófagos J774 (1×10^7 cél/ml) foram ativados com IFN γ (500 ng/ml) e LPS (300 ng/ml), infectados com amastigotas de *L. amazonensis* e mantidos em condições normóxicas e hipóxicas por 24h. As células lisadas com tampão e as proteínas (50 μ g por linha) separadas em SDS-PAGE 10%, foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose, a qual foi incubada com anticorpo anti-iNOS (1:100) e anticorpo monovalente conjugado com peroxidase. **PM:** peso molecular padrão; **1:** macrófago mantidos em normóxia sem nenhum tratamento; **2:** células ativadas com IFN- γ +LPS por 24h em normóxia; **3:** células mantidas em hipóxia por 24h; **4:** células infectadas com amastigotas de *L. amazonensis* em normóxia por 24h; **5:** células infectadas e ativadas com IFN- γ +LPS em normóxia por 24h; **6:** células infectadas em hipóxia por 24h e **7:** células ativadas com IFN- γ +LPS por 24h em hipóxia sem infecção. Tratamentos conforme descrito em materiais e métodos. “Western blotting” representativo de 3 experimentos.

Nossos dados mostraram que imunoestimuladores (IFN- γ e LPS) induzem expressão da enzima iNOS em macrófagos. Entretanto, a enzima iNOS não é expressa em macrófagos mantidos em hipóxia e infectados, sugerindo que a resistência destas células a infecção (Fig. 1,3 e 7) não está relacionada a produção de NO.

4.7- Efeitos da hipóxia na expressão de proteínas do choque térmico

Com o objetivo de avaliar se macrófagos submetidos a ambiente hipóxico sofrem alterações fenotípicas, outras que mudanças na produção de NO e na susceptibilidade a infecção com *L. amazonensis*, avaliamos a expressão de HSP70 pelo “Western Blotting” e a quantificamos através de densidade óptica relativa. Os experimentos de “Western Blotting” foram realizados com macrófagos da linhagem tumoral J774 devido ao grande número de células necessárias para a realização dos ensaios.

HSP70 é constitutivamente expressa em macrófagos J774 e, portanto para avaliar alterações na expressão desta proteína foi necessário um controle positivo. Para isto, induzimos choque térmico (44°C durante 30 minutos, item 3.13 de Materiais e Métodos) em macrófagos. Como mostra a figura 14 (coluna 1) e figura 15, macrófagos J774 expostos ao calor mostraram aumento de 54,5% na expressão de HSP70. Macrófagos não expostos ao choque térmico apresentam níveis basais de HSP70 (Fig. 14, coluna 2) (ADHUNA et al.,1997).

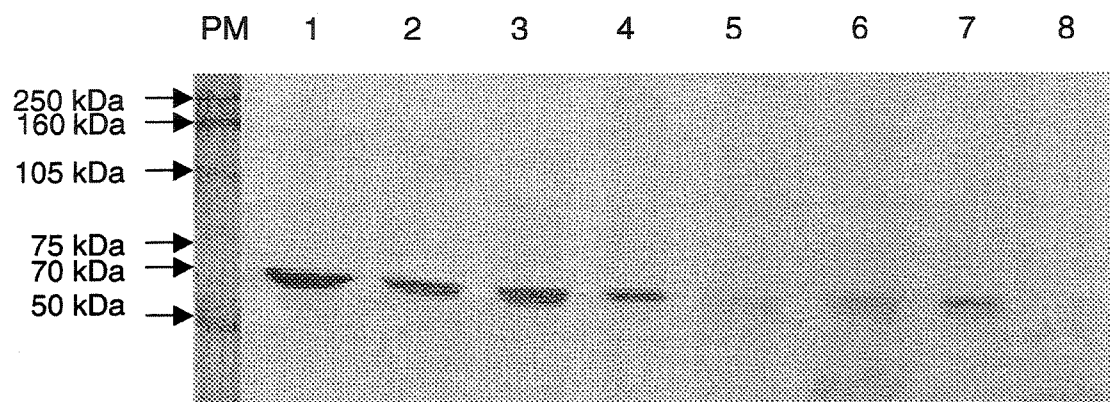


Figura 14. Imunoblot de proteínas (HSP70). Macrófagos J774 foram lisados e suas proteínas (25µg por linha) foram separadas em SDS-PAGE 10% e transferidas para uma membrana de nitrocelulose, a qual foi incubada com anticorpo anti-HSP70 e anticorpo monovalente conjugado com peroxidase. **PM:** peso molecular padrão; **1:** células submetidas ao choque térmico; **2:** células que não sofreram choque térmico e que permaneceram em normóxia; **3:** células ativadas com IFN-γ+LPS em normóxia; **4:** células mantidas em hipóxia; **5:** células infectadas com amastigotas de *L. amazonensis* em normóxia; **6:** células infectadas e ativadas com IFN-γ+LPS em normóxia; **7:** células infectadas em hipóxia e **8:** amastigotas. Os tratamentos são descritos nos itens 3.13, 3.9, 3.7, 3.6 de Materiais e Métodos. “Western blotting” representativo de 4 experimentos.

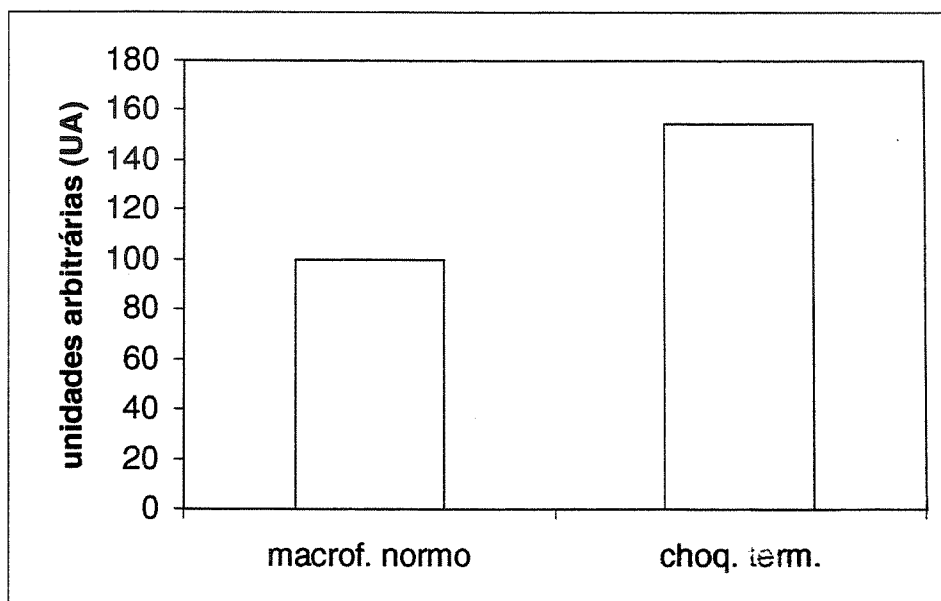


Figura 15. Indução da expressão de HSP70 em macrófagos J774. Densidade óptica relativa das bandas de HSP70 do “Western blotting” mostrado na Fig. 14. Macrófagos cultivados em normóxia (macrof. normo) foram representados como 100% (Unidades Arbitrárias – UA). Choque térmico (choq. térm.) (44°C por 30 minutos e posterior recuperação a 37°C).

É interessante observar que, em relação à expressão de HSP70 em macrófagos J774 que foram mantidos por 24 horas em condições hipóxicas sem infecção, observou-se uma diminuição de 48% na expressão de HSP70 em relação às culturas de macrófagos que permaneceram em normóxia (Fig. 14, colunas 4, 2 e fig. 16).

Avaliamos também a expressão de HSP70 em macrófagos mantidos em hipóxia ou normóxia e infectados com amastigotas *L. amazonensis*. Macrófagos J774 infectados em ambas as condições, hipóxia e normóxia mostraram diminuições na expressão de HSP70 (Fig. 14, colunas 5, 7 e fig. 16).

Macrófagos infectados em normóxia mostraram diminuição de 75% na expressão de HSP70 quando comparada às culturas de macrófagos não infectadas também em normóxia (Fig. 14, colunas 5, 2 e fig. 16). Já em relação aos macrófagos infectados e mantidos em hipóxia não houve alterações na expressão de HSP70 quando comparados aos macrófagos não infectados em hipóxia (Fig. 14, colunas 7, 4 e fig. 16).

Estes dados sugerem que HSP70 tem sua expressão modulada negativamente durante a infecção com *L. amazonensis*, tanto em normóxia como em hipóxia.

