



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA

SOLANGE DOS SANTOS COSTA

AVALIAÇÃO DA RESISTÊNCIA/SUSCEPTIBILIDADE A
Leishmania amazonensis EM MACRÓFAGOS MUTANTES
PARA O GENE VON HIPPEL LINDAU E ESTUDO DA
EXPRESSÃO DE MARCADORES DE SUPERFÍCIE DE
MACRÓFAGOS FRENTE À INFECÇÃO COM *L. amazonensis*

CAMPINAS

2016

SOLANGE DOS SANTOS COSTA

AVALIAÇÃO DA RESISTÊNCIA/SUSCEPTIBILIDADE A *Leishmania amazonensis* EM MACRÓFAGOS MUTANTES PARA O GENE VON HIPPEL LINDAU E ESTUDO DA EXPRESSÃO DE MARCADORES DE SUPERFÍCIE DE MACRÓFAGOS FRENTE À INFECÇÃO COM *L. amazonensis*

Tese apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do Título de Doutora em Parasitologia.

ESTE ARQUIVO DIGITAL CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA TESE DEFENDIDA PELA ALUNA SOLANGE DOS SANTOS COSTA E ORIENTADA PELA SELMA GIORGIO.

Orientadora: SELMA GIORGIO

CAMPINAS

2016

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca do Instituto de Biologia
Mara Janaina de Oliveira - CRB 8/6972

C823a Costa, Solange dos Santos, 1983-
Avaliação da resistência/susceptibilidade a *Leishmania amazonensis* em macrófagos mutantes para o gene Von Hippel Lindau e estudo da expressão de marcadores de superfície de macrófagos frente à infecção com *L. amazonensis* / Solange dos Santos Costa. – Campinas, SP : [s.n.], 2016.

Orientador: Selma Giorgio.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. *Leishmania*. 2. Macrófagos. 3. Antígenos de superfície. 4. Doença de von Hippel-Lindau. I. Giorgio, Selma, 1962-. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Evaluation of the resistance/susceptibility to *Leishmania amazonensis* in macrophages from the Von Hippel Lindau gene mutants and study of cell surface markers in macrophage infected with *L. amazonensis*

Palavras-chave em inglês:

Leishmania

Macrophages

Antigens, Surface

Von Hippel-Lindau disease

Área de concentração: Parasitologia

Titulação: Doutora em Parasitologia

Banca examinadora:

Selma Giorgio [Orientador]

Érika Suzuki de Toledo

Sérgio de Albuquerque

Ronei Luciano Mamoni

Silmara Marques Allegretti

Data de defesa: 20-05-2016

Programa de Pós-Graduação: Parasitologia

Campinas, 20 de maio de 2016.

COMISSÃO EXAMINADORA

Profa. Dra. Selma Giorgio

Profa. Dra. Érika Suzuki de Toledo

Prof. Dr. Sérgio de Albuquerque

Prof. Dr. Ronei Luciano Mamoni

Profa. Dra. Silmara Marques Allegretti

Os membros da Comissão Examinadora acima assinaram a Ata de Defesa, que se encontra no processo de vida acadêmica do aluno.

Agradecimentos

Agradeço a Deus por me sustentar até aqui.

A Profa. Dra. Selma Giorgio pela dedicação, confiança, apoio profissional e incentivo durante a pesquisa.

Aos amigos do Laboratório de Leishmaniose, Alexandra, Myriam, Bárbara, Ademar, Ana, Daniel, Jéssica, Alessandra, Mariana e Luís pelo auxílio, amizade e momentos de alegria compartilhados.

A todos os professores do Departamento de Biologia Animal IB/UNICAMP pelo apoio profissional.

A todos os funcionários e alunos do Departamento de Biologia Animal IB/UNICAMP pelo auxílio e amizade durante estes 4 anos.

Ao Dr. Alexandre e Dr. Wilson pela colaboração neste projeto e a Dra. Márcia por toda dedicação, empenho e cuidado com as análises da citometria de fluxo.

As minhas amigas do Grupo de Discussão Bíblica pelos momentos compartilhados e orações.

A minha família pelo incentivo, apoio e por acreditarem neste projeto juntamente comigo.

Ao meu noivo Fabio, pelo carinho, incentivo e paciência dedicados a mim.

Às instituições de fomento CNPq, CAPES e FAPESP pela concessão da bolsa de doutorado.

Resumo

Leishmania spp. são parasitas obrigatórios de células fagocíticas mononucleares, responsáveis pelo aparecimento de um grupo de doenças que variam de lesões cutâneas simples, lesões mucosas e a leishmaniose visceral. As lesões causadas por *L. amazonensis*, espécie utilizada nestes estudos, apresentam características de tecido hipóxico, uma vez que apresentam parasitas em proliferação, migração de células inflamatórias, infecções secundárias com bactérias anaeróbias e a expressão do fator induzido por hipóxia (HIF-1 α). O HIF-1, um heterodímero composto por uma subunidade β , expressa no núcleo das células, e por uma subunidade α regulada pela concentração de oxigênio. Em condições normais de oxigênio a subunidade α sofre hidroxilação pelas enzimas prolin-hidroxilases, é reconhecida pela proteína Von Hippel Lindau (pVHL) e marcada para a degradação proteossomal. Em condições de hipóxia ou na ausência da pVHL, ocorre a estabilização da subunidade α no citoplasma, que transloca-se para o núcleo onde forma um heterodímero a subunidade β e pode ativar mais de 100 genes de resposta a hipóxia. O modelo que constitui um fenótipo hipóxico com a expressão constante de HIF-1 α é encontrado em células de pacientes que apresentam a síndrome de VHL. Neste trabalho avaliou-se o perfil da infecção de macrófagos originados de monócitos de sangue periférico de pacientes com VHL e de camundongos transgênicos para o gene VHL infectados com *L. amazonensis*. Os ensaios *in vitro*, macrófagos de paciente VHL e/ou de camundongos mutantes para o gene VHL não mostraram diferenças na carga parasitária em relação a macrófagos controle (indivíduo saudável). Nos ensaios *in vivo* camundongos mutantes para VHL e C57BL/6 foram infectados e após 60 dias observou-se lesões menores e carga parasitária reduzida em camundongos mutantes VHL, os dados *in vivo* indicam que HIF-1 α pode estar envolvido no controle da infecção. Outro aspecto da leishmaniose estudado nesse trabalho relaciona-se ao fato de que macrófagos sofrem mudanças após a infecção com *Leishmania*, tais como, alterações na expressão de proteínas e síntese de citocinas e inibição da produção de metabólitos tóxicos de oxigênio e nitrogênio. A apresentação de antígenos e a ativação dos macrófagos são fatores cruciais para a resposta imune do hospedeiro, a qual pode conduzir a cura espontânea ou evoluir para a forma clínica da leishmaniose. Neste trabalho avaliou-se a expressão dos receptores de superfície CD14, CD11C,

CD11B, CD18, CD54, CD206, MHC classe II, TLR-2, CD80 e CD86 de macrófagos humanos originados de monócitos de sangue periférico de indivíduos saudáveis, frente a infecção com *L. amazonensis*. A fenotipagem celular realizada por citometria de fluxo revelou que houve modulação negativa da expressão de CD14, CD11C, CD11B, CD18, CD54 e MHC II em macrófagos com alta carga parasitária, e nenhuma alteração ocorreu na expressão dos marcadores após internalização dos parasitas e em macrófagos com baixa carga parasitária, o que sugere que a presença de amastigotas intracelulares interfere na expressão de moléculas envolvidas na resposta imune inata e apresentação de antígeno.

Abstract

Leishmania spp. parasite of mononuclear phagocytes is involved for the appearance of diseases that range from simple cutaneous lesions, mucosal lesions and visceral leishmaniasis. The lesions caused by *L. amazonensis* used in these studies have hypoxic tissue characteristics because show proliferating parasites, migration of inflammatory cells migration, secondary infection with anaerobic bacteria and expression of the hypoxia inducible factor (HIF-1 α). HIF-1 is a heterodimeric that is composed of β subunit expressed in cell nucleus and an oxygen-regulated α subunit. Under normoxic conditions α subunit is hydroxylated by prolyl-hydroxylase enzymes, it is recognized by the protein Von Hippel Lindau (VHL) and marked for degradation by proteasomes. Under hypoxic conditions or the lack pVHL, α subunit become stabilized in the cytoplasm and translocate to the nucleus, where it dimerizes with β subunit and activate more than 100 hypoxia-responsive genes. A hypoxic phenotype model with constant HIF-1 α expression is observed in cells from the syndrome VHL patients. This study evaluated *L. amazonensis* infection in peripheral blood monocytes derived macrophages from of VHL patients and transgenic mouse model of VHL gene infected with *L. amazonensis*. In vitro assay, VHL patient macrophages and/or transgenic mice of VHL gene showed no differences in parasite load, compared with macrophage controls (healthy individual). In vivo assay, transgenic mice of VHL and C57BL/6 mice were infected and after 60 days small lesions and low parasite load were observed in transgenic mice, the in vivo data demonstrate that HIF-1 α could be involved in the control of infection. Another aspect of leishmaniasis studied in this work relates to fact the macrophage undergo changes after infection with *Leishmania*, such as changes in protein expression and synthesis of cytokines and inhibiting the production of toxic metabolites of oxygen and nitron. The antigen presentation and activation of macrophages are crucial factors for the host immune response, which can lead to spontaneous healing or progress to clinical form of leishmaniasis. In this work was to evaluate surface expression of CD14, CD11c, CD11b, CD18, CD54, CD206, MHC class II, TLR-2, CD80 and CD86 in *L. amazonensis*- infected peripheral blood monocytes derived macrophages from of healthy individuals. The cell analyses by flow cytometry revealed negative modulation of CD14, CD11c, CD11b, CD18, CD54 and MHC II expression in macrophages with high parasite load, no change in these cell markers was detected

in macrophages after parasite internalization and macrophages with low parasite load, suggesting that the presence of intracellular amastigotes interferes in the expression of molecules involved in the innate immune response and antigen presentation.

Sumário

1. Introdução	13
1.1. Leishmaniose	13
1.2. <i>Leishmania amazonensis</i>	15
1.3. Hipóxia	16
1.4. Fator induzido por hipóxia (HIF - <i>Hypoxia Inducible Factors</i>)	17
1.5. Efeitos da hipóxia em células fagocíticas	19
1.6. Mutações e HIF-1 α	19
1.7. A síndrome de Von Hippel Lindau	20
O gene	21
A proteína VHL	22
1.8. Modelo murino transgênico	23
1.9. Interação parasito-hospedeiro	24
1.10. Marcadores de superfície – fagocitose e infecção	26
1.11. Marcadores de superfície	27
2. Objetivo Geral	32
2.1. Objetivos específicos	32
3. Material e métodos	33
3.1. Parasitas	33
3.2. Macrófagos primários de sangue periférico	33
3.2.1. Procedimentos de coleta	33
3.2.2. Separação dos monócitos de sangue periférico e cultivo de macrófagos primários humano	33

3.2.3. Ensaio de infecção de macrófagos primários humano com <i>L. amazonensis</i>	34
3.2.4. Citometria de fluxo	34
3.2.5. Imunofluorescência para HIF-1 α	35
3.3. Macrófagos peritoneais murino e infecção com <i>L. amazonensis</i>	36
3.4. Animais	36
3.4.1. Reação em cadeia da polimerase semi-quantitativa em tempo real (RT-qPCR)	37
3.4.2. Infecção dos animais com <i>L. amazonensis</i>	37
3.4.3. Expressão de HIF-1 α - Western Blotting	37
3.5. Análise dos resultados	38
4. Resultados	39
4.1. Avaliação da expressão de HIF-1 α em macrófagos de sangue periférico de paciente com a síndrome de VHL.	39
4.2. Avaliação da mutação do gene VHL na Geração F1 de camundongos mutantes	44
4.3. Avaliação da expressão de HIF-1 α em macrófagos de camundongos mutantes para o gene VHL (Geração F1- GF1).	46
4.4. Infecção de macrófagos peritoneais de camundongos GF1 e C57BL/6 com <i>L. amazonensis</i> .	47
4.4.1. Infecção de camundongos GF1 e C57BL/6 com <i>L. amazonensis</i>	48
4.5. Macrófagos de sangue periférico e <i>L. amazonensis</i> .	50

4.5.1. Avaliação fenotípica da expressão de marcadores de superfície de macrófagos humano infectados com <i>L. amazonensis</i> .	53
5. Discussão	60
HIF-1 α	60
Modulação de marcadores de macrófagos infectados com <i>L. amazonensis</i>	62
6. Conclusões	65
7. Referências bibliográficas	66
8. Anexos	83

1. Introdução

1.1. Leishmaniose

Leishmania são protozoários que parasitam células fagocíticas mononucleares, em especial macrófagos. São responsáveis pelo aparecimento de um grupo de doenças, as leishmanioses, que variam de lesões cutâneas simples que se curam espontaneamente, lesões mucosas com destruição tecidual intensa e a leishmaniose visceral que é a forma clínica mais severa das leishmanioses (KAYE & SCOTT, 2011). Estas variações clínicas e o desenvolvimento da doença estão relacionados a vários fatores, dentre eles, a espécie de *Leishmania*, características genéticas do parasito e do hospedeiro e condições imunológicas e nutricionais do hospedeiro (DAVISON, 2005; KAYE & SCOTT, 2011; MURRAY et al., 2005; REITHINGER et al., 2007).

A leishmaniose figura como um importante problema de Saúde Pública predominante nas áreas tropicais e subtropicais do mundo. Segundo a Organização Mundial da Saúde, ocorrem anualmente cerca de 1,3 milhões de novos casos de leishmaniose tegumentar, com cerca de 95% dos casos presentes nas Américas, na bacia do Mediterrâneo, Oriente Médio e Ásia Central. No Brasil, segundo o Ministério da Saúde 19.652 casos foram notificados no ano de 2013 e as regiões mais afetadas são Norte, Nordeste, Centro-Oeste, Sudeste e Sul com 45,8%, 29,3%, 16,0%, 7,0% e 1,7% de casos notificados respectivamente (WHO, 2015).

No Brasil são encontradas oito espécies de *Leishmania*, sete delas causando a leishmaniose tegumentar (L.T.) e uma espécie causando a leishmaniose visceral (L.V.), são elas: *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis*, *Leishmania* (V.) *guyanensis*, *Leishmania* (V.) *lainsoni*, *Leishmania* (V.) *shawi*, *Leishmania* (V.) *naiffi*, *Leishmania* (V.) *lindenberg*, *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis* e a *Leishmania* (L.) *infantum*, sinonímia de *L. infantum chagasi*, responsável pela leishmaniose visceral (BRITO et al., 2012).

Leishmania apresenta duas formas em seu ciclo evolutivo, a forma promastigota com flagelo e a forma amastigota, intracelular e sem flagelo externalizado. Promastigotas desenvolvem-se no hospedeiro invertebrado, dípteros do gênero *Phlebotomus* e *Lutzomyia* e são transmitidos aos hospedeiros vertebrados durante o repasto sanguíneo das fêmeas. Dentro do hospedeiro

vertebrado, estes promastigotas são fagocitados por macrófagos e diferenciados em amastigotas, no fagolisossomo destas células. Amastigotas reproduzem-se por divisão binária até o rompimento celular e passam a infectar outros macrófagos estabelecendo a infecção. O inseto vetor infecta-se durante o repasto sanguíneo ao ingerir células infectadas com amastigotas, que no seu intestino irão diferenciar-se em promastigotas fechando o ciclo de vida da *Leishmania* (HANDMAN, 2001; KAYE & SCOTT, 2011; REITHINGER et al., 2007).

Os medicamentos disponíveis para o tratamento das leishmanioses ainda são muito restritos. Há mais de 50 anos, os antimoniais pentavalentes permanecem como fármacos de primeira escolha para o tratamento e apesar de serem eficazes, o uso endovenoso, o tempo de cura prolongado e os efeitos colaterais são fatores limitantes para o tratamento. Contudo, outros fármacos têm sido utilizados com eficácia variável (ALMEIDA & SANTOS, 2011). O mecanismo de ação do glucantime não é totalmente compreendido, mas há hipóteses de que ocorra conversão metabólica de antimônio pentavalente (Sb V) em antimônio trivalente (Sb III), sendo este último o elemento tóxico à *Leishmania*, inibindo a síntese de ATP (GOTO & LINDOSO, 2010; GRIMALDI & TESH, 1993; RATH, et al. 2003). Os principais efeitos colaterais são artralgia, mialgia, insuficiência renal aguda, pancreatite e cardiotoxicidade (ALMEIDA & SANTOS 2011; GOTO & LINDOSO, 2010). A anfotericina B é um antibiótico poliênico, fármaco de segunda escolha no tratamento da leishmaniose. A anfotericina B liga-se ao ergosterol presente na membrana de *Leishmania* e promove a formação de pequenos poros que alteram a permeabilidade da membrana e acabam por interromper a integridade osmótica da célula levando à sua morte (GOTO & LINDOSO, 2010; KAUR & RAJPUT, 2014). Um dos seus efeitos colaterais é a nefrotoxicidade, que foi parcialmente resolvida pela formulação lipídica da anfotericina. No entanto, seu alto custo limita seu uso pelos pacientes (ALMEIDA & SANTOS, 2011; AMATO et al., 2004; RATH et al., 2003). A pentamidina apresenta bons resultados no tratamento da L.T. em algumas regiões do Novo Mundo. Este fármaco interfere com a síntese de DNA de *Leishmania* e promove a fragmentação da membrana mitocondrial. Seus efeitos colaterais são hipoglicemia, alterações cardiológicas e nefrotoxicidade (GOTO & LINDOSO, 2010). A miltefosina, originalmente usado para tratar o câncer, foi eficaz na cura de pacientes com L.V. na Índia; no entanto, poucos estudos sobre o tratamento da L.T. foram relatados. Um dos seus mecanismos de ação é a modulação de receptores de superfície celular

(ROATT et al., 2014). Outros fármacos vêm sendo testados para o tratamento das leishmanioses entre eles, paramomicina, fluconazol, cetoconazol, itraconazol e alopurinol. A alta toxicidade associada a algumas destas alternativas é um fator limitante para o uso sistêmico na leishmaniose e até momento não tiveram resultados satisfatórios capazes de torná-los fármacos de escolha (GOTO & LINDOSO, 2010; GRIMALDI & TESH, 1993).

1.2. *Leishmania amazonensis*

Leishmania amazonensis, espécie utilizada neste estudo, é responsável pela maioria dos casos da leishmaniose cutânea na região amazônica do Brasil e é o agente mais importante da leishmaniose cutânea difusa na América do Sul (CONVIT et al., 1993 apud REIMÃO et al., 2013). A manifestação clínica inicial da doença caracteriza-se pela formação de pápula eritematosa, única ou múltipla, seguida pela formação de um nódulo que evolui para úlcera com bordas elevadas, contorno regular e fundo com granulações grosseiras (ALMEIDA & SANTOS, 2011; GONTIJO & CARVALHO, 2003; REITHINGER & TESH 2007).

Em exames histopatológicos verifica-se um infiltrado denso de macrófagos vacuolizados e cheios de amastigotas, apresentando um granuloma macrofágico (MORAES & SILVEIRA, 1994; SILVEIRA; LAINSON; CORBETT 2004).

A lesão pode curar-se espontaneamente ou evoluir para a forma clínica da doença dependendo de fatores do parasito, do hospedeiro e da carga parasitária inoculada (GOTO & LINDOSO, 2010; MURRAY et al., 2005). A patogênese segue um conjunto complexo de interações entre os fatores desencadeados pela resposta imune inata e adquirida do hospedeiro.

Inicialmente, no local da infecção, as formas promastigotas desencadeiam uma resposta inflamatória aguda inespecífica da qual participam células (macrófagos, neutrófilos, monócitos, células natural *killer*, células dendríticas), receptores de reconhecimento (por exemplo, receptor *toll-like*) e o sistema complemento. Na superfície do parasita são depositados componentes do complemento que favorecem a fagocitose pelos macrófagos. Os macrófagos e as células dendríticas infectados fazem a apresentação de antígenos aos linfócitos T auxiliares (Th) CD4+. A partir deste momento, duas subpopulações distintas de células T CD4+ podem ser identificadas baseada no perfil de citocinas promovida

pelo próprio estímulo antigênico (MURRAY et al., 2005; REITHINGER & TESH, 2007).

A cura clínica resulta da ativação dos linfócitos T do tipo 1 (Th1), caracterizada pela secreção de citocinas proinflamatórias como, interleucina 12 (IL12), interferon gama (IFN- γ) e fator de necrose tumoral α (TNF- α) que induzem a ativação dos macrófagos e estes produzem óxido nítrico e intermediários reativos de oxigênio capazes de matar o parasita. A reação de hipersensibilidade tardia nestes pacientes é positiva. Por outro lado, a progressão e cronicidade da doença resulta da ativação dos linfócitos T do tipo 2 (Th2), caracterizada pela secreção das citocinas IL4, IL10, IL13 e TGF- β que impedem a ativação dos macrófagos e a produção de citocinas protetoras. Embora a resposta Th2 previna a destruição extensa do tecido, ela promove a infecção intracelular (AFONSO & SCOTT, 1993; REITHINGER & TESH, 2007; ROGERS et al., 2002).

Pacientes com lesões cutâneas difusas, causada por *L. amazonensis*, apresentam resposta tipo Th2 com a presença de IL4 e IL5 e baixas concentrações de IFN- γ e IL12. Nesta condição os pacientes exibem completa anergia ao antígeno de *Leishmania*, a reação de hipersensibilidade tardia e a produção de linfócitos são negativos (REITHINGER & TESH, 2007; SILVEIRA; LAINSON; CORBETT 2004; SILVEIRA et al. 2009;).

A lesão cutânea difusa é clinicamente caracterizada pelo aparecimento de nódulos que raramente ulceram. O baixo nível da resposta Th1 justifica a recrudescência frequente da doença após a terapia convencional. Anticorpos específicos anti *Leishmania*, IgG, estão presentes em grandes concentrações no soro desses pacientes, contudo não há evidência da sua influência no controle da infecção (GONTIJO & CARVALHO, 2003; MONDOLFI et al., 2013; REITHINGER et al., 2007; SILVEIRA; LAINSON; CORBETT, 2004; SILVEIRA et al., 2009).

1.3. Hipóxia

A concentração normal de O₂ para as células do corpo humano varia entre 21%, correspondente a pressão parcial (pO₂) de 150 mmHg nas vias superiores, a aproximadamente 1% na junção cortico-medular do rim. A hipóxia é definida como uma redução na quantidade de O₂ disponível para a célula, tecido ou organismo e pode ocorrer devido às circunstâncias fisiológicas tais como exercícios

físicos ou permanência em locais com alta altitude, bem como de condições patofisiológicas como apneia do sono, neoplasias, aterosclerose, fraturas ósseas, artrites e reações inflamatórias em geral (KAELIN; RATCLIFFE, 2008; KOH; SPIVAK-KROIZMAN; POWIS, 2008; WENGER, 2002). A presença de hipóxia nessas lesões tem sido relacionada à indução de citocinas angiogênicas, a síntese de proteínas da matriz extracelular e processo de cicatrização (HAROON et al., 2000; SHWEIKI; ITIN; SOFFER; KESHET, 1992). Por outro lado, em algumas patologias a angiogênese estimulada pela hipóxia favorece a progressão da doença como no caso da retinopatia, artrite reumatóide e tumores malignos. Há evidências de que dificuldades na difusão/infusão de quimio e radioterápicos durante o tratamento de carcinomas estão associadas à presença de hipóxia nos tecidos tumorais (MURDOCH; MUTHANA; LEWIS, 2005). De fato, nosso grupo de pesquisa investigou o efeito de fármacos leishmanicidas, anfotericina B, glucantime e miltefosina em macrófagos peritoneais murinos infectados com *L. amazonensis* expostos a condições hipóxicas e normóxicas e constatou que estes fármacos são menos eficientes em condições de hipóxia (5% O₂) (AYRES; PINTO; GIORGIO, 2008).

