

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Wagner Welber Arrais da Silva



**EFEITOS DA HIPÓXIA E DO OXIGÊNIO HIPERBÁRICO
NOS MODELOS *IN VITRO* E *IN VIVO* DA LEISHMANIOSE**

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
Wagner Welber Arrais da Silva
e aprovada pela Comissão Julgadora.

Tese apresentada ao Instituto de
Biologia para obtenção de título
de Mestre em Parasitologia.

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

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Selma Giorgio".

JANEIRO

2003

2003 11/24

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

UNIVERSIDADE UNICAMP
CHAMADA SI38e
EX
COMBO 53009
PROC 16-124/03
C X
PREÇO R\$ 11,00
DATA 09/09/03
Nº CPD

CM00181048-9

BIBID - 286508

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

Silva, Wagner Welber Arrais da

Si38e

Efeitos da hipóxia e do oxigênio hiperbárico nos modelos *in vitro* e *in vivo* da leishmaniose / Wagner Welber Arrais da Silva. -- Campinas, SP:[s.n.], 2002.

Orientadora: Selma Giorgio
Tese (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas.
Instituto de Biologia

1. Leishmaniose - Brasil. 2. Macrófagos. I. Giorgio, Selma.
- II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia.
- III. Título.

**“Pode o homem tornar-se culto pela cultura dos outros;
mas só se torna sábio pelas próprias experiências.”**

Mansour Chalita

**Aos meus pais, José e Antônia e à minha irmã Cristina, que
sempre acreditaram em mim e me apoiaram em todos os
momentos, dedico este trabalho.**

Agradecimentos

À Prof^ª. Dr^ª. Selma Giorgio, pela receptividade, pelo exemplo de dedicação e responsabilidade e pela confiança dedicados durante a orientação.

Aos Professores do Departamento de Parasitologia, pelos valiosos ensinamentos.

Aos funcionários do Departamento de Parasitologia, pelo auxílio dispensado durante a realização desse trabalho.

Às companheiras de trabalho, Claudia e Marcele, pela amizade e apoio.

Às amigas do Departamento de Imunologia, Paula, Vânia e Jacy, pela colaboração.

À Prof^ª. Dr^ª. Eliana Maria Zanotti-Magalhães e à Prof^ª. Dr^ª. Urara Kawazoe, pela participação na banca prévia e por todas as sugestões oferecidas.

À Prof^ª. Dr^ª. Marlene Tiduko Ueda, Prof^ª. Dr^ª. Ana Maria Aparecida Guaraldo, Prof^ª. Dr^ª. Maria Sílvia Viccari Gatti e ao Prof. Dr. Reinaldo José da Silva, pela participação na banca examinadora e pelas valiosas sugestões a este trabalho.

À companheira Fabíola, pelo apoio, carinho e principalmente por tudo que passamos juntos.

Resumo

As infecções, em geral, provocam mudanças na pressão parcial de oxigênio tornando o microambiente tecidual hipóxico (oxigenação diminuída). O fluxo sanguíneo alterado, a isquemia e a proliferação de células e microrganismos infectantes são alguns dos fatores responsáveis pela hipóxia associada às infecções. Os macrófagos se adaptam a ambientes hipóxicos, alterando o metabolismo, a produção de linfocinas pró-inflamatórias e as atividades exo, endo e fagocíticas. A lesão causada pelo parasita *Leishmania amazonensis* tem as características que levam a hipóxia tecidual, como a presença de um grande número de amastigotas em divisão, a migração de células inflamatórias, as infecções secundárias com bactérias aeróbicas e anaeróbicas e as mudanças no fluxo sanguíneo tecidual. Assim, analisamos neste trabalho o papel da hipóxia no modelo *in vitro* da infecção com *L. amazonensis* e investigamos os possíveis mecanismos de reversão deste ambiente na evolução da lesão na leishmaniose murina, utilizando a terapia com oxigênio hiperbárico.

A cultura de macrófagos J774 incubada com amastigotas em ambiente hipóxico (5% de O₂) apresentou diminuição da porcentagem de células infectadas quando comparada ao controle normóxico, mas manteve o mesmo percentual de infecção ao ser ativada com gIFN e LPS e não apresentou na produção de nitrito. O tratamento com oxigênio hiperbárico em formas promastigotas e amastigotas inibiu o crescimento e a diferenciação celular. Camundongos BALB/c tratados com oxigênio hiperbárico (1h/dia, 2,5 ATA e 100% de O₂) mostraram uma significativa diminuição do tamanho da lesão. Houve diminuição do processo edematoso e conseqüente melhora do fluxo sanguíneo local, mas

ocasionou um precoce comprometimento sistêmico com diminuição da sobrevivência dos camundongos tratados.

Concluimos que a hipóxia é um importante estimulador/ativador de macrófagos e que a restrição de O₂ resulta em uma produção deficiente de nitrito, mas não impede que as células restrinjam a infecção com *L. amazonensis*. Os mecanismos pelos quais os macrófagos matam os amastigotas não são ainda conhecidos, mas podemos sugerir uma ação independente de NO, como, por exemplo, o aumento da atividade lisossomal. Sugerimos também que a HBO favoreceu a metástase, apesar da significativa melhora no fluxo sanguíneo da área lesionada, propiciando futuros estudos sobre o efeito adjuvante do oxigênio hiperbárico com drogas anti-parasitárias no modelo murino da leishmaniose e de outros parasitas.

Abstract

Infections can cause the formation of hypoxic areas (low PO₂). The altered blood flow, ischemia, cell proliferation and the presence of microorganisms causes hypoxia in injured tissues.

Macrophages adapt to the presence of hypoxia and alter their metabolism, pro-inflammatory lymphokines production and phagocytosis activity. Lesions induced by *Leishmania amazonensis* are characterized by a large number of amastigotes, inflammatory cells migration, secondary infection with anaerobic and aerobic bacteria and altered tissue blood flow which can cause chronic areas of hypoxia. We have analyzed the effect of hypoxia on *L. amazonensis* *in vitro* and *in vivo* models and also studied the effect of hyperbaric therapy on murine leishmaniasis. The murine J774 macrophages cultures infected with *L. amazonensis* amastigotes under hypoxic conditions (5% O₂) showed a decrease in the number of infected cells compared with cell cultures infected in normoxia (21% O₂). However macrophage cultures activated with gamma-interferon and bacterial lipopolisaccharides showed the same percentage of infected cells compared with non-stimulated macrophages in hypoxia and, no significant nitrite production.

Hyperbaric treatment inhibited the growth and differentiation of *L. amazonensis* promastigotes and amastigotes. In addition BALB/c mice infected with *L. amazonensis* and treated with hyperbaric therapy (1 hour/day, 2.5 ATA, 100% O₂) showed a significant decrease of lesions size. We also observed a decreased of the edematous process, an improvement of local blood flow, and early metastasis.

Taken together our results provided evidences that hypoxia is an important stimulator/activator factor for *L. amazonensis* killing macrophages and also that hyperbaric therapy can be tested as an adjuvant therapy with anti-leishmanial drugs.

Lista de Abreviaturas

gIFN	Interferon gama
HBO	Oxigênio hiperbárico
HEPES	Ácido hidroxietil piperazina etanosulfúrico
IL	Interleucina
iNOS	Óxido nítrico sintase induzida
LPS	Lipopolissacarídeo de origem bacteriana
NOS	Óxido nítrico sintase
SFB	Soro fetal bovino
SOD	Superóxido desmutase
Th1	Linfócito tipo “helper” 1
Th2	Linfócito tipo “helper” 2
TNF	Fator de necrose tumoral

Sumário

1. Introdução	1
1.1. Aspectos gerais da leishmaniose.....	1
1.2. Aspectos da patologia das lesões cutâneas.....	3
1.3. Resposta imune do hospedeiro.....	4
1.4. Relevância fisiológica da hipóxia.....	6
1.5. Efeitos da hipóxia em neutrófilos e macrófagos.....	7
1.6. Oxigenação hiperbárica.....	10
2. Objetivos	14
3. Materiais e Métodos	15
3.1. Animais.....	16
3.2. Meio de cultura.....	16
3.3. Obtenção e manutenção de <i>Leishmania amazonensis</i>	16
3.4. A linhagem celular murina J774.....	17
3.5. Ambiente hipóxico.....	17
3.6. Infecção das culturas de macrófagos J774 com <i>Leishmania amazonensis</i>	18
3.7. Ativação das culturas de macrófagos J774 com gIFN e LPS.....	19
3.8. Análise da produção de nitrito.....	19
3.9. Tratamento <i>in vitro</i> de <i>Leishmania amazonensis</i> com oxigênio hiperbárico.....	20
3.10. Tratamento de camundongos infectados com <i>Leishmania amazonensis</i> com oxigênio hiperbárico.....	21

3.11. Análise estatística.....	22
4. Resultados.....	23
4.1. Padronização da infecção <i>in vitro</i> de macrófagos J774 com formas amastigotas de <i>Leishmania amazonensis</i>	23
4.2. Avaliação do efeito da hipóxia na infecção de macrófagos J774 com formas amastigotas de <i>Leishmania amazonensis</i>	24
4.3. Avaliação do efeito da hipóxia em macrófagos J774 ativados com gIFN e LPS e infectados com formas amastigotas de <i>Leishmania amazonensis</i>	26
4.4. Análise da produção de Óxido Nítrico (NO).....	27
4.5. Análise morfológica dos macrófagos J774 em ambiente normóxico e hipóxico.....	30
4.6. Efeito do oxigênio hiperbárico em formas promastigotas e amastigotas de <i>Leishmania amazonensis</i> e determinação da atividade leishmanicida do Glucantime em condições hiperbáricas.....	36
4.7. Análise da exposição de camundongos BALB/c infectados com amastigotas de <i>Leishmania amazonensis</i> à terapia com oxigênio hiperbárico.....	41
4.8. Análise da sobrevivência de camundongos BALB/c infectados com amastigotas de <i>Leishmania amazonensis</i> e tratados com oxigênio hiperbárico.....	43
4.9. Aspecto da lesão desenvolvida em camundongos BALB/c infectados com amastigotas de <i>Leishmania amazonensis</i>	45
5. Discussão.....	46
6. Conclusões.....	52
7. Referências Bibliográficas.....	53

1. Introdução

1.1. Aspectos gerais da leishmaniose

Parasitas do gênero *Leishmania* foram descritos primeiramente por Cunningham em 1885 e, posteriormente, por Leishman em 1900 e Donovan em 1903. A leishmaniose é endêmica em regiões tropicais da África, Américas, no subcontinente indiano, Mediterrâneo e no sudoeste da região asiática (HANDMAN, 2000).

O número global de indivíduos infectados, segundo estimativas da Organização Mundial de Saúde (WHO), é de 12 milhões, de uma população de 350 milhões vivendo em áreas endêmicas; há cerca de 3 milhões de casos clínicos. Outro fato significativo em relação a leishmaniose é a reativação de infecções subclínicas assintomáticas em indivíduos com síndrome da imunodeficiência adquirida (www.who.int). No Brasil estima-se o aparecimento de 20.000 a 40.000 casos clínicos por ano.

A *Leishmania*, um protozoário pertencente à família Trypanosomatidae, apresenta duas formas em seu ciclo evolutivo: promastigotas que se desenvolvem no hospedeiro invertebrado e amastigotas que vivem em fagolisosomas de macrófagos do hospedeiro vertebrado. Os hospedeiros invertebrados são insetos da ordem Díptera, dos gêneros *Phlebotomus* (velho mundo) e *Lutzomyia* (novo mundo) e os hospedeiros vertebrados são os mamíferos, incluindo o homem.

No inseto vetor a *Leishmania* é parasita extracelular de forma alongada e flagelada (promastigotas) que multiplica-se por divisão binária no intestino médio. Existe a formação de estágios infectantes, chamados de promastigotas metacíclicos que migram para a probóscide do flebótomo e no momento do repasto sanguíneo são inoculados no tecido

celular subcutâneo do hospedeiro vertebrado. No hospedeiro vertebrado são fagocitados por macrófagos presentes no tecido (histiócitos). Em seguida os promastigotas transformam-se em amastigotas, que possuem forma arredondada, sem flagelo. Os amastigotas multiplicam-se por divisão binária dentro do fagolisosoma até romper o histiócito infectando novas células, mantendo assim a infecção. Durante o repasto sanguíneo o inseto vetor pode ingerir macrófagos contendo amastigotas, que no seu intestino vão se transformar em formas promastigotas fechando o ciclo evolutivo do parasita (HANDMAN, 2001).

As leishmanioses apresentam ampla variedade de manifestações clínicas, desde lesões cutâneas de evolução benigna até lesões metastásicas viscerais que geralmente são fatais se não tratadas. Essas variações clínicas dependem principalmente da espécie do parasito e da susceptibilidade do hospedeiro (HERWALDT, 1999; HANDMAN, 2000).

O parasita utilizado nesse estudo, a *L. amazonensis*, causa geralmente lesões ulceradas únicas que respondem bem ao tratamento e podem curar-se espontaneamente. Contudo, cerca de 30% dos pacientes exibem a forma cutânea difusa que se caracteriza pelo aparecimento de nódulos no rosto e membros, com abundância de macrófagos infectados, ausência de linfócitos e focos necróticos. Os pacientes não respondem ao teste cutâneo com leishmanina (teste de Montenegro), sendo baixa a capacidade de proliferação “*in vitro*” de seus linfócitos na presença de antígenos do parasita. Não há cura espontânea e a resistência ao tratamento é comum (GRIMALDI & TESH, 1993).

O controle das leishmanioses esbarra no fato dela ser uma zoonose, sendo os animais silvestres e domésticos potenciais reservatórios do parasita. O combate ao flebótomo também tem gerado muitas dificuldades no que tange o crescimento urbano desordenado (HANDMAN, 2000). A resistência à drogas (antimoniais pentavalentes, como

o glucantime) utilizados tradicionalmente na terapia contra as leishmanioses, aliada aos efeitos colaterais destes compostos fazem com que alternativas ao tratamento sejam estudadas (HERWALDT, 1999).

1.2. Aspectos da patologia das lesões cutâneas

Após a inoculação de promastigotas, a fagocitose pelos histiócitos e a transformação em amastigotas a infecção tende a manter-se, e na persistência do parasita, o infiltrado linfocítico perivascular inicial é substituído por macrófagos. Os macrófagos infectados acumulam-se, e essa agregação microscópica circundada por um colar de linfócitos é definida como uma organização granulomatosa.

WEIGLE & SARAVIA (1996) avaliaram 221 lesões cutâneas causadas por *Leishmania(Viannia)*, e observaram abundância de linfócitos, histiócitos, e granulomas. Na típica escara leishmaniótica com alta freqüência de cura, observam-se poucos amastigotas e abundância de células gigantes e células epitelióides. Nestas lesões que curam-se há completa re-epitelização, acompanhada de fibrose e uma marcada redução do infiltrado inflamatório (BIDDLESTONE *et al.*, 1994). Em contraste, quando ocorre linfadenopatia o padrão histológico envolve a proliferação parasitária, com predomínio de amastigotas, e menos freqüentemente a presença de células gigantes e epitelióides (WEIGLE & SARAVIA, 1996).

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) 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 de manifestações clínicas diversas, com aumento da morbidade, facilmente confundidas com doenças crônicas de pele como a psoríase, os eczemas, a varicela e os carcinomas de pele (WEIGLE & SARAIVA, 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 & SARAIVA, 1996).