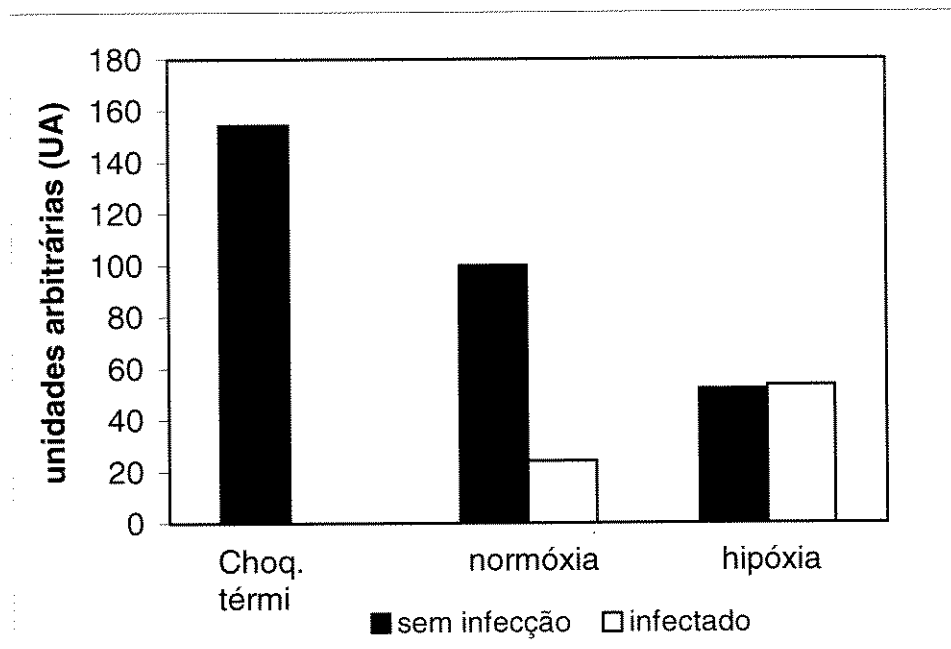


Figura 16. Análise da expressão de HSP70 em macrófagos J774 sob hipóxia. Densidade óptica relativa das bandas de HSP70 do “Western blotting” mostrado na Fig. 14. Macrófagos cultivados em normóxia sem infecção foram representados como 100% (Unidades Arbitrárias – UA). Choque térmico (choq. térmico) (44°C por 30 minutos e posterior recuperação a 37°C). Culturas de macrófagos J774 (1×10^7 cel/ml) sem infecção ou infectados com *L. amazonensis* foram mantidas em hipóxia durante 24h.

Foi avaliado também a expressão de HSP70 em culturas de células ativadas com IFN- γ e LPS e infectadas com amastigotas de *L. amazonensis* em ambiente normóxico (Fig. 14, colunas 3, 5, 6 e fig. 17). Macrófagos ativados não mostraram significativa diminuição na expressão de HSP70 quando comparados às culturas de macrófagos sem ativação (Fig. 14, colunas 3, 2 e fig. 17). Contudo, macrófagos ativados e infectados durante 24 horas em normóxia mostram diminuição na expressão de HSP70 (45%) em relação a macrófagos sem nenhum tratamento (Fig. 14, colunas 6, 2 e fig. 17).

Vale salientar que a redução em HSP70 observada em macrófagos ativados e infectados em normóxia é semelhante aquela de macrófagos infectados em hipóxia (Fig. 14, colunas 6, 7 e fig. 17). Nas duas situações, observamos resistência dos macrófagos a infecção com *L. amazonensis* (Fig. 1, 3, 7 e 8).

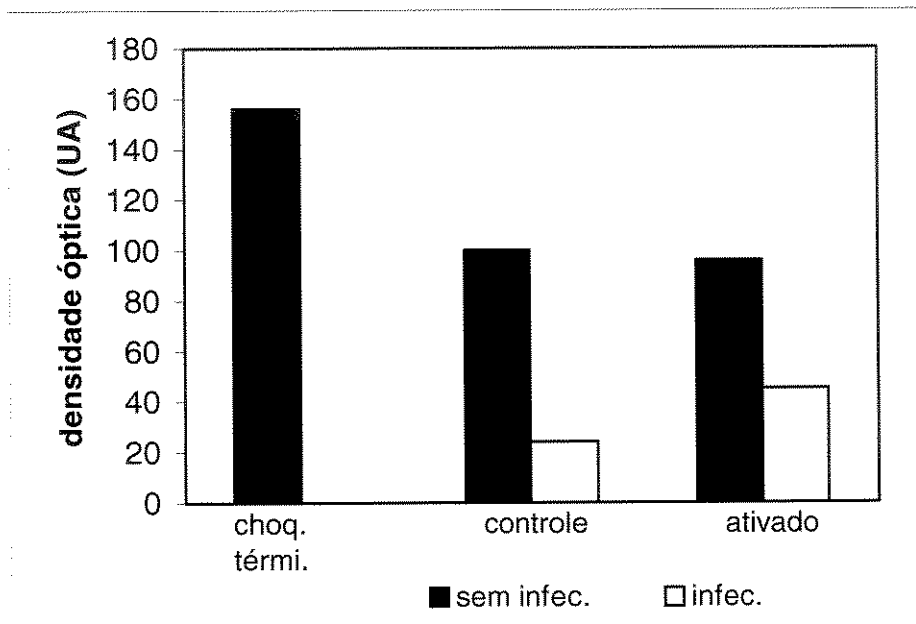


Figura 17. Análise da expressão de HSP70 em macrófagos J774 ativados. Densidade óptica relativa das bandas de HSP70 do “Western blotting” mostrado na Fig. 14. Macrófagos cultivados em normóxia (controle) sem infecção foram representados como 100% (Unidades Arbitrárias – UA). Choque térmico (choq. térmi.) (44°C por 30 minutos e posterior recuperação a 37°C). Culturas de macrófagos J774 (1×10^7 cel/ml) sem infecção ou infectadas com *L. amazonensis* foram ativadas com IFN- γ e LPS durante 24h.

4.8- Avaliação dos efeitos da oxigenação hiperbárica na infecção de macrófagos peritoneais murinos com formas amastigotas de *L. amazonensis*.

Uma vez que tecidos infectados ou lesados apresentam micro áreas hipóxicas que se expandem devido à perfusão deficiente (CLARK & MOON, 1999) e como o uso da oxigenação hiperbárica eleva os níveis sistêmicos e locais do oxigênio, avaliamos os possíveis efeitos de altas concentrações de oxigênio em macrófagos peritoneais murinos infectados com *L. amazonensis*. Culturas de macrófagos foram infectadas e submetidas à oxigenação hiperbárica (HBO) com 100% de O₂ e 2,5 ATA durante 2 horas. Culturas de macrófagos que foram mantidas em HBO também apresentaram uma redução na porcentagem de infecção quando comparadas às culturas mantidas em ambiente normóxico (Fig. 18). Nossos dados mostram que há uma redução de células infectadas de 52% quando as culturas são mantidas em HBO (Fig. 18).

Na figura 19 observou-se que o número de parasitas por macrófagos também foi menor em culturas de células mantidas em HBO (cerca de 30%) quando comparado com as culturas mantidas em ambiente normóxico.

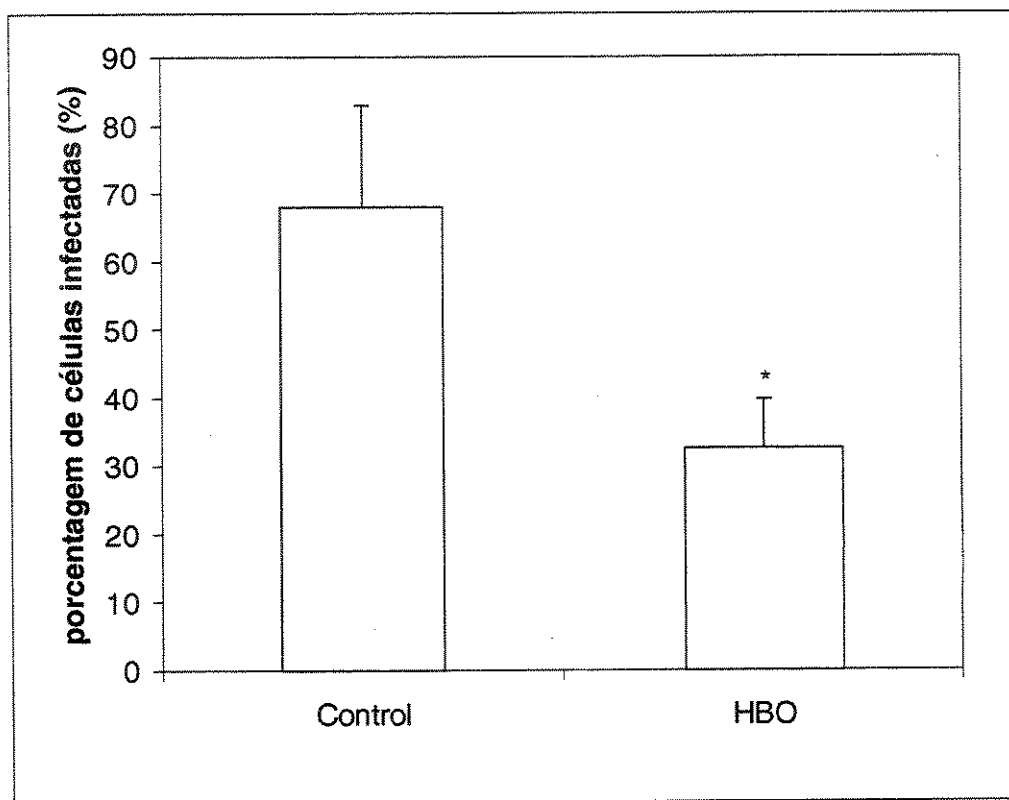


Figura 18. Efeito da HBO em macrófagos peritoneais murinos infectados com amastigotas de *L. amazonensis*. Macrófagos peritoneais (5×10^5 cel/ml) foram infectados com amastigotas na proporção 3:1 (parasita: célula) e mantidos em condições normóxicas (control) (20,8 O₂ ; 5% CO₂ e N₂ atmosférico) por 1h. Em seguida, foram expostos por 2h à oxigenação hiperbárica (HBO) (100% O₂; PO₂ 253.3 kPa); as culturas controles permaneceram em normóxia. A porcentagem de células infectadas foi determinada em lâminulas coradas com Giemsa. Dados de um experimento representativo. Diferenças significativas entre condições normóxicas e hiperbáricas. *P < 0,05.