As alterações na pressão parcial de oxigênio conduzem o organismo a um processo adaptativo circunstancial, com a finalidade de restaurar os níveis fisiológicos de oxigênio. As respostas celulares a hipóxia variam de mudanças no fluxo de íons na membrana plasmática, alterações na proliferação e a ativação de genes específicos que induzem a apoptose. Os mecanismos moleculares envolvidos nessa adaptação à hipóxia estão relacionados com a expressão do fator de transcrição induzido por hipóxia, o HIF-1 (HELFMAN; FALANGA, 1993; KOH; SPIVAK-KROIZMAN; POWIS, 2008; LEWIS et al. 1999; SEMENZA, 2001; YUN et al. 1997).

1.4. Fator induzido por hipóxia (HIF - *Hypoxia Inducible Factors*)

O fator de transcrição induzido por hipóxia HIF é um heterodímero composto por uma subunidade β , constitutivamente expressa no núcleo das células, e por uma das três subunidades α (HIF-1 α , HIF-2 α ou HIF-3 α) regulada pela presença de oxigênio (GORDAN; SIMON, 2007; KAELIN; RATCLIFFE, 2008; NIZET; JOHNSON, 2009).

Em condições normais de oxigênio a subunidade α sofre hidroxilação pós-transcricional realizada pelas enzimas oxigênio-dependente, as prolin-hidroxilases, o HIF- α então, é rapidamente degradado pela proteína Von Hippel Lindau (pVHL). Em condições de hipóxia ou na ausência da pVHL, ocorre a estabilização da subunidade α no citoplasma, que por sua vez transloca-se para o núcleo onde forma um heterodímero a subunidade β , o HIF-1, e pode ativar mais de 100 genes que contém elementos de resposta a hipóxia (HOFFMAN et al., 2001; KAEHLIN, 2007; SIMS, 2001).

HIF-1 α está presente em diversos tecidos com inflamação e microambientes hipóxicos. Este fator é responsável pela atividade de vários genes envolvidos principalmente na glicólise anaeróbica, na proliferação celular, no metabolismo de ferro, na angiogênese e apoptose a fim de aumentar a adaptação da célula ao ambiente hipóxico (SEMENZA, 2001; SEMENZA, 2009; ZINKERNAGEL; JOHNSON; NIZET, 2007a).

Evidências recentes sugerem que HIF-1 desempenha um papel importante nas infecções e doenças inflamatórias. A ativação do HIF-1 foi relatada como um fenômeno geral em infecções com patógenos humanos, além disso, é essencial para a capacidade bactericida dos fagócitos, produzindo várias moléculas efetoras da resposta imune do hospedeiro (NIZET; JOHNSON, 2009; SINGH et al. 2012). Degrossoli, Bosetto e Giorgio (2007) verificaram a expressão de HIF-1 α em macrófagos murino e humano infectados com *L. amazonensis*, quando estas células infectadas foram tratadas com cloreto de cádmio, um inibidor de HIF-1 α , mostraram uma redução na sobrevivência do parasita, o que sugere que HIF-1 α é importante na resposta adaptativa dos fagócitos mononucleares parasitados. Singh et al. (2012) verificaram a expressão de HIF-1 α em cultura de células J774 e macrófago peritoneal infectadas com *L. donovani* e em células derivadas do baço de camundongos Balb/c infectados, sugerindo que o parasita ativa HIF-1 para sua sobrevivência dentro dos macrófagos. Arrais-Silva et al. (2005) verificaram a expressão de HIF-1 α em lesões cutâneas de camundongos BALB/c infectados com *L. amazonensis*. As análises por imunohistoquímica das lesões sugeriram a presença do perfil de hipóxia neste microambiente.

A leishmaniose experimental em camundongos é um dos modelos mais estudados de infecção intracelular, tanto ao nível do parasita como da resposta imune do hospedeiro. Recentemente Araújo, Arrais-Silva e Giorgio (2012) avaliaram

pelo marcador pimonidazol, que se liga irreversivelmente à proteínas contendo tióis em células com baixa tensão de oxigênio, que lesões causadas por *L. amazonensis* em pata de camundongos Balb/c e C57BL/6 são hipóxicas e positivas para a expressão de HIF-1 α , no citoplasma e núcleo de macrófagos. A hipoxia nas lesões é esperada, uma vez que há infiltração leucocitária, tecidos infectados, proliferação de parasitas e comprometimento da microcirculação (ARAÚJO et al., 2012; ARRAIS-SILVA et al. 2005; GIORGIO et al. 1998).

1.5. Efeitos da hipóxia em células fagocíticas

Os macrófagos podem se adaptar a hipóxia, resistindo a apoptose, alterando o metabolismo para uma via glicolítica anaeróbia e os processos de fagocitose (LEEPER-WOODFORD; DETMER, 1999). Compostos de alta-energia tais como ATP, podem ser reduzidos pela exposição das células a baixas concentrações de oxigênio. O aumento na demanda destes compostos em condições anaeróbicas pode resultar em um sistema pouco eficiente para produção de ATP o que torna a fagocitose comprometida nessas condições (LEEPER-WOODFORD; MILLS 1992).

Colhone et al. (2004) estudaram o efeito da hipóxia experimental durante a infecção com *L. amazonensis*. A avaliação, com diferentes linhagens de macrófagos humanos e murinos demonstrou que o cultivo em 5%O₂ reduz em cerca de 50% o número de células infectadas e os parasitas intracelulares; sugerindo um fenótipo de resistência dos macrófagos a infecção em condições de hipóxia. Um estudo realizado por Zinkernagel, Johnson e Nizet (2007) mostrou que a indução farmacológica de HIF-1 α , pelo composto mimosina, aumenta a capacidade fagocítica de neutrófilos e monócitos humanos U937 desafiados com *Staphylococcus aureus* em condições de normóxia, observando também um efeito dose-dependente do fármaco para a atividade bactericida. Além disso, a fagocitose e atividade bactericida de macrófagos e neutrófilos tratados com mimosina foram melhores em condições de hipóxia que em normóxia.

1.6. Mutações e HIF-1 α

O modelo que constitui um fenótipo hipóxico com a expressão constante de HIF-1 α é encontrado em células de pacientes que apresentam a síndrome de

Von Hippel Lindau (VHL). De fato Walmsley et al. (2006) mostraram que neutrófilos isolados de pacientes com VHL e cultivados em condições de normóxia tem uma redução da apoptose constitutiva comparados a neutrófilos de indivíduos saudáveis. Em condições de hipóxia, neutrófilos de ambos são idênticos quanto a indução de apoptose. Além disso, neutrófilos VHL, sob condições de normóxia e hipóxia, mostraram um aumento na fagocitose de *Streptococcus* inativados comparados a neutrófilos de indivíduos normais. Para confirmar o fenótipo parcial de hipóxia em neutrófilos VHL, os pesquisadores buscaram a evidência direta da ativação do HIF-1 α pela detecção, por PCR, de um gene alvo de HIF-1, o PHD3, sendo este presente em neutrófilos VHL, mas ausente em neutrófilos controle. Esses dados não foram avaliados em macrófagos de pacientes com VHL. O fato das células de pacientes VHL apresentarem uma inibição da apoptose pode estar envolvida com a ubiquitinação-dependente e degradação do HIF-1 α pela proteína Von Hippel Lindau (pVHL). Os autores sugerem que HIF 1 α /via VHL regularia a resposta imune inata em humanos e que pacientes com VHL apresentam anomalias funcionais coerentes com a exacerbação da sinalização do HIF-1 α (WALMSLEY et al, 2006) o que justifica nosso interesse na avaliação da expressão do HIF-1 α e a capacidade infectiva de *L. amazonensis* em macrófagos VHL.

1.7. A síndrome de Von Hippel Lindau

A síndrome de Von Hippel Lindau é uma doença genética autossômica dominante, causada por mutações germinativas e somáticas no gene supressor tumoral VHL. A síndrome tumoral de VHL é caracterizada pela predisposição hereditária a diversas neoplasias tanto benignas quanto malignas, afetando com maior frequência o sistema nervoso central, a retina, os rins, pâncreas e as supra-renais (MAHER; YATES, 1991; GOMY et al. 2010). Uma variedade de outras lesões tem sido associadas a doença de VHL, incluindo tumores do ouvido interno, epidídimo e cistoadenomas (BARONTINI; DAHIA, 2010; LONSER et al. 2003).

A síndrome de VHL tem incidência mínima de 1:36.000 nascidos vivos. A doença pode manifestar-se desde a infância, mas geralmente apresenta-se entre a 2ª e 3ª década de vida, sendo a penetrância idade-dependente completa aos 65 anos e a expressividade altamente variável (MAHER & MOORE, 1992).

Manifestações como angioma de retina, hemangioblastoma cerebelar, carcinoma renal e na glândula supra-renal (feocromocitoma) são frequentes (MAHER; YATES; FERGUSON-SMITH, 1990). O angioma de retina é uma das complicações iniciais mais frequentes da VHL, estimada entre 25% a 80% dos pacientes, com idade média de 30 anos. O hemangioblastoma cerebelar e da medula espinhal afeta entre 60% a 80% dos pacientes, com idade média de 30 anos. O carcinoma renal de células claras ocorre entre 40% a 70% dos pacientes, com idade média de 37 anos (BARONTINI; DAHIA, 2010). Feocromocitoma ocorre em menos de 10% dos pacientes, frequentemente antes dos 40 anos, porém em algumas famílias, esta é a complicação mais frequente (MAHER & MOORE, 1992).

O gene

O gene VHL, responsável pela doença, mapeado por análise de “*linkage*” no braço curto do cromossomo 3, é composto por 3 éxons, sendo que dois transcritos com *splicing* alternativo foram detectados, revelando a presença (isoforma I) ou ausência (isoforma II) do éxon 2. Acredita-se que a isoforma II tem sua atividade supressora tumoral afetada, por não codificar um produto funcional (GNARRA et al., 1994; GOMY et al., 2010; RICHARDS et al., 1994).

O gene VHL codifica uma proteína de 213 aminoácidos com peso molecular de 28 a 30 quilodáton (pVHL30) e uma proteína menor com peso molecular de 18 quilodáton (pVHL18) (BARONTINI; DAHIA, 2010; SIMS, 2001).

Existem mais de 300 mutações germinativas do gene VHL e inclui mutações de sentido trocado (*missense*), mutações que levam a uma proteína truncada (*non-missense, frameshift*), deleções de um ou vários nucleotídeos, mutações nas regiões de *splicing* e deleção de um ou dois éxons. A mutação germinativa do gene VHL está associada com maior risco genético de ocorrer hemangioblastomas, carcinoma renal e outras formações de tumores (BÉROUD et al, 1998; NEUMANN; BENDER, 1998, SIMS, 2001).

A mutação genética molecular e o agrupamento fenotípico permitiram o desenvolvimento de uma classificação clínica. Subtipos clínicos são delineados dependendo se há risco de feocromocitoma ou carcinoma renal de células claras. Tipo 1- geralmente causada por deleções ou truncamento do gene VHL, ocorre sem o risco de feocromocitoma. Tipo 2- mutações pontuais *missense*, pode ocorrer tanto hemangioblastoma e feocromocitoma, alto risco para carcinoma renal de células

claras e tumores pancreáticos são classificados como Tipo 2B. O Tipo 2C são aqueles com risco de feocromocitoma isolado. Presume-se que a correlação genótipo-fenótipo na doença de VHL reflete o grau em que as funções do produto do gene VHL são quantitativamente e qualitativamente alteradas por mutações diferentes (BARONTINI; DAHIA, 2010; KAE LIN, 2007; SIMS, 2001).

Além disso, as mutações no gene VHL são causadoras da síndrome não tumoral, a policitemia de Chuvash. Esta é uma doença autossômica recessiva causada pela mutação germinativa “*missense*” e que resulta em aumento do HIF e dos níveis de eritropoietina, mas sem o fenótipo da síndrome tumoral de VHL (BARONTINI; DAHIA, 2010).

A proteína VHL

O produto do gene VHL, a proteína VHL (pVHL) é amplamente expressa em tecidos humanos normais, exceto em células endoteliais e é localizada tanto no núcleo quanto no citoplasma, dependendo da fase do ciclo celular (SINGH; SHIELDS; SHIELDS, 2001).

A pVHL forma um complexo multimérico que contém, as proteínas chamadas Elongin B e Elongin C, além de Cul2 e Rbx1. Este complexo de proteínas que possui atividade ubiquitina-ligase, determina a seleção de proteínas para degradação proteossomal (LONSER et al., 2003; KAE LIN, 2007; SINGH; SHIELDS; SHIELDS, 2001).

Os substratos mais bem documentado do complexo ubiquitina ligase da pVHL, e ligados a formação de tumores são as subunidades alfa de HIF-1 α , HIF-2 α e HIF-3 α . Através da ubiquitinização a pVHL degrada a subunidade HIF- α na presença de oxigênio e esta última liga-se ao domínio β da pVHL. Células desprovidas da pVHL não conseguem degradar HIF-1 α e, conseqüentemente, este se transloca para o núcleo e transcrionalmente ativa genes que contém elementos de resposta a hipóxia. Estes genes estão envolvidos na glicose anaeróbica e angiogênese, tal como o fator de crescimento vascular-endotelial (VEGF), fator de crescimento derivados de plaquetas (PDGF) e eritropoiese (HOFFMAN et al., 2001; KAE LIN, 2007; ROBINSON; OHH, 2014; SIMS, 2001).

O grupo de pesquisa liderado pelo Dr. Wilson Araujo Silva Jr. (Depto de Genética, Faculdade de Medicina- Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP), colaborador neste trabalho, tem trabalhos de pesquisa com pacientes com a

síndrome de VHL, para identificação e caracterização de mutações germinativas no gene VHL. O Dr. Wilson e seus colaboradores identificaram e caracterizaram sete diferentes mutações germinativas no gene VHL em famílias brasileiras. Oito famílias apresentaram Tipo 1 da síndrome de VHL, uma família apresentou o Tipo 2B e duas famílias apresentaram Tipo 1B (GOMY et al., 2010).

1.8. Modelo murino transgênico

Camundongos da linhagem B6.129P2-*Lyz2*^{tm1^(cre)lfo}/J, cujo alelo *knock-in* *LysMcre*, apresentam uma Cre recombinase inserida no gene da lisozima 2, que reconhecem especificamente sítios loxP, quando estes animais são cruzados com uma linhagem que contém a sequência de sítio loxP de interesse flanqueado, a recombinação resultante será a deleção do gene alvo em células de linhagem mielóide, incluindo monócitos, macrófagos e granulócitos maduros (CLAUSEN, et al. 1999).

Camundongos da linhagem B6.129S4(C)-*Vhl*^{tm1^{Jae}}/J, contém sítios loxP flanqueado na região do promotor VHL e éxon 1 (HAASE et al., 2000). Quando há o cruzamento desta linhagem com a linhagem B6.129P2-*Lyz2*^{tm1^(cre)lfo}/J, mediada por Cre; a recombinação gênica, geração F1, resultará na supressão do gene VHL em células mielóides. A geração F1 do cruzamento destas duas linhagens mutantes pode ser útil em estudos de inflamação mediada por células mielóides (CRAMER et al., 2003).

Cramer et al. (2003) estudaram o papel da resposta hipóxia durante o processo inflamatório de irritação cutânea crônica em camundongos. Os pesquisadores suprimiram genes alvos, tais como HIF-1, VEGF e VHL em linhagens separadas de camundongos mutantes expressando a Cre-recombinase em células mielóides. Como esperado, em macrófagos HIF-1α nulo, a indução da hipóxia reduziu os níveis de RNAm de VEGF e a deleção do gene VHL resultou em uma elevada taxa da expressão basal do HIF-1α. Estas deleções mostraram o papel crítico do HIF-1α na infiltração celular nos primeiros estágios inflamatórios, demonstrando claramente a necessidade desta via para ativação inflamatória. A utilização de animais transgênicos em modelo de infecção para a leishmaniose pode ser útil para determinar o papel da inflamação mediada por células mielóides.

Maxwell et al. (1999) verificaram que em células de carcinoma renal deficientes para VHL, o HIF-1 α é constitutivamente estabilizado e HIF-1 é ativado. Quando testaram a re-expressão da pVHL nas células, ocorreu a restauração do mecanismo de degradação do HIF-1 α oxigênio-dependente, confirmando um efeito da pVHL na estabilidade do HIF-1 α .

Peyssonnaud et al. (2005) verificaram que macrófagos murinos “*knockout*” para VHL, mostraram aumento na morte intracelular de *Pseudomonas aeruginosa* comparado com macrófagos do tipo selvagem. Células mielóides “*knockout*” para HIF-1 α mostraram diminuição da atividade bactericida tanto *in vitro* como *in vivo*. Sob a ativação da via HIF-1 α através da eliminação da pVHL ou indução farmacológica, as células mielóides mostraram melhor capacidade bactericida. Os pesquisadores concluíram que o controle transcricional do HIF-1 α em neutrófilos e macrófagos é importante para limitar a disseminação sistêmica da infecção bacteriana.

Camundongos mutantes vêm sendo utilizados como modelos experimentais principais para estudos de infecção com o parasita *Leishmania*, facilitando a avaliação da resposta imune desenvolvida pelo hospedeiro, uma vez que substituiu a participação de pacientes e permite a reprodutibilidade dos experimentos. Diante da hipótese do papel do HIF-1 α e consequentes modificações celulares na resposta imune durante a infecção com *L. amazonensis*, avaliamos a ausência da proteína VHL, a expressão de HIF-1 α e o perfil da infecção de macrófagos primários de camundongos mutantes para o gene VHL (*in vitro*), e o processo infeccioso em modelo murinho mutante para o gene VHL (*in vivo*).

1. 9. Interação parasito-hospedeiro

Os modelos *in vitro* (macrófagos cultivados e infectados com *Leishmania*) e *in vivo* (camundongos isogênicos) são excelentes ferramentas para estudos imunológicos, bioquímicos e patológicos da leishmaniose (HANDMAN, 1999; HANDMAN, 2001; MURRAY et al. 2005). Por exemplo, as respostas Th1 e Th2 observadas em camundongos C57BL/6 e BALB/c, respectivamente, infectados por *L. amazonensis* são semelhantes às respostas observadas em infecções humanas,

validando a relevância biológica destes modelos para o estudo da doença (AFONSO & SCOTT, 1993).

Estudos realizados por vários autores nos modelos *in vitro* mostram que macrófagos sofrem mudanças após a infecção com *Leishmania*, como alterações na expressão de proteínas e síntese de citocinas, inibição da produção de metabólitos tóxicos de oxigênio e nitrogênio e modulação da apoptose (ALEXANDER; SATOSKAR; RUSSELL, 1999; FORTÉA et al., 2007; LINARES et al., 2001; STAFFORD; NEUMANN; BELOSEVIC, 2002). A apresentação de antígenos e a ativação dos macrófagos são fatores cruciais para a resposta imune do hospedeiro na leishmaniose. As moléculas do complexo de histocompatibilidade (MHC classe II), moléculas co-estimuladoras (CD80 e CD86) e entre outras, tem grande importância no reconhecimento e apresentação antigênica aos linfócitos T, os quais diferenciam em resposta tipo Th1 e ativam os macrófagos (OVERATH; AEBISCHER, 1999).

Os macrófagos expressam uma gama ampla de receptores de membrana que podem interagir tanto com componentes naturais do hospedeiro como microorganismos. Os receptores de superfície do macrófago regulam uma variedade de funções, incluindo diferenciação, crescimento, sobrevivência, adesão, migração, fagocitose, ativação e citotoxicidade. A capacidade dos macrófagos para reconhecer ligantes endógenos e exógenos e responder de forma adequada, é fundamental na homeostase e na defesa do hospedeiro (TAYLOR et al., 2005). No entanto esta capacidade de controlar a resposta imune pode ser subvertida por alguns microorganismos, entre eles *Leishmania*, que estão bem adaptados a sobreviver dentro do macrófago (LINEHANS et al., 2000).

Uma das características mais importantes dos macrófagos é a sua capacidade para capturar e internalizar partículas, incluindo agentes infecciosos. A modulação da expressão de moléculas de superfície em células hospedeiras está envolvida direta ou indiretamente na apresentação de antígenos e é uma estratégia utilizada por vários agentes infecciosos para escapar ou contornar a resposta imune (LINEHANS et al., 2000). Vários receptores têm sido implicados no reconhecimento de *Leishmania* pelos macrófagos, no entanto, não se sabe se ocorre modulação dessas moléculas durante a infecção, uma possível via de “evasão” das atividades efetoras de macrófagos, utilizada pelo parasita.

1.10. Marcadores de superfície – fagocitose e infecção

É aceito que a fagocitose de *Leishmania* sp. seja composta por dois eventos distintos, mas constitutivos: a adesão e a interiorização na célula hospedeira (ZENIAN et al., 1979). A infecção depende da interação de ligantes dos promastigotas e/ou amastigotas com receptores dos fagócitos mononucleares, tanto para adesão como para a fagocitose. Essas interações incluem ligação das moléculas de superfície do parasita ou opsonização de moléculas derivadas do hospedeiro (SAMPAIO et al., 2007). A entrada de *Leishmania* no macrófago envolve a deposição de componentes do complemento, anticorpos e a presença de manose e proteínas ligadoras de heparina na superfície do parasita (BLACKWELL et al., 1985; BOSETTO & GIORGIO, 2007; HESPANHOL et al., 2005; LOVE et al., 1993). Alguns receptores são conhecidos por facilitarem a internalização de *Leishmania* no macrófago, entre eles: o receptor de Complemento 3 (CR3) e de manose (MR), receptores Fc gama (FcγRs, em particular FcγRII) e de fibronectina (FnRS) (UENO & WILSON, 2012).

Muitos estudos que investigam a interação de *Leishmania* e macrófagos são descritos na literatura (ANAND e al., 2015; LIU & UZONNA, 2012; PODINOVSKAIA & DESCOTEAUX, 2015; WYLER; SYPEK; MCDONALD, 1985). As principais moléculas de adesão presentes na superfície de promastigotas são: glicoproteínas (gp63) e lipofosfoglicanos (LPG) sendo reconhecidos como os principais fatores de virulência (HANDMAN, 1999; MORAIS et al., 2014). A ligação de *Leishmania* aos macrófagos pode ocorrer por meio da interação direta das gp63 e LPG a receptores de manose/fucose de macrófagos (UENO & WILSON, 2012). Já a forma amastigota apresenta expressão diminuída destas moléculas em sua superfície e pouco se sabe sobre as moléculas que participam da entrada do amastigota na célula hospedeira (HANDMAN, 1999; LOVE; KANE; MOSSER, 1998). As implicações das possíveis vias de ligação e de entrada de amastigotas em macrófagos ainda não estão definidas. Contudo, os estudos sobre a interação *Leishmania*-célula são importantes para compreender o processo de infecção (UENO & WILSON, 2012).

Ainda há muito a ser aprendido sobre as interações e funções dos receptores de *Leishmania* e macrófagos. Por esta razão, neste trabalho, foi avaliada a expressão das moléculas de superfície, CD11b, CD11c, CD14, CD206, CD80,

CD86, MHC II, CD18, CD54, TLR-2 e HLA-DR em macrófagos humanos frente a infecção com *L. amazonensis*.