Assim, podemos concluir que o processo de infecção, fagocitose e multiplicação da *Leishmania*, a inflamação crônica com infiltrado celular mononuclear e a formação de granuloma, com conseqüente dificuldade de perfusão local (isquemia), leva ao estabelecimento de uma hipóxia local (diminuição do aporte de oxigênio).

1.3. Resposta imune do hospedeiro

A extensão e a gravidade da leishmaniose são limitadas à capacidade de macrófagos se ativarem e produzirem compostos tóxicos ao parasita. Tanto o modelo *in vitro* (macrófagos cultivados, infectados com as formas promastigotas ou amastigotas), como o sistema *in vivo* (linhagens murinas isogênicas) têm se mostrado ferramentas muito úteis para os estudos imunológicos, patológicos e bioquímicos (ALEXANDER et al., 1999; HANDMAN, 2000; SOLBACH & LASKAY, 2000). Utilizando-se camundongos infectados com *L. major* e *L. amazonensis*, diversos mecanismos de susceptibilidade e resistência foram descritos. Por exemplo, a estimulação de linfócitos T CD4 (Th1), as

linfocinas ativadoras de macrófagos (IFN γ e IL12) e os de intermediários reativos de nitrogênio (expressão da enzima iNOS) produzidos por macrófagos ativados e tóxicas ao parasita são os principais componentes da resposta imune em camundongos resistentes a esses parasitas (C57BL/6) (AUGUSTO et al., 1996; SOLBACH & LASKAY, 2000). Por outro lado, respostas imune do tipo Th2, com produção das linfocinas TGF, IL-4, e IL-10 estão envolvidas na susceptibilidade de camundongos a *L. amazonensis* (BALB/c) (SOLBACH & LASKAY, 2000).

A *L. amazonensis*, a espécie que utilizamos em nossos estudos, provoca lesões cutâneas em linhagens murinas susceptíveis, caracterizadas por um grande número de amastigotas em divisão e migração de células inflamatórias (MCEL RATH 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 e a inibição da produção de intermediários reativos de oxigênio e nitrogênio (OVERATH & AEBISCHER, 1999), como será discutido no item 1.5 dessa introdução. 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 (ver itens 1.4 e 1.5), os macrófagos infectados, cultivados em baixa pO $_2$, sofrem as mesmas alterações.

1.4. 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 está 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 várias 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.*, 1994; LEWIS *et al.*, 1999). Por exemplo, 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). A presença de hipóxia nessas lesões tem sido relacionada a indução de citocinas angiogênicas e a síntese de proteínas da matriz extracelular. Recentemente, HARRON *et al.*, (2000) utilizando técnicas imunohistoquímicas avaliaram as relações espaciais e temporais da hipóxia em células de tecido cutâneo lesado. Os resultados mostraram uma relação positiva entre a presença de granulomas, de proliferação celular e de hipóxia (< 10 mmHg) em fase tardia pós incisão experimental. Tais dados sugerem que o remodelamento tecidual e a apoptose detectadas após o período de hipóxia seriam estimulados pela reduzida oxigenação tecidual.

Apesar da hipóxia ter sido, por muito tempo, relacionada a efeitos deletérios, como inibição da proliferação e morte celular, estudos recentes têm demonstrado que as alterações na pO_2 são fisiologicamente importantes. 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 (YUN *et al.*, 1997; LEWIS *et al.*, 1999).

O estudo dos efeitos celulares da hipóxia, definida como um sinal ou estímulo metabólico, é recente. Muitas informações são necessárias para a compreensão das respostas das células a este estímulo ambiental, como por exemplo, a modulação da densidade celular, a expressão de receptores, e a transdução de sinais. As adaptações que as células sofrem durante a hipóxia ocorrem em períodos de infecção quando há mudanças microambientais como, a disponibilidade de oxigênio e a acidose. As células do sistema imune, presentes nestas condições, são influenciadas por estas mudanças.

1.5. Efeitos da hipóxia em neutrófilos e macrófagos

Durante as infecções ocorrem reações inflamatórias nos tecidos lesados, isto é, há um acúmulo de células do sistema imune como as células polimorfonucleares, os macrófagos e os linfócitos. Nesses focos teciduais, como já discutido anteriormente, a pO_2 é reduzida devido ao rompimento de vasos sanguíneos, perfusão deficiente e proliferação celular. Os neutrófilos, por exemplo, são células pré-adaptadas a hipóxia porque possuem um número reduzido de mitocôndrias e grande parte de sua energia é obtida por anaerobiose (BABIOR, 1984). Estas células em cultura, mantidas em hipóxia, sobrevivem por mais tempo que os mesmos neutrófilos em normoxia (HANNAH *et al.*, 1995). Acredita-se que os períodos prolongados em que neutrófilos são observados em focos

inflamatórios, situação que agrava a destruição tecidual, podem ser explicados pela resistência desta célula a hipóxia (HANNAH *et al.*, 1995; LEWIS *et al.*, 1999).

Os macrófagos acumulam-se no centro ou nas adjacências de áreas hipóxicas e pouco vascularizadas de tecidos lesados (LEWIS *et al.*, 1999), como por exemplo em tecido cerebral com oclusão vascular ocorrida durante malária em macacos *Rhesus* (IBIWOYE *et al.*, 1993). Há vários efeitos da hipóxia nas funções de macrófagos. Mas, diferente dos neutrófilos que são pré-adaptados a pO_2 reduzida, os macrófagos precisam adaptar suas atividades metabólicas à esta condição (LEWIS *et al.*, 1999). A exposição de macrófagos alveolares a um período crônico de hipóxia (96 horas), por exemplo, 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). Estas observações sugerem que macrófagos se adaptam à falta de oxigênio, alterando seu metabolismo para vias glicolíticas anaeróbias para a produção de ATP, semelhante às células tumorais sob condições de pO_2 reduzida (LEWIS *et al.*, 1999). Apesar de macrófagos se adaptarem à hipóxia obtendo energia para algumas funções, estas células necessitam de oxigênio para o “burst” respiratório e para a regulação do pH intravacuolar a níveis ótimos para a atividade das enzimas lisossomais (BABIOR, 1984). Assim, a falta de oxigênio para a realização destas atividades pode explicar, em parte, os estudos relacionando hipóxia à inibição da fagocitose. Os macrófagos alveolares e as 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; TE KOPPELE *et al.*, 1991). Em um outro estudo sobre a adaptação de macrófagos alveolares à hipóxia, LEEPER-WOODFORD & MILLS, (1992) avaliaram alguns parâmetros como aderência, concentração de ATP e viabilidade. Nestes experimentos, apesar das células em hipóxia

apresentarem índices fagocíticos reduzidos para hemácias fixadas, eram viáveis, aderentes, tinham a capacidade de recuperar sua função fagocítica e de aumentar a produção de ATP aos níveis normais, quando cultivadas novamente em ambiente normóxico. Um efeito interessante da hipóxia na retenção de partículas é a descrição de que macrófagos que fagocitaram hemácias em ambiente normóxico e depois foram cultivados em pO_2 reduzida apresentavam as hemácias em sua superfície, sugerindo um processo de exocitose (LEEPER-WOODFORD & MILLS, 1992). De fato, vários autores sugerem que os efeitos dos baixos níveis de pO_2 tais como, a produção de energia deficiente, as rápidas mudanças nas concentrações de ATP, os níveis elevados de Ca^{++} e a disfunção da membrana celular são os responsáveis pela exocitose que ocorre durante a hipóxia (CHEUNG *et al.*, 1986; LEEPER-WOODFORD & MILLS, 1992). A relevância destes resultados e dos mecanismos propostos não foram relacionados ao contexto de infecções, mas podemos supor que a liberação de microrganismos fagocitados ou a exocitose de material antigênico, durante a hipóxia tornariam os macrófagos ineficientes no “clearance” de patógenos e poderiam influenciar no curso da infecção.

A resposta de macrófagos a pO_2 reduzida é a produção de várias linfocinas pró-inflamatórias e de fatores quimiotáticos, como IL1, TNF, IL6, IL8 e MIP (macrophage inflammatory protein 1 alpha). Os dados foram obtidos com culturas primárias de monócitos humanos, macrófagos murinos e linhagens celulares, na maioria pré- ou pós-tratadas com lipopolissacarídeos (SCANNELL *et al.*, 1993; WEST *et al.*, 1994; VANOTTEREN *et al.*, 1995; ALBINA *et al.*, 1995; LEEPER-WOODFORD & DETMER, 1999). ALBINA *et al.*, (1995) mostraram que, apesar da supressão da síntese de óxido nítrico (NO) devido à falta de um dos substratos, o oxigênio, macrófagos em hipóxia têm aumentados: o metabolismo da arginina, a atividade arginase e a produção da enzima

iNOS. Os autores sugerem que a hipóxia, se transitória, deve “primar” macrófagos, e que durante a reoxigenação estas células responderiam mais eficientemente aos estímulos externos. A relevância dessas observações para situações de infecções não foram examinadas.

Os dados aqui resumidos permitem concluir que a hipóxia é uma situação a que os macrófagos se adaptam, alterando o seu metabolismo, a produção de linfocinas pró-inflamatórias, de proteínas de choque térmico e da enzima iNOS e as atividades exocíticas, endocíticas e fagocíticas. As observações de que as respostas de macrófagos a hipóxia são mais exacerbadas na presença de LPS, mostram a importância dos co-estímulos e principalmente de moléculas de patógenos para a adaptação. Sendo assim, a análise do comportamento de macrófagos em hipóxia durante infecções, como a leishmaniose, é importante para avaliar a relevância dos mecanismos aqui discutidos no desenvolvimento de terapias.

1.6.Oxigenação hiperbárica

A terapia com oxigênio hiperbárico, é definida como o tratamento em que o indivíduo respira 100% de oxigênio (O₂) a uma pressão ambiental de pelo menos 1,4 Atmosferas absolutas. O primeiro relato data do século XV, quando era usado para tratar doenças respiratórias. Por algum tempo sua aplicação perdeu o suporte científico, mas desde a segunda metade do século XX, muitas publicações científicas recuperaram a credibilidade desta terapia (BURAS *et al.*, 2000). A terapia com HBO é regida basicamente por três leis físicas, a Lei de Henry: “A quantidade de gás que se dissolve num meio líquido, a uma determinada temperatura, é diretamente proporcional à pressão do gás sobre

o líquido”, a Lei de Dalton: “A pressão exercida por uma mistura de gases é igual à soma das pressões parciais de cada gás na mistura”, e a Lei de Boyle-Marriotti: “Se a temperatura for constante, o volume do gás varia inversamente com a pressão absoluta do sistema”. Os efeitos benéficos são a ampliação de cura de úlceras, o aumento da capacidade bactericida de neutrófilos, o efeito direto tóxico contra alguns microorganismos, a vasoconstrição arteriolar com subsequente redução de edema e a diminuição da lesão isquêmica. Atualmente há treze condições patológicas aceitas pelo Conselho Federal de Medicina no Brasil, que segue as determinações da Sociedade Americana de Medicina Hiperbárica (Undersea and Hyperbaric Medical Society – www.uhms.org) para o tratamento em câmara hiperbárica (HBO) e outras patologias ainda sob investigação (GARCIA-COVARRUBIAS & CUAUHTEMOC SANCHEZ-RODRIGUEZ, 2000). A mionecrose e as necroses ósseas estão entre as indicações de tratamento. O oxigênio hiperbárico promove a oxigenação tecidual e estimula a cicatrização da úlcera. Apesar da produção de metabólitos reativos de oxigênio estar associada com reações contrárias à exposição ao oxigênio hiperbárico, alguns efeitos benéficos desta terapia podem ser também associados com a produção de superóxido e/ou peróxido de hidrogênio, como por exemplo o efeito bactericida (HINK & JANSEN, 2001). A elucidação dos mecanismos farmacológicos e bioquímicos é fundamental para a exploração do potencial terapêutico do oxigênio hiperbárico.

O uso racional da HBO, baseia-se no fato de que tecidos infectados ou lesados apresentam micro áreas hipóxicas que se expandem devido a perfusão deficiente (isquemia) e ao aumento do consumo de O₂ por células e microorganismos infectantes em proliferação. A HBO eleva os níveis sistêmicos e locais de O₂ necessários para produção de ATP, a síntese de proteínas e a produção de espécies reativas das quais o O₂ é o substrato.

A HBO também induz a migração de fibroblastos e a produção e hidroxilação de colágeno nos tecidos lesados, aumentando a cicatrização (CLARK & MOON, 1999).

O aumento da concentração de O₂ é tóxico para vários parasitas *Giardia intestinalis*, *Entamoeba histolytica* e *Pneumocystis carinii* (GILLIN & DIAMOND, 1981; PESANTI, 1984). No caso de *Schistosoma mansoni*, como os níveis de enzimas antioxidantes variam nos estágios de desenvolvimento do parasita, observou-se que as formas adultas, que apresentam níveis altos de SOD e glutatona comparados às formas imaturas e aos ovos, são mais resistentes a hiperóxia (MKOJI *et al.*, 1988; NARE *et al.*, 1990).

Em estudos clínicos, o tratamento com HBO (adjuvante na terapia com anfotericina B) em pacientes com infecção por *Candida albicans* resultou em erradicação do fungo e melhora dos sintomas (COUCH *et al.*, 1988). Vários antibióticos, fungicidas e drogas antiparasitárias, principalmente os nitrocompostos, têm atividade aumentada *in vitro* e *in vivo* em ambiente hiperóxico e HBO (PARK *et al.*, 1992).

A *Leishmania*, apesar de possuir defesas antioxidantes, tais como a expressão de SOD, catalase, glutatona peroxidase, e TSA (thio-specific antioxidant protein) (WEBB *et al.*, 1998) é lisada por intermediários reativos de oxigênio (AUGUSTO *et al.*, 1996) e é mais susceptível, na forma promastigota, a anfotericina B quando em ambiente hiperóxico (MUHVICH *et al.*, 1993). MUHVICH *et al.*, (1993), entretanto, não analisaram os efeitos em amastigotas ou em células infectadas (os dois sistemas *in vitro* similares ao encontrado em lesões).

Assim, o efeito adjuvante de HBO na ação de drogas (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 reativos

intermediários de oxigênio, são os principais fatores que sugerem uma atividade terapêutica da oxigenação hiperbárica nessa parasitose.

2. Objetivos

Analisar o papel da hipóxia no modelo *in vitro* da infecção com *L. amazonensis* e investigar os possíveis mecanismos de reversão deste ambiente na evolução da lesão na leishmaniose murina, utilizando oxigênio hiperbárico.

Especificamente pretendemos:

- a) Avaliar se os macrófagos murinos em ambiente hipóxico apresentam susceptibilidade/resistência diversa daquela observada em normoxia à infecção com *L. amazonensis*.
- b) Analisar se os macrófagos mantidos em hipóxia apresentam mudanças funcionais diversas daquelas de macrófagos infectados em normóxia, isto é, respostas leishmanicidas após tratamento com a linfocina gIFN e o LPS e a produção de nitrito.
- c) Analisar os efeitos do tratamento com oxigênio hiperbárico em ambos os estágios de vida de *L. amazonensis* (amastigotas e promastigotas), e a atividade leishmanicida do glucantime, a droga de primeira linha usada contra a leishmaniose, em condições hiperbáricas.
- d) Avaliar se a reperusão da área isquêmica, através da terapia com oxigênio hiperbárico, aumenta a resistência de macrófagos à infecção por *L. amazonensis* e altera o curso da infecção em camundongos, de linhagem susceptível (BALB/c).