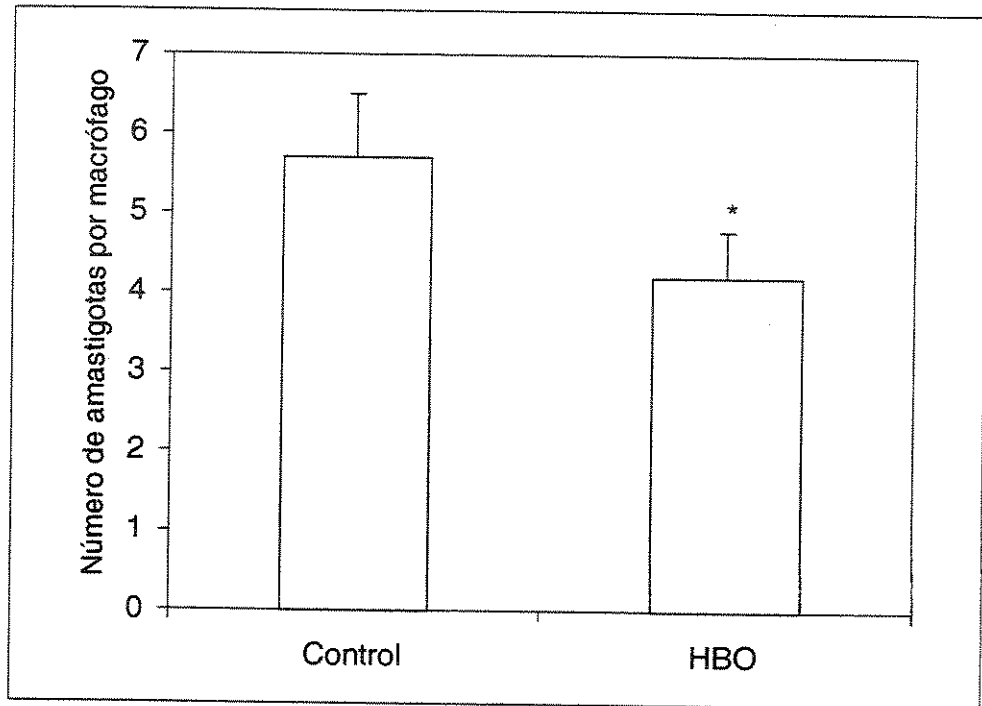


Figura 19. Efeito da HBO em macrófagos peritoneais murinos infectados com amastigotas de *L. amazonensis*. Macrófagos peritoneais (5×10^5 cel/ml) foram infectados com amastigotas na proporção 3:1 (parasita: célula) e mantidos em condições normóxicas (control) (20,8 O₂; 5% CO₂ e N₂ atmosférico) por 1h. Em seguida, foram expostos por 2h à oxigenação hiperbárica (HBO) (100% O₂; PO₂ 253.3 kPa); as culturas controles permaneceram em normóxia. O número de amastigotas por célula foi determinado em lamínulas coradas com Giemsa. Diferenças significativas entre condições normóxicas e hiperbáricas. *P < 0,05.

Assim nossos dados mostram que altas concentrações de oxigênio também exercem efeito em culturas de macrófagos.

5.DIUSSÃO

A interrupção do fluxo sangüíneo alterado de tecidos lesados e/ou inflamados freqüentemente causa a formação de áreas de baixa tensão de oxigênio (LEWIS et al., 1999). Nas leishmanioses cutâneas causadas por *L. braziliensis* ou por *L. amazonensis* a inflamação ativa (migração de células mononucleares), a destruição tecidual (induzida por células inflamatórias), as infecções secundárias com bactérias aeróbicas e anaeróbicas e as tentativas de reparo tecidual (proliferação de pequenos vasos sangüíneos) ocorrem simultaneamente (WEIGLE & SARAVIA, 1996 e GIORGIO et al., 1998) e têm características que levam a hipóxia tecidual. Assim, neste trabalho investigamos os efeitos da hipóxia na resistência/susceptibilidade de macrófagos a *L. amazonensis*. Sob as condições usadas, fornecemos evidências que macrófagos de diferentes fontes (linhagens celulares e célula primária) expostas a hipóxia e infectadas com *L. amazonensis* mostraram uma redução na porcentagem de células infectadas e no número de parasitas intracelulares por macrófago (Fig. 1, 3, 7 e 2, 4). A cinética de infecção em macrófagos peritoneais murinos indica que a hipóxia não diminui a atividade fagocítica de macrófagos a *L. amazonensis* (Fig. 5), mas induz resistência dos macrófagos a infecção com o parasita.

Na literatura, informações em relação aos efeitos da hipóxia na infecção de macrófagos por microrganismos não estão disponíveis para comparações com os resultados presentes. Entretanto, vários estudos têm mostrado que a hipóxia altera o fenótipo de macrófagos, isto é, a morfologia, a expressão de marcadores de superfície, a fagocitose e a atividade metabólica (LEWIS et al., 1999).

LEEPER-WOODFORD & MILLS (1992) mostraram que a hipóxia aguda (1,7% O₂) alterou a função fagocítica em macrófagos alveolares de coelhos diminuindo a entrada de hemácias fixadas com glutaraldeído, sem diminuir significativamente a viabilidade e a aderência das células alveolares. Macrófagos pulmonares quando incubados em baixas concentrações de oxigênio também apresentaram atividade fagocítica duas vezes menor do que culturas de células mantidas em ambiente normóxico (SIMON et al., 1981). Também REICHNER et al. (2001) mostraram redução da fagocitose de partículas de zimosan e “beads” de látex por macrófagos de ratos obtidos de lesões e do peritônio, quando estes eram mantidos sob condições hipóxicas. Contudo, TURNER et al. (1999) não observaram influência na fagocitose de hemácias em condições hipóxicas por células de linhagem monocítica humana, e MATSUMOTO et al. (2000) mostraram que não há diferenças na ligação e na entrada de lipoproteínas de baixa densidade (LDL) em macrófagos derivados de monócitos humanos em hipóxia. A razão para os diferentes resultados pode ser devido aos diferentes tipos de macrófagos testados, a porcentagem e a duração da hipóxia aplicada e a natureza das partículas usadas nos vários estudos. Os dados do presente trabalho mostram que a hipóxia não afeta a fagocitose de amastigotas de *L. amazonensis* pelos macrófagos (Fig. 5), mas induz culturas de macrófagos a inibir o crescimento e/ou induzem morte intracelular do parasita (Fig. 2, 4, Tab. 1). Podemos sugerir que macrófagos estão ativados/estimulados em ambiente com restrição de oxigênio.

Para avaliar esta hipótese, comparamos os efeitos de ativadores clássicos de macrófagos, IFN- γ e LPS (LINARES et al., 2000) com os efeitos da hipóxia. Como esperado, em ambiente normóxico a porcentagem de infecção das células peritoneais diminuiu cerca de 50% quando as células foram ativadas com os imunostimuladores. A hipóxia “estimulou” macrófagos a reduzirem a infecção em 40%. Quando os dois estímulos foram utilizados, isto é, macrófagos ativados e submetidos a hipóxia, não observamos um efeito sinérgico (Fig. 8).

Para avaliar se a redução na infecção observada durante a hipóxia não está relacionada a uma menor viabilidade de macrófagos neste ambiente, realizamos o teste do MTT, verificamos a aderência celular e ainda, analisamos a viabilidade celular também através do corante vital Tripán Blue. O teste de viabilidade celular MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) utilizado no presente trabalho tem muitas vantagens, como, por exemplo, é rápido, pode-se analisar muitas amostras de uma só vez e o substrato não interfere na medida do produto. Segundo MOSMANN (1983) através do teste do MTT é possível diferenciar células vivas de células mortas sendo de ampla aplicabilidade para medidas de sobrevivência e proliferação de várias células. Utilizamos neste trabalho esse método de análise de viabilidade para os macrófagos peritoneais, macrófagos J774 infectados ou não com o parasita e formas amastigotas de *L. amazonensis* em ambientes hipóxicos e normóxicos (Fig 10). Apesar da literatura não apresentar dados que possibilitem a comparação dos nossos resultados, observamos que macrófagos peritoneais não apresentaram diferenças significativas na viabilidade quando comparados em ambientes hipóxicos e normóxicos (Fig. 10). Em relação aos macrófagos J774, esses apresentaram maior

viabilidade em ambiente normóxico (Fig. 10). LEEPER-WOODFORD & MILLS (1992) observaram diferença pouco significativa na viabilidade ou aderência de macrófagos alveolares em ambiente hipóxico quando comparado ao ambiente normóxico. Esses autores observaram que embora as células em hipóxia mostrassem menor aderência, a diminuição na função fagocítica de macrófagos alveolares observada não foi devida à diminuição da viabilidade ou às mudanças na aderência dos macrófagos.

Em relação às formas amastigotas do parasita elas se mostraram significativamente mais ativas em hipóxia quando comparada a normóxia. O mesmo resultado foi encontrado quando macrófagos J774 infectados com formas amastigotas foram analisados pelo teste do MTT, eles mostraram-se significativamente mais viáveis em hipóxia quando comparada a normóxia (Fig 10). Esse aumento na viabilidade de macrófagos infectados em hipóxia parece estar relacionado a maior atividade das formas amastigotas neste ambiente ou, na tentativa de eliminar o parasita, as células estariam mais ativas/estimuladas metabolicamente em ambientes com restrição de oxigênio. Assim podemos sugerir que a redução na infecção não está relacionada à morte de macrófagos em hipóxia.