1.11. Marcadores de superfície

Os principais receptores de superfície e marcadores fenotípicos de macrófagos são aqui descritos:

CD14 é expresso principalmente nas células da linhagem mielóide, incluindo monócitos, macrófagos e granulócitos (TAYLOR et al., 2005). Este receptor da resposta imune inata pode atuar com propriedade de reconhecimento, principalmente para lipopolissacarídeos (LPS) de bactérias (SLADEK & RYSANEK, 2008), além disso, pode se ligar as células apoptóticas (VIRIYAKOSOL et al., 2000). Alguns modelos *in vivo* e *in situ* mostram que a expressão de CD14 corresponde fortemente com a presença de LPS e/ou com a fase da resposta inflamatória. Yamamoto et al. (1999) observaram que o LPS aumenta a expressão de CD14 em macrófagos durante a fase inicial da resposta inflamatória, no modelo *in vivo* durante lesão pulmonar e em lesão hepática aguda (Xie et al., 2002). Sladek e Rysanek (2008) notaram um aumento na expressão de CD14 na fase da resolução da inflamação induzida por LPS em glândula mamária. Figueiredo et al. (2013) mostram um aumento na expressão de CD14 no jejuno e cólon de cães infectados com *L. infantum*. No entanto, pouco se conhece sobre os mecanismos que regulam a expressão de CD14 em macrófagos nos locais de infecções bacterianas e/ou por outros tipos de patógenos.

Uma vez que a resposta imune para a leishmaniose é dependente da ativação celular, a apresentação de peptídeos patogênicos pelas moléculas de MHC II juntamente com a coestimulação das moléculas CD80 e CD86 aos linfócitos T CD4, são de grande importância na determinação da cura ou na progressão da doença. As moléculas do complexo de histocompatibilidade (**MHC**) **classe II**, também conhecidas como antígeno leucocitário humano (HLA-DR), estão principalmente presentes em células apresentadoras de antígenos incluindo os macrófagos, células dendríticas e linfócitos B. As células apresentadoras de antígeno processam antígenos exógenos em peptídeos e o receptor MHC classe II é responsável por apresentar esses peptídeos derivados dos patógenos aos linfócitos

T CD4 dando início ao desenvolvimento da resposta imune adquirida (ASSAN & MOURAD, 2011; LANG & ANTOINE, 1991).

Vários estudos têm documentado sobre a expressão de moléculas de MHC II em células infectadas por *Leishmania*. Figueiredo et al. (2012) mostraram que células dendríticas infectadas com promastigotas de *L. amazonensis*, *L. brasiliensis* e *L. major* apresentam diminuição da expressão de moléculas de MHC II e CD86. Estudos anteriores demonstram que moléculas de MHC classe II de macrófagos ativadas com IFN- γ e infectados com amastigotas de *L. amazonensis*, *L. donovani*, *L. major* e *L. mexicana* apresentam uma redistribuição destas moléculas associadas com a membrana do vacúolo parasitóforo (VP) (ANTOINE et al., 1991; ANTOINE et al. 1999.; LANG et al., 1994a.; LANG et al., 1994b.; LEO et al.; 1995). Além disso, as moléculas de MHC II associadas ao VP contendo *L. amazonensis* estão localizadas nas zonas de fixação dos amastigotas a membrana do vacúolo. (LANG et al., 1994a.; LEO et al., 1995). Estes resultados levantam a hipótese de que as moléculas de MHC II interagem com moléculas da membrana plasmática do amastigota, e que esta última poderia participar da degradação das moléculas de MHC II o que consequentemente poderia evitar o reconhecimento dos linfócitos T (LEO et al., 1995).

As moléculas **CD80** e a **CD86** são expressas nas células apresentadoras de antígenos, cuja expressão é amplamente aumentada quando estas encontram os patógenos e fornecem um sinal coestimulador para a ativação dos linfócitos T através do receptor CD28. O receptor CD86 é constitutivamente expresso e rapidamente regulado seguindo a ativação, enquanto que CD80 é expresso somente após a ativação celular (TULADHAR; NATARAJAN; SATOSKAR, 2011).

Estudos indicam que moléculas coestimuladoras podem influenciar o desenvolvimento de uma resposta Th1 ou Th2 seguido pela secreção de citocinas que podem ativar ou inibir os macrófagos e favorecer a infecção. Contudo, estudos são controversos a respeito da infecção por *Leishmania* induzir alterações no padrão de expressão de moléculas coestimuladoras de monócitos e macrófagos. Por exemplo, um trabalho realizado por Almeida, Cardoso e Barral-Netto (2003) mostrou que macrófagos humanos infectados com *L. chagasi* apresentaram aumento na expressão de CD86. Outro estudo realizado por Brodskyn, Dekrey e Titus (2001) mostrou que macrófagos humanos infectados com *L. major* não mostraram

alterações na expressão de CD80 e a expressão de CD86 foi ligeiramente reduzida comparada ao controle. Quando os macrófagos foram cultivados com leucócitos do sangue periférico e infectados com *L. major*, 44,0% das células expressaram CD80 comparado ao controle expressando 17,0%, porém nenhuma diferença foi observada na expressão de CD86. Já em macrófagos de camundongos C57BL/6 após infecção com *L. donovani* ou com *L. major*, não ocorreram alterações na expressão de moléculas coestimulatórias e em macrófagos de camundongos Balb/c infectados com *L. donovani* ocorreu aumento da expressão de CD54, mas não de CD80 (SAHA et al., 1995; VON STEBUT et al., 1998; KAYE et al., 1994 apud ALMEIDA; CARDOSO; BARRAL-NETO, 2003). Estes resultados sugerem que a infecção com *Leishmania* pode influenciar a expressão de moléculas coestimuladoras, no entanto isto não está claro.

As **integrinas** são moléculas receptoras da superfície de células hematopoiéticas que participam da adesão célula-célula e das interações entre célula-matriz, além disso, são importantes na resposta inflamatória. Entre elas estão uma subunidade β (CD18) e uma subunidade α (CD11a, CD11b, CD11c). Sua expressão é regulada tanto durante a diferenciação como na maturação dos monócitos em macrófagos (VARGA et al., 2007).

O receptor de manose, **CD206** ou **MR**, presente em macrófagos contribui para a defesa do hospedeiro por uma variedade de mecanismos, entre eles, a capacidade de mediar a fagocitose de patógenos e induzir mecanismos de morte intracelular. No entanto as funções efectoras induzidas através deste receptor são complexas podendo envolver tanto o hospedeiro como fatores patogênicos (TAYLOR et al., 2005).

Entre os receptores de superfície de macrófagos que são relatados facilitar a entrada de *Leishmania* na célula estão os CD11b/CD18, também conhecido por receptor do complemento 3 (CR3), os receptores de manose e alguns receptores *Toll-like* (TLR) entre outros (BLACKWELL et al., 1985; BOSETTO & GIORGIO, 2007; REITHINGER et al. 2007)

Almeida et al. (2003) verificaram diminuição na expressão de CD11b em monócitos humanos infectados com promastigotas de *L. chagasi* mas não em macrófagos, sugerindo que a inibição da expressão de CD11b pelo parasita poderia ser um mecanismo de escape de *Leishmania*. Ueno et al. (2009), utilizando

microscopia confocal verificaram a presença de CR3 e MR nos vacúolos parasitóforos de macrófagos derivados de monócitos humano após a fagocitose de promastigotas em fase logarítmica de *L. chagasi*, mas em vacúolos com promastigotas metacíclicos opsonizados com soro continham somente moléculas de CR3 e não de MR. Guy e Belosevic (1993) relataram que o bloqueio de CR3 por anticorpos diminui a entrada de amastigotas de *L. major* em macrófagos, mas quando as células foram tratadas com manana solúvel para modular negativamente MR, a entrada de amastigotas nas células não foi prejudicada, mostrando que a internalização de amastigotas faz-se por receptores CR3 (ALMEIDA et al., 2003).

Os receptores *Toll-like* (TLRs) são proteínas transmembranas que conferem especificidade para a imunidade inata das células no reconhecimento do padrão de moléculas associadas a patógenos (PAMPS). A via de sinalização dos TLRs é um dos primeiros sistemas de defesa contra microorganismos invasores (REIS et al., 2006; TUON et al., 2008).

A família TLR é composta por 13 membros (TLR1 para TLR13) que tem especificidade para diferentes patógenos e induzem a produção de diferentes citocinas, estão localizados na membrana plasmática ou na membrana interna de macrófagos, DCs, e células NK (SIGNORINO et al. 2014). Vários estudos demonstram o reconhecimento de moléculas derivadas de *Leishmania* por diferentes TLRs (REIS et al., 2006; TUON et al., 2008;)

Estudo realizado por Figueiredo et al. (2003) analisaram o jejuno e o cólon de cães infectados com *L. infantum* e observaram que houve aumento na expressão de CD11b, CD14, TLR-2, TLR-9 e de citocinas como IL10 e TNF- α mesmo com baixa carga parasitária, já o cólon apresentou alta carga parasitária com aumento frequente da expressão de TLR2, CD11C e a citocina IL4. Veer et al. (2003) e Muraille et al. (2003) trabalhando com camundongos C57BL/6 nulo para o fator 88 de diferenciação mielóides (MyD88), um mediador da sinalização para TLR, verificaram que estes animais foram mais suscetíveis a infecção com *L. major* comparado a camundongos tipo selvagem, além disso observaram perfil da resposta imune tipo Th2 semelhante a camundongos Balb/c com deficiência na expressão de IL12. Os autores sugerem que há um papel central da imunidade inata no

reconhecimento e controle da infecção e sugerem que *L. major* possui um ligante para TLR.

O **CD54** também conhecida como molécula de adesão intracelular 1 (**ICAM-1**) é uma proteína transmembrana da superfamília das imunoglobulinas. Está presente em leucócitos e células endoteliais. É um ligante das integrinas CD18, CD11a e CD11b e uma das moléculas-chave nos processos inflamatórios, pois está envolvida na adesão de leucócitos e células endoteliais nos locais de infecção ou injúria. Além disso, a ICAM-1 interage com fatores importantes envolvidos em muitos tipos de tumores humanos e também pode ser utilizada como receptor por agentes patogênicos como o rinovírus e o *Plasmodium falciparum* (ADUKPO et al., 2013; BELLA et al., 1998; EGUSA et al., 2005; YASHIRO, 2008).

Murray (2000) observou o curso da infecção em camundongos C57BL/6 controle e camundongos C57BL/6 *knockout* para o gene ICAM-1 infectados com *L. donovani* e verificou que a carga parasitária hepática do animal controle atingiu o pico na 2ª semana após a infecção e diminuiu na 8ª semana. Em contraste, em camundongos *knockout* a infecção visceral progrediu até a 12ª semana. O autor sugere que a ausência de ICAM-1 retarda o controle da infecção.

Almeida et al. (2003) observaram que cultura de monócitos humanos infectados com promastigotas de *L. chagasi*, exibiram reduzida expressão de CD54, HLA-DR e um aumento na expressão de CD86, sugerindo que o parasita induz à uma fraca adesão dos monócitos aos linfócitos o que poderia prejudicar a produção de IFN- γ .

Vários estudos demonstram que diferentes receptores de macrófagos participam e/ou interagem na fagocitose de diferentes espécies de *Leishmania*, embora os eventos de sinalização iniciais sejam desconhecidos, acredita-se que *Leishmania* selecionaria receptores que promovessem sua sobrevivência no hospedeiro. Contudo, a interação entre os receptores de superfície dos macrófagos com *Leishmania*, em seres humanos, é em grande parte desconhecida e uma maior compreensão desses receptores poderia empicar em novas estratégias terapêuticas.

2. Objetivo Geral

Compreender a interação parasito-hospedeiro e avaliar a expressão de marcadores de superfície de macrófagos e sua importância durante o processo infeccioso com *Leishmania amazonensis*.

2.1. Objetivos específicos

- Avaliar a expressão de HIF-1 α de macrófagos peritoneais de camundongos mutantes para o gene VHL
- Avaliar a capacidade de infecção de *L. amazonensis* em macrófagos peritoneais de camundongos mutantes para o gene VHL
- Avaliar o desenvolvimento da lesão de camundongos mutantes para o gene VHL infectados com *L. amazonensis*
- Avaliar a expressão de marcadores de superfície: CD14 (marcador de macrófagos); CD11b, CD11c, CD18, (integrinas, importante na resposta inflamatória); MHC classe II (complexo principal de histocompatibilidade, ativação de linfócitos); CD54 (molécula de adesão, ativação de linfócitos); TLR-2 (toll-like, reconhecimento de patógenos); CD83, CD86 (moléculas coestimuladoras, ativação de linfócitos) e CD206 (receptor de manose, receptor de patógenos) em resposta a internalização e infecção de *L. amazonensis* em macrófagos humanos.

3. Material e métodos

3.1. Parasitas

Amastigotas de *L. amazonensis* (MHOM/BR/73/M2269) foram mantidos em camundongos isogênicos BALB/cAnUnib, no coxim plantar de uma das patas traseiras (GIORGIO et al. 1998). Após a eutanásia dos animais os amastigotas foram retirados da lesão através de raspagem, com bisturi estéril, em solução salina contendo gentamicina (25mg/l). A suspensão obtida foi filtrada em gaze estéril e o número de amastigotas foi contado em câmara de Neubauer (BARBIERI et al., 1993).

3.2. Macrófagos primários de sangue periférico

3.2.1. Procedimentos de coleta

A coleta de cerca de 40 mL de sangue periférico em tubo estéril com heparina de voluntários saudáveis foi realizada no Laboratório de Leishmaniose, Departamento de Biologia Animal, Instituto de Biologia- UNICAMP.

A coleta de 20 mL de sangue periférico de 1 paciente diagnosticado com a síndrome de Von Hippel Lindau foi realizada no Ambulatório de Aconselhamento Genético do Câncer do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP, sob a coordenação do Profs. Drs. Wilson Araújo da Silva Jr e Victor E. Ferraz. (Conselho Nacional de Ética em Pesquisa nº CAAE 00574312.6.0000.5404/UNICAMP).

3.2.2. Separação dos monócitos de sangue periférico e cultivo de macrófagos primários humano

As células brancas foram separadas das alíquotas de sangue por gradiente de Histopaque 1077 (Sigma) conforme protocolo do fabricante. Após a centrifugação (400xg, 30 minutos a temperatura ambiente) e a formação da camada intermediária, as células mononucleares foram coletadas com pipeta sorológica estéril e transferidas para o tubo Falcon e lavadas (250xg, 10 minutos a temperatura ambiente) em solução salina tamponada com fosfato (PBS) pH 7,4. As células foram ressuspensas em meio RPMI 1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino

(SFB) inativado e com 25 µg/ml de gentamicina. As células viáveis foram contadas em câmara de Neubauer, determinada pela coloração com Azul de Tripán e a separação de monócitos foi feita por aderência (BOSSETO & GIORGIO, 2007; DEGROSSOLI et al., 2007)

As células (5×10^5 células/poço) foram mantidas em placa de cultura de 24 poços contendo lamínulas em meio RPMI 1640 a 10% de SFB durante 7 dias, para a diferenciação dos monócitos em macrófagos, à 37°C em estufa úmida de CO₂. As trocas do meio de cultura foram realizadas após 2 horas, 24 horas e 96 horas do início do cultivo de células conforme protocolo anteriormente padronizado por Bosetto e Giorgio (2007) e Degrossoli, Bosetto e Giorgio (2007).

3.2.3. Ensaio de infecção de macrófagos primários humano com *L. amazonensis*

No 7º dia da cultura, as células foram incubadas na presença de amastigotas nas proporções de 1:1 e 8:1 (amastigotas por célula). Após 1 hora e/ou 24 horas, os macrófagos aderidos em lamínula foram fixados em metanol durante 15 minutos e corados com solução de Giemsa durante 10 minutos. A avaliação da porcentagem de macrófagos infectados e de parasitas/macrófago realizou-se pela contagem de 200 células por lamínula, em microscópio óptico, aumento de 1000 vezes. Os resultados foram expressos em porcentagem de células infectadas e número de amastigotas por célula (DEGROSSOLI; BOSETTO; GIORGIO, 2007). Teste ANOVA de 1 fator, variável independente (animal), variável dependente (porcentagem de infecção ou número de amastigotas por macrófago).

3.2.4. Citometria de fluxo

Concomitantemente com o ensaio de macrófagos infectados e corados com Giemsa, no período de 1 hora e/ou 24 horas, células infectadas foram soltas pela remoção mecânica com *scraper* em PBS pH 7,4 gelado e transferidas para tubo Falcon, após a centrifugação (250xg, 10 minutos a temperatura ambiente) foi realizada a incubação com os anticorpos (Tabela 1) durante 20 minutos a 4°C. As células foram lavadas e fixadas com paraformaldeído 2%. A fenotipagem celular foi realizada por citometria de fluxo (FACsCanto Becton Dickinson, Mountain View, EUA) e analisada por FCS Express Software (Denovo Software) em colaboração

com o Centro Integrado de Pesquisas Oncohematológicas da Infância CIPOI (Faculdade de Ciências Médicas) – UNICAMP (Dra. Márcia Cristina Fornazim e Dr. Alexandre Eduardo Nowill). Teste ANOVA de 2 fatores, variável independente (marcador e infecção), variável dependente (porcentagem da expressão dos marcadores).

Tabela 1: Anticorpos empregados para a caracterização fenotípica de macrófagos e células não aderentes (linfócitos).

ANTICORPOS	FLUOROCROMO	PROCEDÊNCIA
Anti-CD14	FITC	BD Pharmingen
Anti-CD11b	APC Cy7	BD Pharmingen
Anti- CD11c	APC	BD Pharmingen
Anti- CD18	FITC	BD Pharmingen
Anti- CD54	PE	BD Pharmingen
Anti- MHC classe II	PE	BD Pharmingen
Anti- CD80	PE	BD Pharmingen
Anti- CD86	APC	BD Pharmingen
Anti- CD 206	PE	BioLegend
Anti- TLR-2	ALEXA FLUOR 647	BD Pharmingen
Anti- CD3	FITC	BD Pharmingen
Anti- CD8	APC	BD Pharmingen

3.2.5. Imunofluorescência para HIF-1 α

Os macrófagos de sangue periférico mantidos em placas de cultura foram fixados com paraformaldeído a 4% durante 10 minutos, lavados em PBS pH 7,2, permeabilizados com Tween 20 (1%) e novamente lavados em PBS. Os sítios de ligação inespecíficas foram bloqueados com albumina de soro bovino (BSA) (3%) durante 30 minutos. As células foram incubadas com anticorpo anti-HIF-1 α , mantidas *overnight* a 4°C, lavadas em PBS contendo Tween 20 a 0.1% e incubadas com anticorpo secundário anti-rato conjugado com FITC durante 1 hora em temperatura ambiente. As células foram lavadas em PBS contendo Tween 20 (0.1%). As lamínulas foram montadas em meio DABCO, tendo-se adicionado previamente ao mesmo o DAPI e visualizadas em microscópio óptico acoplado a

fluorescência Olympus BX 51 e as imagens capturadas pelo aplicativo da Olympus (DEGROSSOLI; BOSETTO; GIORGIO, 2007).

3.3. Macrófagos peritoneais murino e infecção com *L. amazonensis*

Os macrófagos peritoneais murino foram cultivados conforme protocolos padronizados anteriormente por Degrossoli, Bosetto e Giorgio (2007). Resumidamente, após a eutanásia dos camundongos por deslocamento cervical, na cavidade peritoneal foi injetado PBS estéril. O exsudato foi retirado e armazenado em frasco estéril imerso em banho de gelo. As células foram adicionadas em lamínulas em placas de 24 poços (5×10^5 células/poço) e mantidas durante 2 horas. Após este período, a cultura de células foi lavada e foi adicionado meio RPMI 1640 suplementado com 10% de SFB e mantida durante 24 horas em estufa úmida de CO₂ a 37°C. Os amastigotas foram adicionados na proporção de 3:1 (parasitas/célula) às culturas. Após 1 hora de contato as células foram lavadas para retirada de amastigotas livres e a cultura de células mantida durante 24 horas e 48 horas em estufa úmida de CO₂ a 37°C. Em seguida procedeu-se a fixação com metanol e coloração com Giemsa. A avaliação da porcentagem de macrófagos infectados e o número de parasitas/macrófago realizou-se pela contagem de 200 células por lamínula, em microscópio óptico, aumento de 1000 vezes. Fotos foram registradas em um microscópio óptico Carl Zeiss, modelo Primo Star, acoplado à câmera AxioCam ERc5s.

3.4. Animais

Camundongos isogênicos da linhagem BALB/c/AnUnib e C57BL/6/JUnib (fêmeas, 4 semanas), SPF (*Specific Pathogen Free*), fornecidos pelo Centro Multi-Disciplinar de Bioterismo – CEMIB/UNICAMP, foram mantidos em isolador no Biotério da Parasitologia, Departamento de Biologia Animal do Instituto de Biologia da Unicamp, durante o decorrer dos experimentos (aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Unicamp –CEUA, Número 3310-1).

Camundongos da linhagem B6.129P2-Lyz2^{tm1(cre)lfo}/J e camundongos da linhagem B6.129S4(C)-Vhl^{tm1Jae}/J, fornecidos pelo CEMIB/UNICAMP (importados da The Jackson Laboratory – Bar Harbor – USA) foram mantidos no Biotério de Animais

SPF, Depto de Imunologia, IB/UNICAMP. Essas duas linhagens foram cruzadas e a Geração F1 de camundongos mutantes para o gene VHL em células mielóides, foi utilizada para os ensaios com cultura de macrófagos e para a avaliação da susceptibilidade a infecção com *L. amazonensis* (aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Unicamp CEUA-IB-UNICAMP- Número 3738-1).

3.4.1. Reação em cadeia da polimerase semi-quantitativa em tempo real (RT-qPCR)

Utilizando-se macrófagos peritoneais de camundongos tipo selvagens e mutantes, foi utilizado o kit QIAGEN (nº 80004) e se obteve o DNA genômico. Para a quantificação do gene VHL no genoma dos camundongos 50ng de DNA total foi amplificado. A quantificação dos ácidos nucléicos foi realizada por espectrofotometria utilizando NanoDrop 2000 (Eppendorf). Em todos os casos, a reação de amplificação foi realizada no volume final de 20ul utilizando SyBRGreen no equipamento StepOne RT-PCR system (Applied Biosystems). Os pares de *primers* específicos utilizados foram para VHL: VHLd: 5'-CCTTCAAGTTGCCCGGAGCG-3'; VHLr: 5'-GTGGATGCGGCGGCCGGTGC-3'; Gliceraldeído fosfato desidrogenase (GDPH): GDPHd: 5'-TGTGTCCGTCGTGGATCTGA-3'; GDPHr: 5'-CCTGCTTCACCACCTTCTTGA-3' (utilizado como controle).

3.4.2. Infecção dos animais com *L. amazonensis*

Camundongos (fêmeas de 4 semanas), foram infectados no coxim plantar da pata traseira direita com 1×10^6 amastigotas. O tamanho das lesões foram medidos por paquímetro após 30, 45, 60 e 90 dias da infecção. A avaliação da carga parasitária foi feita pela contagem de amastigotas em câmara de Neubauer. Teste ANOVA de 1 fator, variável independente (dias após infecção) variável dependente (tamanho da lesão ou número de amastigotas).

3.4.3. Expressão de HIF-1 α - Western Blotting

A cultura de macrófagos peritoneais de camundongos Geração F1 e camundongos C57BL/6, foram mantidas durante 24 horas em estufa úmida de CO₂,

após este período foram tratadas ou não com 500 μ M de mimosina (Enzo) durante 4 horas e/ou 24 horas.

Os macrófagos murinos nas placas de cultura, foram lavados com PBS pH 7,4 e 100 μ L do tampão de lise (4% SDS, 20% glicerol, 10% β -mercaptoetanol, 0,004% azul de bromofenol, 0,125 M Tris HCL, pH 6.8) foi adicionado. As proteínas foram desnaturadas a 95°C durante 3 minutos. A eletroforese ocorreu em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) a 10%. Após a separação, as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose (NC – Amersham Pharmacia Biotech), para realização do imunoblotting.