3. Materiais e Métodos

Lista de compostos utilizados e suas procedências:

Bicarbonato de sódio	Sigma*
gIFN	Sigma
Glucantime	
HEPES	Sigma
L-Glutamina	Sigma
LPS	Sigma
Meio RPMI 1640	Sigma
Penicilina e Estreptomicina	Sigma
Reagente de Gries	Sigma
SFB inativado	CultiLAB, Campinas, SP, Brasil

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

3.1. Animais

Camundongos isogênicos da linhagem BALB/c, fêmeas com idade entre 6 e 12 semanas, SPF (Specific Patogen Free), fornecidos pelo Centro Multi-Institucional de Bioterismo - CEMIB/UNICAMP foram mantidos na 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 células foi o RPMI 1640 suplementado com 10% SFB inativado, 20 mM de bicarbonato de sódio, 10 mM de tampão HEPES, 100 UI/ml de penicilina e 100 UI/ml de estreptomicina e L-glutamina (meio RPMI).

3.3. Obtenção e manutenção de *Leishmania amazonensis*

O parasita utilizado neste trabalho foi a *L. amazonensis* (MHOM/BR/73/M2269).

As 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. Os camundongos foram sacrificados por deslocamento cervical, a pata infectada foi retirada e

o tecido raspado com bisturi em solução salina com penicilina e estreptomicina. 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.

Para a diferenciação em promastigotas, frascos de cultura com amastigotas em meio RPMI eram mantidos em estufa seca com temperatura de 26 a 28°C. Após 2 a 3 dias ocorria a diferenciação. As formas promastigotas foram mantidas em meio RPMI, em estufa seca a temperatura de 26 a 28° C no Laboratório de Leishmaniose do Departamento de Parasitologia do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas.

3.4. 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, mantidas em estufa a 5% CO₂, O₂ atmosférico a 37°C e repicadas a cada 7 dias.

3.5. Ambiente Hipóxico

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

Para aferir o grau de hipóxia dentro da câmara foi utilizado um analisador de gás (testoryt/confor), com uma solução absorvente de oxigênio (Oxsorbent - EUA). Após a lavagem da câmara, a entrada de gás foi fechada e a saída foi acoplada à 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 O₂ que, em nossos experimentos, foi de 5%.

3.6. Infecção das culturas de macrófagos J774 com *Leishmania amazonensis*

Foram feitos experimentos iniciais de padronização (tempo e número de parasitas), em placas de 24 poços (Costar, Corning, Falcon ou Nunc), contendo lamínulas redondas de 13 mm de diâmetro (GlassTecnica). A densidade de macrófagos foi ajustada para 10⁵ células/ml. Os macrófagos J774 mantidos em hipóxia, ou imediatamente após um período hipóxico, foram infectados com amastigotas, durante 24 horas em diferentes proporções (parasitas:célula). Após esse período, as lamínulas com os macrófagos aderidos e infectados foram fixadas em metanol (10 min) e coradas com Giemsa (10 min) (GIORGIO & BARÃO, 1998). O número de células, de parasitas e a porcentagem de infecção foram avaliados em microscópio óptico. Todos experimentos foram realizados em triplicata.

3.7. Ativação das culturas de macrófagos J774 com gIFN e LPS

Para analisar a capacidade funcional dos macrófagos mantidos em normóxia ou hipóxia e infectados com *Leishmania amazonensis*, utilizamos os ativadores gIFN e LPS. As culturas de macrófagos J774 foram incubadas nas condições descritas no item 3.5 com a linfocina gIFN (2500 ng/ml) e LPS (100 ng/ml) durante 8 horas. Após a lavagem das placas de cultura com meio RPMI, as células nas lamínulas eram infectadas, fixadas e coradas como descrito no item 3.6.

3.8. Análise da produção de nitrito

Macrófagos J774 foram cultivados em meio RPMI e a concentração foi ajustada para 10^5 células/ml. Os sobrenadantes de culturas celulares (ativadas ou não com gINF e LPS) em ambiente hipóxico ou normóxico foram coletados em diferentes tempos (24 h, 48 h) e congelados à -20°C . A produção de óxido nítrico foi dosada indiretamente através da concentração de seu metabólito no meio de cultura (nitrito), pelo método de Gries (GREEN *et al.*, 1984). Resumidamente, os sobrenadantes foram descongelados, o volume de 100 μl foi colocado em placas de 96 poços (Costar ou Nunc - USA) adicionando-se igual quantidade de reagente de Gries. As placas foram incubadas à temperatura ambiente por 5 minutos e a quantificação colorimétrica foi realizada à 540 nm em leitora de ELISA.

3.9. Tratamento *in vitro* de *Leishmania amazonensis* com oxigênio hiperbárico

Amastigotas e promastigotas de *L. amazonensis* foram suspensos em meio RPMI, em uma concentração de 10^6 parasitas/ml e, mantidos em frascos de 25 cm². Os frascos eram mantidos na posição horizontal para que a profundidade do meio de 3 mm facilitasse a difusão do O₂ e foram colocados dentro de uma câmara hiperbárica (Research Chamber, model HB 1300B, Sechrist Inc., Anaheim, CA - USA). A câmara foi pressurizada com 100% de O₂ medicinal (White Martins – Campinas) durante 5 minutos, até a pressão de 2,5 ATA. Essa pressão foi mantida pelo tempo requerido de cada experimento e depois foi descompressurizada durante 5 minutos. A densidade e a motilidade flagelar de promastigotas e a viabilidade de amastigotas tratados os controles não tratados foram determinadas usando câmara de Neubauer em aumento de 400X. Os amastigotas foram incubados com o corante vital eritrosina B, que permeabiliza apenas os parasitas inviáveis (LEMESTRE *et al.*, 1997). A transformação de amastigotas extracelulares, mantidos à 26° C, em promastigotas também foi estimada em câmara de Neubauer.

Dois diferentes protocolos foram usados:

- a) Três sessões de 2 h com 15 min de intervalo: os frascos de cultura com os parasitas foram mantidos em HBO por 2 h, depois da câmara despressurizada alíquotas foram removidas dos frascos e os parasitas foram contados. Os frascos de cultura retornaram à HBO por dois tempos de 2 h e nos intervalos foram retiradas alíquotas e realizados novamente testes de viabilidade e contagem dos parasitas. Ao final de três sessões (um total de 6 h), os parasitas foram lavados e

suspensos em meio RPMI fresco ou levados diretamente a estufa seca à temperatura de 26 a 28°C.

- b) Os frascos com os parasitas foram mantidos em HBO por 1h, em intervalos de 24 h, num total de 6 dias consecutivos. As contagens e testes de viabilidade foram realizados diariamente.

Para os tratamentos em que se utilizou droga anti-leishmanicida, o Antimoniato de N-metil glucamina - Glucantime (Rhodia-Rhone-Poulenc Group - São Paulo, SP, Brasil), foi diluído na concentração de 8,5 mg/ml em culturas de promastigotas e 60 µg/ml em culturas de amastigotas (CALLAHAN *et al.*, 1997).

3.10. Tratamento de camundongos infectados com *Leishmania amazonensis* com oxigênio hiperbárico

Camundongos BALB/c, com idade entre 4 e 6 semanas, foram infectados via subcutânea com 2×10^6 amastigotas no coxim plantar de uma das patas traseiras. Os seguintes protocolos de tratamento com HBO foram aprovados pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA-IB) da UNICAMP, protocolo 457-1:

- a) Um grupo de animais (n= 15) imediatamente após a infecção foram tratados em câmara hiperbárica com sessões diárias de 1h à pressão de 2,5 ATA, respirando 100% O₂ medicinal (White Martins-Campinas), em gaiolas com tampa perfurada de acrílico. A câmara foi descompressurizada durante 5 min. Animais controles foram infectados nas mesmas condições e não foram expostos a HBO (n= 9).

- b) Um grupo de animais (n=09) com 30 dias de infecção, foram tratados em câmara hiperbárica com sessões diárias de 1h à pressão de 2,5 ATA, respirando 100% O₂ medicinal (White Martins-Campinas), em gaiolas com tampa perfurada de acrílico. A câmara foi descompressurizada durante 5 min. Animais controles foram infectados nas mesmas condições e não foram expostos a HBO (n= 9).

A avaliação do tamanho da lesão foi feita através da medição de patas infectadas e contralaterais foram medidas com o auxílio de paquímetro (Starret - USA), a cada 10 dias. Em algumas fases da infecção os animais eram sacrificados para avaliação da carga parasitária na lesão. Amostras de sangue para quantificação de células também foram avaliadas (coloração de Giemsa). A avaliação da sobrevivência de grupos controles (infectados e não tratados) e dos grupos infectados e tratados foram realizados nesses experimentos.

3.11. Análise estatística

Foi utilizado a análise de variância, seguida pelo teste de Comparações Múltiplas de Tukey. 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). O software Microsoft Excel 2000 foi utilizado para a confecção dos gráficos.

4. Resultados

4.1. Padronização da infecção *in vitro* de macrófagos J774 com formas amastigotas de *Leishmania amazonensis*.

Inicialmente, padronizamos a infecção *in vitro* dos macrófagos J774 com as formas amastigotas de *Leishmania amazonensis*. Os resultados da média de três experimentos são mostrados na Figura 1. A proporção de 10:1 (parasitas : célula) foi escolhida para os experimentos seguintes, uma vez que, as proporções inferiores (2:1 e 5:1) resultaram em porcentagens de macrófagos infectados baixas (cerca de 20%). As proporções de 20:1, 50:1 e 100:1, resultaram em culturas com grande número de amastigotas extracelulares dificultando a contagem em microscópio.

Nós também realizamos experimentos em que as culturas de J774 foram infectadas com as formas promastigotas de *L. amazonensis*, mas as porcentagens de células infectadas sempre foram muito baixas (cerca de 10%) independente da proporção e do tempo de incubação com os parasitas (dados não mostrados).

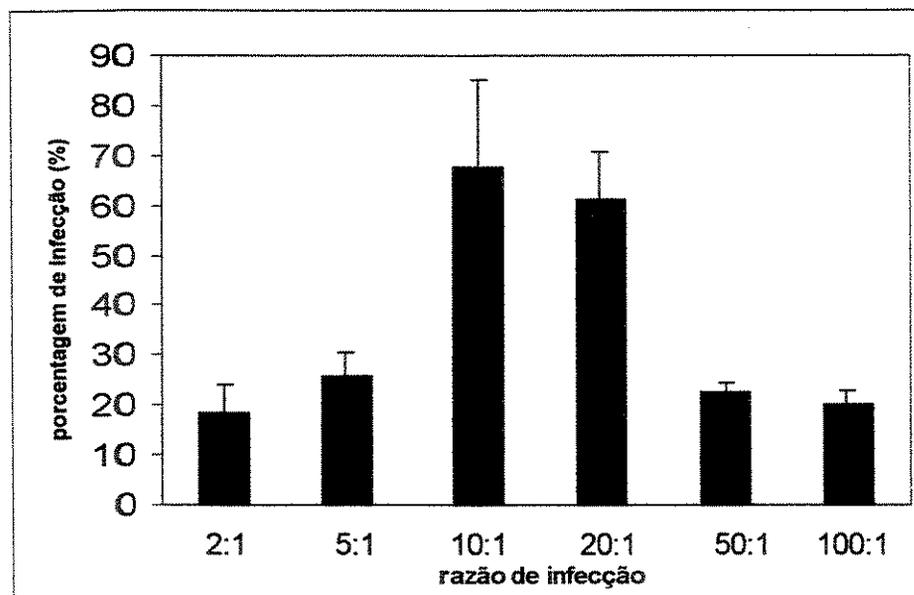


Figura 1. Infecção de macrófagos J774 com amastigotas de *L. amazonensis*. Células J774 em uma densidade de 10^5 células/ml aderidas em lamínulas de vidro foram infectadas com amastigotas em diferentes proporções (parasitas por célula) durante 24h. Em seguida, as lamínulas foram coradas e avaliadas conforme item 3.5 de Materiais e Métodos. Os valores representam a média de três experimentos \pm desvio padrão.

4.2. Avaliação do efeito da hipóxia na infecção de macrófagos J774 com formas amastigotas de *Leishmania amazonensis*.

Nesses experimentos avaliamos o efeito do ambiente hipóxico (5% de O_2) na infecção de macrófagos J774 com *L. amazonensis*. As células foram mantidas durante 24 h na presença de amastigotas, tanto em ambiente normóxico (21% de O_2) como hipóxico.

Observamos que a porcentagem de infecção dos macrófagos J774 em ambiente com restrição de O_2 (hipóxia) foi significativamente menor (cerca de 20%) quando comparado com culturas mantidas em ambiente normóxico (cerca de 45%) (Figura 2). Esses dados mostram que há uma redução de células infectadas de cerca de 55% quando as culturas são

mantidas em hipóxia. Paralelamente, observamos que o número de amastigotas por macrófago em culturas mantidas em hipóxia e normóxia foi semelhante (cerca de 2 amastigotas por macrófago). Vale salientar que o teste de viabilidade com os amastigotas e a observação da manutenção de aderência das células J774 em ambiente hipóxico descartam a possibilidade de que o efeito observado de redução da infecção estivesse relacionado a efeitos tóxicos em 5% de O_2 (Figura 2).

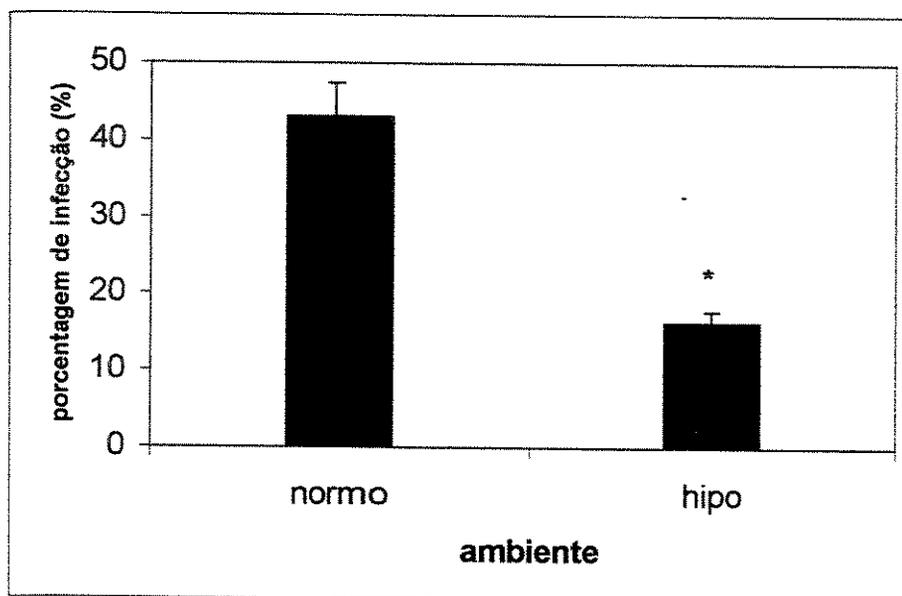


Figura 2. Infecção de macrófagos J774 com amastigotas de *Leishmania amazonensis* em ambiente hipóxico. Células J774 em uma densidade de 10^5 células/ml aderidas em lamínula de vidro foram infectadas com amastigotas na proporção de 10:1 (parasitas por célula) em ambiente normóxico (normo) ou hipóxico (hipo), durante 24 h. * Estatística: $p < 0,05$. Os valores representam a média de três experimentos \pm desvio padrão.