Avaliamos o possível mecanismo leishmanicida de macrófagos em hipóxia. Como o NO é um importante componente ativador envolvido na morte da *Leishmania* por macrófagos ativados com linfocinas (GREEN et al., 1990; PANARO et al., 1999; LINARES et al., 2001), análises da produção de nitrito foram necessárias para investigar o mecanismo leishmanicida do macrófago sob hipóxia. Os resultados indicam que a hipóxia reduz a síntese de nitrito em células

infectadas com *L. amazonensis* e ativadas com IFN- γ e LPS (Fig. 12). Esses resultados são similares aos encontrados por McCORMICK et al. (2000) que mostram uma diminuição de 60-50% na produção de nitrito em macrófagos peritoneais ativados com IFN- γ e LPS sem infecção. Também, MELLILO et al. (1996) observaram uma diminuição de 70% na produção de nitrito no sobrenadante de culturas de macrófagos ANA-1 não infectadas, submetidas as condições hipóxicas e ativadas com IFN- γ e LPS. Nossos dados sugerem não haver correlação entre produção de nitrito e a redução na infecção em macrófagos sob hipóxia, embora, não possamos excluir a participação de outras espécies reativas geradas por reações oxidativas na atividade leishmanicida do macrófago sob condições hipóxicas. No entanto, isto parece improvável já que em hipóxia a concentração de oxigênio, que é o substrato para essas reações, é limitada (McCORMICK et al., 2000; OTTO & BAUMGARDNER, 2001).

O efeito da hipóxia e dos imunoestimuladores em macrófagos também pode ser observado pela análise da expressão de iNOS através da técnica de "Western Blotting". Nossos resultados indicam que IFN- γ e LPS ativam a expressão de iNOS pelo macrófago em condições normóxicas e hipóxicas (Fig. 13, colunas 2 e 7). Contudo, macrófagos mantidos sob condições hipóxicas na ausência dos imunoestimuladores não induzem a expressão de iNOS (Fig. 17, coluna 3). Resultados similares aos nossos também foram observados por outros autores. OTTO & BAUMGARDNER (2001) mostraram que esses imunoestimuladores ativaram macrófagos a expressarem a iNOS, produzindo NO, além de apresentarem atividades citotóxicas. MELILLO et al. (1996) também mostraram que células ANA-1 tratadas sob condições hipóxicas na ausência de

imunoestimuladores não induziram a expressão de iNOS e, ainda esses mesmos autores demonstraram que a hipóxia age sinergicamente com IFN- γ e LPS na indução da expressão da proteína iNOS e na atividade enzimática da iNOS citosólica em macrófagos murinos. DANILIUC et al. (2003) observaram aumentos na expressão de iNOS quando células RAW 164.7 ativadas com INF- γ e LPS foram submetidas a hipóxia, porém outros dados indicam que a expressão do gene da iNOS por macrófagos é aumentada pela hipóxia na presença de um estímulo (LPS ou IFN- γ), mas não na presença de ambos.

Com o objetivo de avaliar se macrófagos submetidos a ambiente hipóxico sofrem alterações fenotípicas, avaliamos a expressão de HSP70 pelo “Western Blotting” e a quantificamos através de densidade óptica relativa. Nossos resultados mostram que culturas de macrófagos J774 expostas a hipóxia diminuem a expressão de HSP70 quando comparados às culturas expostas a normóxia (Fig. 13 e 15). HSP70 é induzida em resposta a hipóxia/reoxigenação em vários tipos de células e tecidos incluindo cérebro de ratos (FERRIERO et al., 1990), cultura de cardiomiócitos de ratos (IWAKI et al., 1993), células epiteliais humanas (TURMAN et al., 1997) e astrócitos primários de ratos (UEHARA et al., 1999). Diminuições na expressão de HSP70 foram observadas em outras linhagens celulares. Em células RAW expostas a hipóxia por 24 horas também se observou diminuição na expressão de HSP70 quando comparado às culturas mantidas em condições normóxicas (YUN et al., 1997b). Pouca ou nenhuma expressão de HSP70 foi observada logo após 6 horas de hipóxia em cardiomiócitos de ratos adultos (GUPTA & KNOWLTON, 2002). Células da linhagem endotelial microvascular humana HMEC-1 não tratadas expressam altos

níveis de HSP70, contudo quando essas células foram submetidas a hipóxia houve uma redução de cerca de 52% na expressão de HSP70 (OEHLER et al., 2000). Em células endoteliais tolerantes a hipóxia, períodos prolongados de baixa concentração de oxigênio reduz a expressão de HSP70 enquanto estimula a atividade e a expressão de enzimas glicolíticas (GRAVEN & FARBER, 1997; GRAVEN et al., 1993; OEHLER et al., 2000). A regulação da expressão de HSP70 durante a hipóxia difere entre os vários tipos celulares. Contudo, as razões para a redução na expressão de HSP70 em resposta a hipóxia ainda permanece incerta (OEHLER et al., 2000). Uma possível explicação para essa diminuição na expressão de HSP70 em condições hipóxicas também observada em nossos experimentos é que, como HSP70 exerce proteção contra os efeitos da injúria oxidativa em alguns tipos celulares (SUZUKI et al., 1998), supõe-se que as células em condições normóxicas precisam expressar grandes quantidades de HSP70. Esta produção de HSP70 previne danos oxidativos, mas mecanismo de defesa celular pode não ser necessário quando a concentração de oxigênio é reduzida como na hipóxia (OEHLER et al., 2000). Como baixos níveis de oxigênio privam a cadeia respiratória mitocondrial do seu principal aceptor de elétrons (O_2), a via glicolítica anaeróbica substitui a fosforilação oxidativa mitocondrial para produzir ATP (PIACENTINI & KARLINER, 1999) e como resultado, é necessário aumentar os níveis de fosfatases altamente energéticas para manter as funções normais das células. Todas essas adaptações celulares a hipóxia podem influenciar a célula no sentido de desviar o seu metabolismo normal para um aumento da atividade de enzimas necessárias à via glicolítica e diminuição na expressão de outras proteínas, não relacionadas às vias anaeróbicas, como, por exemplo, é o caso da

HSP70. Segundo OEHLER et al. (2000) células endoteliais, que diminuem a expressão de HSP70 durante hipóxia, mantiveram seu nível intracelular de ATP independentemente do oxigênio por converter glicose em lactato via glicólise anaeróbica, aumentando a atividade de enzimas glicolíticas em resposta a hipóxia.

Avaliamos também a expressão de HSP70 em macrófagos mantidos em hipóxia ou normóxia e infectados com amastigotas *L. amazonensis*. Macrófagos J774 infectados com amastigotas de *L. amazonensis* tanto em ambientes normóxicos quanto hipóxicos diminuem a expressão de HSP70 e não induzem a expressão de iNOS, o mesmo ocorrendo em macrófagos ativados (Fig. 13, 14, 16 e 17). BALESTIERI et al. (2002) e LINARES et al. (2000) também observaram que macrófagos murinos J774-G8 infectados com *L. amazonensis* mostraram inibição da atividade da iNOS e produção de NO quando essas células foram adicionalmente estimuladas com LPS. Como o NO constitui a molécula efetora mais importante na destruição de *Leishmania* intracelular pelo macrófago, os dados de BALESTIERI et al. (2002), LINARES et al. (2000) e os nossos sugerem que a interferência na habilidade de sintetizar NO pode constituir um importante mecanismo de evasão pelo parasita, *in vitro*. Infecções por outros patógenos intracelulares assim como a *Leishmania* também inibem a produção de NO. Culturas de macrófagos peritoneais ativadas e infectadas com tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi* mostraram diminuir a produção de NO (PAKIANATHAM & KUHN, 1994). Infecções em macrófagos alveolares com *Mycobacterium bovis* BCG (HANANO & KAUFMANN, 1995) ou macrófagos peritoneais infectados com *Cryptococcus neoformans* também resultaram em diminuição da produção de NO (KAWAKAMI et al., 1997). Pouco é conhecido sobre os mecanismos que atuam na

inibição da síntese de NO pelos patógenos ou seus produtos. Moléculas da superfície de extratos de *L. major*, tais como LPG, também foram encontradas participar da inibição da síntese de NO (PROUDFOOT et al., 1995, PROUDFOOT et al., 1996). Esse mecanismo de defesa da *Leishmania*, inibindo a produção de NO pelo macrófago e garantindo assim sua sobrevivência intracelular, também poderia explicar a diminuição na expressão de HSP70 em macrófagos J774 infectados. De fato, ADHUNA et al. (1997) também observaram alterações na expressão de HSP70 durante o curso da infecção por *L. donovani* em macrófagos J774-G8. Macrófagos infectados com formas promastigotas tiveram seus níveis de HSP70 elevados até 18h após a infecção, mas após dois dias de infecção quando as formas promastigotas se transformaram em formas amastigotas houve diminuição significativa na expressão de HSP70. Estes mesmos autores sugerem que a diminuição na expressão de HSP70 pode estar relacionada à liberação de algum fator pelas formas amastigotas ou pelo macrófago infectado como consequência da infecção.

Como já visto por HAMMERER-LERCHER et al. (2001) HSP70 está envolvida na proteção celular e essa citoproteção mantém a conformidade das proteínas e a homeostase, desse modo aumenta a habilidade da célula para sobreviver ao estresse metabólico, e ainda HSP70 parece interagir com células apresentadoras de antígenos murinas e humanas resultando na secreção de várias citocinas inflamatórias (IL-12, IL-1 β , GM-CSF) e regular a apresentação de antígeno e moléculas coestimulatórias tais como MHC-II e CD86 (BASU et al., 2000; CHEN et al., 1999; SINGH-JASUJA et al., 2000; BINDER et al., 2000). Essa atividade pró-inflamatória da HSP70 deve constituir um mecanismo do sistema

imune para perceber eventos necróticos, sinalizando um estado de alerta molecular para que o sistema imune seja capaz de responder a simultâneos contextos antigênicos (BASU et al., 2000). Portanto sugerimos que, seria vantajoso para o parasita apresentar um mecanismo de defesa que inibisse ou diminuísse a expressão de HSP70 na célula, garantindo assim sua multiplicação e sobrevivência intracelular.