Para o imunoblotting, a membrana de NC foi bloqueada por 1 hora com 5% de leite em pó desnatado em PBS + 0,05% de Tween 20, no agitador, depois incubada com anticorpo primário (policlonal desenvolvido em coelho) anti-HIF-1 α (1:1000, Novus) , anti- β actina (policlonal desenvolvido em coelho) (1:1000, Biolegend) durante 2 horas em temperatura ambiente, no agitador. Após a incubação, a membrana de NC foi lavada por 30 minutos com 0,05% de Tween 20 em PBS e, em seguida, incubada com o anticorpo secundário (policlonal desenvolvido em cabra anti-coelho) conjugado com peroxidase (1:1000, Amersham) durante 1 hora no agitador. Depois da incubação com o anticorpo conjugado, a membrana de NC foi lavada novamente com PBS+Tween 20 0,05% durante 30 minutos e a detecção foi realizada pela quimioluminescência (SuperSignal West Pico, Pierce) no sistema de análise *Western blotting* (ABANADES et al., 2009). As imagens foram quantificadas por densitometria óptica (DEGROSSOLI et al., 2004) em software ImageJ. As densitometrias de HIF-1 α foram normalizadas com β -actina em todos os ensaios.

3.5. Análise dos resultados

Todos os experimentos tiveram no mínimo três repetições realizados separadamente e os resultados de cada experimento foram expressos pela média $\pm$ DP. A ocorrência de possíveis diferenças entre as médias foram testadas por ANOVA e pelo teste de comparações múltiplas de Duncan's com o nível de significância α de 5% (0.05) (SPIEGEL, 1974). Empregando o pacote estatístico SAS (SAS. Institute, 2008. SAS software for microcomputers V. 9.2, Carolina do Norte, EUA) e Graph Pad Prism 5.

4. Resultados

Os resultados são apresentados em duas partes: avaliação da expressão de HIF-1 α durante a infecção com *L. amazonensis* (itens 4.1 a 4.4) e análise da expressão de marcadores de superfície em resposta a internalização e infecção de *L. amazonensis* em macrófagos humanos (item 4.5).

4.1. Avaliação da expressão de HIF-1 α em macrófagos de sangue periférico de paciente com a síndrome de VHL.

A primeira etapa foi avaliar se pacientes com a síndrome de VHL expressam HIF-1 α em seus macrófagos. Como controles, utilizou-se macrófagos de indivíduos saudáveis.

Observou-se que a localização da marcação para HIF-1 α em macrófagos de paciente VHL foi acentuada em porções citoplasmáticas e em macrófagos de indivíduo saudável também ocorreu esta marcação, porém com menor intensidade (Figura 1).

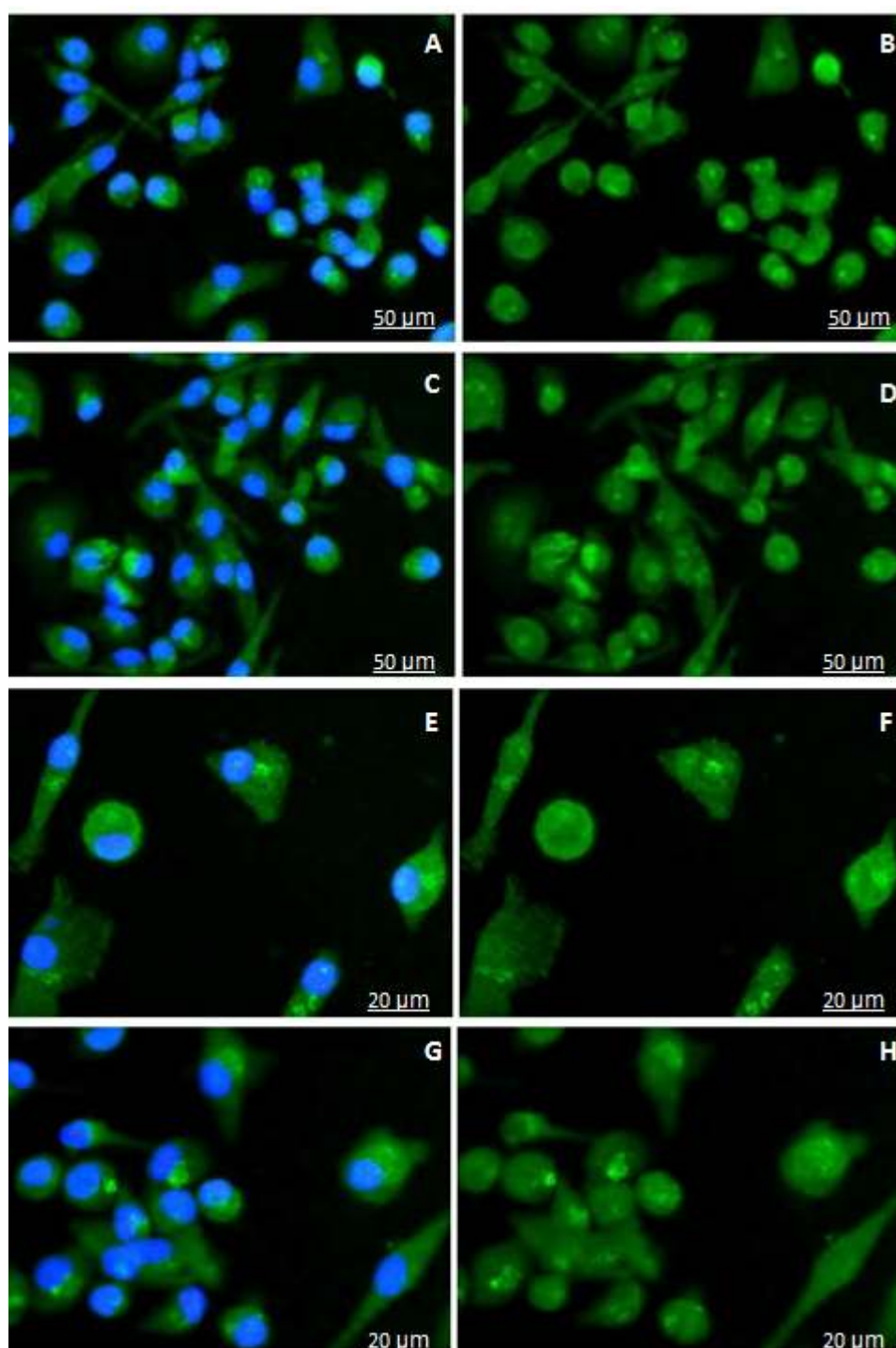


Figura 1: Cultura de macrófagos humanos marcados para HIF-1 α . Macrófagos de sangue periférico humano (2×10^5 /poço) foram fixados com paraformaldeído 4% e marcados com o anticorpo anti-HIF-1 α . O núcleo foi marcado com DAPI (painel A, C, E e G) e o citoplasma com anticorpo secundário conjugado com FITC (painel B, D, F e H). A e B indivíduo saudável objetiva de 20x, C e D paciente objetiva de 20x; E e F indivíduo saudável objetiva de 40x, G e H paciente objetiva de 40x.

Agentes farmacológicos são utilizados em ensaios *in vivo* e *in vitro* para estabilização da proteína HIF-1 α na célula. A mimosina, um quelante de ferro, é capaz de inibir a prolil hidroxilase mimetizando a situação de hipóxia e consequente estabilização do HIF-1 α (ZINKERNAGEL et. al, 2008). Assim, a mimosina foi testada no ensaio de imunofluorescência para avaliar se ocorreria a indução da expressão de HIF-1 α em macrófagos humano. Observou-se uma forte marcação nuclear de HIF-1 α , sendo que os macrófagos de paciente VHL apresentaram expressão mais intensa que os macrófagos de indivíduo saudável, como observado na sobreposição das imagens (Figura 2).

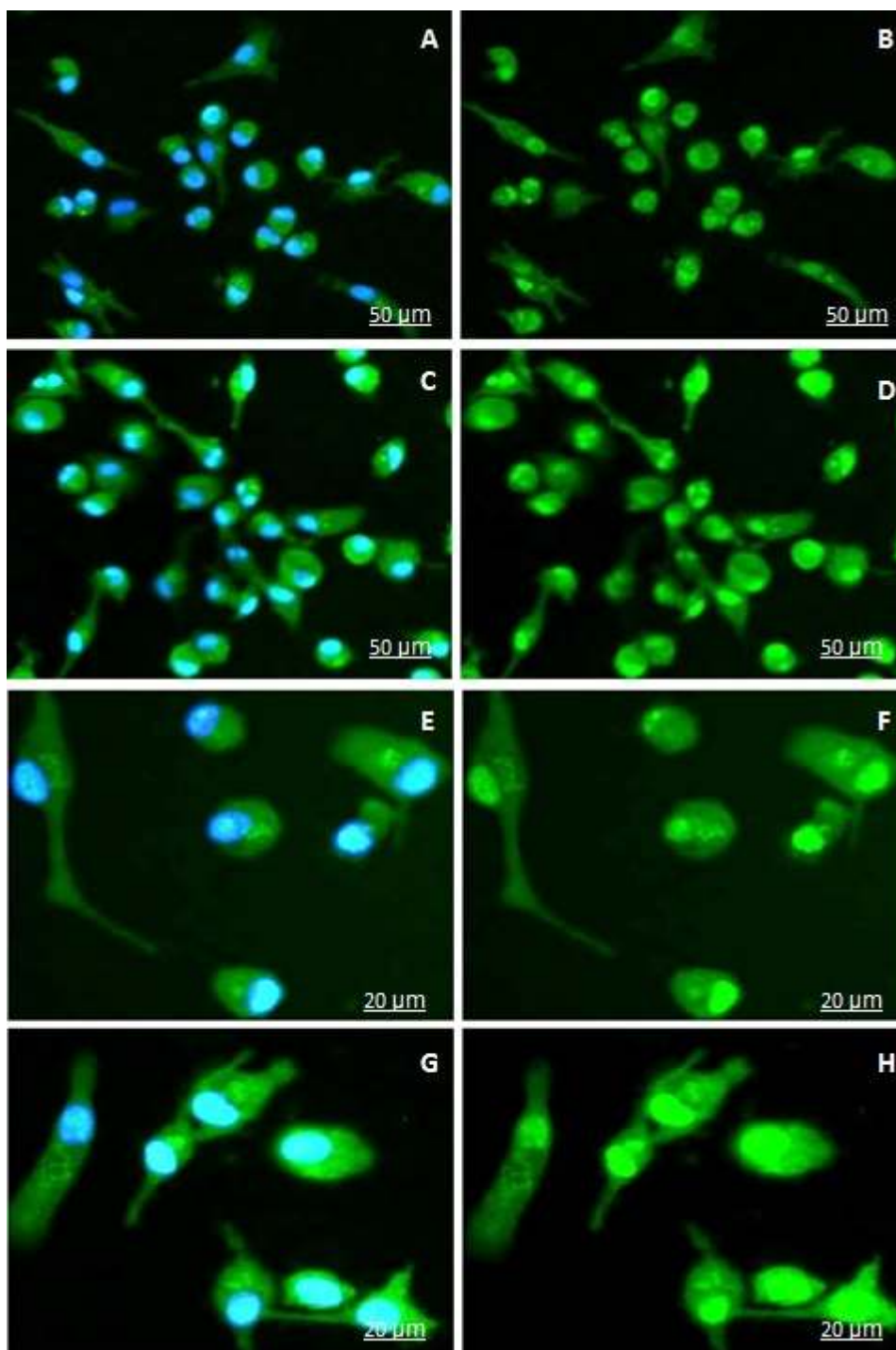


Figura 2: Cultura de macrófagos humanos tratada com mimosina e marcada para HIF-1 α . Macrófagos de sangue periférico humano (2×10^5 /poço) foram incubados com 500 μ M de mimosina durante 4h. Após o período de incubação as células foram fixadas com paraformaldeído 4% e marcadas com o anticorpo anti-HIF-1 α . O núcleo foi marcado com DAPI (painel A, C, E e G) e o citoplasma com anticorpo secundário conjugado com FITC (painel B, D, F e H). A e B indivíduo

saudável objetiva de 20x, C e D paciente objetiva de 20x; E e F indivíduo saudável objetiva de 40x, G e H paciente objetiva de 40x.

Concomitantemente com os ensaios de imunofluorescência realizou-se a infecção de macrófagos humano de paciente com a síndrome de VHL com *L. amazonensis*. A porcentagem de infecção de macrófagos de paciente VHL foi ligeiramente inferior em relação ao controle (indivíduo saudável), 59,5% e 65,0% de infecção respectivamente. O número de amastigotas intracelulares em macrófagos de paciente VHL foi de 4.8 amastigotas/macrófago e em células de indivíduo saudável foi de 3.6 amastigotas/macrófago (Figura 3). Entretanto essas diferenças observadas na porcentagem de células infectadas e no número de parasitas intracelulares não são significativas ($p=0.10$ e $p=0.70$ respectivamente).

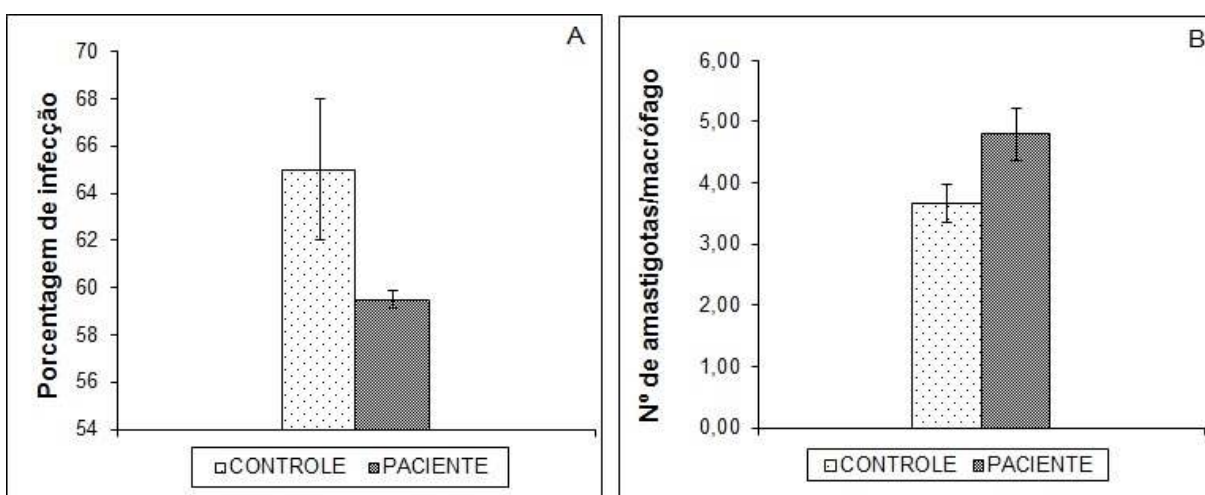


Figura 3: Infecção de macrófagos humanos com *L. amazonensis*. Macrófagos de sangue periférico humano (2×10^5 /poço) foram infectados com amastigotas (3:1 amastigotas/macrófago) permitindo o contato durante 1h. A cultura foi lavada para retirada de parasitas não aderentes. As células foram mantidas em estufa úmida de CO_2 a 37°C durante 24h. Após o período de incubação as células foram fixadas com metanol e coradas com Giemsa. Os resultados foram expressos em porcentagem de células com parasitas intracelulares A: porcentagem de infecção; B: número de amastigotas por célula.

4.2. Avaliação da mutação do gene VHL na Geração F1 de camundongos mutantes

Os experimentos realizados com células de pacientes VHL não foram continuados, devido à dificuldade no recrutamento de um número significativo de pacientes do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP para obtenção de sangue. Assim optou-se pela utilização de células de camundongos que apresentam mutação no gene VHL em células mielóides, mimetizando o que pode ocorrer em pacientes com a síndrome de VHL.

O cruzamento de camundongos da linhagem B6.129P2-*Lyz2*^{tm1(cre)lfo}/J e da linhagem B6.129S4(C)-*Vhl*^{tm1Jae}/J, permitiu que a Geração F1 (GF1) apresentasse deleção de uma das cópias do gene VHL em metade da população de células mielóides (Figura 4). A RT-qPCR confirmou este dado, demonstrando que camundongos GF1 apresentam esta deficiência no gene VHL (Figura 5).

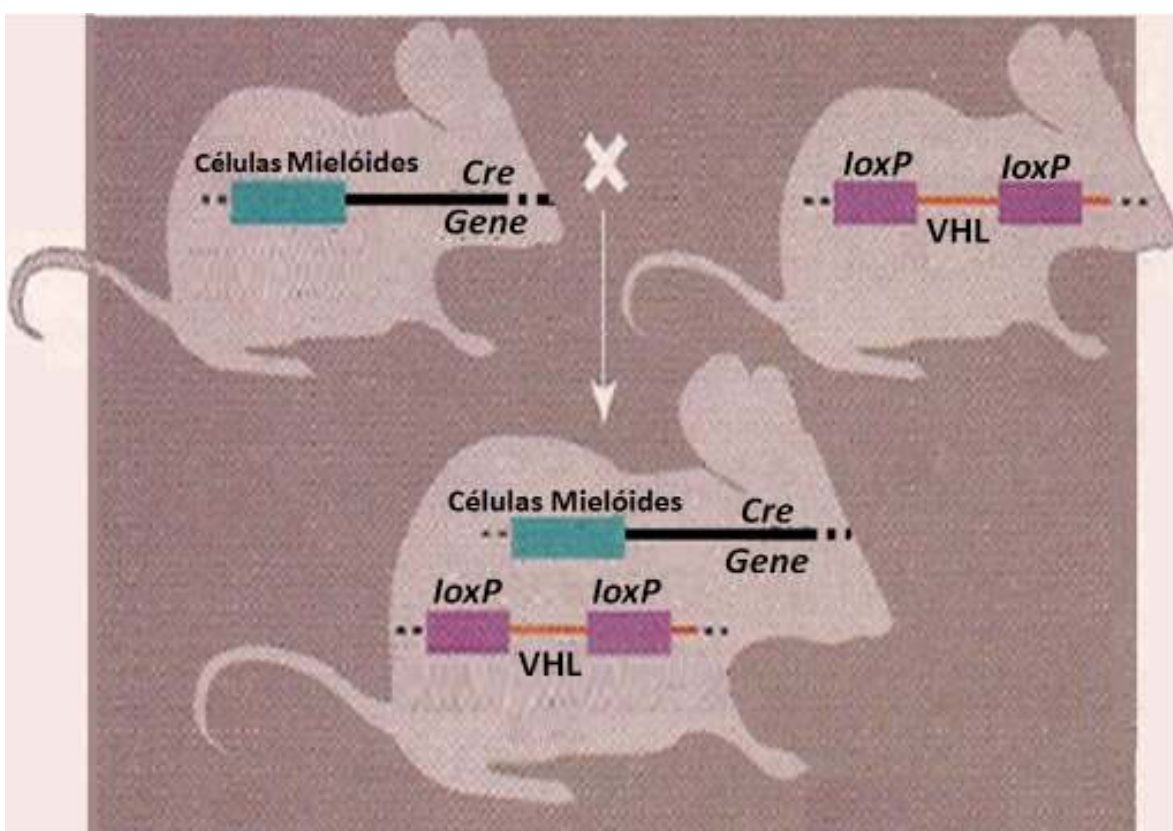


Figura 4: Cruzamento de animais transgênicos para a geração de animais mutantes VHL. Camundongos da linhagem B6.129P2-*Lyz2*^{tm1(cre)lfo}/J (Cre recombinase reconhece sítios loxP) e camundongos da linhagem B6.129S4(C)-

Vhl^{tm1Jae}/J (sítios loxP flanqueado na região do promotor VHL e exon 1) foram cruzados e a ninhada acompanhada até o desmame.

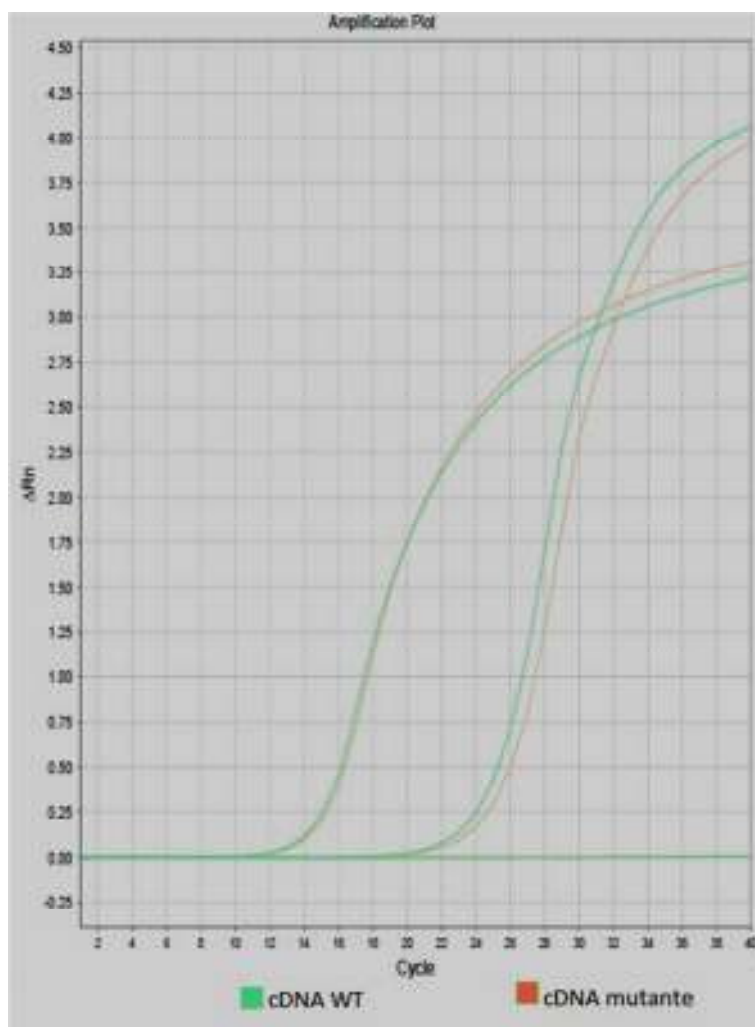


Figura 5: PCR do gene VHL: Gliceraldeído fosfato desidrogenase (GDPH) foi o controle de carga (50 ng). O DNA genômico extraído de camundongos C57BL/6 e GF1 e foi amplificado usando SyBRGreen e primers específicos para GDPH (controle de carga, esquerda) e o gene VHL (direita). A curva representa a intensidade de fluorescência de cada reação para cada ciclo da PCR.

Os camundongos transgênicos com as referidas mutações, LyzCre, VHL e GF1, apresentam viabilidade normal e não mostram nenhum fenótipo de anomalia quando mantidos em condições de barreiras estéreis.

4.3. Avaliação da expressão de HIF-1 α em macrófagos de camundongos mutantes para o gene VHL (Geração F1- GF1).

Como considerado anteriormente, através da ubiquitinação a pVHL degrada a subunidade HIF- α , com a ausência da pVHL ocorreria a estabilização de HIF-1 α na célula. Para verificar se ocorreu nos animais, após o cruzamento, a não degradação de HIF-1 α , células de camundongos GF1 foram submetidas à técnica de Western blotting. Observou-se que a abundância de HIF-1 α em células VHL não tratada (mut-ctro) foi mais intensa em relação a células tipo selvagem (Wild Type-wt-ctro), camundongos C57BL/6 (intensidade da banda de 1,85 e 1 respectivamente). Além disso, quando as células foram tratadas com mimosina a marcação para HIF-1 α foi ainda mais intensa em células VHL comparada as células tipo selvagem, como demonstrada pela intensidade da banda 7,80 e 4,42 respectivamente (Figura 6).