4.3. Avaliação do efeito da hipóxia em macrófagos J774 ativados com gIFN e LPS e infectados com a forma amastigota de *Leishmania amazonensis*

Observamos que macrófagos J774 ativados com gIFN e LPS durante 8 h eram capazes de reduzir os índices de infecção em ambiente normóxico (44% para 21%), como já descrito na literatura (HO *et al.*, 1992). Entretanto, esses mesmos ativadores não foram capazes de potencializar o efeito leishmanicida observado em ambiente hipóxico (16,5% não ativado para 16% ativado, ambos em hipóxia) (Figura 3).

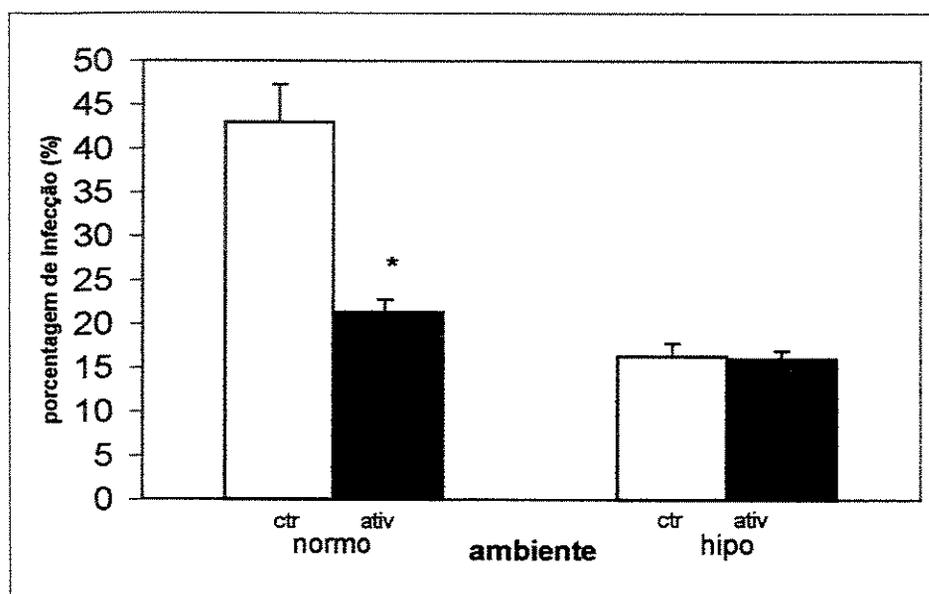


Figura 3. Ativação de macrófagos J774 com gIFN e LPS infectados com amastigotas de *Leishmania amazonensis* em ambiente hipóxico. Células J774 em uma densidade de 10^5 células/ml aderidas em lamínula de vidro foram tratadas com meio RPMI por 8 h (ctr) ou ativadas por 8h com gIFN e LPS (ativ) e infectadas com amastigotas na proporção de 10:1 (parasitas por célula) em ambiente normóxico (normo) ou hipóxico (hipo) durante 24 h. As lamínulas foram coradas e avaliadas conforme item 3.6 de Materiais e Métodos. * Estatística: $p < 0,05$. Os valores representam a média de três experimentos \pm desvio padrão.

4.4. Análise da produção de Óxido Nítrico (NO).

Com o objetivo de avaliar a produção de NO, um intermediário reativo de nitrogênio, envolvido nos efeitos leishmanicidas de macrófagos ativados, medimos a concentração de nitrito em sobrenadantes de cultura de 24 e 48 h de células J774 mantidas em ambiente hipóxico e normóxico. Na Figura 4 observamos que macrófagos ativados em normóxia produzem maiores quantidades de nitrito como já descrito na literatura (LINARES *et al.*, 2000). É interessante observar que a produção de nitrito em culturas de ambiente hipóxico é significativamente menor do que aquela em normóxia, tanto em culturas ativadas como não ativadas com gIFN e LPS.

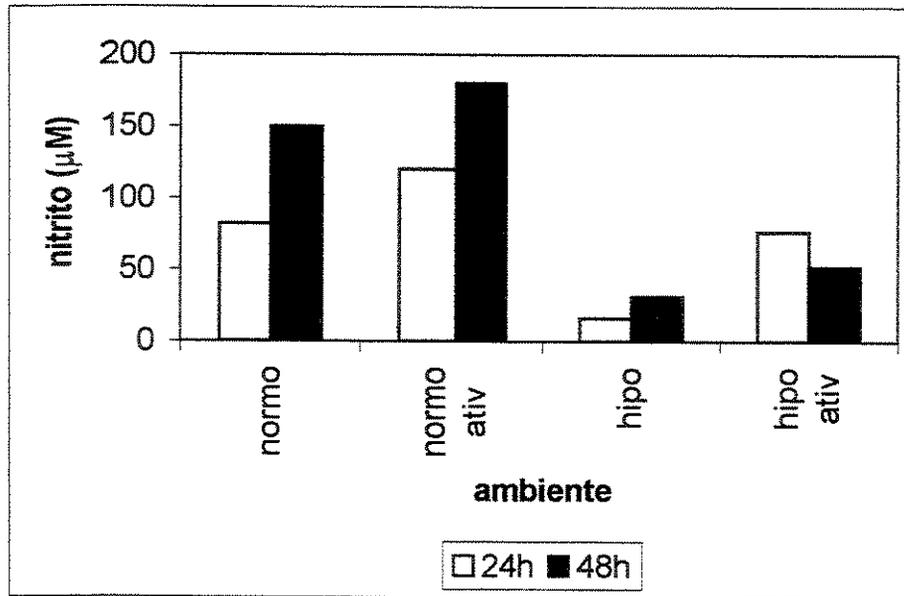


Figura 4. Produção de nitrito em culturas de macrófagos J774 ativados ou não com gIFN e LPS. Células J774 em uma densidade de 10^5 células/ml foram ativadas ou não por 8h com gIFN e LPS e cultivadas em ambiente normóxico (normo) ou hipóxico durante 24 e 48 h, como descrito no item 3.5 de Materiais e Métodos. A análise da concentração de nitrito foi realizada pelo método de Griess conforme o item 3.7 de Materiais e Métodos.

4.5. Análise morfológica dos macrófagos J774 em ambiente normóxico, hipóxico

Os resultados anteriores apontam uma diminuição da infecção de macrófagos em ambiente hipóxico (Figura 2) e sugerem que a restrição de O_2 é suficiente para estimular/ativar o macrófago. Assim, avaliamos a morfologia dessas células e comparamos com o aspecto observado em células ativadas em ambiente normóxico. Primeiramente, observamos que em culturas mantidas em hipóxia (Figura 6) apresentam células espreadas, enquanto que culturas mantidas em normóxia, não estimuladas e não infectadas, apresentam células com aspecto arredondado (Figura 5). Quando macrófagos foram tratados com imunoestimuladores (gIFN e LPS) mostraram padrões morfológicos semelhantes em normóxia e hipóxia (Figuras 7 e 8), isto é, característicos de células ativadas, estavam espreadas, maiores e vacuolizadas. É interessante observar que macrófagos não tratados com gIFN e LPS, porém mantidos em hipóxia também têm esse aspecto “estimulado/ativado” (Figura 6).

Em ambiente normóxico na presença de gIFN e LPS (Figura 11) ou em ambiente hipóxico, na presença ou não de gIFN e LPS (Figura 12 e Figura 10, respectivamente), os macrófagos infectados também mostraram-se com aspecto “estimulado/ativado”, isto é, espreados, maiores e vacuolizados, além de apresentarem quando expostos à hipóxia, a presença de “vacúolos nús” (vacúolos com presença de restos celulares) (Figura 13). Em contraste, em ambiente normóxico, as culturas não ativadas mostraram-se com alta porcentagem de infecção e as células sem características de ativação (Figura 9).

Assim, células em hipóxia têm padrão morfológico semelhante à de macrófagos ativados em ambiente normóxico, sugerindo que a hipóxia é uma importante condição “estimuladora” para a célula.

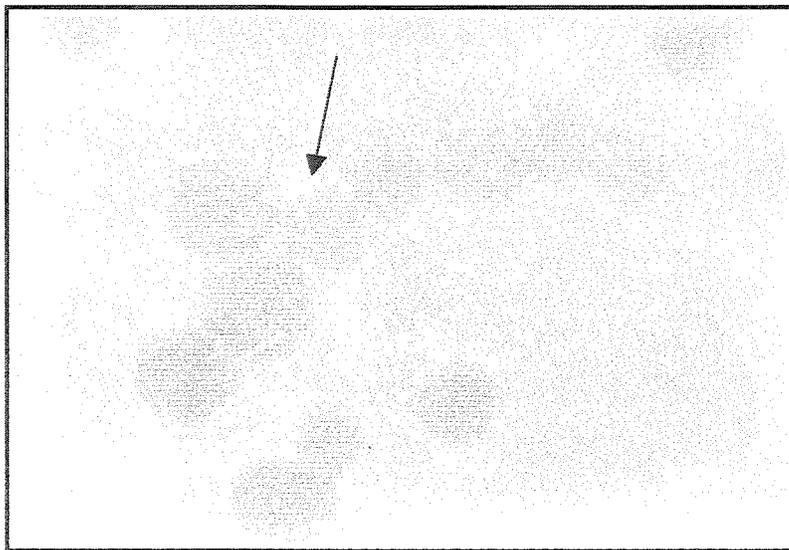


Figura 5. Aspecto morfológico de cultura de macrófagos em ambiente normóxico. Células J774 em uma densidade de 10^5 células/ml aderidas em lamínulas de vidro foram cultivadas durante 24 h em ambiente normóxico. As lamínulas foram coradas e avaliadas conforme o item 3.6 de Materiais e Métodos (Aumento, 400X). Notar todas as células arredondadas indicadas na figura.

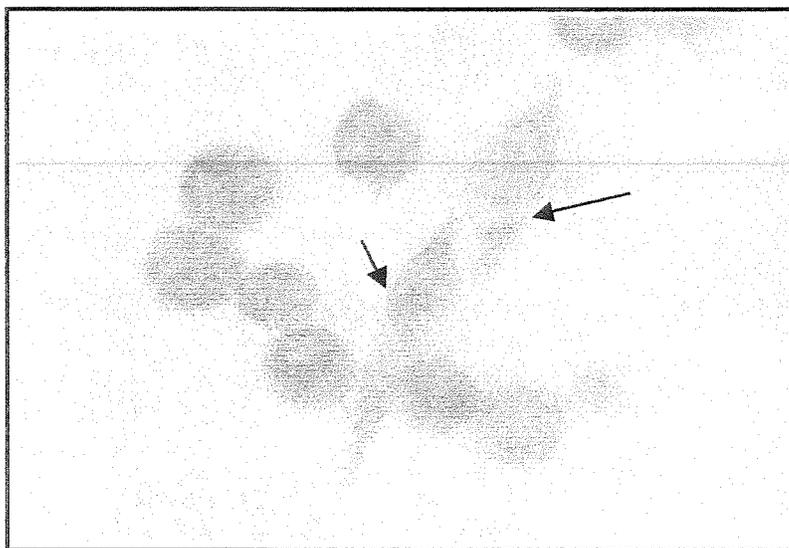


Figura 6. Aspecto morfológico de cultura de macrófagos em ambiente hipóxico. Células J774 em uma densidade de 10^5 células/ml aderidas em lamínulas de vidro foram cultivadas durante 24 h em ambiente hipóxico. As lamínulas foram coradas e avaliadas conforme o item 3.6 de Materiais e Métodos (Aumento, 400X). Notar células espreiadas indicadas na figura.

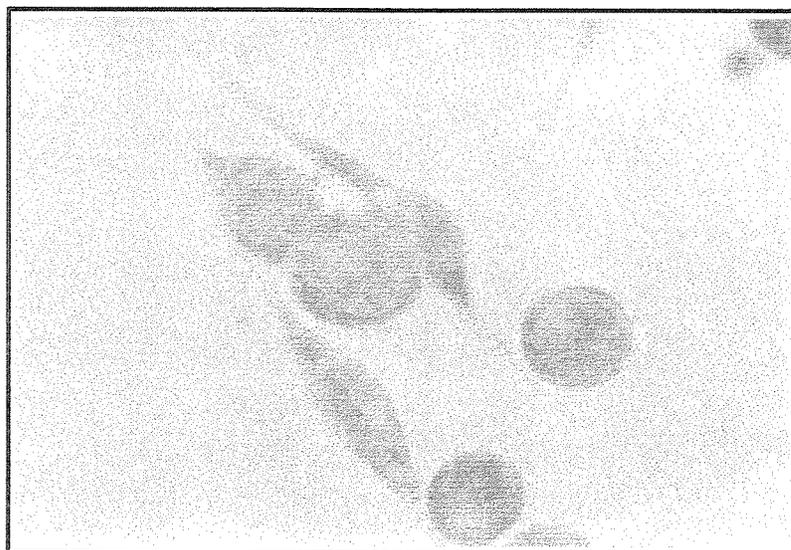


Figura 7. Aspecto morfológico de cultura de macrófagos J774 ativada com gINF e LPS em ambiente normóxico. Células J774 em uma densidade de 10^5 células/ml aderidas em lamínulas de vidro foram ativadas durante 8 h com gINF e LPS e cultivadas por 24 h em ambiente normóxico. As lamínulas foram coradas e avaliadas conforme o item 3.6 de Materiais e Métodos (Aumento, 1000X).

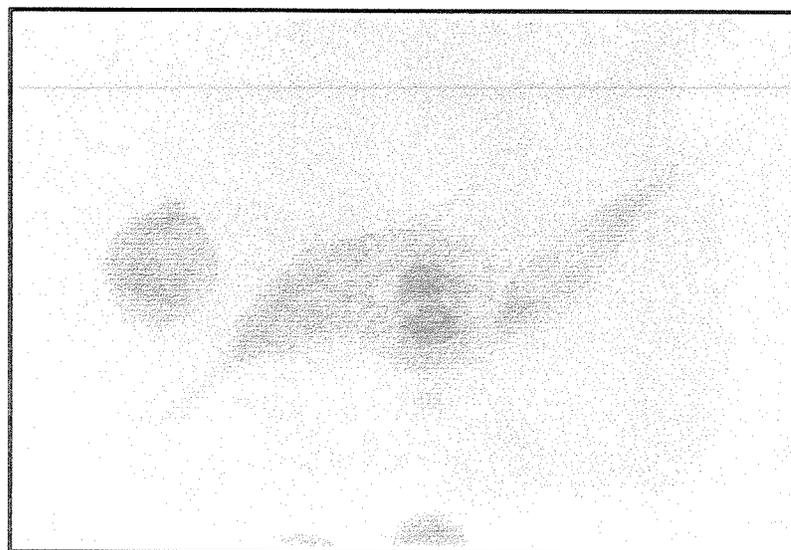


Figura 8. Aspecto morfológico de cultura de macrófagos J774 ativada com gINF e LPS em ambiente hipóxico. Células J774 em uma densidade de 10^5 células/ml aderidas em lamínulas de vidro foram ativadas durante 8 h com gINF e LPS e cultivadas por 24 h em ambiente hipóxico. As lamínulas foram coradas e avaliadas conforme o item 3.7 de Materiais e Métodos (Aumento, 1000X).