Em resumo, todos os nossos dados relacionados ao ambiente hipóxico aqui apresentados demonstram que macrófagos são capazes de controlar a infecção pela *L. amazonensis* em hipóxia. Descartamos o papel do NO como molécula leishmanicida nos macrófagos em hipóxia. Não podemos descartar a hipótese de que em hipóxia os parasitas podem ser liberados dos macrófagos através de um processo de exocitose. Outros autores têm sugerido que em células expostas a hipóxia alterações metabólicas tais como mudanças no ATP celulares conduzam a perda de partículas inertes previamente fagocitadas e liberação de conteúdo lisosomal ou eventos semelhantes a exocitose (LEEPER-WOODFORD & MILLS, 1992; LEWIS et al., 1999). Como há evidências de que o processo de exocitose relaciona-se a liberação de parasitas de macrófagos infectados durante disseminação da *Leishmania* (SOLBACH & LASKAY, 2000), não descartamos a hipótese de exocitose de amastigotas por macrófagos em hipóxia. Futuras investigações são necessárias para explicar o mecanismo que está operando na resistência dos macrófagos à infecção por *L. amazonensis* sob condições hipóxicas.

Na segunda fase deste trabalho nós avaliamos o efeito da oxigenação hiperbárica (HBO) com 100% de O₂ e 2,5 ATA em macrófagos peritoneais

murinos. O uso de oxigenação hiperbárica baseou-se no fato de que tecidos infectados ou lesados apresentam micro áreas hipóxicas que se expandem devido à perfusão deficiente e ao aumento do consumo de oxigênio por células e microrganismos, característicos de lesões causadas pela *L. amazonensis* (CLARK & MOON, 1999; GIORGIO et al., 1998). A oxigenação hiperbárica eleva os níveis sistêmicos e locais do oxigênio necessário para a produção de ATP, a síntese de proteínas, e a produção de espécies reativas das quais o oxigênio é o substrato (CLARK & MOON, 1999). Apenas um trabalho relata que formas promastigotas de *Leishmania* foram mais susceptíveis a anfotericina B quando em ambiente hiperóxico (MUHVICH et al., 1993). Os autores não estudaram os efeitos de HBO em amastigotas e em macrófagos infectados. Experimentos realizados em nosso laboratório indicaram que a HBO impediu o crescimento de formas promastigotas e a transformação de amastigotas em promastigotas de *L. amazonensis* com conseqüente morte do parasita (ARRAIS-SILVA, 2003). Os resultados mostrados aqui indicam que culturas de macrófagos peritoneais infectados com *L. amazonensis* mantidos em HBO por 2h diminuem a porcentagem de infecção em 52%, reduzindo também o número de parasita por célula (cerca de 30%) em comparação ao ambiente normóxico (Fig. 18 e 19). Um dos possíveis mecanismos pelo qual a HBO reduziria a carga parasitária é através dos altos níveis de radicais de oxigênio formados em macrófagos, uma vez que a terapia hiperbárica induziria estresse oxidativo (KURATA et al., 1995). Através deste estresse oxidativo os macrófagos apresentariam atividade leishmanicida aumentada. De fato, intermediários reativos de oxigênio e nitrogênio, tais como O_2^- , H_2O_2 , NO, $ONOO^-$ têm efeitos leishmanicidas (AUGUSTO et al., 1996).

Assim, nossos dados, mostrando efeitos leishmanicidas da HBO sugerem que este tratamento tem potencial uso terapêutico contra a leishmaniose murina.

Podemos, com os experimentos realizados neste trabalho demonstrar que a avaliação dos efeitos de alta e baixa tensão de oxigênio em um modelo *in vitro* de infecção intracelular contribui para o entendimento da resposta celular a infecção nos microambientes teciduais.

6. CONCLUSÕES

- O ambiente hipóxico reduziu a porcentagem de macrófagos infectados com amastigotas de *L. amazonensis* e o número de amastigotas intracelulares. Essa redução não está relacionada à morte de macrófagos mas provavelmente a capacidade destas células de eliminar amastigotas em ambiente hipóxico.
- Macrófagos peritoneais murinos submetidos a hipóxia reduzem a porcentagem de infecção tão efetivamente quanto macrófagos ativados com IFN- γ e LPS em normóxia.
- A produção de nitrito por macrófagos peritoneais infectados e ativados com IFN- γ e LPS e mantidos em hipóxia é reduzida em relação à produção de nitrito por células infectadas e ativadas sob condições normóxicas.
- Macrófagos J774 murinos infectados com *L. amazonensis* e submetidos ao ambiente hipóxico não induzem a expressão da enzima iNOS, mesmo na presença de imunoestimuladores.
- A expressão de HSP70 por macrófagos J774 murinos é alterada em condições hipóxicas e durante a infecção com amastigotas de *L. amazonensis*.

- A oxigenação hiperbárica reduziu a porcentagem de macrófagos peritoneais murinos infectados com amastigotas de *L. amazonensis* e o número de amastigotas intracelulares.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADHUNA; SALOTRA, P; MUKHOPADHYAYA, B & BHATNAGAR, R. Modulation of macrophage heat shock protein (HSPs) expression in response to intracellular infection by virulent and avirulent strains of *Leishmania donovani*. **Biochem. Mol. Biol. Int.**, 43(6): 1265-1275, 1997.

ALBINA, J. E; HENRY, W. L. Jr; MASTROFRANCESCO, B; MARTIN, B. A & REICHNER, J. S. Macrophage activation by culture in an anoxic environment. **J. Immunol.**, 155: 4391-6, 1995.

ALEXANDER, J. & RUSSEL, D. G. The interaction of *Leishmania* species with macrophages. **Adv. Parasit.**, 31: 175-254, 1992.

AMEMIYA, K.; KANEKO, Y.; MURAMATSU, T.; SHIMONO, M. & INOUE, T. Pulp cells responses during hypoxia and reoxygenation in vitro. **Eur. J. Oral. Sci.**, 111(4): 332-338, 2003.

ARMIJOS, R. X.; CHICO, M. E. & CRUZ, M. E. Human cutaneous leishmaniasis in Ecuador: Identification of parasites by enzyme electrophoresis. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, 42: 424-428, 1990.

ARRAIS-SILVA, W. W. Efeitos da hipóxia e do oxigênio hiperbárico nos modelos *in vitro* e *in vivo* da leishmaniose. 2003. 64f. Dissertação (Mestrado em Parasitologia)- Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

ASHFORD, R. W. Cutaneous leishmaniasis: Strategies for prevention. **Clin. Dermatol.**, 17: 327-332, 1999.

AUGUSTO, O.; LINARES, E. & GIORGIO, S. Possible roles of nitric oxide and peroxynitrite in murine leishmaniasis. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, 29: 853-862, 1996.

AYALA, A.; ERTEL, W. & CHAUDRY, I. H. Trauma-induced suppression of antigen presentation and expression of major histocompatibility class II antigen complex in leukocytes. **Shock**, 5(2): 79-90, 1996.

BALESTIERI, F. M. P.; QUEIROZ, A. R. P.; SCAVONE, C.; COSTA, V. M. A.; BARRAL-NETO, M. & ABRAHAMSOHN, I. A. *Leishmania (L.) amazonensis*-induced inhibition of nitric oxide synthesis in host macrophages. **Microbes and Infection**, 4: 23-29, 2002.

BARBIERI, C. L.; GIORGIO, S.; MERJAN, A. J. C & FIGUEIREDO, E. N. Glycophingolipid antigens of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* amastigotes identified by use of a monoclonal antibody. **Infection and Immunity**, 61(5): 2131-2137, 1993.

BARRAL, A.; BADARO, R. & BARRAL-NETO, M. Isolation of *Leishmania mexicana amazonensis* from the bone-marrow in a case of American visceral leishmaniasis. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, 35: 732-734, 1986.

BARRAL, A.; PEDRAL-SAMPAIO, D.; GRIMALDI, G. Jr; MOMEM, H.; McMAHON-PRATT, D.; RIBEIRO de JESUS, A.; AMEIDA, R. P; BADARO, R.; BARRAL-NETO, M.; CARVALHO, E. M. & JOHNSON, W. D. Jr. *L. amazonensis* is implicated in the whole spectrum of human clinical leishmaniasis. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, 44:536-546, 1991.

BASU, S.; BINDER, R.; SUTO, R.; ANDERSON, K. & SRIVASTAVA, P. Necrotic but not apoptotic cell death releases heat shock proteins, which deliver a partial maturation signal to dendritic cells and activate the NF- κ B pathway. **Int. Immunol.**, 12: 1539, 2000.

BECKER, I.; VOLKOW, P.; VELASCO-CASTREJON, O.; DOMINGUEZ, J. S. D.; MORALES-VARGAS, A.; RUIZ-REMÍGIO, A. & PEREZ-MONTFORT, R. The efficacy of pentamidine combined with allopurinol and immunotherapy for the treatment of patients with diffuse cutaneous leishmaniasis. **Parasitol. Res.**, 85: 165-170, 1999.

BEIL, W. J.; MEINARDUS-HAGER, G.; NEUGEBAUER, D. C. & SORG, C. Differences in the onset of the inflammatory response to cutaneous leishmaniasis in resistant and susceptible mice. **J. Leuko. Biol.**, 52: 135-142, 1992.

BERMAN, J. D. Human leishmaniasis: clinical, diagnostic, and chemotherapeutic developments in the last 10 years. **Clin. Infect. Dis.**, 24: 684-703, 1997.