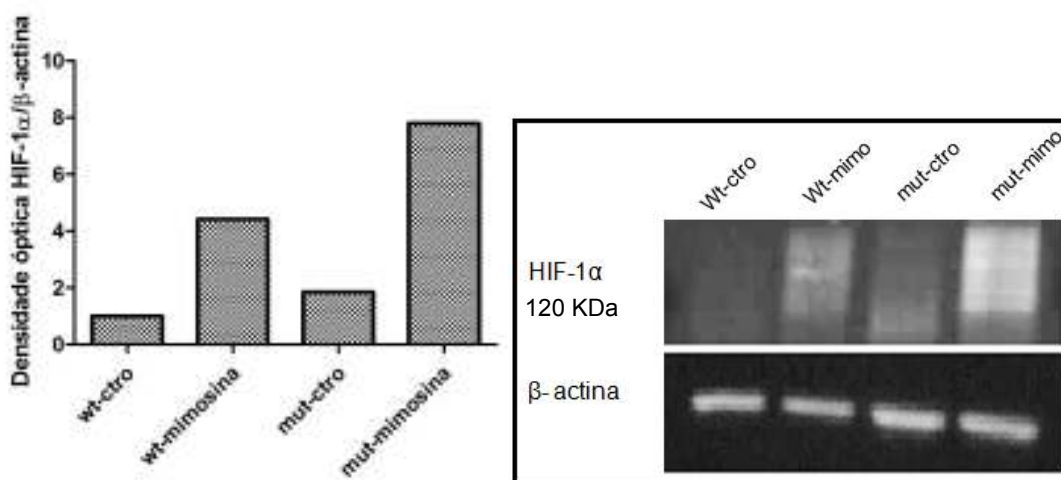


Figura 6: Expressão de HIF-1 α em macrófagos peritoneais: Macrófagos peritoneais (5×10^5) de camundongos GF1 (mutantes) e tipo selvagem foram mantidos em estufa de CO₂ a 37°C durante 24h. Após este período foram tratados ou não com 500 μ M de mimosina durante 4h. As células foram então lisadas com tampão de lise para a realização do Western blotting. Wt-ctro (wild-type-controle); Wt-mimosina (wild-type tratado com mimosina); mut-ctro (mutante-controle); mut-mimosina (mutante tratado com mimosina). As imagens foram quantificadas por densitometria óptica.

4.4. Infecção de macrófagos peritoneais de camundongos GF1 e C57BL/6 com *L. amazonensis*.

Após a confirmação da mutação do gene VHL em camundongos GF1 e a expressão de HIF-1 α nos macrófagos, foi avaliada a infecção *in vitro* de macrófagos com *L. amazonensis*.

A porcentagem de infecção de macrófagos de camundongos C57BL/6 e GF1 no tempo de 24 horas foi de 63,7%, 3,0 amastigotas/célula e 62,0%, 2,9 amastigotas/célula, respectivamente. No tempo de 48 horas a porcentagem de infecção de macrófagos foi de 52,0%, 3,0 amastigotas/célula e 44,9%, 2,9 amastigotas/célula (para C57BL/6 e GF1 respectivamente) (Figura 7). Não houve diferença significativa na infecção entre macrófagos de camundongos GF1 e C57BL/6 ($p=0.59$ tempo de 24h e $p=0.34$ tempo de 48h).

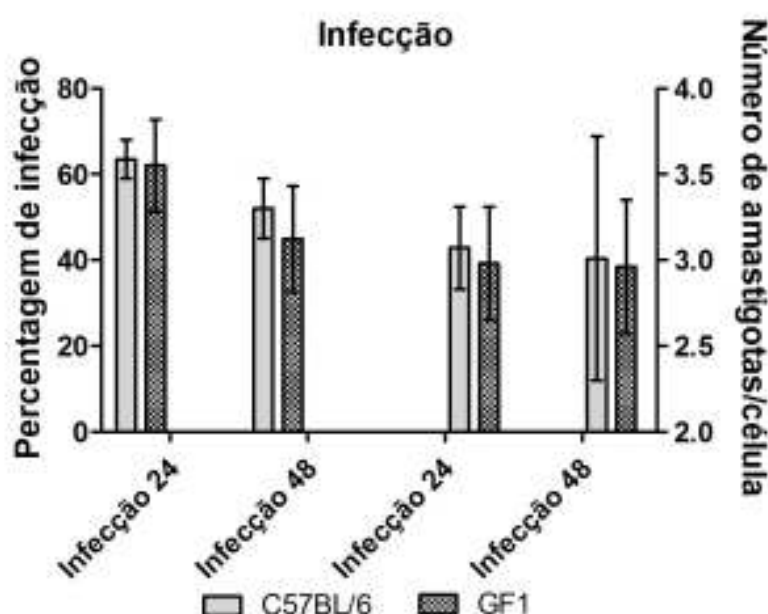


Figura 7: Infecção de macrófagos peritoneais de camundongos C57BL/6 e GF1 com *L. amazonensis*: barra clara- C57BL/6; barra escura-GF1. Os macrófagos peritoneais murino foram cultivados em placas de 24 poços (5×10^5 células/poço) e mantidos durante 24 horas em estufa úmida de CO₂ a 37°C. Os amastigotas foram adicionados na proporção de 3:1 (parasitas/célula) às culturas. Após 1 hora de contato as células foram lavadas e mantidas durante 24 horas e 48 horas em estufa de CO₂ a 37°C. Em seguida foram fixadas com metanol e coradas com Giemsa. A avaliação da porcentagem de macrófagos infectados e o número de

parasitas/macrófago realizou-se pela contagem de 200 células por lamínula, em microscópio óptico, aumento de 1000 vezes.

4.4.1. Infecção de camundongos GF1 e C57BL/6 com *L. amazonensis*

O HIF-1 é um fator de transcrição que quando presente, ativa genes de resposta a hipóxia envolvidos na eritropoiese, angiogênese entre outros e pode ser determinante na resposta às infecções (ZINKERNAGEL; JOHNSON; NIZET, 2007). O modelo *in vivo* possibilita a observação desses eventos frente a um processo infeccioso, por isso foi realizada a infecção de camundongos mutantes para o gene VHL com *L. amazonensis*.

A evolução da infecção de camundongos GF1, mutantes para o gene VHL, e C57BL/6 com *L. amazonensis* foi acompanhada durante 90 dias. O tamanho da lesão foi medido nos tempos de 30, 45, 60 e 90 dias após a infecção. Observou-se que no tempo de 30 dias após o inóculo do parasita a lesão de camundongo GF1 foi significativamente maior que em camundongos C57BL/6. Já com 60 dias após a infecção a medida da lesão de camundongo GF1 foi significativamente menor que camundongos C57BL/6 (1,80 mm e 2,89 mm respectivamente). Nos demais dias, 45 e 90 após a infecção, não houve diferença entre os grupos (Figura 8 e 9). (valor $p=0.02$ tempo de 30 dias; $p=0.09$ tempo de 45 dias; $p=0.01$ tempo de 60 dias; $p=0.55$ tempo de 90 dias).

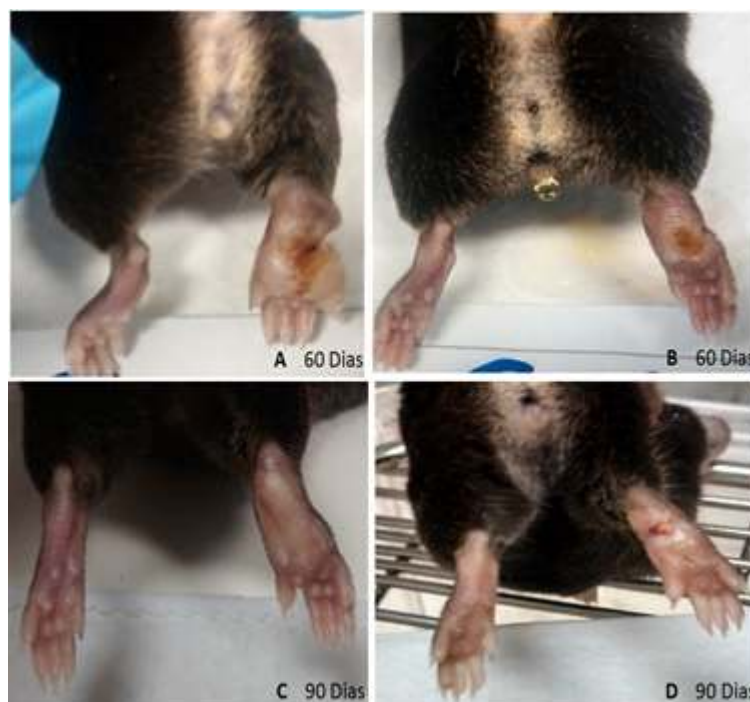


Figura 8: Evolução da leishmaniose cutânea experimental: Camundongos C57BL/6 (A e C) e camundongos GF1 (B e D) foram infectados no coxim plantar da pata traseira direita com 10^6 amastigotas de *L. amazonensis*, a progressão a infecção foi acompanhada durante 90 dias.

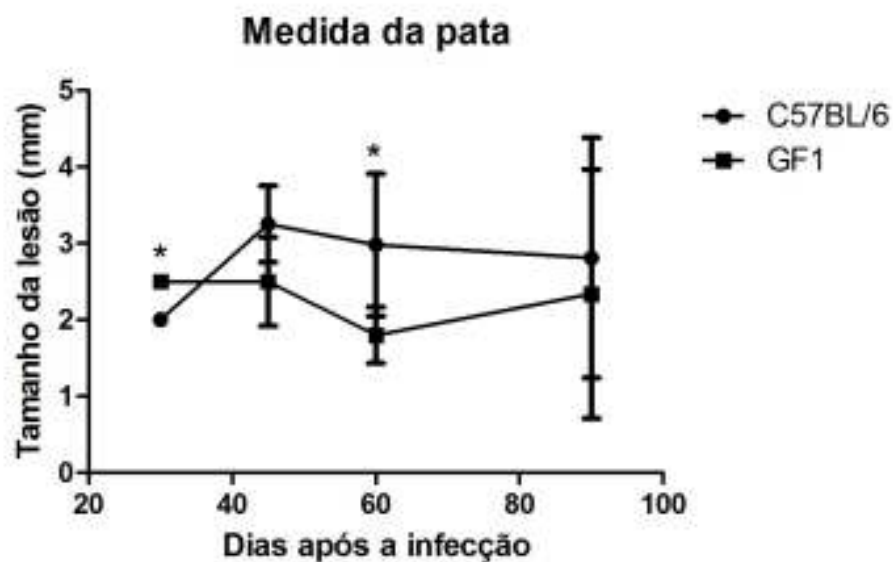


Figura 9: Medida da pata de camundongos infectados: Camundongos C57BL/6 e camundongos GF1 foram infectados no coxim plantar da pata traseira direita com 10^6 amastigotas de *L. amazonensis*, o tamanho da lesão foi medido por paquímetro durante os tempos de 30, 45, 60 e 90 dias após a infecção. (n= 4 por grupo).

A carga parasitária entre os animais GF1 e C57BL/6 foi avaliada e também houve diferença significativa no número de amastigotas obtidos da lesão. Obteve-se de camundongos C57BL/6 mais que o dobro de amastigotas comparado a camundongos GF1 após 60 dias de infecção. Após 90 dias de infecção, em ambos os grupos houve redução na carga parasitária, mas sem diferença significativa no número de amastigotas obtidos, embora haja uma tendência de camundongos GF1 terem menor carga parasitária que camundongos C57BL/6 (Figura 10). ($p=0.03$ tempo 60 dias após a infecção e $p=0.19$ tempo 90 dias após infecção).

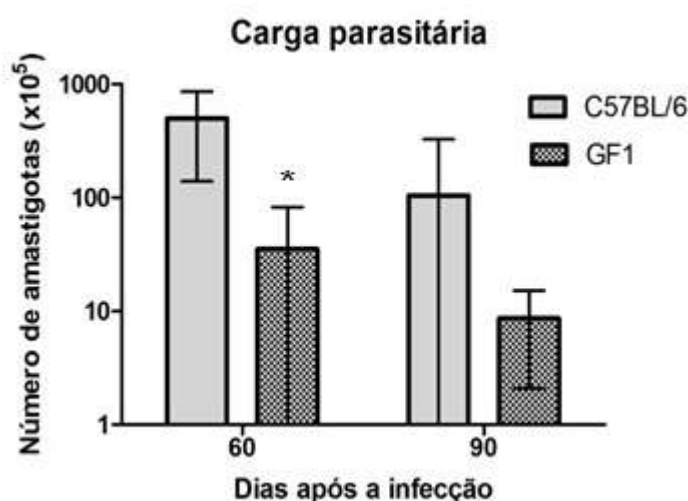


Figura 10: Carga parasitária de camundongos infectados com *L. amazonensis*: Camundongos GF1 (barra escura) e C57BL/6 (barra clara) foram eutanasiados e a carga parasitária das lesões (número de amastigotas) foi avaliada nos tempos de 60 e 90 dias após a infecção. ($n=4$ por grupo).

4.5. Macrófagos de sangue periférico e *L. amazonensis*.

Os monócitos de sangue periférico foram mantidos em cultura durante 7 dias para a diferenciação em macrófagos. Inicialmente observou-se o perfil morfológico destas células após 8 dias em cultivo, infectadas ou não com *L. amazonensis*. Em ambas as culturas, observou-se a integridade das células bem como seu aspecto alongado típico de macrófagos primários. Em cultura de células infectadas observou-se a formação de grandes vacúolos repletos de amastigotas, típico da infecção com *L. amazonensis* em macrófagos (Figura 11). A população total de células não infectadas e infectadas também foi observada mediante

citometria de fluxo, e a região de macrófagos foi determinada pela sua distribuição quanto aos parâmetros de tamanho (FSC) e complexidade celular (SSC). Avaliou-se também a porcentagem de linfócitos T presentes na cultura, sendo de 1,6% para o marcador CD3 e 6,6% para o marcador CD8 (Figura 12). Esses dados sugerem que as culturas celulares eram constituídas de macrófagos.

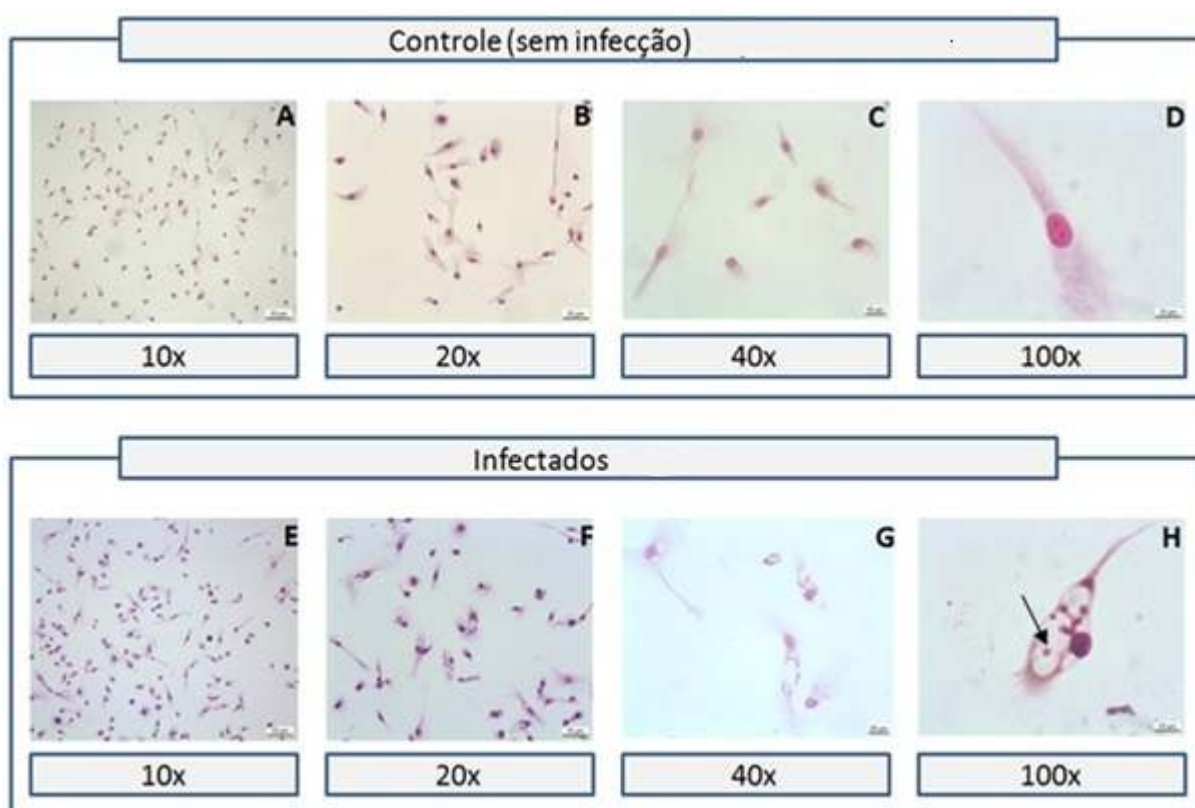


Figura 11: Coloração das culturas de macrófagos de sangue periférico humano. Macrófagos humanos (3×10^5) foram infectados com amastigotas de *L. amazonensis* (3:1) e mantidos em estufa de CO₂ a 37°C durante 24h. Após o período de incubação as células foram fixadas com metanol, coradas com Giemsa e visualizadas em microscópio óptico. Macrófagos não infectados: (A; B; C; D objetivas de 10x, 20x, 40x e 100x); Macrófagos infectados: (E; F; G; H objetivas de 10x, 20x, 40x e 100x). A seta indica vacúolo com amastigota.

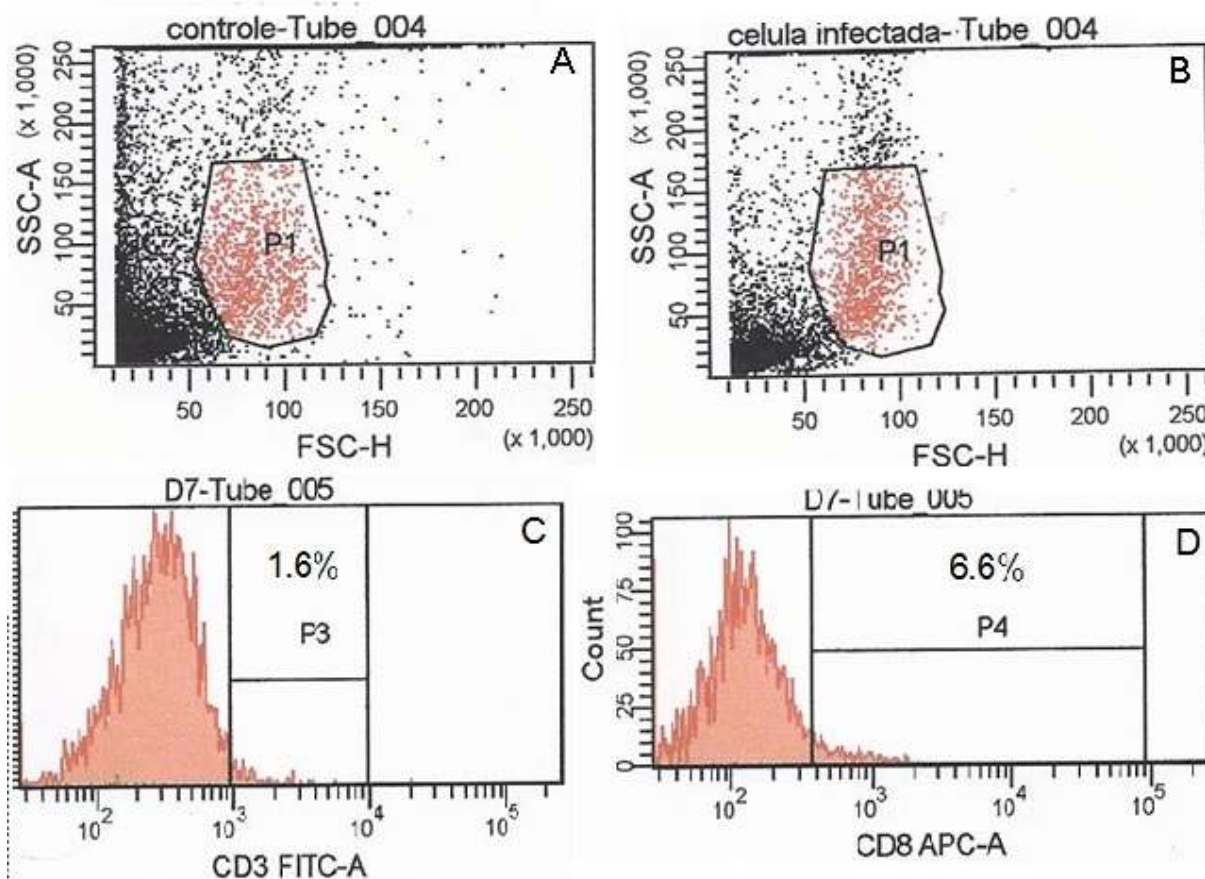


Figura 12: Citometria de fluxo de macrófagos humano: Macrófagos de sangue periférico foram mantidos 7 dias em cultura e infectados ou não com *L. amazonensis* na proporção de 3:1. Após 24h as células foram fixadas com paraformaldeído 2% e analisadas pela citometria de fluxo (A e B). Macrófagos não infectados foram marcadas com anticorpos para linfócitos T (anti-CD3 e anti-CD4). A região de macrófagos e linfócitos foi determinada pela distribuição quanto aos parâmetros de tamanho (FSC) e complexidade celular (SSC). Histogramas representativos da análise por citometria de fluxo caracterizam a população de linfócitos (C e D).

4.5.1. Avaliação fenotípica da expressão de marcadores de superfície de macrófagos humano infectados com *L. amazonensis*.

Foram avaliadas populações de macrófagos com diferentes níveis de infecção. A população de macrófagos com baixo nível de infecção, (infectados com proporção de 1 amastigota/célula), apresentou após o tempo de 24 horas, 17,0% de macrófagos infectados e 2,2 amastigotas/macrófago. Na população de células infectadas na proporção 8:1, obteve-se um nível alto da carga parasitária, 60,0% de macrófagos infectados e 5,8 amastigotas/macrófagos (Figura 13).

Na Figura 14 observou-se a porcentagem de células expressando os seguintes marcadores: CD14, MHC II, C86, CD80, CD11b, CD11c e CD206.

Populações de macrófagos com nível baixo de infecção não mostraram diferenças significativas na expressão dos marcadores em relação às células não infectadas (Figura 14). Já na população de macrófagos com alto nível de infecção houve menor expressão de marcadores celulares como CD14, MHC classe II, CD11b e CD11c. Por outro lado, marcadores como CD80, CD86 e CD206 não mostraram alteração significativa na sua expressão em relação ao controle (Figura 14).

Assim, macrófagos humanos quando infectados com *L. amazonensis* exibem modulação significativa na expressão de alguns dos seus marcadores de superfície, dependendo do nível da infecção (Figura 13 e 14).