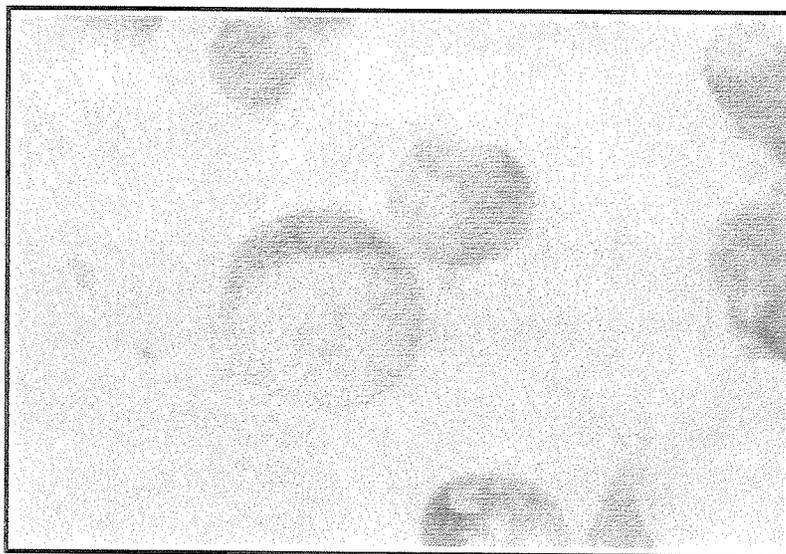


Figura 9. Aspecto morfológico da infecção de macrófagos J774 com formas amastigotas de *L. amazonensis* em ambiente normóxico. Células J774 em uma densidade de 10^5 células/ml aderidas em lamínulas de vidro foram infectadas com amastigotas em uma proporção de 10:1 (parasitas por célula) durante 24 h em ambiente normóxico. As lamínulas foram coradas e avaliadas conforme o item 3.6 de Materiais e Métodos (Aumento, 1000X).

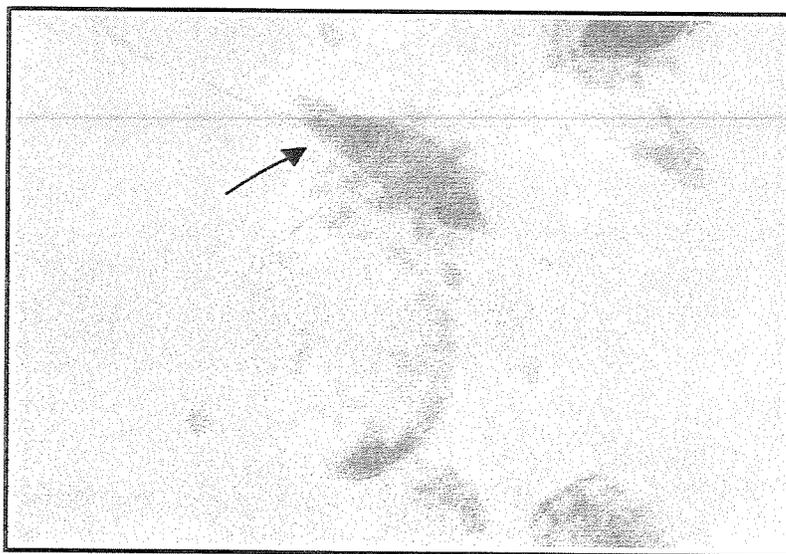


Figura 10. Aspecto morfológico da infecção de macrófagos J774 com formas amastigotas de *L. amazonensis* em ambiente hipóxico. Células J774 em uma densidade de 10^5 células/ml aderidas em lamínulas de vidro foram infectadas com amastigotas em uma proporção de 10:1 (parasitas por célula) durante 24 h em ambiente hipóxico. As lamínulas foram coradas e avaliadas conforme item 3.6 de Materiais e Métodos (Aumento, 1000X). Notar aspecto espreado de célula indicada na figura.

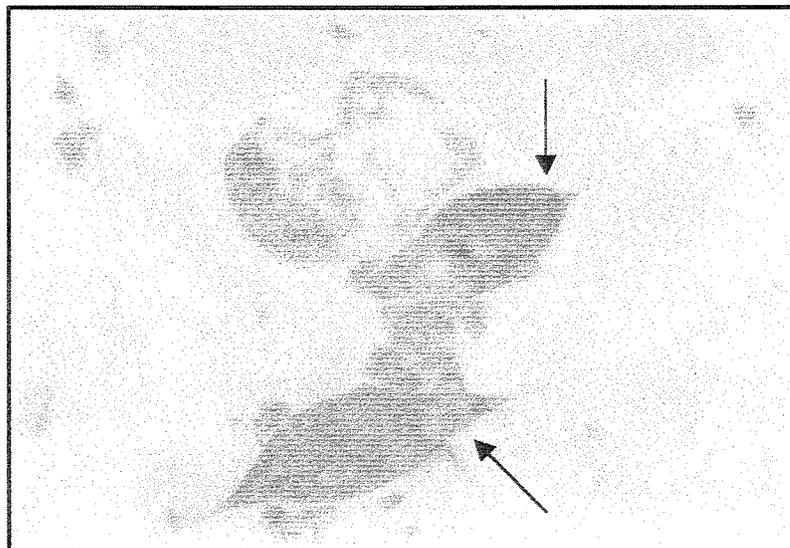


Figura 11. Aspecto morfológico da infecção de macrófagos J774 ativados e infectados com formas amastigotas de *L. amazonensis* em ambiente normóxico. Células J774 em uma densidade de 10^5 células/ml aderidas em lamínulas de vidro foram ativadas com gIFN e LPS durante 8 h e infectadas com amastigotas em uma proporção de 10:1 (parasitas por célula) durante 24 h em ambiente normóxico. As lamínulas foram coradas e avaliadas conforme o item 3.6 de Materiais e Métodos (Aumento, 1000X). Notar células espreiadas indicadas na figura.

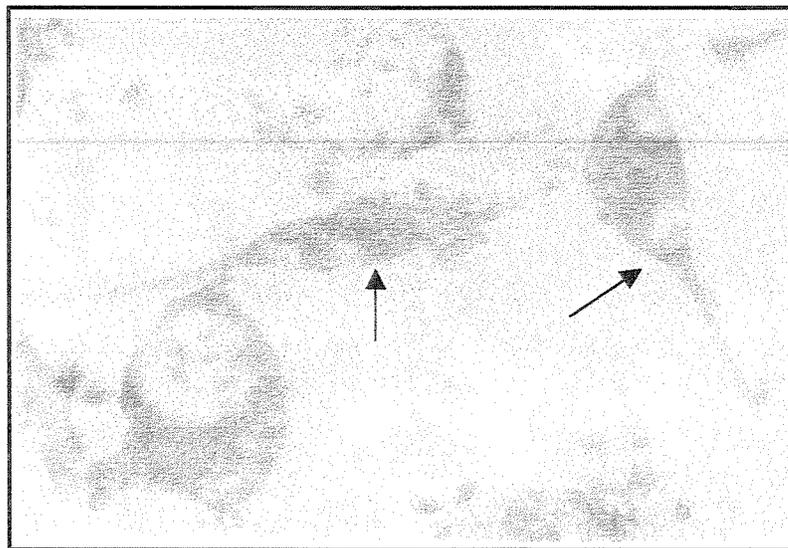


Figura 12. Aspecto morfológico da infecção de macrófagos J774 ativados e infectados com formas amastigotas de *L. amazonensis* em ambiente hipóxico. Células J774 em uma densidade de 10^5 células/ml aderidas em lamínulas de vidro foram ativadas com gIFN e LPS durante 8 h e infectadas com amastigotas em uma proporção de 10:1 (parasitas por célula) durante 24 h em ambiente hipóxico. As lamínulas foram coradas e avaliadas conforme o item 3.6 de Materiais e Métodos (Aumento, 1000X). Notar células espreiadas indicadas na figura.

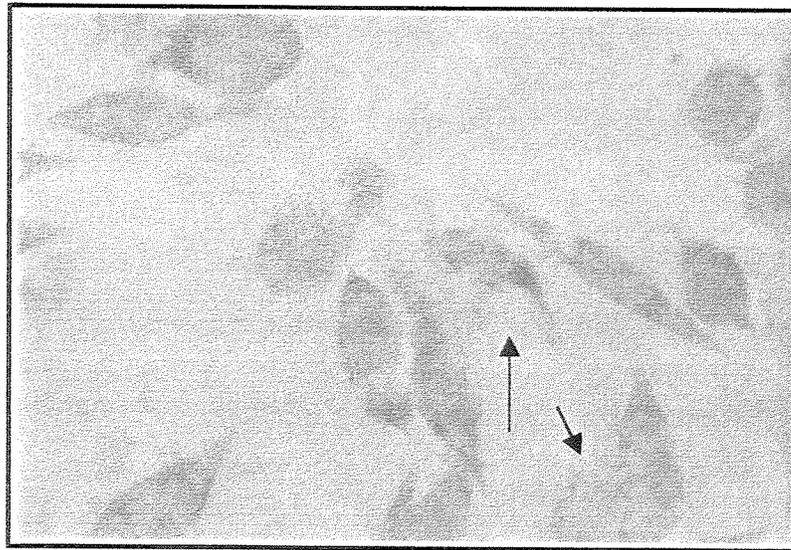


Figura 13. Aspecto morfológico da infecção de macrófagos J774 ativados e infectados com formas amastigotas de *L. amazonensis* em ambiente hipóxico. Células J774 em uma densidade de 10^5 células/ml aderidas em lamínulas de vidro foram ativadas com gIFN e LPS durante 8 h e infectadas com amastigotas em uma proporção de 10:1 (parasitas por célula) durante 24 h em ambiente hipóxico. As lamínulas foram coradas e avaliadas conforme o item 3.5 de Materiais e Métodos (Aumento, 1000X). Notar presença de “vacúolos nús” indicados na figura.

4.6. Efeito do oxigênio hiperbárico em formas promastigotas e amastigotas de *Leishmania amazonensis* e determinação da atividade leishmanicida do Glucantime em condições hiperbáricas.

Para avaliar o efeito do oxigênio hiperbárico no parasita, nós realizamos experimentos em que as duas formas de *Leishmania* foram tratadas intermitentemente em HBO. Na Figura 14 observamos que o número de promastigotas e amastigotas não se alterou durante os tratamentos em HBO (3 sessões de 2 h com intervalo de 15 min). Efeitos adversos só foram observados quando promastigotas foram expostos ao glucantime sob condições hiperbáricas; os parasitas ficaram imóveis, vacuolisados e com o corpo celular arredondado depois de 2 sessões de HBO. A sessão adicional (2 h) aumentou o número de promastigotas imóveis (70-80%) (Figura 14). Em contraste, promastigotas não expostos em HBO, mas tratados com glucantime, mantiveram alta motilidade e corpo celular fusiforme por 72 h após o tratamento (dados não mostrados).

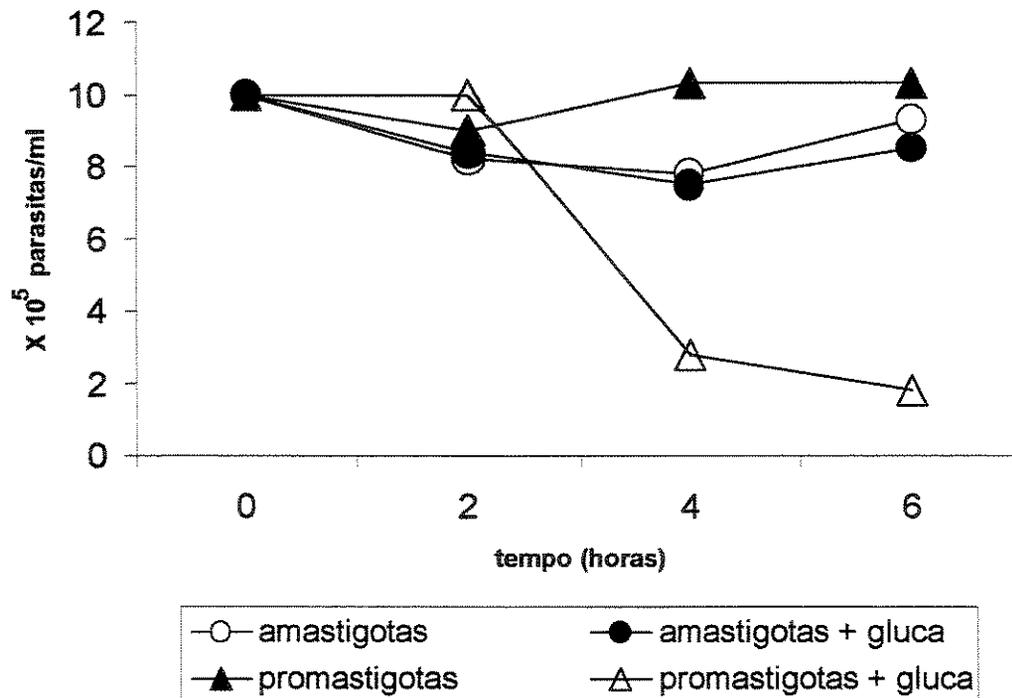


Figura 14. Efeito do oxigênio hiperbárico em formas promastigotas e amastigotas de *L. amazonensis*. Formas amastigotas e promastigotas foram tratadas com Glucantime e/ou HBO (pressão de 2,5 ATA em 3 sessões de 2 h com intervalo de 15 minutos à condições ambiente). O número de parasitas foi contado em câmara de Neubauer e a viabilidade de formas amastigotas foi realizada através do corante Eritrosina B como descrito no item 3.8 de Materiais e Métodos.

É interessante notar que os promastigotas expostos à HBO (tratados e não tratados com glucantime) não proliferaram durante 3 dias consecutivos. Os promastigotas (controle) tiveram crescimento típico no período de cultura (8 dias) (Figura 15).

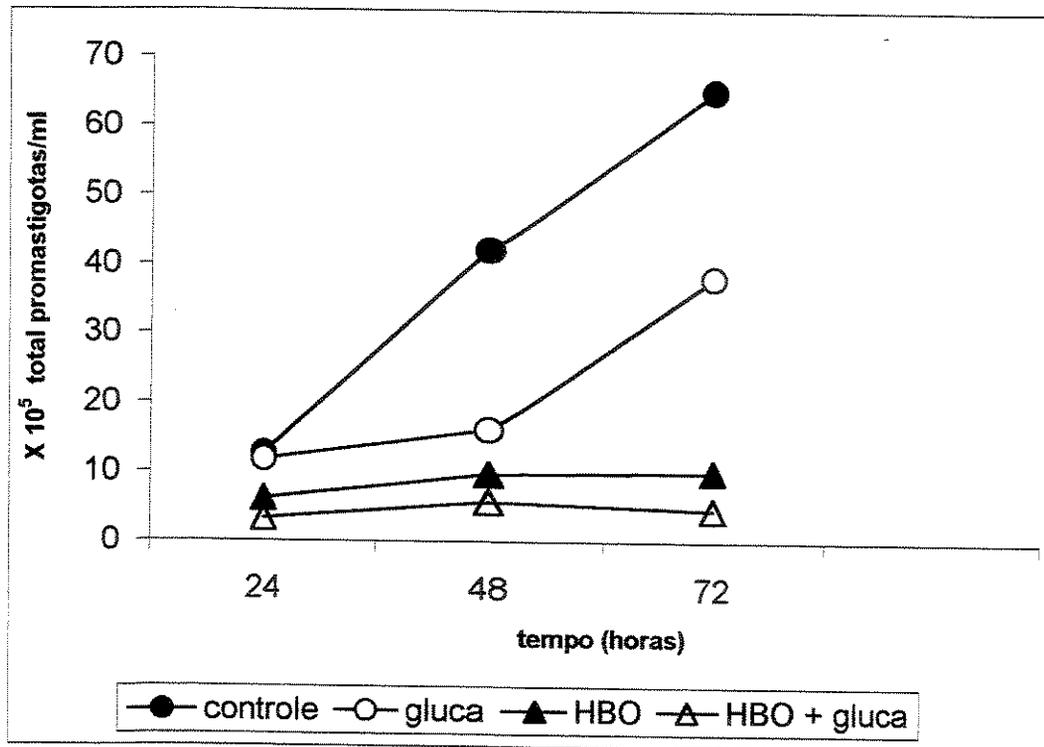


Figura 15. Efeito do tratamento com oxigênio hiperbárico em formas promastigotas de *L. amazonensis*. Formas promastigotas foram tratadas com Glucantime e/ou HBO (pressão de 2,5 ATA em 3 sessões de 2 h com intervalo de 15 minutos à condições ambiente). Em seguida, foram mantidas em estufa seca à temperatura de 26°C. O número de parasitas foi contado a cada 24 h em câmara de Neubauer como descrito no item 3.9 de Materiais e Métodos.