BERTHOLET, S. & MAUEL, J. Human monocytic U937 cells transfected with human hepatic inducible nitric oxide synthase exhibit leishmanicidal activity. **J. Leukoc. Biol.**, 67: 34-39, 2000.

BIDDLESTONE, L. R.; HEPBURN, N. C. & McLAREN, K. M. A clinicopathological study of cutaneous leishmaniasis in British troops from Belize. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, 88: 672-676, 1994.

BINDER, R. J.; ANDERSON, K.; BASU, S. & SRIVASTAVA, P. Cutting edge: heat shock protein gp96 induces maturation and migration of CD11c(+) cells in vivo. **J. Immunol.**, 165: 6029, 2000.

BRUNKER, R. L. & BROWN, O. R. Effects of hyperoxia on oxidized and reduced NAD and NADP concentrations in *Escherichia coli*. **Microbios**, 4: 193-203, 1971.

BUTTERICK, C. J.; WILLIAMS, D. A.; BOXER, L. A. & BAEHNER, R. L. Changes in energy metabolism, structure and function in alveolar macrophages under anaerobic conditions. **Br. J. Haematol.**, 48: 523-532, 1981.

CANTOS, G.; BARBIERI, C. L.; IACCOMINI, M.; GORIN, P. A. & TRAVASSOS, L. R. Synthesis of antibody complexes of yeast mannan and mannan derivatives and their effect on *Leishmania*-infected macrophages. **Biochemistry Journal**, 289: 155-160, 1993.

CHEN, W.; SYLDATH, U.; BELLMANN, K.; BURKART, V. & KOLB, H. Human 60-kDa heat-shock protein: a danger signal to the innate immune system. **J. Immunol.** 162: 3212, 1999.

CHI, N. C & KARLINER, J. S. Molecular determinants of responses to myocardial ischemia/reperfusion injury: focus on hypoxia-inducible and heat shock factors. **Cardiovascular Research.**, 61: 437-447, 2004.

CHRISTIANS, E. S.; YAN, L. J. & BENJAMIN, I. J. Heat shock factor 1 and heat shock proteins: critical partners in protection against acute cell injury. **Crit. Care. Med.**, 30(1 Supp): S43-50, 2002.

CLARK, L. A. & MOON, R. E. Hyperbaric oxygen in the treatment of life-threatening soft-tissue infections. **Respir. Care. Clin. N. Am.**, 5: 203-219, 1999.

COLHONE, M. C.; ARRAIS-SILVA, W. W.; PICOLI, C. & GIORGIO, S. Effects of hypoxia on macrophage infection by *Leishmania amazonensis*. **J. Parasitol.**; 90(4), 2004.

CONVIT, J.; CASTELLANOS, P. L.; ULRICH, M.; CASTÉS, M.; RODON, A.; PINARDI, M. E.; RODRIQUEZ, N.; BLOOM, B. R.; FORMICA, S.; VALECILLOS, L. & BRETANA, A. Immunotherapy of localized, intermediate and diffuse forms of american cutaneous leishmaniasis. **J. Infect. Dis.**, 160(1): 104-115, 1989.

CORNFIELD, D. N.; STEVENS, T.; MCMURTRY, I. F.; ABMAN, S. H. & RODMAN, D. M. Acute hypoxia causes membrane depolarization and calcium influx in fetal pulmonary artery smooth muscle cells. **Am. J. Physiol. Lung. Cell. Mol. Physiol.**, 266: L469-475, 1994.

COSTA, J. M. L.; MARSDEN, P. D. & LLANOS-CUENTAS, E. A. Disseminated cutaneous leishmaniasis in a field clinic in Bahia, Brazil: A report of eight cases. **J. Trop. Med. Hyg.**, 89: 319-323, 1986.

CROWTHER, M.; BROWN, N. J.; BISHOP, E. T. & LEWIS, C. E. Microenvironmental influence on macrophage regulation of angiogenesis in wound and malignant tumors. **J. Leukoc. Biol.**, 70: 478-490, 2001.

CUNNINGHAM, A. C. Parasitic adaptive mechanisms in infection by *Leishmania*. **Experimental and Molecular Pathology**, 72: 132-141, 2002.

DANILIUC, S.; BITTERMAN, H.; RAHAT, M. A.; KINARTY, A.; ROSENZWEIG, D. & NIYZA, L. Hypoxia inactivates inducible nitric oxide synthase in mouse macrophages by disrupting its interaction with α -actinin 4¹. **J. Immunol.**, 171: 3225-3232, 2003.

DEDHIA, H. V.; MA, J. Y.; VALLYATHAN, V.; DALAL, N. S.; BANKS, D.; FLINK, E. B.; BILLIE, M.; BARGER, M. W. & CASTRANOVA, V. Exposure of rats to hyperoxia: alteration of lavagate parameters and macrophage function. **J. Toxicol. Environ. Health.**, 40(1): 1-13, 1993.

EL-ON, J.; SNEIER, R. & ELIAS, E. *Leishmania major*: bacterial contamination of cutaneous lesions in experimental animals. **Isr. J. Med. Sci.**, 28: 847-51, 1992.

FALANGA, V.; QIAN, S. W.; DANIELPOUR, D.; KATZ, M. H.; ROBERTS, A. B. & SPORN, M. B. Hypoxia upregulates the synthesis of TGF-beta 1 by human dermal fibroblasts. **J. Invest. Dermatol.**, 97(4): 634-7, 1991.

FERRIERO, D.; SOBERANO, H.; SIMON, R. & SHARP, F. Hypoxia-ischemia induces heat shock protein-like (HSP72) immunoreactivity in neonatal rat brain. **Brain. Res. Dev. Brain. Res.**, 53: 145-150, 1990.

FUKUTO, J. M. & CHAUDHURI, G. Inhibition of constitutive and inducible nitric oxide synthase: potential selective inhibition. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, 35: 165-94, 1995.

GANFORNINA, M. D. & LOPEZ-BARNEO, J. Single K⁺ channels in membrane patches of arterial chemoreceptor cells are modulated by O₂ tension. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 88: 2927-2930, 1991.

GARNER, W. L.; DOWNS, J. B.; REILLEY, T. E.; FROLICHER, D.; KARGI, A. & FABRI, P. J. The effects of hyperoxia during fulminant sepsis. **Surgery.**, 105(6): 747-51, 1989.

GENNARI, R. & ALEXANDER, J. W. Effects of hyperoxia on bacterial translocation and mortality during gut-derived sepsis. **Arch. Surg.**, 131(1): 57-62, 1996.

GILLIN, F. D. & DIAMOND, L. S. *Entamoeba histolytica* and *Giardia lamblia*: effects of cysteine and oxygen tension on trophozoite attachment to glass and survival in culture media. **Exp. Parasitol.**, 52: 9-17, 1981.

GIORGIO, S. & BARAO, S. C. Intracellular *Leishmania amazonensis* killing induced by the guanine nucleoside 8-bromoguanosine. **Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo.**, 40(4): 237-40, 1998.

GIORGIO, S.; LINARES, E.; ISCHIRPOULOS, H.; VON ZUBEN, F. J.; YAMADA, A. & AUGUSTO, O. In vivo formation of electron paramagnetic resonance-detectable nitric oxide and of nitrotyrosine is not impaired during murine leishmaniasis. **Infect. Immun.**, 66: 807-814, 1998.

GONTIJO, B. & CARVALHO, M. L. R. Leishmaniose tegumentar americana. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, 36(1): 71-80, jan-fev, 2003.

GORAK, P. M.; ENGWERDA, C. R. & KAYE, P. M. Dendritic cells, but not macrophages, produce IL-12 immediately following *Leishmania* infection. **Eur. J. Immunol.**, 28:687-695, 1998.

GRAVEN, K. K. & FARBER, H. W. Endothelial hypoxic stress proteins. **Kidney Int.**, 51: 426-437, 1997.

GRAVEN, K. K.; ZIMMERMAN, L. H.; DICKSON, E. W.; WEINHOUSE, G. L. & FARBER, H. W. Endothelial cell hypoxia associated proteins are cell and stress specific. **J. Cell. Physiol.**, 157: 544-554, 1993.

GREEN, L. C.; WAGNER, D. A.; GLOGOWSKI, J.; SKIPPER, P. L.; WISHNOK, J. S. & TANNENBAUM, S. R. Analysis of nitrate, nitrite and (¹⁵N) nitrate in biological fluids. **Analytical Biochemistry**, 126: 131-136, 1984.

GREEN, S. J.; MELTZER, M. S.; HIBBS J. B. & NACY, N. A. Activated macrophages destroy intracellular *Leishmania major* amastigotes by an L-arginine-dependent killing mechanism. **J. Immunol.**, 144(1): 278-283, 1990.

GRIMALDI, G. Jr. & TESH, R. B. Leishmaniasis of the new world: current concepts and implications of future research. **Clin. Microbiol. Rev.**, 6: 230-250, 1993.

GUDEWICZ, T. M.; MADER, J. T. & DAVIS, C. P. Combined effects of hyperbaric oxygen and antifungal agents on the growth of *Candida albicans*. **Aviat. Space. Environ. Med.**, 58: 673-678, 1987.

GUPTA, S. & KNOWLTON, A. A. Cytosolic heat shock protein 60, hypoxia, and apoptosis. **Circulation**, 106: 2727-2733, 2002.

GUTIERREZ, Y.; SALINAS, G. H. & PALMA, G. Correlation between histopathology, immune response, clinical presentation, and evolution in *Leishmania braziliensis* infection. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, 45: 281-289, 1991.