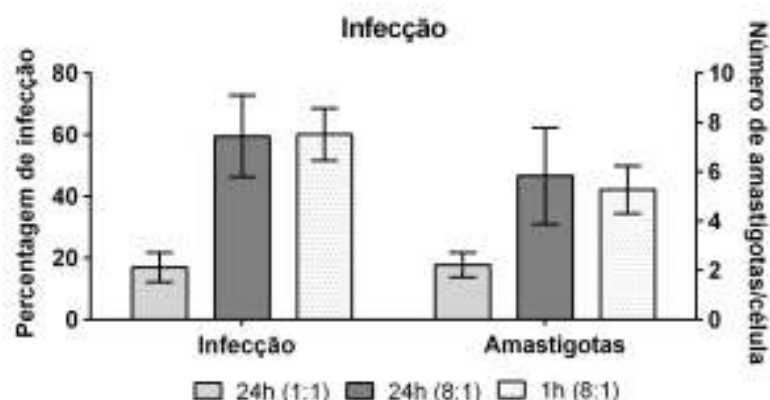


Figura 13: Porcentagem de infecção e carga parasitária: Macrófagos humanos foram infectados com amastigotas nas proporções 1:1 e 8:1, as células foram incubadas durante 1h e 24h a 37°C em estufa úmida de CO₂, após este período foi feita a fixação com metanol, coloração com Giemsa e contagem dos macrófagos infectados e o número de amastigotas/macrófago em microscópio óptico.

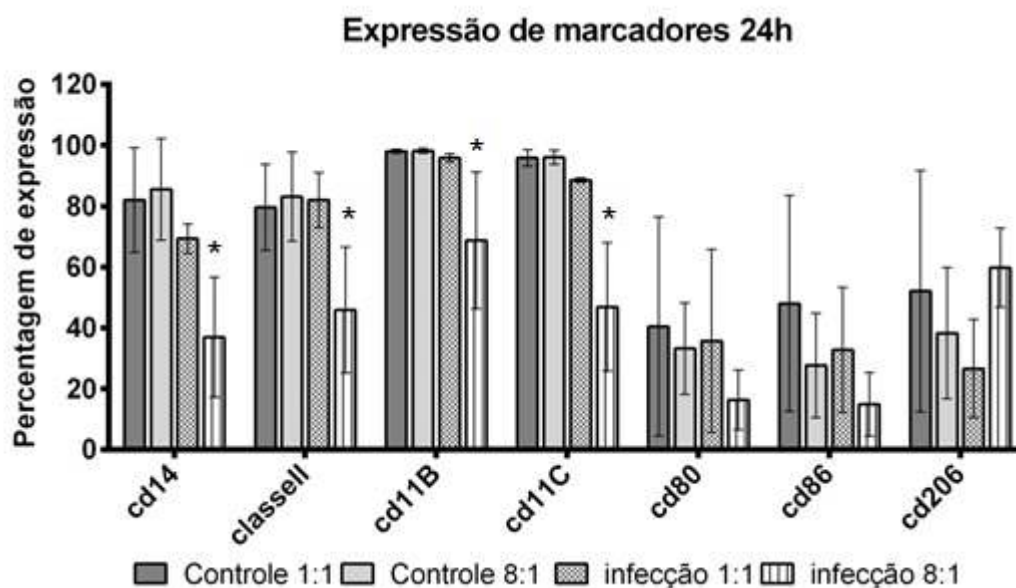


Figura 14: Expressão dos marcadores e intensidade de infecção 24h: Macrófagos humanos foram infectados com amastigotas nas proporções 1:1 e 8:1, as células foram incubadas durante 24h a 37°C em estufa úmida de CO₂, após este período foram desprendidas da placa de culta com scraper e marcadas com os anticorpos e analisadas pela citometria de fluxo. Paralelamente foi feita a fixação com metanol, coloração com Giemsa e contagem da porcentagem de infecção em microscópio óptico. (* valor de $p=0.03$ cd11B; $p=0.01$ cd11C; $p=0.03$ cd14; $p=0.01$ classe II).

A seguinte questão foi analisada: a diminuição da expressão desses marcadores acontece logo após a entrada da *Leishmania* na célula, ou é necessário o estabelecimento dos parasitas por um período maior no interior dos macrófagos? Para responder a este questionamento avaliou-se a expressão dos marcadores de superfície após 1 hora de contato dos macrófagos com a *L. amazonensis*, tempo necessário para internalização do parasita.

Os resultados mostram que não houve diferença significativa na expressão dos marcadores de superfície, CD14, MHC II, CD11c, CD11b, CD206, CD80 e CD86, das células que mantiveram contato durante 1 hora com parasita em relação ao controle (células não infectadas) (Figura 16). Após 1 hora de contato a porcentagem de macrófagos infectados e o número de amastigotas/célula foi de 60,0% e 5,0 amastigotas (Figura 13).

Os dados sugerem que a modulação negativa dos marcadores de superfície está relacionada com o tempo de infecção (Figura 14 e 16).

Histogramas representativos da análise por citometria caracterizam a população de macrófagos (Figura 15).

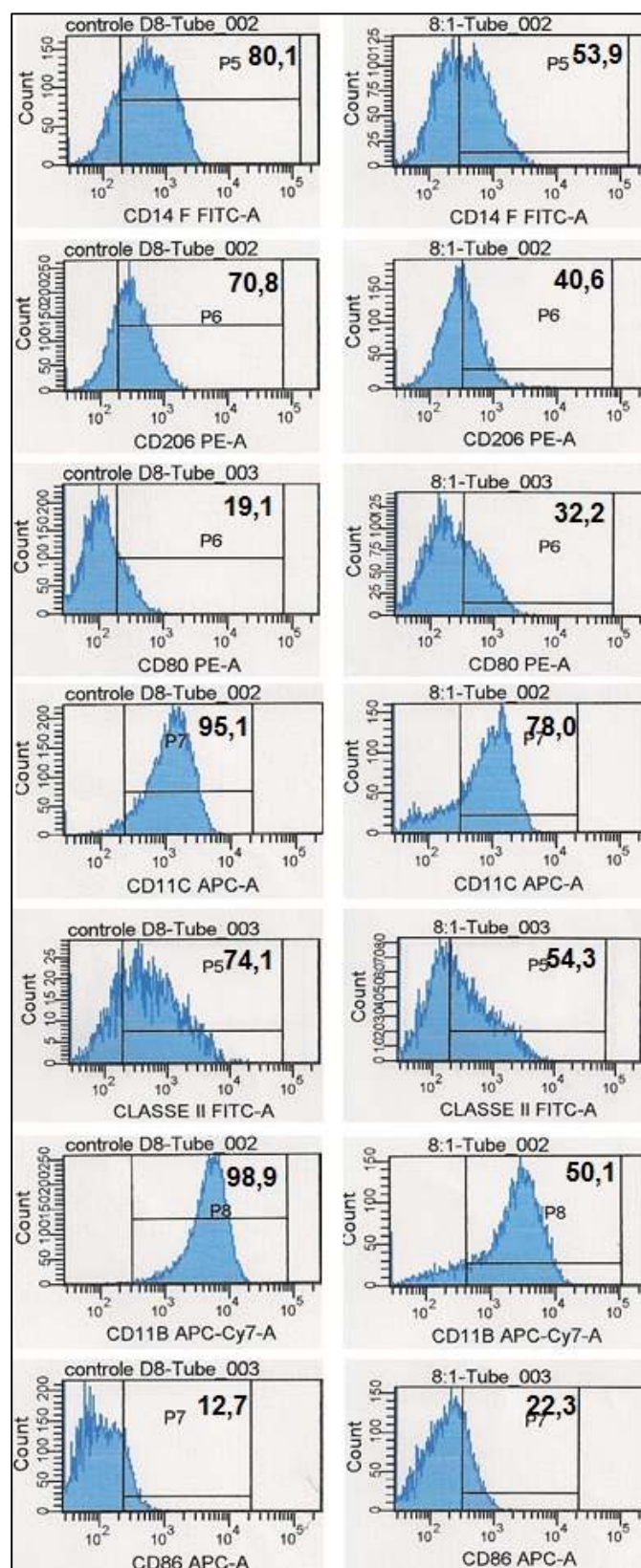


Figura 15: Citometria de fluxo de macrófagos humanos: Macrófagos de sangue periférico foram mantidos 7 dias em cultura e infectados ou não com *L. amazonensis* na proporção de 8:1. Após 24h as células foram fixadas com paraformaldeído 2% e analisadas pela citometria de fluxo. Macrófagos foram marcadas com anticorpos

CD11B, CD14, CD206, Classe II, CD11C, CD80 e CD86. A região de macrófagos foi determinada pela distribuição quanto aos parâmetros de tamanho (FSC) e complexidade celular (SSC).

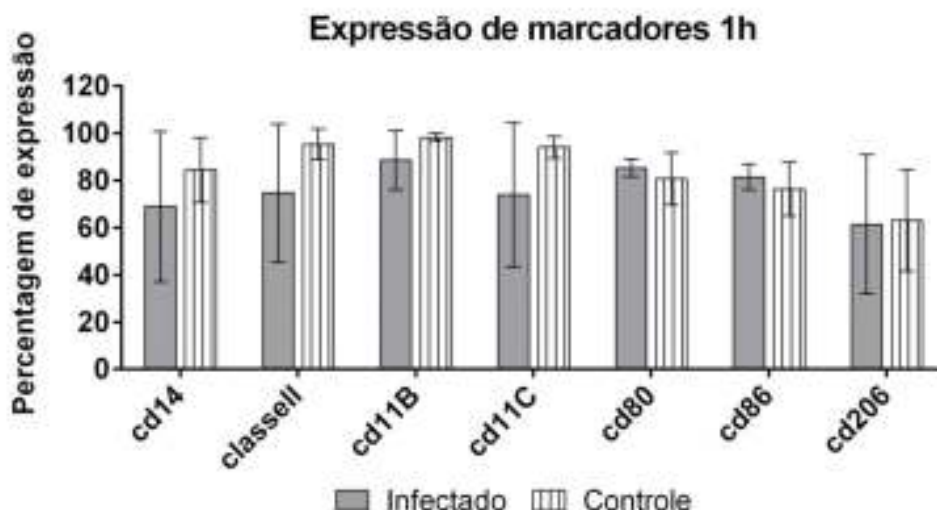


Figura 16: Expressão dos marcadores e infecção 1h: Macrófagos humanos foram infectados com amastigotas na proporção 8:1, as células foram incubadas durante 1h a 37°C em estufa úmida de CO₂, após este período foram desprendidas da placa de culta com scraper e marcadas com os anticorpos e analisadas pela citometria de fluxo. Paralelamente foi feita a fixação com metanol, coloração com Giemsa e contagem da porcentagem de infecção em microscópio óptico (p=0.53).

Outros marcadores de superfície importantes para a resposta imune como: CD54, CD18 e TLR-2 foram avaliados frente a infecção com *L. amazonensis*. Destes, CD18 e CD54 e CD11c também mostram modulação negativa em macrófagos infectados (Figura 17). A porcentagem de infecção dos macrófagos foi de 65,0% e a carga parasitária foi de 7,2 amastigotas/célula (Figura 18).

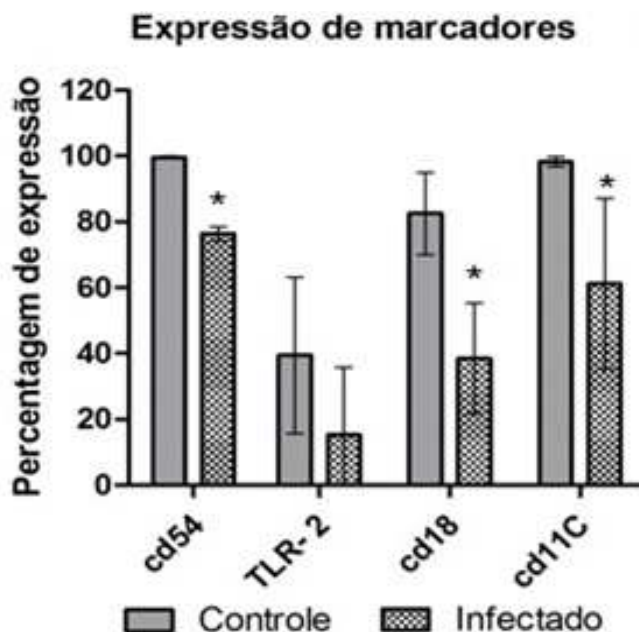


Figura 17: Expressão de marcadores: Macrófagos humanos foram infectados com amastigotas nas proporções 8:1, as células foram incubadas durante 24h a 37°C em estufa úmida de CO₂, após este período foram desprendidas da placa de culta com scraper e marcadas com os anticorpos e analisadas pela citometria de fluxo. Paralelamente foi feita a fixação com metanol, coloração com Giemsa e contagem da porcentagem de infecção em microscópio óptico (* valor de $p = 0.05$ cd11C; $p = 0.04$ cd18; $p = 0.02$ cd54).

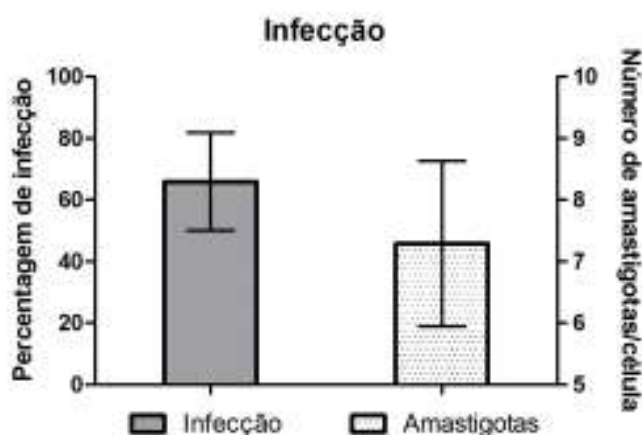


Figura 18: Porcentagem de infecção e carga parasitária (outros marcadores): Macrófagos humanos foram infectados com amastigotas nas proporções 8:1, as células foram incubadas durante 24h a 37°C em estufa úmida de CO₂, após este período foi feita a fixação com metanol, coloração com Giemsa e contagem dos macrófagos infectados e o número de amastigotas/macrófago em microscópio óptico.

Histogramas representativos da análise por citometria caracterizam a população de macrófagos (Figura 19).

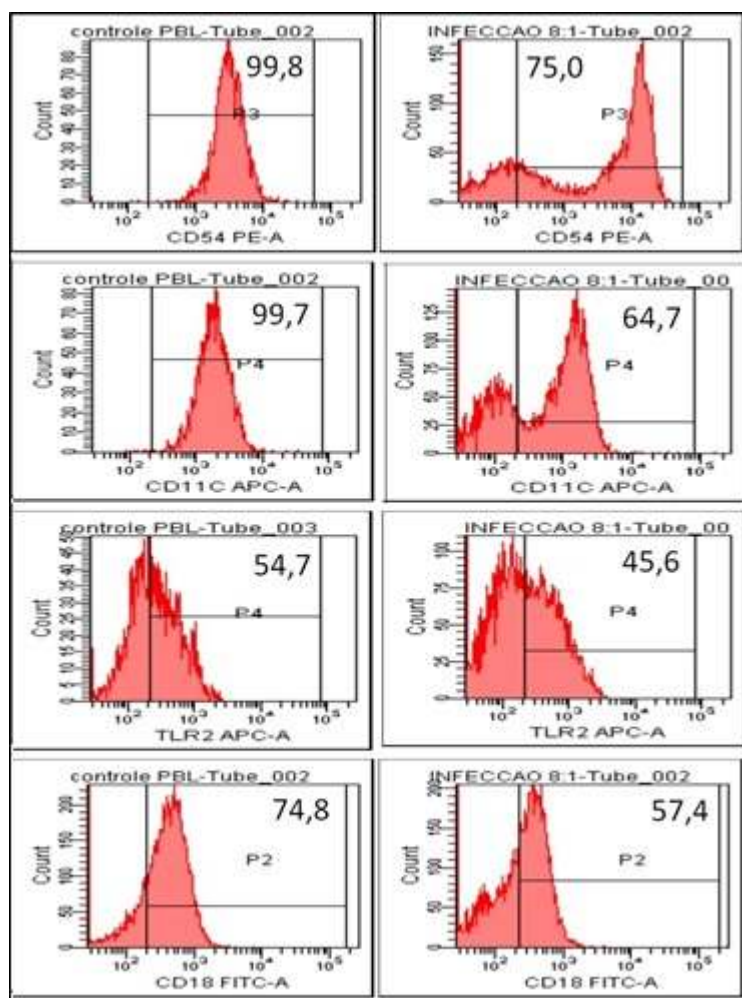


Figura 19: Citometria de fluxo de macrófagos humanos: Macrófagos de sangue periférico foram mantidos 7 dias em cultura e infectados ou não com *L. amazonensis* na proporção de 8:1. Após 24h as células foram fixadas com paraformaldeído 2% e analisadas pela citometria de fluxo. Macrófagos foram marcados com anticorpos CD18, CD11C, CD54 e TLR-2. A região de macrófagos foi determinada pela distribuição quanto aos parâmetros de tamanho (FSC) e complexidade celular (SSC).

5. Discussão

HIF-1 α

A formação do complexo HIF-1 α e pVHL é essencial para a degradação proteossomal de HIF-1 α . Em condições normais a enzima prolil hidroxilase é responsável pela hidroxilação de resíduos prolina no domínio de degradação oxigênio-dependente (ODD) de HIF-1 α . Essa hidroxilação promove a interação de HIF-1 α com a proteína VHL que marca o HIF-1 α com cadeias de poliubiquitina e este será degradado pelo proteossomo. Em condições de hipóxia, ou na utilização de quelantes de ferro que mimetizam a hipóxia, ou ainda na ausência e/ou mutação da pVHL ocorre a estabilização da expressão de HIF-1 α o qual se transloca para o núcleo (BEDESSEM; STÉPHANOU, 2014). Os dados aqui obtidos, do cultivo de macrófagos originados de monócitos de sangue periférico de paciente com a síndrome de VHL confirmaram que a expressão de HIF-1 α , tanto em condição de normóxia como após o tratamento com mimosina, foi maior quando comparada a expressão em macrófagos de indivíduo saudável.

A utilização de modelo murino transgênico na compreensão da interação patógeno-hospedeiro e dos mecanismos imunológicos, durante o processo infeccioso têm contribuído grandemente nas pesquisas (CLAUSEN et al., 1999). Camundongos mutantes para o gene VHL exibem expressão aumentada de HIF-1 α e são utilizados para avaliação da resposta inflamatória frente a um patógeno. O modelo murino escolhido para este trabalho apresenta mutação em células mielóides para o gene VHL e condiz com a expressão aumentada de HIF-1 α nestas células como relatado por outros pesquisadores (CRAMER et al., 2003; PEYSSONNAUX et al., 2005).

Muitos registros na literatura demonstraram que o HIF-1 α está envolvido na inflamação mediada por célula mielóide e tem papel importante na imunidade inata contra patógenos intracelulares. Em resposta a maioria dos patógenos, os fagócitos aumentam a transcrição de HIF-1 α , componente regulador do HIF-1 para expressar moléculas efetoras contra os invasores (SINGH et al., 2012). De fato, tanto no modelo *in vitro* como *in vivo*, a habilidade de fagócitos mononucleares em expressar HIF-1 α quando parasitados com *L. amazonensis* foi observada por Araújo; Arrais-Silva e Giorgio (2012); Arrais-Silva et al. (2005) e Degrossoli; Bosetto e Giorgio (2007). Outros pesquisadores também verificaram a expressão de HIF-1 α

em cultura de células infectadas com *L. donovani* e tantos outros tem demonstrado aumento da expressão de HIF-1 α com outros parasitas (FERREIRA et al., 2009; HAEBERLE et al., 2008; ARAÚJO et al., 2010). Muito se investiga sobre o papel do HIF-1 α durante a infecção com vários microrganismos, e se este pode favorecer o desenvolvimento das patologias. Alguns dos modelos estudados utilizam-se de células mutantes para a expressão de HIF-1 α durante a infecção com o patógeno e sugerem que HIF-1 α estaria envolvido com a sobrevivência do parasita dentro da célula (SINGH et al., 2012).

Sabe-se que camundongos C57BL/6 são mais resistentes a infecção com *Leishmania* e tendem para uma resposta imune do tipo Th1. Araújo, Arrais-Silva e Giorgio (2012) demonstraram que a lesão de camundongos C57BL/6 infectados com *L. amazonensis* apresentou infiltrado inflamatório com predominância de macrófagos na fase inicial da lesão bem como a expressão de HIF-1 α e HIF-2 α no núcleo de células infectadas, ao contrário, camundongos BALB/c susceptíveis a infecção, apresentaram expressão de HIF-1 α e HIF-2 α no citoplasma. Cramer et al. (2003) verificaram que o HIF-1 α tem um papel crítico na infiltração celular nos primeiros estágios inflamatórios. O modelo de inflamação aguda induzida por éster de forbol em camundongos mutantes para o gene *Vhl* resultou em uma resposta hiperinflamatória enquanto que em camundongos mutantes para HIF-1 α resultou em pouca evidência de infiltração ou edema. Além disso, células deficientes em HIF-1 α quando desafiadas com *Streptococcus* apresentaram 7 vezes mais unidades formadoras de colônia viáveis que células tipo selvagem. Neste estudo, demonstrou-se que camundongos GF1 (mutantes para o gene *VHL*) infectados com *L. amazonensis* têm carga parasitária inferior a de camundongos C57BL/6, o que sugere que devido à expressão constante de HIF-1 α , pode ter ocorrido uma infiltração celular no local da lesão logo no início da infecção controlando a carga parasitária. De fato, Chawla et al. (2012) mostraram que o tratamento com mimosina, um indutor da expressão de HIF-1 α , inibiu 30% a proliferação de promastigotas de *L. donovani*, e quando testada em macrófagos infectados inibiu em 50% a proliferação de amastigota, sugerindo que a expressão aumentada de HIF-1 α , nos macrófagos, afeta a infecção. Por outro lado Singh et al. (2012) mostraram que a superexpressão de HIF-1 α em macrófagos promoveu o crescimento intracelular de *L. donovani*. Embora os dados *in vitro* da infecção de macrófagos GF1 e macrófagos tipo selvagem com *L. amazonensis* não tenham mostrado

diferença na porcentagem de infecção, os dados *in vivo* indicam que HIF-1 α está envolvido no controle da infecção. Os dados também sugerem a complexibilidade do fenomeno observado, e que outros fatores estão envolvidos no resultado da infecção, pois a natureza e a magnitude das atividades citotóxicas das células hospedeiras frente à infecção com *Leishmania* são dependente de fatores do microambiente tecidual, tais como, a tensão de oxigênio, a disponibilidade de ferro, a estabilização de HIF-1 α e a ativação de HIF-1 (NIZET & JOHNSON, 2009). Contudo o mecanismo de ação de HIF-1 α e suas vertentes durante a infecção com *Leishmania* ainda são obscuros e necessitam de mais investigação.

Modulação de marcadores de macrófagos infectados com *L. amazonensis*

Leishmania tem uma variedade de moléculas de superfície que interagem com moléculas da célula hospedeira e estas estão envolvidas no desencadeamento de vias de sinalização, essenciais para a entrada do parasita e sua sobrevivência no interior da célula (HANDMAN, 1999; MORAIS et al., 2014; UENO & WILSON, 2012). No entanto os vários mecanismos desenvolvidos por *Leishmania* para evadir as defesas do hospedeiro ainda não estão bem definidos (MORAIS et al., 2015).

A avaliação fenotípica da expressão de marcadores de superfície de macrófagos humanos infectados com amastigotas de *L. amazonensis* revelou que existe modulação negativa na expressão de alguns marcadores, CD11C, CD11B, CD18, MHC classe II, CD54 e CD14 dependendo do nível da infecção, e outros marcadores como CD206, CD80, CD86 e TLR-2 não mostraram diferença na expressão em macrófagos infectados comparado aos macrófagos não infectados.