Em relação aos amastigotas expostos à HBO, estes mantiveram-se viáveis após o tratamento (Figura 14), mas perderam a capacidade de transformarem-se em promastigotas quando permaneceram em normóxia à 26°C (Figura 16). Paralelamente, amastigotas (controle) transformaram-se em promastigotas no período de 72 h (Figura 16). Resultados similares foram alcançados com amastigotas tratados com glucantime, tanto em ambiente normóxico como hiperóxico.

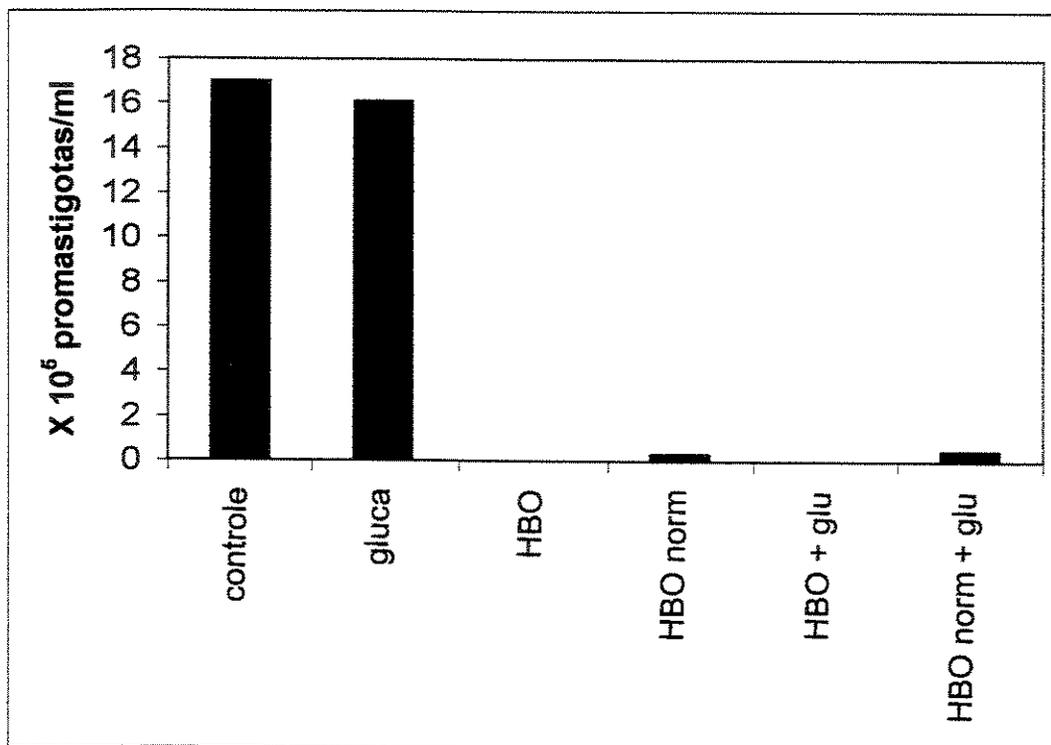


Figura 16. Capacidade de transformação de formas amastigotas de *L. amazonensis* em promastigotas após tratamento com oxigênio hiperbárico. Formas amastigotas foram tratadas com Glucantime e/ou HBO (pressão de 2,5 ATA em 3 sessões de 2 h com intervalo de 15 minutos à condições ambiente). Em seguida, foram lavadas por centrifugação e colocadas em meio de cultura fresco (normóxico) ou permaneceram com em meio hiperóxico, na seqüência, foram mantidas em estufa seca à temperatura de 26°C. O número de parasitas de promastigotas foi contado após 72 h em câmara de Neubauer como descrito no item 3.9 de Materiais e Métodos.

Com os resultados anteriores apontando a perda da capacidade de amastigotas transformarem-se em promastigotas após tratamento hiperbárico (Figura 16), nosso

próximo passo foi analisar se estes parasitas mantiveram a infectividade quando inoculados em camundongos susceptíveis. Assim, infectamos camundongos BALB/c com 10^6 amastigotas tratados ou não em HBO (3 sessões de 2 h com intervalo de 15 min). É interessante notar que os amastigotas que foram expostos à HBO desenvolveram lesões muito semelhantes às do grupo controle, sugerindo que a virulência das formas amastigotas não foi alterada com esse protocolo (Figura 17).

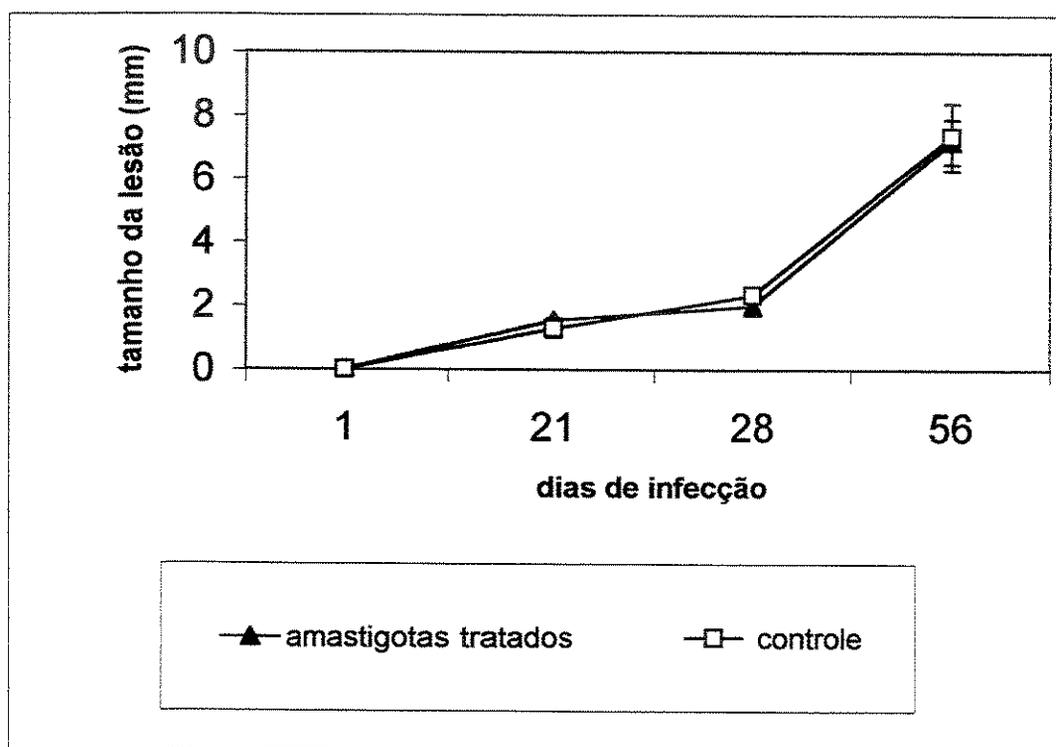


Figura 17. Infecção de camundongos BALB/c com formas amastigotas expostas à HBO. Camundongos BALB/c foram infectados no coxim plantar de uma das patas traseiras com 10^6 amastigotas de *L. amazonensis* previamente expostos à HBO (3 sessões de 2 h com intervalo de 15 min). As lesões foram medidas com paquímetro como descrito no item 3.9 de Materiais e Métodos. Os valores representam a média do tamanho da lesão de cada grupo \pm desvio padrão.

4.7. Análise da exposição de camundongos BALB/c infectados com amastigotas de *Leishmania amazonensis* à terapia com oxigênio hiperbárico.

Os resultados mostrados nas Figuras 14, 15 e 16 indicam que o tratamento de formas de *L. amazonensis* com HBO tem efeito deletério tanto em promastigotas como em amastigotas. Nosso próximo passo foi avaliar se a exposição de camundongos BALB/c infectados com amastigotas à terapia com oxigênio hiperbárico resultaria em modificação da evolução da leishmaniose. Camundongos BALB/c foram infectados com 2×10^6 amastigotas de *L. amazonensis* e tratados em câmara hiperbárica (HBO), em duas fases da infecção. Um grupo (n=15) tratado desde o início da infecção (dia 1) foi submetido a tratamento de 1h/dia à pressão de 2,5 ATA, respirando 100% de O₂ medicinal. Observamos que esse protocolo de tratamento alterou a evolução da lesão, diminuindo o processo edematoso e causou diferença significativa do tamanho da pata infectada a partir do 80º dia (Figura 18). Em outro protocolo de tratamento, em que camundongos BALB/c foram expostos a HBO após 30 dias de infecção (dia 30), também observamos diferenças significativas após o 80º dia de tratamento (Figura 19).

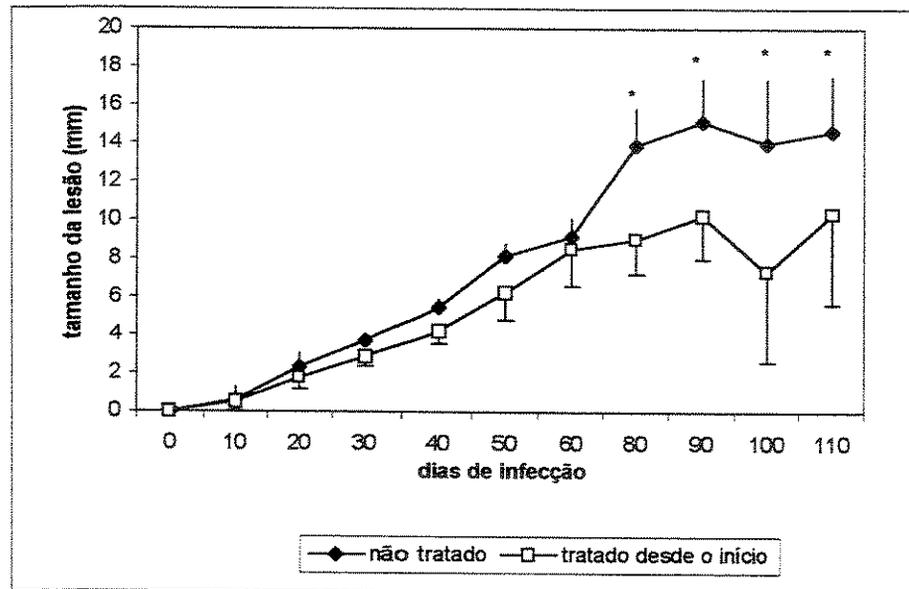


Figura 18. Efeito do tratamento de camundongos BALB/c infectados com amastigotas de *L. amazonensis*. Camundongos BALB/c foram infectados com 2×10^6 amastigotas no coxim plantar de uma das patas traseiras e foram tratados em HBO (1h/dia à 2,5 ATA respirando 100% de O_2) durante o período de observação. * Estatística: $p < 0,05$. Os valores representam a média do tamanho da lesão de cada grupo \pm desvio padrão.

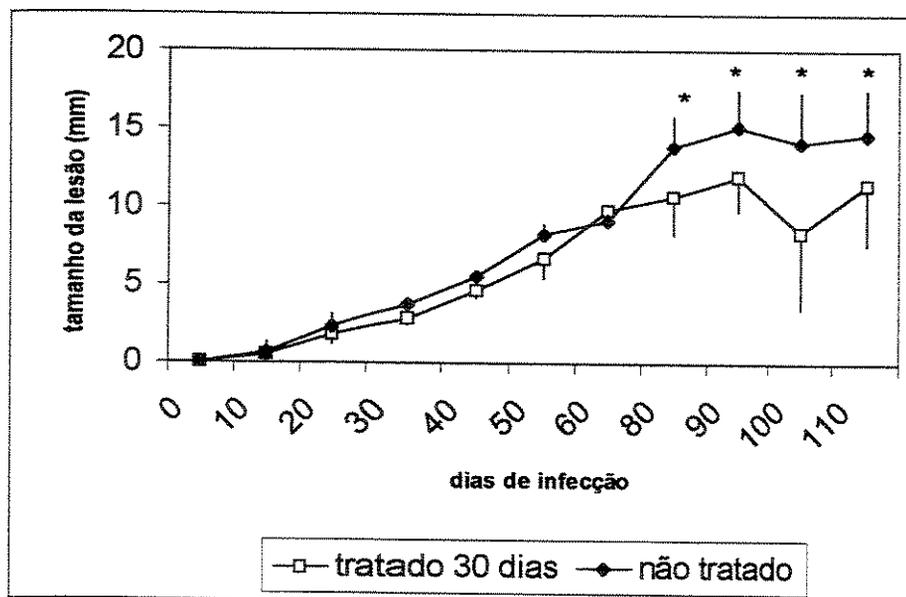


Figura 19. Efeito do tratamento de camundongos BALB/c infectados com amastigotas de *L. amazonensis*. Camundongos BALB/c foram infectados com 2×10^6 amastigotas no coxim plantar de uma das patas traseiras e foram tratados em HBO (1h/dia à 2,5 ATA respirando 100% de O_2) após trinta dias de infecção. * Estatística $p < 0,05$. Os valores representam a média do tamanho da lesão de cada grupo \pm desvio padrão.

4.8. Análise da sobrevivência de camundongos BALB/c infectados com amastigotas de *Leishmania amazonensis* e tratados com oxigênio hiperbárico.

Analisamos a sobrevivência dos camundongos BALB/c infectados com 2×10^6 amastigotas de *L. amazonensis* expostos ao oxigênio hiperbárico no início da infecção (dia 1) e após trinta dias de infecção (dia 30). Observamos que a porcentagem de sobrevivência foi reduzida em ambos os grupos tratados com HBO, quando comparada com a porcentagem de sobrevivência do grupo não tratado (Figura 20). Lesões

metastásicas ocorreram de forma precoce em camundongos tratados, o que determinou o agravamento sistêmico causando a morte dos animais (Figura 20).