HAMMERER-LERCHER, A.; MAIR, J.; BONATTI, J.; WATZKA, S. B. C.; PUSCHENDORF, B. & DIRNHOFER, S. Hypoxia induces heat shock proteins expression in human coronary artery bypass grafts. **Cardiovascular Research**, 50: 115-124, 2001.

HANANO, R. & KAUFMANN, S. H. E. Nitric oxide and mycobacterial growth inhibition by murine alveolar macrophages: the sequence of rIFN- γ stimulation and *Mycobacterium bovis* BCG infection determines macrophage activation. **Immunol. Lett.**, 45: 23-27, 1995.

HANDMAN, E. Cell biology of *Leishmania*. **Adv. Parasitol.**, 44:1-39, 2000.

HELFMAN, T. & FALANGA, V. Gene expression in low oxygen tension. **Am. J. Med. Sci.**, 306: 37-41, 1993.

HEPBURN, N. C.; TIDMAN, M. J. & HUNTER, J. A. A. Cutaneous leishmaniasis in British troops from Belize. **Br. J. Dermatol.**, 128: 63-68, 1993.

HERWALDT, B. L. Leishmaniasis. **Lancet**, 354: 1191-1199, 1999.

HIGHTOWER, L. E. Heat shock, stress protein, chaperones, and proteotoxicity. **Cell.**, 66: 191-197, 1991.

HUNT, T. K.; KNIGHTON, D. R.; THAKRAL, K. K.; GOODSON, W. H. & ANDREWS W. S. Studies on inflammation and wound healing: angiogenesis and collagen synthesis stimulated *in vivo* by resident and activated wound macrophages. **Surgery**, 96: 48-54, 1984.

INAMOTO, Y.; OKUNO, F.; SAITO, K.; TANAKA, Y.; WATANABE, K.; MORIMOTO, I.; YAMASHITA, U. & ETO, S. Effect of hiperbaric oxygenation on macrophage function in mice. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, 179: 886-891, 1991.

IWAKI, K., CHI, S.; DILLMANN, W. & MESTRIL, R. Induction of HSP70 in cultured rat neonatal cardiomyocytes by hypoxia and metabolic stress. **Circulation**, 87: 2023–2032, 1993.

JACOBSON, M. D. & RAFF, M. C. Programmed cell death and Bcl-2 protection in very low oxygen. **Nature**, 374(6525): 814-6, 1995.

KAMRADT, M. C.; CHEN, F. & CRYNS, V. L. The small heat shock protein alpha B-crystallin negatively regulates cytochrome c- and caspase-8-dependent activation of caspase-3 by inhibiting its autoproteolytic maturation. **J. Biol. Chem.**, 276: 16059-63, 2001.

KANE, M. M. & MOSSER, D. M. Leishmania parasites and their ploys to disrupt macrophage activation. **Curr. Opin. Hematol.**, 7: 26-31, 2000.

KAWAKAMI, K.; ZHANG, T.; QURESHI, M. H. & SAITO, A. *Cryptococcus neoformans* inhibits nitric oxide production by murine peritoneal macrophages stimulated with interferon- γ and lipopolysaccharide. **Cell. Immunol.** 180: 47–54, 1997.

KOCH, A. E.; POLVERINI, P. J. & LEIBOVICH, S. J. Induction of neovascularization by activated human monocytes. **J. Leukoc. Biol.**, 39: 233-238, 1986.

KUMAR, G. K. & KLEIN, J. B. Analysis of expression and posttranslational modification of proteins during hypoxia. **J. Appl. Physiol.**, 96: 1178-1186, 2004.

KURATA, S. I.; YAMASHITA, U. & NAKAJIMA, H. Hyperbaric oxygenation reduces the cytostatic activity and transcription of nitric oxide synthase gene of mouse peritoneal macrophages. **Biochimica et Biophysica Acta.**, 1263: 35-38, 1995.

LE KOPPELE, J. M.; KELLER, B. J.; CALDWELL-KENDEL, J. C.; LEMASTRES, J. J. & THURMAN, R. G. Effects of hepatotoxic chemicals and hypoxia on hepatic nonparenchymal cells: impairment of phagocytosis by Kupffer cells and disruption of the endothelium in rat livers perfused with colloidal carbon. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, 110: 20-30, 1991.

LEEPER-WOODFORD, S. K. & MILLS, J. W. Phagocytosis and ATP levels in alveolar macrophages during acute hypoxia. **Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.**, 6: 326-334, 1992.

LEWIS, J. S.; LEE, J. Á.; UNDERWOOD, J. C.; HARRIS, A. L. & LEWIS, C. E. Macrophage response to hypoxia: relevance to disease mechanisms. **J. Leukoc. Biol.**, 66: 889-900, 1999.

LIN, K. M.; LIN, B. & LIAN, I. Y. Combined and individual mitochondrial HSP60 and HSP10 expression in cardiac myocytes protects mitochondrial function and prevents apoptotic cell deaths induced by simulated ischemia-reoxygenation. **Circulation**, 103: 1787-92, 2001.

LINARES, E.; AUGUSTO, O.; BARÃO, S. C. & GIORGIO, S. *Leishmania amazonensis* infection does not inhibit systemic nitric oxide levels elicited by lipopolysaccharide *in vivo*. **J. Parasitol.**, 86: 78-82, 2000.

LINARES, E.; GIORGIO, S.; MORTARA, R. A.; SANTOS, C. X. C.; YAMADA, A. T. & AUGUSTO, O. Role of peroxynitrite in macrophage microbicidal mechanisms *in vivo* revealed by protein nitration and hydroxylation. **Free Radical Biology and Medicine**, 30(11): 1234-1242, 2001.

MATSUMOTO, K.; TANIGUCHI, T.; FUJIOKA, Y.; SHIMIZU, H.; ISHIKAWA, Y. & YOKOYAMA, M. Effects of hypoxia on cholesterol metabolism in human monocyte-derived macrophages. **Life Sciences**, 67(17): 2083-2091, 2000.

MCCORMICK, T. S.; STEVENS, S. R. & KANG, K. Macrophages and cutaneous inflammation. **Nat. Biotechnol.**, 18(1): 25-6, 2000.

McELRATH, M. J.; KAPLAN, G.; NUSRAT, A. & COHN, Z. A. Cutaneous leishmaniasis. The defect in cell T influx in BALB/c mice. **J. Exp. Med.**, 165: 546-59, 1987.

MELILLO, G.; TAYLOR, L. S.; BROOKS, A.; COX, G. W. & VARESIO, L. Regulation of inducible nitric oxide synthase expression in IFN- γ treated murine macrophages cultured under hypoxic conditions. **J. Immunol.**, 157: 2638-2644, 1996.

MKOJI, G. M.; SMITH, J. M. & PRICHARD, R. K. Antioxidant systems in *Schistosoma mansoni*: evidence for their role in protection of the adult worms against oxidant killing. **Int. J. Parasitol.**, 18: 667-73, 1988.

MOON, R. E. & CAMPORESI, E. M. Hyperbaric oxygen therapy: from the nineteenth to the twenty-first century. **Respir. Care. Clin. N. Am.**, 5(1): 1-5, 1999.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. **J. Immunol. Meth.**, 65: 55-63, 1983.

MUHVICH, K. H.; ANDERSON, L. H.; CRISWELL, D. W. & MEHM, W. J. Hyperbaric hyperoxia enhances the lethal effects of amphotericin B in *Leishmania braziliensis panamensis*. **Undersea Hyperbaric Med.**, 20: 321-328, 1993.

MULLER, K.; ZANDBERGEN, G. V.; HANSEN, B.; LAUFS, H.; JAHNKE, N.; SOLBACH, W. & LASKAY, T. Chemokines, natural killer cells and granulocytes in the early course of *Leishmania major* infection in mice. **Med. Microbiol. Immunol.**, 190: 73-76, 2001.

NAKANO, M.; MANN, D. L. & KNOWLTON, A. A. Blocking the endogenous increase in HSP72 increases susceptibility to hypoxia and reoxygenation in isolated adult feline cardiocytes. **Circulation**, 95: 1523-1531, 1997.

NARE, B.; SMITH, J. M. & PRICHARD, R. K. *Schistosoma mansoni*: levels of antioxidants and resistance to oxidants increase during development. **Exp. Parasitol.**, 70: 389-397, 1990.

NIINIKOSKI, J. & HUNT, T. K. Oxygen tensions in healing bone. **Surg. Gynecol. Obstet.**, 134: 746-50, 1972.

- OEHLER, R.; SCHMIERER, B.; ZELLNER, M.; PROHASKA, R. & ROTH, E. Endothelial cells downregulate expression of the 70kDa heat shock protein during hypoxia. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, 274: 542-547, 2000.
- OVERATH, P. & AEBISCHER, T. Antigen presentation by macrophages harborin intravesicular pathogens. **Parasitol. Today.**, 15: 325-332, 1999.
- OTTO, C. M. & BAUMGARDNER, J. E. Effect of culture PO₂ on macrophage (RAW 264.7) nitric oxide production. **Am. J. Physiol. Cell. Physiol.**, 280(2): C280-287, 2001.
- PAKIANATHAN, D. R. & KUHN, R. E. *Trypanosoma cruzi* affects nitric oxide production by murine peritoneal macrophages. **J. Parasitol.**, 80: 432-437, 1994.
- PANARO, M. A.; ACQUAFREDA, A.; LISI, S.; LOFRUMENTO, D. D.; TROTTA, T.; SATALINO, R.; SACCIA, M.; MITOLO, V. & BRANDONISIO O. Inducible nitric oxide synthase and nitric oxide production in *Leishmania infantum*-infected human macrophages stimulated with interferon-gamma and bacterial lipopolysaccharide. **International Journal of Laboratory Research**, 29(3): 122-127, 1999.
- PARK, M. K.; MYERS, R. A. M. & MARZELLA, L. Oxygen tensions and infections: modulation of microbial growth, activity of antimicrobial agents and immunological responses. **Clin. Inf. Dis.**, 14: 720-740, 1992.
- PELHAM, H. R. B. Speculations on the functions of the major heat shock and glucose-regulated proteins. **Cell.**, 46: 959-961, 1986.
- PESANTI, E. L. *Pneumocystis carinii*: oxygen uptake, antioxidant enzymes, and susceptibility to oxygen-mediated damage. **Infec. Immuno.**, 44: 7-11, 1984.