Os dados obtidos apontam para uma similaridade em relação aos da literatura, onde outros pesquisadores mostram que a *Leishmania* interage com CD11b/CD18 seja pela diminuição da expressão ou pela internalização, no vacúolo parasitóforo, dessas moléculas de superfície de macrófagos infectados com promastigotas de *L. chagasi* (GONÇALVES et al., 2005; UENO et al., 2009).

Durante a infecção com *Leishmania*, no local da lesão ocorre o recrutamento de células inflamatórias na tentativa de controlar a infecção, citocinas, quimiocinas e moléculas de adesão como CD54(ICAM-1) participam deste processo. Nossos dados mostram que houve diminuição da expressão de CD54 em macrófagos infectados com amastigotas de *L. amazonensis* sugerindo que o parasita interfere na expressão ou na síntese desta molécula. Almeida et al. (2003)

observaram diminuição da expressão de CD54 em cultura de monócitos, mas não em macrófagos, infectados com promastigotas de *L. chagasi*.

Moléculas de MHC classe II presentes nas células apresentadoras de antígenos são iniciadoras da resposta imune adaptativa ao apresentar peptídeos de patógenos aos linfócitos T (ASSAN & MOURAD, 2011; LANG & ANTOINE, 1991). Vários pesquisadores tem demonstrado que moléculas da superfície de *Leishmania* spp. interagem com as moléculas de MHC II de macrófagos de camundongos ativados com IFN- γ , entre as observações estão que as moléculas MHC II apresentaram-se associadas ao vacúolo parasitóforo no local de fixação da *Leishmania*, mas sem alteração na expressão dessas moléculas na superfície de macrófagos (ANTOINE et al., 1999; LANG et al., 1994a.; LANG et al. 1994b.; LEO et al., 1995). Nossos dados mostram que a fagocitose de amastigota de *L. amazonensis* não altera a expressão de MHC II de macrófagos humanos de sangue periférico. Quanto à infecção a baixa carga parasitária celular também não altera a expressão do marcador, mas quando há alta carga parasitária ocorre a modulação negativa da expressão de MHC II na superfície das células infectadas. Almeida et al. (2003) também observaram diminuição da expressão de MCH II na superfície de macrófagos humanos infectados com *L. chagasi*. Estes resultados sugerem que a interferência nas moléculas de MHC II na superfície de macrófagos humanos pela infecção com *Leishmania* poderia prejudicar a apresentação de antígenos.

As moléculas coestimuladoras atuam como um sinal secundário importante que regula e direciona a resposta imune que se segue (TULADHAR; NATARAJAN; SATOSKAR, 2011). Nós não observamos alteração significativa na expressão de CD80 e CD86 na cultura de macrófagos humanos infectados com *L. amazonensis*. Estes dados são similares ao encontrado por Brodskyn e colaboradores (2001) em que macrófagos humanos infectados com *L. major* não mostraram alterações na expressão de CD80 e a expressão de CD86 foi ligeiramente reduzida. Por outro lado, Almeida et al. (2003) mostraram que macrófagos humanos infectados com *L. chagasi* apresentaram aumento na expressão de CD86. Os resultados controversos a respeito da infecção por *Leishmania* induzir alterações no padrão da expressão de moléculas coestimuladoras podem ser atribuídos as diferentes espécies de *Leishmania* utilizadas e a resposta imune desencadeada pela mesma.

O receptor de manose (CD206) é um receptor de reconhecimento de patógenos e desempenha um papel importante durante a resposta imune inata pelo reconhecimento e fagocitose de vários microorganismos (TAYLOR et al., 2005). Há evidências de que promastigotas de *L. donovani* utiliza-se do receptor de manose para a entrada na célula (BASU; SETT; DAS, 1991; WILSON & PEARSON, 1988). Os nossos dados mostram que não há modulação significativa da expressão de CD206 durante a infecção de macrófagos humanos com *L. amazonensis*. Akilov et al. (2007) utilizaram macrófagos de camundongos *knockout* para o receptor de manose e observaram que não houve diferença na cinética de infecção de promastigotas de *L. major* e *L. donovani* em relação a macrófagos controle, sugerindo que o receptor de manose não é necessário para a internalização da *Leishmania*. Os relatos na literatura são controversos e são necessárias mais pesquisas para definir o papel do receptor de manose na infecção.

O receptor *Toll Like* (TLR) também é um receptor de reconhecimento de patógeno importante na imunidade inata (REIS et al., 2006). Alguns autores sugerem que o TLR desempenha papel importante no reconhecimento e controle da infecção de camundongos com *L. major* (MURAILLE et al., 2003; VEER et al., 2003). Guerra et al. (2010) verificaram que a carga parasitária de camundongos *knockout* para TLR2 infectados com *L. amazonensis* foi inferior a camundongos C57BL/6 controle. Os dados aqui obtidos da infecção de macrófagos humanos com *L. amanzonensis*, não indicaram alteração na expressão de TLR2, mais pesquisas são necessárias para a compreensão do TLR na infecção com *Leishmania*.

Os dados mostram que a fagocitose de amastigota de *L. amazonensis* pelos macrófagos humanos de sangue periférico não altera a expressão dos marcadores analisados, 1 hora após a internalização. Além disso, a baixa carga parasitária celular exibida em macrófagos após 24h de cultivo também não altera a expressão dos marcadores. Entretanto quando ocorre alta carga parasitária ocorre modulação negativa de alguns marcadores citados (CD11C, CD11B, CD18, CD14, CD54 e MHC classe II). Os resultados sugerem que a presença do amastigota no interior da célula pode interferir ou não, na expressão e/ou síntese de algumas moléculas favorecendo a sua sobrevivência dentro do macrófago.

Vários pesquisadores investigam a interação da *Leishmania* com a célula hospedeira, uma diversidade nas observações da expressão de marcadores celulares é notável, o que parece ser plausível devido às diferenças das espécies

utilizadas como das células hospedeiras. Este trabalho contribui para o aprofundamento da investigação da interação parasita-hospedeiro, fornecendo hipóteses sobre os mecanismos de escape da *Leishmania* no início da infecção, período que irá direcionar todo o processo infeccioso; e seu entendimento contribui para o futuro terapêutico e da imunização profilática para essa parasitose.

6. Conclusões

- 1- Macrófagos de paciente VHL exibem maior expressão de HIF-1 α que macrófagos de indivíduo saudável.
- 2- Não houve diferença na carga parasitária nos ensaios *in vitro* entre macrófagos VHL (humano ou murino) e macrófagos controle (humano ou murino).
- 3- Os camundongos GF1, mutantes VHL, infectados com *L. amazonensis* mostraram carga parasitária menor que camundongos C57BL/6.
- 4- A fagocitose de amastigota de *L. amazonensis* não alterou a expressão de nenhum marcador de superfície de macrófagos humanos de sangue periférico estudado (CD11C, CD11B, MHC classe II, CD80, CD86, CD14 e CD206).
- 5- A infecção de macrófagos humanos com baixa carga parasitária de *L. amazonensis* não alterou a expressão de nenhum marcador de superfície dos macrófagos humanos de sangue periférico estudado (CD11C, CD11B, MHC classe II, CD80, CD86, CD14 e CD206).
- 6- A infecção de macrófagos humanos com alta carga parasitária de *L. amazonensis* modulou negativamente a expressão dos seguintes marcadores: CD14, CD11B, CD11C, CD18, MHC classe II e CD54 e não alterou a expressão de CD80, CD86, CD206 e TLR-2.

7. Referências bibliográficas

ABANADES, D. R.; RAMÍREZ, L.; IBORRA, S.; SOTERIOU, K.; GONZÁLEZ, V. M.; BONAY, P.; ALONSO, C.; SOTO, M. Key role of the 3' untranslated region in the cell cycle regulated expression of the *Leishmania infantum* histone H2A genes: minor synergistic effect of the 5' untranslated region. **BMC Mol. Biol.** v. 10, n. 48, 2009.

ADUKPO, S.; KUSI, K. A.; OFORI, M. F.; TETTEH, J. K. A. AMOAKO-SAKYI, D.; GOKA, B. Q.; ADJEI, G. O.; EDOH, D. A.; AKANMORI, B. D.; GYAN, B. A.; DODOO, D. High plasma levels of soluble intercellular adhesion molecule (ICAM)-1 are associated with cerebral malaria. **PLOS ONE**. v. 8, n. 12, p. 1-6, 2013.

AFONSO, L.C.; SCOTT, P. Immune responses associated with susceptibility of C57BL/10 mice to *Leishmania amazonensis*. **Infect Immun.** v.61, n.7, p. 2952-2959, 1993.

AKILOV, O. E.; KASUBOSKI, R. E.; CARTER, C. R.; MCDOWELL, M. A. The role of mannose receptor during experimental leishmaniasis. **J. Leukoc. Biol.** v. 81, p. 1188-1196, 2007.

ALMEIDA, M. C.; CARDOSO, S. A.; BARRAL-NETTO, M. *Leishmania (Leishmania) chagasi* infection alters the expression of cell adhesion and costimulatory molecules on human monocyte and macrophage. **Int. J. Parasitol.** v. 33, p. 153-162, 2003.

ALMEIDA, O. L. S.; SANTOS, J. B. Avanços no tratamento da leishmaniose tegumentar do novo mundo nos últimos dez anos: uma revisão sistemática da literatura. Advances in the treatment of cutaneous leishmaniasis in the new world in the last ten years: a systematic literature review. **An. Bras. Dermatol.** v. 86, n. 3, p. 497-506, 2011.

ALEXANDER, J.; SATOSKAR, A. R.; RUSSELL, D. G. *Leishmania* species: models of intracellular parasitism. **J. Cell Sci.** v. 112, p. 2993-3002, 1999.

AMATO, V. S.; RABELLO, A.; ROTONDO-SILVA, A.; KONO, A.; MALDONADO, P. H.; ALVES, I. C.; FLOETER-WINTER, L. M.; AMANTO, V.; SHIKANAYIA-YASUDA, M. A. Successful treatment of cutaneous leishmaniasis with lipid formulations of amphotericin B in two immunocompromised patients. **Acta trop.** v. 92, n. 2, pl 127-132, 2004.

ANAND, N.; KANWAR, R. K.; DUBEY, M. L.; VAHISHTA, R. K.; SEHGAL, R.; VERMA, A. K.; KANWAR, J. R. Effect of lactoferrin protein on red blood cells and macrophages: mechanism of parasite-host interaction. **Drug Des. Devel. Ther.** v.9, p. 3821-3835, 2015.

ANTOINE, J. C.; JOUANNE, C.; LANG, T.; PRINA, E.; CHASTELLIER, C.; FREHEL, C. Localization of major histocompatibility complex class II molecules in phagolysosomes of murine macrophages infected with *Leishmania amazonensis*. **Infect. Immun.** v. 59, n. 3, p. 764-775, 1991.

ANTOINE, J. C.; LANG, T.; PRINA, E.; COURRET, N.; HELLIO, R. H-2M molecules, like MHC class II molecules, are targeted to parasitophorous vacuoles of *Leishmania*-infected macrophages and internalized by amastigotes of *L. amazonensis* and *L. mexicana*. **J. Cell Sci.** v. 112, p. 2559-2570, 1999.

ARAÚJO, A.P.; FREZZA, T. F.; ALLEGRETTI, S. M.; GIORGIO, S. Hypoxia, hypoxia-inducible factor-1 α and vascular endothelial growth factor in a murine model of *Schistosoma mansoni* infection. **Exp. Mol. Pathol.** v. 89, p. 327–33, 2010.

ARAÚJO, A. P.; ARRAIS-SILVA, W. W.; GIORGIO, S. Infection by *Leishmania amazonensis* in mice: A potential model for chronic hypoxia. **Acta Histochem.** v.114, p. 797– 804, 2012.

ARRAIS-SILVA, W. W.; PAFFARO JR, V. A.; YAMADA, A. T.; GIORGIO, S. Expression of hypoxia-inducible factor-1 α (HIF-1 α) in the cutaneous lesions of BALB/c mice infected with *Leishmania amazonensis*. **Exp. Mol. Pathology** v. 78, n. 1, p. 49-54, 2005.

ASSAN, G. S.; MOURAD, W. An unexped role for MHC class II. **Nat. Immunol.** v. 12, n. 5, p.375-376, 2011

AYRES, D. C; PINTO, L. A.; GIORGIO, S. Efficacy of pentavalent antimony, amphotericin B, and miltefosine in *Leishmania amazonensis*-infected macrophages under normoxic and hypoxic conditions. **J. Parasitol.**, v. 94, n. 6, p.1415-1417, 2008.

BARBIERI, C. L.; GIORGIO, S.; MERJAN, A. J.; FIGUEIREDO, E. N. Glycosphingolipid antigens of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* amastigotes identified by use of a monoclonal antibody. **Infect. Immun.**, v. 61, n. 5, p. 2131-2137, 1993.

BARONTINI, M.; DAHIA, P. L. M. VHL disease. **Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.** v. 24, p.401-413, 2010.

BASU, N.; SETT, R.; DAS, P. K. Down-regulation of mannose receptors on macrophages after infection with *Leishmania donovani*. **Biochem. J.** v. 277, p. 451-456, 1991.

BELLA, J.; KOLATKAR, P. R.; MARLOR, C.; GREVE, J. M.; ROSSMANN, M. G. The structure of the two amino-terminal domains of human ICAM-1 suggests how it function as a rhinovirus receptor and as an LFA-1 integrin ligand. **Proc. Natl. Acad. Sci.** v. 95, p. 4140-4145, 1998.

BÉROUD, C.; JOLY, D.; GALLOU, C.; STAROZ, F.; ORFANELLI, M. T.; JUNIEN, C. Software and database for the analysis of mutations in the VHL gene. **Nucleic Acids Res.** v. 26, n. 1, p. 256-258, 1998.

BLACKWELL, J. M.; EZEKOWITZ, R. A. B.; ROBERTS, M. B.; CHANNON, J. Y.; SIM, R. B.; GORDON, S. Macrophage complement and lectin-like receptors bind *Leishmania* in the absence of serum. **J. Exp. Med.**, v. 162, p.324-331, 1985.

BOSETTO, M. C.; GIORGIO, S. *Leishmania amazonensis*: multiple receptor-ligand interactions are involved in amastigote infection of human dendritic cells. **Exp. Parasitol.** v. 116, p.306-310, 2007.

BRITO, M. E. F.; ANDRADE, M. S.; DANTAS-TORRES, F.; RODRIGUES, E. H. G.; CAVALCANTI, M. P.; ALMEIDA, A. M. P. BRANDÃO-FILHO, S. P. Cutaneous leishmaniasis in northeastern Brazil: a critical appraisal of studies conducted in State of Pernambuco. Leishmaniose cutânea no nordeste do Brasil: uma avaliação crítica dos estudos realizados no Estado de Pernambuco. **Rev. Soc. Bras. Med.Trop.** v. 45, n. 4, p. 425-429, 2012.

BRODSKYN, C. I.; DEKREY, G.; TITUS, R. G. Influence of costimulatory molecules on immune response to *Leishmania major* by human cells in vitro. **Infect. Immun.** v. 69, n. 2, p. 665-672, 2001.

CHAWLA, B.; KUMAR, R. R.; TYAGI, N.; SUBRAMANIAN, G.; SRINIVASAN, N.; PARK, M. H.; MADHUBALA, R. A unique modification of the eukaryotic initiation factor 5A shows the presence of the complete hypusine pathway in *Leishmania donovani*. **PLoS ONE.** v. 7, n. 3, p. 1-12, 2012.

CLAUSEN, B. E.; BURKHARDT, C.; REITH, W.; RENKAWITZ, R.; FÖRSTER, I. Conditional gene targeting in macrophages and granulocytes using LysMcre mice. **Transgenic Res.** v. 8, n. 4, p.265-277, 1999.

COLHONE, M. C.; ARRAIS-SILVA, W. W.; PICOLLI, C.; GIORGIO, S. Effect of hypoxia on macrophage infection by *Leishmania amazonensis*. **J. Parasitol.** v. 90, p. 510-515, 2004.

CRAMER, T.; YAMANISHI, Y.; CLAUSEN, B. E.; FORSTER, I.; PAWLINSKI, R.; MACKMAN, N.; HAASE, V. H.; JAENISCH, R.; CORR, M.; NIZET, V.; FIRESTEIN, G. S.; GERBER, H. P.; FERRARA, N.; JOHNSON, R. S. HIF-1 Is Essential for myeloid cell-mediated inflammation. **Cell Press.** v. 112, p.645-657, 7 mar. 2003.

DAVISON, R. N. Leishmaniasis. **Med.** v. 33, n. 8, p. 43-46, 2005.

DEGROSSOLI, A.; COLHONE, M. C.; ARRAIS-SILVA, W. W.; GIORGIO, S. Hypoxia modulates expression of the 70-kD heat shock protein and reduces *Leishmania* infection in macrophages. **J. Biomed. Sci.** v. 4, n. 10, p. 1-15, 2004.

DEGROSSOLI, A.; BOSETTO M.; LIMA C. B. A.; GIORGIO S. Expression of hypoxia-inducible factor 1alpha in mononuclear phagocytes infected with *Leishmania amazonensis*. **Immunol. Lett.**, v. 114, n. 2, p.119-25, 2007.

EGUSA, H.; NIKAWA, H.; MAKIHIRA, S.; JEWETT, A.; YATANI, H.; HAMADA, T. Intercellular adhesion molecule 1-depedent activation of interleukin 8 expression in *Candida albicans* – infected huma gingival epithelial cells. **Infect. Immun.** v. 73, n. 1, p. 622-626, 2005.

FERREIRA, M.C.; GAMEIRO, J.; NAGIB, P. R.; BRITO, V. N.; VASCONCELLOS E. C.; VERINAUD. L. Effect of low intensity helium–neon (HeNe) laser irradiation on experimental paracoccidioidomycotic wound healing dynamics. **Photochem Photobiol.** v. 85, p. 227–33, 2009.

FIGUEIREDO, A. B.; SERAFIM, T. D.; MARQUES-DA-SILVA, E. A.; MEYER-FERNANDES, J. R.; AFONSO, L. C. C. *Leishmania amazonensis* impairs DC function by inhibiting CD40 expression via A_{2B} adenosine receptor activation. **Eur. J. Immunol.** v. 42, p. 1203-1215, 2012.

FIGUEIREDO, M. M.; AMORIM, I. F. G.; PINTO, A. J. W.; BARBOSA, V. S.; PINHEIRO, L. J.; DEOTI, B.; FARIA, A. M. C.; TAFURI, W. L. Expression of toll-like receptors 2 and 9 in cells of dog jejunun and colon naturally infected with *Leishmania infantum*. **BMC Immunol.** v. 14, n. 22, p. 1-12, 2013.

FORTÉA, J.O.; PRINA, E.; LLAVE, E. L.; LECOEUR, H.; LANG. T.; MILON, G . Unveiling pathways used by *Leishmania amazonensis* amastigotes to subvert macrophage function. **Immunol. Rev.** v. 219, p. 66-74, 2007.

GIORGIO, S.; LINARES, E.; ISCHIROPOULOS, H.; VON ZUBEN, F. J.; YAMADA, A.; AUGUSTO, O. *In vivo* formation of electron paramagnetic resonance-detectable

nitric oxide and nitrotyrosine is not impaired during murine leishmaniasis. **Infect. Immun.** v. 66, p. 807-814, 1998

GNARRA, J. R.; TORY, K.; WENG, Y.; SCHMIDT, L.; WEI, M. H.; LATIF, F.; LIU, S.; CHEN, F.; DUH, F. M.; LUBENSKY, I.; DUAN, D. R.; FLORENCE, C.; POZZATTI, R.; WALTHER, M. M.; BANDER, N. H.; GROSSMAN, H. B.; BRAUCH, H.; POMER, S.; BROOKS, J. D.; ISAACS, W. B.; LERMAN, M. I.; ZBAR, B.; LINEHAN, W. M. Mutations of the VHL tumour suppressor gene in renal carcinoma. **Nat. Genet.** v. 7, p. 85-90, 1994.

GOMY, I.; MOLFETTA, G. A.; BARRETO, E. A.; FERREIRA, C. A.; ZANETTE, D. L.; CASALI-DA-ROCHA, J. C.; SILVA, W. A. Jr. Clinical and molecular characterization of brasilian families with von Hippel Lindau disease: a need for delineating genotype-phenotype correlation. **Fam. Cancer.** v. 9, p. 635-642, 2010.

GONÇALVES, R.; VIEIRA, E. R.; MELO, M. N.; GOLLOB, K. J.; MOSSER, D. M.; TAFURI, W. L. A sensitive flow cytometric methodology for studying the binding of *L. chagasi* to canine peritoneal macrophages. **BMC Infectious Diseases.** v. 5, n. 30, p. 1-10, 2005.

GONTIJO, B.; CARVALHO, M. L. R. Leishmaniose tegumentar americana. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** v. 36, n. 1, p. 71-80, 2003.

GORDAN, J.D.; SIMON, M. C.; Hypoxia-inducible factors: central regulators of the tumor phenotype. **Curr. Opin. Genet. Dev.** v. 17, n. 1, p. 71-7, 2007.

GOTO, H.; LINDOSO, L. Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. **Expert. Rev. Anti Infect. Ther.** v. 8, n. 4, p. 419-433, 2010.

GRIMALDI, G.; TESH, R. Leishmaniasis of the new world: current concepts and implications for future research. **Clin. Microbiol. Rev.** v.6, n. 3, p. 230-250, 1993.

GUERRA, C. S.; SILVA, R. M. M.; CARVALHO, L. O. P.; CALABRESE, K. S.; BOZZA, P. T.; CÔRTE-REAL, S. Histopathological analysis of initial cellular response in TLR-2 deficient mice experimentally infected by *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. **Int. J. Exp. Path.** v. 91, p. 451-459, 2010.

GUY, R. A.; BELOSEVIC, M. Comparison of receptors required for entry of *Leishmania major* amastigotes into macrophages. **Infect. Immun.** v. 61, n. 4, p. 15553-1558, 1993.

HAASE, V. H.; GLICKMAN, J. N.; SOCOLOVSKY, M.; JAENISCH, R. Vascular tumors in livers with targeted inactivation of the von Hippel-Lindau tumor suppressor. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.**, v. 98, n. 4, p.1583-1588, 2001

HAEBERLE, H. A.; DÜRRSTEIN, C.; ROSENBERGER, P.; HOSAKOTE, Y. M.; KUHLCHE, J.; KEMPF, V. A.; GAROFALO, R. P.; ELTZSCHIG, H. K. Oxygen-independent stabilization of hypoxia inducible factor (HIF)-1 during RSV infection. **PLoS One.** v. 3, n. 10, p. 1-11, 2008.

HANDMAN, E. Cell biology of *Leishmania*. **Adv. Parasitol.** v. 44, p. 1-39, 1999.

HANDMAN, E. Leishmaniasis: current status of vaccine development. **Clin. Microbiol. Rev.** v.14, n. 2, p. 229-243, 2001.

HAROON, Z. A.; RALEIGH, J. A.; GREENBERG, C. S.; DEWHIRST, M. W. Early wound healing exhibits cytokine surge without evidence of hypoxia. **Ann. Surg.** v. 231, n.1, p. 137-147, 2000.

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

HESPANHOL, R. C.; SOEIRO, M. N. C.; MEUSER, M. B.; MEIRELLES, M. N. S. L.; CÔRTE-REAL, S. The expression of mannose receptors in skin fibroblast and their involvement in *Leishmania (L.) amazonensis* invasion. **J. Histochem. Cytochem.**, v.53, n. 1, p.35-44, 2005.

HOFFMAN, M. A.; OHH, M.; YANG, H.; KLCO, J. M.; IVAN, M.; KAE LIN, W. G. Von Hippel-Lindau disease protein mutants linked to type 2c VHL disease preserve the ability to downregulate HIF. **Hum. Mol. Genet.** v. 10, n. 10, p.1019-1027, 2001.