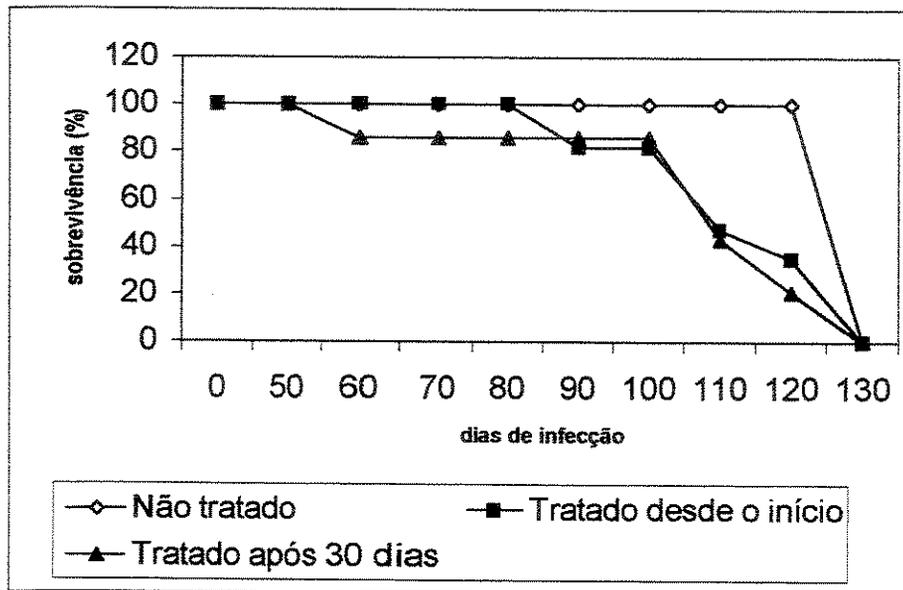


Figura 20. Sobrevivência de Camundongos BALB/c infectados com amastigotas de *L. amazonensis*. Camundongos BALB/c foram infectados com 2×10^6 amastigotas no coxim plantar de uma das patas traseiras e foram tratados em HBO (1h/dia à 2,5 ATA respirando 100% de O_2) alternativamente no início ou após trinta dias de infecção.

4.9. Aspecto da lesão desenvolvida em camundongos BALB/c infectados com amastigotas de *Leishmania amazonensis*

Com o objetivo de avaliar o aspecto das lesões desenvolvidas em camundongos BALB/c tratados em HBO, alternativamente no início ou após trinta dias de infecção, foram realizadas fotografias durante o período de observação (130 dias). Camundongos tratados, desde o início ou após trinta dias de infecção, apresentaram precoces ulcerações das lesões (40 dias) e diminuições dos processos edematosos quando comparados com o grupo controle (Figuras 21 e 22). Assim, apesar das significativas mudanças morfológicas e das lesões terem sido menores que às do grupo não tratado (Figuras 18 e 19), a sobrevivência dos grupos expostos à HBO foi reduzida (Figura 20), devido a uma evidente melhora do grau isquêmico local que promoveu a disseminação hematogênica do parasita.

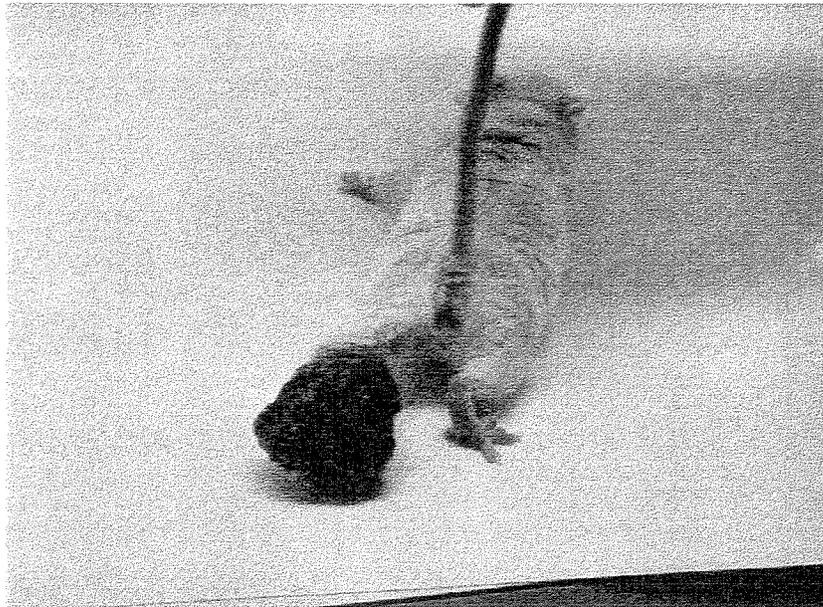


Figura 21. Aspecto da lesão de camundongo BALB/c infectado com *L. amazonensis*. Aspecto da pata de camundongo BALB/c infectados com 2×10^6 amastigotas, após 90 dias.

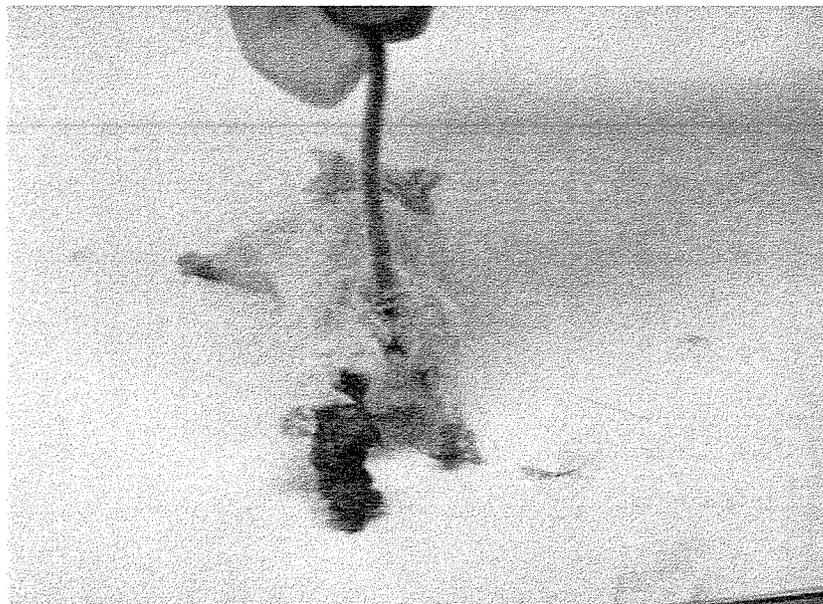


Figura 22 Aspecto de camundongo BALB/c infectado com *L. amazonensis* e tratado em HBO. Aspecto da pata de camundongo BALB/c infectado com 2×10^6 amastigotas e tratados em HBO desde o início da infecção (tempo de infecção de 90 dias). Notar a diminuição do processo edematoso comparado ao controle (Figura 21).

5. Discussão

A interrupção do fluxo sanguíneo de tecidos lesados e/ou inflamados frequentemente causa a formação de áreas de baixa tensão de oxigênio. Estas áreas hipóxicas em enfermidades crônicas tais como, tumores malignos, úlceras dérmicas, fraturas ósseas e lesões em pacientes diabéticos levam a uma tensão de oxigênio menor que 10 mmHg (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 aeróbias e anaeróbias e as tentativas de reparação tecidual (proliferação de pequenos vasos sanguíneos) ocorrem simultaneamente (WEIGLE & SARAIVA, 1996 e GIORGIO *et al.*, 1998). Na impossibilidade do hospedeiro eliminar o parasita, há destruição tecidual com formação da típica úlcera leishmaniótica com focos de necrose, conseqüente isquemia e diminuição do aporte de oxigênio. Assim, a parte inicial de nosso trabalho foi realizada com a finalidade de avaliar os efeitos a restrição do aporte de oxigênio (hipóxia) em culturas de macrófagos J774 infectados com o parasita *L. amazonensis*.

Vários estudos têm mostrado que a hipóxia altera a morfologia, a expressão de marcadores de superfície, a fagocitose e a atividade metabólica de macrófagos (ARNET *et al.*, 1996; LEWIS *et al.*, 1999). Por exemplo, TURNER *et al.*, (1999) e GRIMASHAW & BALKWILL (2001) demonstraram que a quimiotaxia está diminuída em macrófagos sob condições hipóxicas. CROWTHER *et al.*, (2001) mostraram que moléculas pró-angiogênicas são liberadas por macrófagos em hipóxia. REICHNER *et al.*, (2001)

observaram diminuição da fagocitose de partículas de látex em macrófagos de lesão ou peritoniais e LEEPER-WOODFORD & MILLS, (1992) também observaram diminuição da capacidade de macrófagos alveolares fagocitarem hemácias em ambiente com restrição de O₂. Esses autores não propõem mecanismos para essa modulação da fagocitose em hipóxia.

Nossos experimentos iniciais *in vitro* mostraram que a condição adequada de infecção seria com formas amastigotas de *L. amazonensis* em uma proporção de 10:1 (parasitas por célula). Essas culturas apresentaram em ambiente hipóxico, porcentagem de infecção 55% menor que células mantidas em ambiente normóxico (Figura 2). Esse resultado sugere que macrófagos podem também ser estimulados por fatores microambientais presentes no tecido infectado, um desses fatores, a hipóxia, estimulou o macrófago à atividade leishmanicida. Nesse sentido, avaliamos o efeito de imunostimuladores (gIFN e LPS) em ambiente hipóxico. Nossos resultados mostraram que em ambiente com restrição de oxigênio (5% de O₂) a diminuição da porcentagem de infecção evidenciada em normóxia não ocorreu, sugerindo que o grau de hipóxia (5% de O₂) alcançado em nossos experimentos é suficiente para estimular o macrófago e impossibilitar um sobre-estímulo com gIFN e LPS (Figura 3). Assim, nossos resultados sugerem que macrófagos estão ativados/estimulados em ambiente com restrição de oxigênio. O aspecto morfológico das células também permitiu-nos sugerir que a hipóxia é um importante estímulo para os macrófagos, uma vez que, culturas celulares mantidas em hipóxia (ativadas ou não com gIFN e LPS) apresentaram morfologias semelhantes às mantidas em ambiente normóxico ativadas com gIFN e LPS (Figura 6). Macrófagos J774 infectados com amastigotas de *L. amazonensis* em ambiente hipóxico (ativados ou não com gIFN e LPS) mostraram alterações morfológicas semelhantes aos macrófagos infectados

em normóxia e tratados com gIFN e LPS (Figura 10), sugerindo que as alterações morfológicas sofridas pelos macrófagos são ambiente-dependentes. Apesar da literatura não apresentar dados que possibilitem a comparação dos nossos resultados (LEEPER-WOODFORD & MILLS, 1992; REICHNER *et al.*, 2001), há trabalhos indicando que o efeito da hipóxia em macrófagos é o de ativação. Por exemplo, MELLITO *et al.*, (1995) mostraram que a hipóxia induz a expressão da enzima iNOS em células endoteliais bovinas, mas não aumenta a produção de nitrito em cultura de macrófagos ativados com gIFN. ARNET *et al.*, (1996) também demonstraram que células endoteliais bovinas em hipóxia aumentam a transcrição da enzima NOS. Assim, também analisamos a produção de óxido nítrico em culturas de macrófagos J774 mantidas em ambiente hipóxico e normóxico ativadas ou não com gIFN e LPS. Nossos resultados indicaram que a produção de nitrito por macrófagos J774 mantidos em hipóxia (com ou sem gIFN e LPS) foi significativamente menor (Figura 4), quando comparados com resultados em normóxia, sugerindo que o ambiente com restrição de oxigênio, apesar de aumentar a transcrição da enzima NOS (ARNET *et al.*, 1996), limitou sensivelmente a produção de nitrito, provavelmente porque o O₂ é um importante substrato para sua produção e está limitado em nossas condições (MCCORMICK *et al.*, 2000). Mesmo assim, estes macrófagos foram capazes de restringir a infecção com *Leishmania* (Figura 2). No entanto, não podemos descartar a hipótese de que outros intermediários de nitrogênio estejam agindo nessas células ou que produtos lisossomais estejam sendo produzidos em maior quantidade.

Assim, nossos resultados mostram que a hipóxia é um importante estimulador/ativador de macrófagos e que a restrição de O₂ resulta em uma produção deficiente de nitrito, mas não impede que as células restrinjam a infecção com *L. amazonensis*. Os mecanismos pelos quais os macrófagos matam os amastigotas não são

ainda conhecidos, mas podemos sugerir uma ação independente de NO, como, por exemplo, o aumento da atividade lisossomal.

Na segunda etapa do nosso trabalho avaliamos o efeito de um ambiente hiperbárico com 100% de O₂ em culturas de parasitas. Em nossas condições experimentais (3 sessões de 2 h com intervalo de 15 min), a HBO induziu uma rápida imobilização de formas promastigotas de *L. amazonensis* tratadas com glucantime, a droga de primeira linha usada contra a leishmaniose (Figura 14). O efeito do aumento da tensão de oxigênio em agentes antiparasitários é desconhecido, mas uma possível razão para o efeito tóxico imediato do glucantime sob HBO em promastigotas é a rápida absorção da droga através da membrana do parasita. Outro mecanismo possível é que os altos níveis de radicais de oxigênio formados durante a exposição a HBO ocasione dano na membrana lipídica (DOCAMPO, 1995). Também avaliamos o efeito da HBO no crescimento de promastigotas no período de 48 h, foi interessante notar que culturas de promastigotas tratadas ou não com glucantime e expostas à HBO não proliferaram (Figura 15), sugerindo que a HBO foi suficiente para inibir o crescimento de formas promastigotas. MUHVICH *et al.*, (1993) demonstraram o efeito tóxico da exposição de promastigotas de *L. panamensis* ao oxigênio hiperbárico durante 24 h, no entanto esse tratamento é muito longo (24 h) e intolerável para o organismo humano. Nossos resultados também indicaram que a HBO impede a transformação de formas amastigotas em promastigotas (Figura 16). Sugerimos que sob HBO, parasitas produzem NO e alteram o seu processo de diferenciação celular. De fato, LEMESTRE *et al.*, (1997) demonstraram que o tratamento com NO impede a conversão de amastigotas viáveis *in vitro* e BASU *et al.*, (1997) mostraram que *Leishmania* produz NO. Assim, em nossas condições experimentais foi possível inibir o crescimento de formas promastigotas e a transformação de amastigotas em promastigotas com a conseqüente

morte do parasita (Figura 16). Os mecanismos moleculares implicados na “estase” do parasita ainda terão que ser elucidados, mas, interessante, as formas amastigotas que foram expostas à HBO, sob as mesmas condições experimentais, quando inoculadas em camundongos susceptíveis (BALB/c), apresentaram curva de crescimento da lesão semelhante às lesões provocadas por amastigotas não tratados. Estes resultados sugerem que apesar da HBO impedir a transformação em promastigotas, não altera a infectividade (virulência) do parasita (Figura 17).

A terapia hiperbárica além do efeito tóxico direto do oxigênio sobre microorganismos, tais como *Candida albicans*, *S. mansoni*, *G. intestinalis* (GARCIA-COVARRUBIAS & CUAUHEMOC SANCHES-RODRIGUES, 2000), atua em úlceras isquêmicas favorecendo a reperfusão e conseqüentemente diminuindo a hipóxia tecidual (BURAS *et al.*, 2000). Com a finalidade de investigar o efeito do oxigênio hiperbárico na evolução da lesão leishmaniótica, camundongos BALB/c foram infectados com amastigotas de *L. amazonensis*. Essa linhagem é utilizada como um modelo de leishmaniose murina, devido a susceptibilidade a várias espécies de *Leishmania* (HANDMAN, 2000). Nossos resultados indicaram que a HBO modulou a evolução da lesão dos camundongos diminuindo o processo edematoso e diminuindo significativamente o tamanho da lesão (Figuras. 18 e 19). No entanto, pelo próprio efeito reperfusivo do tratamento, isto é, diminuição da isquemia tecidual, notamos que nos camundongos expostos à HBO ocorreram lesões metastásicas (presença de nódulos na cauda, nas patas e na região periocular) precocemente, provavelmente através da disseminação do parasita por via linfática e hematogênica, o que levou ao agravamento sistêmico e conseqüentemente diminuiu a sobrevivência dos animais tratados (Figura 20). Esses resultados sugerem que o tratamento hiperbárico altera a evolução da lesão e precocemente favorece o aparecimento de lesões

metastásicas. Esses experimentos foram realizados com doses de parasitas muito altas (2×10^6 amastigotas/camundongo) e não descartamos a possibilidade de que infecções mais brandas (número menor de parasitas) possam ser mais fáceis de controlar durante o tratamento hiperbárico. Não há dados na literatura que permitam a comparação com nossos resultados.