PIACENTINI, L. & KARLINER, J. S. Altered gene expression during hypoxia and reoxygenation of the heart. **Pharmacol. Ther.**, 83: 21-37, 1999.

PROUDFOOT, L.; O'DONNELL, C. & LIEW, F. Y. Glycoinositolphospholipids of *Leishmania major* inhibit nitric oxide synthesis and reduce leishmanicidal activity in murine macrophages. **Eur. J. Immunol.**, 25: 745–750, 1995.

PROUDFOOT, L.; NIKOLAEV, A. V.; FENG, G. J.; WEI, X. Q.; FERGUSON, M. A. J.; BRIMACOMBE, J. S. & LIEW, F. Y. Regulation of the expression of nitric oxide synthase and leishmanicidal activity by glycoconjugates of *Leishmania* lipophosphoglycan in murine macrophages. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, 93: 10984–10989, 1996.

RALPH, P. & NAKOINZ, I. Direct toxic effects of immunopotentiators on monocytic, myelomonocytic and histiocytic or macrophage tumor cells in culture. **Cancer Res.**, 37: 546-50, 1977.

REIS e SOUZA, C.; SHER, A. & KAYE, P. The role of dendritic cells in the induction and regulation of immunity to microbial infection. **Curr. Opin. Immunol.**, 11: 392-399, 1999.

REICHNER, J. S.; FITZPATRICK, P. A.; WAKSHULL, E. & ALBINA, J. E. Receptor-mediated phagocytosis of rat macrophages is regulated differentially for opsonized particles and non-opsonized particles containing b-glucan. **Immunol.**, 104: 198-206, 2001.

REMENSNYDER, J. P. & MAJINO, G. Oxygen gradients in healing wounds. **Am. J. Pathol.**, 52: 301-319, 1968.

SAMPAIO, R. N.; MARSDEN, P. D.; LLANOS-CUENTAS, E. A. *Leishmania mexicana amazonensis* isolated from a patient with fatal mucosal leishmaniasis. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, 18: 273-274, 1985.

SANCHEZ, J. L.; BENEDICT, M. & DINIEGA, B. M. Epidemiologic investigation of an outbreak of cutaneous leishmaniasis in a defined geographic focus of transmission. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, 47: 47-54, 1992.

SHENNIB, H.; CHIU, R.; MULDER, D.; RICHARDS, G. & PRENTIS, J. Pulmonary bacterial clearance and alveolar macrophage function in septic shock lung. **Am. Rev. Respir. Dis.**, 130: 444-449, 1984.

SHIMIZU, S.; EGUCHI, Y.; KAMIKE, W.; ITOH, Y.; HASEGAWA, J.; YAMABE, K.; OTSUKI, Y.; MATSUDA, H. & TSUJIMOTO, Y. Induction of apoptosis as well as necrosis by hypoxia and predominant prevention of apoptosis by Bcl-2 and Bcl-XL. **Cancer Res.**, 56(9): 2161-6, 1996.

SIMON, L. M.; AXLINE, S. G. & PESANTI, E. L. Adaptations of phagocytosis and pinocytosis in mouse lung macrophages after sustained in vitro hypoxia. **Am. Rev. Respir. Dis.**, 123: 64-68, 1981.

SINGH-JASUJA, H.; SCHERER, H.; HILF, N.; ARNOLD-SCHILD, D.; RAMMENSEE, H.; TOES, R. & SCHILD, H. The heat shock protein gp96 induces maturation of dendritic cells and down-regulation of its receptor. **Eur. J. Immunol.** 30: 2211, 2000.

SMITH, R. M. & MOHIDEEN, P. One hour in 1 ATA oxygen enhances rat alveolar macrophage chemiluminescence and fungal cytotoxicity. **Am. J. Physiol.**, 260(6 Pt 1): L457-63, 1991.

SOLBACH, W. & LASKAY, T. The host response to *Leishmania major*. **Adv. Immunol.**, 74: 275-317, 2000.

STUEHR, D. J. Structure-function aspects in the nitric oxide synthases. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, 37: 703-712, 1997.

SUNDERKOTTER, C.; KUNG, M.; STUNBRINK, K.; MEINARDUS-HAGER, G.; GOEBELER, M.; BILDAU, H. & SORG, K. Resistance of mice to experimental leishmaniasis is associated with more rapid appearance of mature macrophages *in vitro* and *in vivo*. **J. Immunol.**, 151: 4891-4901, 1993.

SUZUKI, K.; SAWA, Y.; KANEDA, Y.; ICHIKAWA, H.; SHIRAKURA, R. & MATSUDA, H. Overexpression of heat shock protein 70 attenuates hypoxic injury in coronary endothelial cells. **J. Mol. Cell. Cardiol.**, 30: 1129-1136, 1998.

SZABO, C.; WONG, H. R. & SALZMAN, A. L. Pre-exposure to heat shock inhibits peroxynitrite-induced activation of poly (ADP) ribosyltransferase and protects against peroxynitrite cytotoxicity in J774 macrophages. **Eur. J. Pharmacol.**, 315(2): 221-6, 1996.

THAKRAL, K. K.; GOODSON, W. HIII. & HUNT, T. K. Stimulation of wound blood vessel growth by wound macrophages. **J. Surg. Res.**, 26: 430-436, 1979.

TOWFIGH, S.; HEISLER, T.; RIGBERG, D. A.; HINES, O. J.; CHU, J.; MCFADDEN, D. W. & CHANDLER, C. Intestinal ischemia and the gut-liver axis: an *in vitro* model. **J. Surg. Res.**, 88: 160-164, 2000.

TSUKAMOTO, Y.; KUWABARA, K.; HIROTA, S.; IKEDA, J.; STERM, D.; YANAGI, H.; MATSUMOTO, M.; OGAWA, S. & KITAMURA, Y. 150kD oxygen-regulated protein is expressed in human atherosclerotic plaques and allows mononuclear phagocytes to withstand cellular stress on exposure to hypoxia and modified low density lipoprotein. **J. Clin. Invest.**, 98: 1930-1941, 1996.

TURMAN, M.; KAHN, D.; ROSENFELD, S.; APPLE, C. & BATES, C. Characterization of human proximal tubular cells after hypoxic preconditioning: constitutive and hypoxia-induced expression of heat shock protein Hsp70 (A, B, and C), Hsc70, and Hsp90. **Biochem. Mol. Ed.**, 60: 49–58, 1997.

TURNER, L.; SCOTTON, C.; NEGUS, R. & BALKWILL, F. Hypoxia inhibits macrophages migration. **Eur. J. Immunol.**, 29: 2280-7, 1999.

UEHARA, T.; KANEKO, M.; TANAKA, S.; OKUMA, Y. & NOMURA, Y. Possible involvement of p38 MAP kinase in HSP70 expression induced by hypoxia in rat primary astrocytes. **Brain Res.**, 823: 226–230, 1999.

WEBB, J. R.; CAMPOS-NETO, A.; OVENDALE, P. J.; MARTIN, T. I.; STROMBERG, E. J.; BADARO, R. & REED, S. G. Human and murine immune responses to a novel *Leishmania major* recombinant protein encoded by members of a multicopy gene family. **Infec. Immun.**, 66: 3279-89, 1998.

WEIGLE, K. & SARAIVA, N. G. Natural history, clinical evolution, and the host-parasite interaction in New World cutaneous leishmaniasis. **Clin. Dermatol.**, 14: 433-50, 1996.

WEISZ, G.; LAVY, A.; ADIR, Y.; MELAMED, Y.; RUBIN, D.; EIDELMAN, S. & POLLACK, S. Modification of *in vivo* and *in vitro* TNF-IL-1, and IL-6 secretion by circulating monocytes during hyperbaricoxygen treatment in patients with perianal Crohn's disease. **J. Clin. Immunol.**, 17: 154–9, 1997.

WHO - Report of the Fourth TDR/IDRI Meeting on Second-Generation Vaccines against Leishmaniasis. México. **WHO**, 1-16, 2001.

XU, D. Z.; LU, Q.; KUBICKA, R. & DEITCH, E. A. The effect of hypoxia/reoxygenation on the cellular function of intestinal epithelial cells. **J. Trauma.**, 46: 280-285, 1999.

YUN, J. K.; McCORMICK, T. S.; JUDWARE, R. & LAPETINA, E. G. Cellular adaptive responses to low oxygen tension: apoptosis and resistance. **Neurochem. Res.**, 22: 517-521, 1997a.

YUN, J. K.; Mc CORMICK, T. S.; VILLABONA, C.; JUDWARE, R. R.; ESPINOSA, M. B. & LAPETINA, E. G. Inflammatory mediators are perpetuated in macrophages resistant to apoptosis induced by hypoxia. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 94: 13903-13908, 1997b.

ZHOU, L.; DOSANJH, A.; CHEN, H. & KARASEK, M. Divergent effects of extracellular oxygen on the growth, morphology, and function of human skin microvascular endothelial cells. **J. Cell. Physiol.**, 182: 134-40, 2000.