No entanto, há dados mostrando um efeito benéfico do tratamento hiperbárico em outros modelos murinos. Por exemplo, STEVENS *et al.*, (1993) observaram que o tratamento hiperbárico melhorou a eficiência do metronidazol em camundongos infectados com *Clostridium perfringen*. INAMOTO *et al.*, (1991) demonstraram que o tratamento hiperbárico de camundongos sadios provoca a redução da produção da interleucina-1. KURATA *et al.*, (1995) observaram que o tratamento em HBO de camundongos sadios reduz a síntese de peroxinitrito e GREGOREVIC *et al.*, (2001) demonstraram que o tratamento em HBO modula a atividade de enzimas antioxidantes em tecido muscular de ratos.

Apesar de em nossas condições experimentais a HBO ter favorecido a metástase, concluímos que houve uma significativa melhora no fluxo sanguíneo da área lesionada, propiciando futuros estudos sobre o efeito adjuvante do oxigênio hiperbárico com drogas anti-parasitárias no modelo murino da leishmaniose e de outros parasitas.

6. Conclusões

- O ambiente com restrição de oxigênio (hipóxia) é um importante estímulo leishmanicida para macrófagos J774.
- A produção de nitrito em culturas celulares expostas à hipóxia é prejudicada, por falta de O₂ como substrato.
- O tratamento com oxigênio hiperbárico tem efeito deletério sobre formas promastigotas e amastigotas de *L. amazonensis*.
- O tratamento com oxigênio hiperbárico altera a evolução da lesão leishmaniótica diminuindo o processo inflamatório.
- O tratamento com oxigênio hiperbárico aumenta a disseminação parasitária por via hematogênica e linfática.

7. Referências Bibliográficas

ALBINA JE; HENRY WL JR; MASTROFRANCESCO B; MARTIN BA & REICHNER JS. 1995. *Macrophage activation by culture in an anoxic environment*. **J. Immunol.**, **155**: 4391-6.

ALEXANDER J; SATOSKAR AR & RUSSELL DG. 1999. *Leishmania species: models of intracellular parasitism*. **J. Cell. Sci.**, **18**: 2993-2.

ARNET UA; McMILLAN A; DINERMAN JL; BALLERMANN B & LOWENSTEIN CJ. 1996. *Regulation of endothelial nitric-oxide synthase during hypoxia*. **J. Biol. Chem.**, **271**: 15069 – 73.

AUGUSTO O; LINARES E & GIORGIO S. 1996. *Possible roles of nitric oxide and peroxynitrite in murine leishmaniasis.* **Braz. J. Med. Biol. Res.**, **29**: 853-62.

BABIOR BM. 1984. *The respiratory burst of phagocytes*. **J. Clin. Invest.**, **73**: 599-01.

BASU NK; KOLE L; GHOSH A & DAS PK. 1997. *Isolation of a nitric synthase from the protozoan parasite, Leishmania donovani*. **FEMS Microb. Lett.**, **156**: 43-7.

BIDDLESTONE LR; HEPBUM NC & MCLAREN KM. 1994. *A clinico-pathological study of cutaneous leishmaniasis in British troops from Belize*. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, **88**: 672-6.

BURAS JA; STAHL GL; SVOBODA KKH & REENSTRA WR. 2000. *Hyperbaric oxygen downregulates ICAM-1 expression induced by hypoxia and hypoglycemia: the role of NOS. Am. J. Physiol. Cell. Physiol., 278: 292 – 02.*

BUTTERICK CJ; WILLIAMS DA; BOXER LA & BAEHNER RL. 1981. *Changes in energy metabolism, structure and function in alveolar macrophages under anaerobic conditions. Br. J. Haematol., 48: 523-32.*

CALLAHAN H; PORTAL AC; DEVEREAUX R & GROGL M. 1997. *An axenic amastigote system for drug screening. Antimicrob. Ag. Chemother., 41: 818-822.*

CANTOS G; BARBIERI CC; IACOMINI M; GORIN PA & TRAVASSOS LR. 1993. *Synthesis of antimony complexes of yeast mannan and mannan derivatives and their effect on *Leishmania* – infected macrophages. Bioch. J., 289: 155 – 60.*

CHEUNG JY; BONVENTRE JV; MALIS CD & LEAF A. 1986. *Calcium and ischemic injury. N. Engl. J. Med., 314: 1670-6.*

CLARK LA & MOON RE. 1999. *Hyperbaric oxygen in the treatment of life-threatening soft-tissue infections. Respir. Care. Clin. N. Am., 5: 203-19.*

COUCH L; THEILEN F & MADER JT. 1988. *Rhinocerebral mucormycosis with cerebral extension successfully treated with adjunctive hyperbaric oxygen therapy. Arch. Otolaryngol. Head. Neck. Surg., 114: 791-4.*

CROWTHER M; BROWN NJ; BISHOP ET & LEWIS CE. 2001. *Microenvironmental influence on macrophage regulation of angiogenesis in wounds and malignant tumors. J. Leuk. Biol., 70: 478 – 90.*

DOCAMPO R. *Antioxidant mechanisms.* In: MARR JJ & MULLER M, (eds.). 1995. **Biochemistry and molecular biology of parasites.** London: Academic Press, 147-60.

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

GARCIA-COVARRUBIAS L & CUAUHTEMOC SANCHEZ-RODRIGUEZ E. 2000. *Hyberbaric oxygenation therapy, basic concepts. Gac. Med. Mex., 136: 45-56.*

GILLIN FD & DIAMOND LS. 1981. *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.*

GIORGIO S & BARAO SC. 1998. *Intracellular Leishmania amazonensis killing induced by the guanine nucleoside 8 – biomoguanosine. Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo, 40: 237 – 40.*

GIORGIO S; LINARES E; ISCHIRPOULOS H; VON ZUBEN FJ; YAMADA A & AUGUSTO O. 1998 *In vivo formation of electron paramagnetic resonance-detectable nitric oxide and of nitrotyrosine is not impaired during murine leishmaniasis. Infect. Immun.*, **66**: 807-14.

GREEN LC; WAGNER DA; GLOGOWSKI J; SKIPPER PL; WISHNOK JS & TANNENBAUM SR. 1984. *Analysis of nitrate, nitrite and (¹⁵N) nitrate in biological fluids. Anal. Biochem.*, **126**: 131-6.

GREGOREVIC P; LYNCH GS & WILLIAMS DA. 2001. *Hyperbaric oxygen modulates antioxidant enzyme activity in rat skeletal muscle. Eur. J. Appl. Physiol.*, **86**: 24-7.

GRIMALDI GJr & TESH RB. 1993. *Leishmaniasis of the new world: current concepts and implications for future research. Clin. Microbiol. Rev.*, **6**: 230-50.

GRIMASHAW MJ & BALKWILL FR. 2001. *Inhibition of monocyte and macrophage chemotaxis by hypoxia and inflammation – a potential mechanism. Eur. J. Immunol.*, **31**: 480 – 9.

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

HANDMAN E. 2001. *Leishmaniasis: current status of vaccine development. Clin. Microbiol. Rev.*, **14**: 229-43.

HANNAH S; MECKLENBURGH K; RAHMAN I; BELLINGAN GJ; GREENING A; HASLETT C & CHILVERS ER. 1995. *Hypoxia prolongs neutrophil survival in vitro*. **FEBS Lett.**, **372**: 233-7.

HARRON ZA; GREENBERG CS & DEWHIRST MW. 2000. *Early wound healing exhibits cytokine surge without evidence of hypoxia*. **Ann. Surg.**, **231**: 137-47.

HERWALDT BL. 1999. *Leishmaniasis*. **Lancet**, **354**: 1191-9.

HINK J & JANSEN E. 2001. *Are superoxide and/or hydrogen peroxide responsible for some of the beneficial effects of hyperbaric oxygen therapy?*. **Med. Hyp.**, **57**: 764 – 9.

HO JL; REED SG; SOBREL J; ARRUDA S; HE SH; WICK EA & GRABSTEIN KH. 1992. *Interleukin-3 induces antimicrobial activity against Leishmania amazonensis and Trypanosoma cruzi and tumoricidal activity in human peripheral blood-derived macrophages*. **Inf. Imm.**, **60**: 1984-93.

HUNT TK; KNIGHTON DR; THAKRAL KK; GOODSON WH 3rd & ANDREWS WS. 1994. *Studies on inflammation and wound healing: angiogenesis and collagen synthesis stimulated in vivo by resident and activated wound macrophages*. **Surg.**, **96**: 48-54.

IBIWOYE MO; HOWARD CV; SIBBONS P; HASAN M & VAN VELZEN D. 1993. *Cerebral malaria in the rhesus monkey (Macaca mulatta): observations on host pathology*. **J. Comp. Pathol.**, **108**: 303-10.

INAMOTO Y; OKUNO F; SAITO K; TANAKA Y; WATANABE K; MORIMOTO I; YAMASHITA U & ETO S. 1991. *Effect oh hiperbaric oxygenation on macrophage function in mice*. **Bioch. Bioph. Res. Comm.**, **179**: 886 – 91.

KURATA S-I; YAMASHITA U & NAKAJIMA H. 1995. *Hyperbaric oxygenation reduces the cyostatic activity and transcription of nitric oxide synthatese gene of mouse peritoneal macrophages*. **Bioch. Bioph. Act.**, **1263**: 35 – 8.

LEEPER-WOODFORD SK & MILLS JW. 1992. *Phagocytosis and ATP levels in alveolar macrophages during acute hypoxia*. **Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.**, **6**: 326-34.

LEEPER-WOODFORD SK & DETMER K. 1999. *Acute hypoxia increases alveolar macrophage tumor necrosis factor activity and alters NF-kappaB expression*. **Am. J. Physiol.**, **276**: L909-16.

LEMESTRE JP; SERENO D; DAULOUEDA S; VEYRET B; BRAJON N & VINCENDEAU P. 1997. *Leishmania* spp.: *nitric oxide-mediated metabolic inhibition of promastigote and axenically grown amastigote form*. **Exp. Parasitol.**, **86**: 58-68.

LEWIS JS; LEE JA; UNDERWOOD JC; HARRIS AL & LEWIS CE. 1999. *Macrophage responses to hypoxia: relevance to disease mechanisms. J. Leukoc. Biol.*, **66**: 889-00.

LINARES E; AUGUSTO O; BARÃO SC & GIORGIO S. 2000. *Leishmania amazonensis* infection does not inhibit systemic nitric oxide levels elicited by lipopolysaccharide in vivo. *J. Parasitol.*, **86**: 78-2.

MCCORMICK CC; LI WP & CALERO M. 2000. *Oxygen tension limits nitric oxide synthesis by activated macrophages. Bioch. J.*, **15**: 709 – 16.

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

MELLITO G, MUSSO T, SICA A, TAYLOR LS, COX GW, VARESIO L. 1995. *A hypoxia-responsive element mediates a novel pathway of activation of the inducible nitric oxide synthase promoter. J. Exp. Med.*, **1**: 1683-93.

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

MUHVICH KH; ANDERSON LH; CRISWELL DW & MEHM WJ. 1993. *Hyperbaric hyperoxia enhances the lethal effects of amphotericin B in Leishmania braziliensis panamensis*. **Under. Hyperb. Med.**, **20**: 321-8.

NARE B; SMITH JM & PRICHASRD RK. 1990. *Schistosoma mansoni: levels of antioxidants and resistance to oxidants increase during development*. **Exp. Parasitol.**, **70**: 389-97.

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

OVERATH P & AEBISCHER T. 1999. *Antigen presentation by macrophages harboring intravesicular pathogens*. **Parasitol. Tod.**, **15**: 325-32.

PARK MK; MYERS RAM & MARZELLA L. 1992. *Oxygen tensions and infections: modulation of microbial growth, activity of antimicrobial agents and immunological responses*. **Clin. Inf. Dis.**, **14**: 720-40.

PESANTI EL. 1984. *Pneumocystis carinii: oxygen uptake, antioxidant enzymes, and susceptibility to oxygen-mediated damage*. **Infect. Immun.**, **44**: 7-11.

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

REICHNER JS; FITZPATRICK PA; WAKSHULL E & ALBINA JE. 2001. *Receptor-mediated phagocytosis of rat macrophages is regulated differentially for*

opsomized particles and non-opsomized particles containing beta-glucan. Imm., 104:
198 – 06.

REMENSNYDER JP & MAJNO G. 1968. *Oxygen gradients in healing wounds. Am. J. Pathol., 52:* 301 – 19.

SCANNELL G; WAXMAN K; KAML GJ; IOLI G; GATANAGA T;
YAMAMOTO R & GRANGER GA. 1993. *Hypoxia induces a human macrophage cell line to release tumor necrosis factor-alpha and its soluble receptors in vitro. J. Surg. Res., 54:* 281-5

SIMON LM; AXLINE SG & PESANTI EL. 1981. *Adaptations of phagocytosis and pinocytosis in mouse lung macrophages after sustained in vitro hypoxia. Am. Rev. Respir. Dis., 123:* 64-8.

SOLBACH W & LASKAY T. 2000. *The host response to Leishmania infection. Adv. Immunol., 74:*275-17.

STEVENS DL; BRYANT AE; ADAMS K & MADER JT. 1993. *Evaluation of therapy with hyperbaric oxygen for experimental infection with Clostridium perfringens. Clin. Infect. Dis., 17:* 231-7.

TE KOPPELE JM; KELLER BJ; CALDWELL-KENDEL JC; LEMASTRES JJ & THURMAN RG. 1991. *Effect 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.

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

VANOTTEREN GM; STANDIFORD TJ; KUNKEL SL; DANFORTH JM & STRIETER RM. 1995. *Alterations of ambient oxygen tension modulate the expression of tumor necrosis factor and macrophage inflammatory protein-1 alpha from murine alveolar macrophages. Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol., 13:* 399-09.

YUN JK; MCCORMICK TS; JUDWARE R & LAPETINA EG. 1997. *Cellular adaptive responses to low oxygen tension: apoptosis and resistance. Neurochem. Res., 22:* 517-21.

WEBB JR; CAMPOS-NETO A; OVENDALE PJ; MARTIN TI; STROMBERG EJ; BADARO R & REED SG. 1998. *Human and murine immune responses to a novel Leishmania major recombinant protein encoded by members of a multicopy gene family. Infect. Immun., 66:* 3279-89.

WEIGLE K & SARAVIA NG. 1996. *Natural history, clinical evolution, and the host-parasite interaction in New World cutaneous Leishmaniasis. Clin. Dermatol., 14:* 433-50.

WEST MA; LI MH; SEATTER SC & BUBRICK MP. 1994. *Pre-exposure to hypoxia or septic stimuli differentially regulates endotoxin release of tumor necrosis*

factor, interleukin-6, interleukin-1, prostaglandin E2, nitric oxide, and superoxide by macrophages. J. Trauma, 37: 82-9.

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