KAE LIN, W. G. Von Hippel-Lindau disease. **Ann. Rev. Pathol.: Mechanisms Of Disease.** v. 2, p.145-173, 2007.

KAE LIN, W. G. Jr.; RATCLIFFE, P. J. Oxygen sensing by metazoans: the central role of the HIF hydroxylase pathway. **Mol. Cell.** v. 30, p. 393–402, 2008.

KAUR, G.; RAJPUT, B. Comparative analysis of the omics Technologies used to study antimonial, amphotericin B, and pentamidine resistance in *Leishmania*. **J. Parasitol. Res.** p. 1-11, 2014.

KAYE, P.; SCOTT, P. Leishmaniasis: complexity at the host-pathogen interface. **Nat. Ver. Microbiol.** v.9, n. 8, p. 604-15, 2011.

KOH, M. Y.; SPIVAK-KROIZMAN, T. R.; POWIS, G. HIF-1 regulation: not so easy come, easy go. **Trends Biochem Sci.** v. 33, n. 11, p. 526-34, 2008.

LANG, T.; ANTOINE, J. C. Localization of MHC class II molecules in murine bone marrow-derived macrophages. **Immunol.** v. 74, p. 199-205, 1991.

LANG, T.; CHASTELLIER, C. FREHEL, C.; HELLIO, R.; METEZEAU, P.; LEO, S. S.; ANTOINE, J. C. Distribution of MHC class I and MHC class II molecules in macrophages infected with *Leishmania amazonensis*. **J. Cell Sci.** v. 107, p. 69-82, 1994a.

LANG, T.; HELLIO, R.; KAYE, P. M.; ANTOINE, J. C. *Leishmania donovani*- infected macrophages: characterization of the parasitophorous vacuole and potential role of this organelle in antigen presentation. **J. Cell Sci.** v.107, p. 2137-2150, 1994.

LEAO, S. S.; LANG, T.; PRINA, E.; HELLIO, R.; ANTOINE, J. C. Intracellular *Leishmania amazonensis* amastigotes internalize and degrade MHC class II molecules of their host cells. **J. Cell Sci.** v. 108, p. 3219-3231, 1995.

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

LEEPER-WOODFORD, S. K.; DETMER, K. Acute hypoxia increases alveolar macrophage tumor necrosis factor activity and alters NF-kappaB expression. **Am. J. Physiol.**, v. 276, p. L909-L916, 1999.

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

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 Radic. Biol. Med.** v. 30, n. 11, p. 1234-1242, 2001.

LINEHAN, S. A.; MARTÍNEZ-POMARES, L.; GORDON, S. Macrophage lectins in host defence. **Microbes Infect.** n. 2, p.279-288, 2000.

LIU, D.; UZONNA, E. The early interaction of *Leishmania* with macrophages and dendritic cells and its influence on the host immune response. **Front. Cell. Infect. Microbiol.** v.2, n. 83, p. 1-8, 2012.

LONER, R. R.; GLENN, G.; WALTHER, M.; CHEW, E. Y.; LIBUTTI, S. K.; LINEHAN W. M.; OLDFIELD, E. H. Von Hippel-Lindau disease. **Lancet.** v.361, p. 2059-2067, 2003.

LOVE, D. C.; KANE, M. M.; MOSSER, D. M. *Leishmania amazonensis*: the phagocytosis of amastigotes by macrophages. **Exp. Parasitol.** v. 88, p. 161-171, 1998.

MAHER, E. R.; YATES, J. R. W.; FERGUSON-SMITH, M. A. Statistical analysis of the two stage mutation model in von Hippel-Lindau disease, and in sporadic cerebellar haemangioblastoma and renal cell carcinoma. **J. Med. Genet.** v. 27, p. 311-314, 1990.

MAHER, E. R.; YATES, J. R. W. Familia renal cell carcinoma: clinical and molecular genetic aspects. **Br. J. Cancer.** v. 63, p. 176-179, 1991.

MAHER, E. R.; MOORE, A. T. Von hippel lindau disease. **Br. J. Ophthalmol.** v. 76, p.743-745, 1992

MAXWELL, P. H.; WIESENER, M. S.; CHANG, G. W.; CLIFFORD, S. C.; VAUX, E. C.; COCKMAN, M. E.; WYKOFF, C. C.; PUGH, C. W.; MAHER, E. R.; RATCLIFFE, P. The tumour supressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis. **Nat.** v. 399, p. 271-275, 1999.

MISTÉRIO DA SAÚDE. Leishmaniose tegumentar americana – casos confirmados notificados no sistema de informação e agravos de notificação – Sinan net.

Disponível em:

<http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/tabnet/tabnet?sinannet/lta/bases/ltabrnet.def>

Acesso em 30 de maio de 2015.

MONDOLFI, A. E. P.; DUFFEY, G. B.; HORTON, L. E.; TIRADO, M.; JAIMES, O.R.; PEREZ-ALVARES, A.; ZERPA, O. Intermediate/borderline disseminated cutaneous leishmaniasis. **Int. J. Dermatol.** v. 52, p. 446-455, 2013.

MORAES, M. A. P.; SILVEIRA, F. Histopatologia da forma localizada de leishmaniose cutânea por *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. **Rev. Inst. Med. Trop.** v. 36, n. 5, p. 459-463, 1994.

MORAIS, C. G. V.; LIMA, A. K. C.; TERRA, R.; SANTOS, R. F.; DA-SILVA, S. A. G.; DUTRA, P. M. L. The dialogue of the host-parasite relationship: *Leishmania* spp. and *Trypanosoma cruzi* infection. **BioMed Res. Int.** p. 1-19, 2015.

MURAILLE, E.; TREZ, C. D.; BRAIT, M.; BAETSELIER, P. D.; LEO, O.; CARLIER, Y. Genetically resistant mice lacking MyD88 adapterprotein display a high susceptibility to *Leishmania major* infection associated with a polarized Th2 response. **J. Immunol.** v. 170, p. 4237-4241, 2003.

MURDOCH, C.; MUTHANA, M.; LEWIS, C. E. Hypoxia or *in situ* normoxia: the stem cell paradigm. **J. Immunol.**, v. 175, p.6257-6263, 2005.

MURRAY, H. Mononuclear cell recruitment, granuloma assembly, and response to treatment in experimental visceral leishmaniasis: intracellular adhesion molecule 1-dependent and – independent regulation. **Infect. Immun.** v. 68, n. 11, p. 6294-6299, 2000.

MURRAY, H. W.; BERMAN, J. D.; DAVIES, C. R.; SARAIVA, N. G. Advances in leishmaniasis. **Lancet.** v. 366, p. 1561–1577, 2005.

NEUMANN, H. P. H.; BENDER, B. U. Genotype-phenotype correlations in von Hippel-Lindau disease. **J. Int. Med.** v. 243, p.541-545, 1998.

NIZET, V.; JOHNSON, R. S. Interdependence of hypoxic and innate immune responses. **Nat. Rev. Immunol.** v. 9, n. 9, p, 609-17, 2009

OVERATH, P.; AEBISCHER, T. Antigen presentation by macrophages harboring intravesicular pathogens. **Parasitol. Today.** v. 15, n. 8, p. 325-332, 1999.

PEYSSONNAUX, C.; DATTA, V.; CRAMER, T.; DOEDENS, A.; THEODORAKIS, E. A.; GALLO, R. L.; HURTADO-ZIOLA, N.; NIZET, V.; JOHNSON, R. S. Hif-1 α expression. Regulates the bactericidal capacity of phagocytes. **J. Clin. Invest.** v. 115, n. 7, p. 1806-1815, 2005.

PODINOSVKAIA, M.; DESCOTEAUS, A. *Leishmania* and the macrophage: a multifaceted interaction. **Future Microbiol.** v.10, n. 1, p. 111-129, 2015.

RATH, S.; TRIVELIN, L. A.; IMBRUNITO, T. R.; TOMAZELA, D. M.; JESÚS, M. N.; MARZAL, P. C. Antimoniais empregados no tratamento da leishmaniose: estado da arte. **Quim. Nova.** v. 26, n. 4, p. 550-555, 2003.

REIMÃO, J. Q.; TRINCONI, C. T.; YOKOYAMA-YASUNAKA, J. K.; MIGUEL, D. C.; KALIL, S. P.; ULIANA, S. R. B. Parasite burden in *Leishmania (Leishmania)* amazonensis-infected mice: validation of luciferase as a quantitative tool. **J. Microbiol. Methods.** v. 93, p. 95-101, 2013.

REIS, L. C.; BRITO, M. E. F.; SOUZA, M. A.; PEREIRA, V. R. A. Mecanismos imunológicos na resposta celular e humoral na leishmaniose tegumentar americana. **Rev. Pat.Trop.** v. 35, n. 2, p. 103-115, 2006.

REITHINGER, R.; DUJARDIN, J-C.; LOUZIR, H.; PIRMEZ, C.; ALEXANDER, B.; BROOKER, S. Cutaneous leishmaniasis. **Lancet. Infect. Dis.** v.7, p. 581-96, 2007.

RICHARDS, F. M.; CROSSEY, P. A.; PHIPPS, M. E.; FOSTER, K.; LATIF, F.; EVANS, G.; SAMPSON, J.; LERMAN, M. I.; ZBAR, B.; AFFARA, N. A.; FERGUSON-SMITH, M. A.; MAHER, E. R. Detailed mapping of germline deletions of the von Hippel-Lindau disease tumor suppressor gene. **Hum. Mol. Genet.** v. 3, p. 595-8, 1994.

ROATT, B. M.; AGUIAR-SOARES, R. D. O.; COURA-VITAL, W.; KER, H. G.; MOREIRA, N. D.; VITORIANO-SOUZA, J.; GIUNCHETTI, R. C.; CARNEIRO, C. M.; REIS, A. B. Immunotherapy and immunochemotherapy in visceral leishmaniasis: promising treatments for this neglected disease. **Front. Immunol.** v. 5, n. 272, p. 1-12, 2014.

ROBINSON, C. M.; OHH, M. The multifaceted von Hippel-Lindau tumour suppressor protein. **FEBS Lett.** v. 588, p. 2704-2711, 2014.

ROGERS, K. A.; DEKREY, G. K.; MBOW, M. L.; GILLESPIE, R. D.; BRODSKY, C. I.; TITUS, R. G. Type 1 and type 2 responses to *Leishmania major*. **FEMS Microbiol. Lett.** v. 209, p. 1-7, 2002.

SAMPAIO, W. M.; MOURA, E. P.; ARRUDA, F. C. S.; RIBEIRO, R. R.; ALVES, C. F.; MELO, F. A.; FERNANDES, A. P. S. M.; MICHALICK, M. S. M.; MELO, M. N.; TAFURI, W. L.; TAFURI, W. L. *In vitro* binding and survival assays of *Leishmania* parasites to peripheral blood monocytes and monocyte-derived macrophages isolated from dogs naturally and experimentally infected with *Leishmania (Leishmania) chagasi*. **Bmc Vet. Res.** v. 11, n. 3, p.1-9, 2007.

SEMENZA, G. L. Hypoxia-inducible factor 1: oxygen homeostasis and disease pathophysiology. **Trends. Mol. Med.**, v. 7, n. 8, p. 345-350, 2001.

SEMENZA, G.L. Regulation of oxygen homeostasis by hypoxia-inducible factor 1. **Physiol.** v. 24, p. 97-106, 2009.

SHWEIKI, D.; ITIN, A.; SOFFER, D.; KESHET, E. Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. **Nat.** v. 359, n. 6398, p. 843-845, 1992.

SIGNORINO, G.; MOHAMMADI, N.; PATANÈ, F.; BUSCETTA, M.; VENZA, M.; VENZA, I.; MASCUSO, G.; MIDIRI, A.; ALEXOPOULOU, L.; TETI, G.; BIONDO, C.; BENINATI, C. Role of toll-like receptor 13 in innate immune recognition of group B Streptococci. **Infect. Immun.** v. 82, n. 12, p. 5013-5022, 2014.

SILVEIRA, F. T.; LAINSON, R.; CORBETT, C. E. Clinical and immunopathological spectrum of american cutaneous leishmaniasis with special reference to the disease in Amazonian Brasil – a review. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** v. 99, n. 3, p. 239-251, 2004.

SILVEIRA, F. T.; LAINSON, R.; GOMES, C. M. C.; LAURENTI, M. D.; CORBETT, C. E. P. Immunopathogenic competences of *Leishmania (V.) braziliensis* and *L. (L.)*

amazonensis in American cutaneous leishmaniasis. **Parasit. Immunol.** v. 31, p. 423-431, 2009.

SIMS, K. B. Von Hippel Lindau disease: gene to bedside. **Curr. Opin. Neurol.** v. 14, p.695-703, 2001.

SINGH, A. D.; SHIELDS, C. L.; SHIELDS, J. A. Von Hippel-Lindau disease. **Surv. Ophthalmol.** v. 46, n. 2, p.117-142, 2001

SINGH, A. K.; MUKHOPADHYAY, C.; BISWAS, S.; SINGH, V. K.; MUKHOPADHYAY, C. K. Intracellular pathogen *Leishmania donovani* activates hypoxia inducible factor-1 by dual mechanism for survival advantage within macrophage. **Plos one.** v. 7, n. 6, p. 1-13, 2012.

SLADEK, Z.; RYSANEK, D. Expression of macrophage CD14 receptor in the course of experimental inflammatory responses induced by lipopolysaccharide and myramyl dipeptide. **Annu. Rev. Immunol.**, n. 53, p.347-357, 2008.

SPIEGEL, M. R. **Estatística.** São Paulo: Mcgraw-hill do Brasil, 1974.

STAFFORD J. L.; NEUMANN, N. F.; BELOSEVIC, M. Macrophage-mediated innate host defense against protozoan parasites. **Crit. Rev. Microbiol.** v. 28, n. 3, p. 187-248, 2002.

TAYLOR, P. R.; MARTINEZ-POMARES, L.; STACEY, M.; LIN, H-H.; BROWN, G. D.; GORDON, S. Macrophage Receptors and Immune Recognition. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 23, p.901-944, 2005.

TULADHAR, R.; NATARAJAN, G.; SATOSKAR, A. R. Role of Co-stimulation in Leishmaniasis. **Int. J. Biol. Sci.** v. 7, n. 9, p.1382-1390, 2011.

TUON, F. F.; AMATO, V. S.; BACHA, H. A.; ALMUSAWI, T.; DUARTE, M. I.; NETO, V. A. Toll-like receptors and leishmaniasis. **Infect. Immun.** v. 76, n. 3, p. 866-872, 2008.

UENO, N.; BRATT, C. L.; RODRIGUEZ, N. E.; WILSON, M. E. Differences in human macrophage receptor usage, lysosomal fusion kinetics and survival between logarithmic and metacyclic *Leishmania infantum chagasi* promastigotes. **Cell Microbiol.** v. 11, n. 12, p. 1827-1841, 2009.

UENO, N.; WILSON, M. E. Receptor-mediated phagocytosis of *Leishmania*: implications for intracellular survival. **Trends Parasitol.** v. 8, n. 28, p.335-344, ago. 2012

VARGA, G.; BALKOW, S.; WILD, M. K.; STADTBAEUMER, A.; KRUMMEN, M.; ROTHOEFT, T.; HIGUCHI, T.; BEISSERT, S.; WETHMAR, K.; SCHARFFETTER-KOCHANKE, K.; VESTWEBER, D.; GRABBE, S. Active MAC-1 (CD11b/CD18) on DCs inhibits full T-cell activation. **Blood.** v. 109, n. 2, p. 661-669, 2007.

VEER, M. J.; CURTIS, J. M.; BALDWIN, T. M.; DIDONATO, J. A.; SEXTON, A.; MCCONVILLE, M. J.; HANDMAN, E.; SCHOFIELD. MyD88 is essential for clearance of *Leishmania major*: possible role for lipophosphoglycan and toll-like receptor 2 signaling. **Eur. J. Immunol.** v. 33, p. 2822-2831, 2003.

VIRIYAKOSOL, S.; MATHISON, J. C.; TOBIAS, P. S.; KIRKLAND, T. N. Structure-function analysis of CD14 as a soluble receptor for lipopolysaccharide. **J. Biol. Chem.** v.275, n.5, p. 3144-3149, 2000.

WALMSLEY, S. R.; COWBURN, A. S.; CLATWORTHY, M. R.; MORRELL, N. W.; ROPER, E. C.; SINGLETON, V.; MAXWELL, P.; WHYTE, M. K. B.; CHILVERS, E. R. Neutrophils from patients with heterozygous germline mutations in the von Hippel Lindau protein (pVHL) display delayed apoptosis and enhanced bacterial phagocytosis. **Blood.** v. 108, n. 9, p. 3176-3178, 2006.

WENGER, R. H. Cellular adaptation to hypoxia: O₂-sensing protein hydroxylases, hypoxia-inducible transcription factors, and O₂-regulated gene expression. **FASEB J.** v. 16, p. 1151–1162, 2002.

WILSON, M. R.; PEARSON, R. D. Roles of CR3 and mannose receptors in the attachment and ingestion of *Leishmania donovani* by human mononuclear phagocytes. **Infect. Immun.** v. 56, n. 2, p. 363-369, 1988.

WYLER, D. J.; SYPEK, J. P.; MCDONALD, J. In vitro parasite-monocyte interactions in human leishmaniasis: possible role of fibronectin in parasite attachment. **Infect. Immun.** v.49, n. 2, p. 305-311, 1985.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Leishmaniasis. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/en/>. Acesso em 30 maio de 2015.

XIE, G. Q.; JIANG, J. X.; CHEN, Y. H.; LIU, D. W.; ZHU, P. F.; WANG, Z. GUO. Induction of acute hepatic injury by endotoxin in mice. **Hepatobiliary Pancreat Dis. Int.** v. 1, n. 4, p. 558-564, 2002.

YAMAMOTO, T.; EBE, Y.; HASEGAWA, G.; KATAOKA, M.; YAMAMOTO, S. NAITO, N. Expression of scavenger receptor class A and CD14 in lipopolysaccharide-induced lung injury. **Patholo. Int.** v. 49, n. 11, p. 983-992, 1999.

YASHIRO, M. ICAM1 (intercellular adhesion molecule 1 (CD54), human rhinovirus receptor. **Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol.** v. 13, n. 6, p. 415-416, 2009.

YUN, J. K.; McCORMICK, 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.**, v. 94, p.13903-13908, 1997.

ZENIAN, A.; ROWLEST, P.; GINGELL, D. Scanning electron-microscopic study of the uptake of *Leishmania* parasites by macrophages. **J. Cell Sci.** v. 39, p.187-199, 1979.

ZINKERNAGEL, A; JOHNSON, R. S; NIZET, V. Hypoxia inducible factor (HIF) function in innate immunity and infection. **J. Mol. Med.** v. 85, n. 12, p.1339-1346, 2007.

ZINKERNAGEL, A. S.; PEYSSONNAUX, C.; JOHNSON, R. S.; NIZET, V. Pharmacologic augmentation of hypoxia-inducible factor - 1alfa with mimosine boosts the bactericidal capacity of phagocytes. **The J. Infect. Dis.** v. 197, p. 214-217, 2008.

8. Anexos

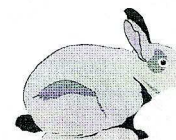
Profa. Dra. Rachel Meneguello
Presidente
Comissão Central de Pós-Graduação
Declaração

As cópias de artigos de minha autoria ou de minha co-autoria, já publicados ou submetidos para publicação em revistas científicas ou anais de congressos sujeitos a arbitragem, que constam da minha Dissertação/Tese de Mestrado/Doutorado, intitulada **Avaliação da resistência/susceptibilidade a Leishmania amazonensis em macrófagos mutantes para o gene Von Hippel Lindau e estudo da expressão de marcadores de superfície de macrófagos frente à infecção com L. amazonensis**", não infringem os dispositivos da Lei n.º 9.610/98, nem o direito autoral de qualquer editora.

Campinas, 05/11/2015

Assinatura : Solange dos Santos Costa
Nome do(a) autor(a): **Solange dos Santos Costa**
RG n.º 41.205.053

Assinatura : Selma Giorgio
Nome do(a) orientador(a): **Selma Giorgio**
RG n.º 11.373.018-4



CEUA/Unicamp

Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA/Unicamp

CERTIFICADO

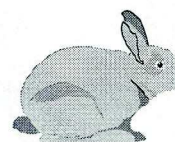
Certificamos que os projetos de pesquisa intitulados Avaliação da expressão do fator induzido por hipóxia (HIF-1 α) e resistência/susceptibilidade a Leishmania amazonensis em macrófagos de indivíduos com a síndrome de Von Hippel Lindau (VHL) (protocolo CEUA/UNICAMP nº 3310-1) e Avaliação da expressão do fator induzido por hipóxia (HIF-1 α) e resistência/susceptibilidade a Leishmania amazonensis em macrófagos mutantes para o gene Von Hippel Lindau (protocolo CEUA/UNICAMP nº 3738-1), de responsabilidade da Profa. Dra. Profa. Dra. Selma Giorgio e Solange dos Santos Costa, tiveram seus títulos alterados para Avaliação da resistência/susceptibilidade a Leishmania amazonensis em macrófagos mutantes para o gene Von Hippel Lindau e estudo da expressão de marcadores de superfície de macrófagos frente à infecção com L. amazonensis tendo em vista a necessidade de revisão do título da tese de maneira a melhor abranger os estudos realizados.

Este documento é válido apenas se apresentado junto com os certificados emitidos originalmente pela CEUA/UNICAMP, sendo 3310-1 emitido em 27/04/2014 e 3738-1 emitido em 02/02/2015.

Campinas, 25 de janeiro de 2016.

Profa. Dra. Liana M. C. Verinaud
Presidente

Fátima Alonso
Secretária Executiva



CEUA/Unicamp

**Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA/Unicamp**

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto "Avaliação da expressão do fator induzido por hipóxia (HIF-1 α) e resistência/susceptibilidade a Leishmania amazonensis em macrófagos de indivíduos com a síndrome de Von Hippel Lindau (VHL)" (protocolo nº 3310-1), sob a responsabilidade de Profa. Dra. Selma Giorgio / Solange dos Santos Costa, está de acordo com os **Princípios Éticos na Experimentação Animal** adotados pela **Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL)** e com a legislação vigente, **LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008**, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, e o **DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009**.

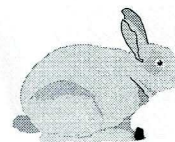
A aprovação pela CEUA/UNICAMP não dispensa autorização prévia junto ao **IBAMA, SISBIO** ou **CIBio**.

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP - em 27 de abril de 2014.

Campinas, 27 de abril de 2014.

Prof. Dr. Alexandre Leite Rodrigues de Oliveira
Presidente

Fátima Alonso
Secretária Executiva



CEUA/Unicamp

Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA/Unicamp

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto "Avaliação da expressão do fator induzido por hipóxia (HIF-1 α) e resistência/susceptibilidade a Leishmania amazonensis em macrófagos mutantes para o gene Von Hippel Lindau" (protocolo nº 3738-1), sob a responsabilidade de Profa. Dra. Selma Giorgio / Solange dos Santos Costa, está de acordo com os **Princípios Éticos na Experimentação Animal** adotados pela **Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL)** e com a legislação vigente, **LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008**, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, e o **DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009**.

A aprovação pela CEUA/UNICAMP não dispensa autorização prévia junto ao **IBAMA, SISBIO** ou **CIBio**.

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP - em 02 de fevereiro de 2015.

Campinas, 02 de fevereiro de 2015.

Prof. Dr. Alexandre Leite Rodrigues de Oliveira
Presidente

Fátima Alonso
Secretária Executiva

PROJETO DE PESQUISA

Título: Avaliação da expressão do fator induzido por hipóxia (HIF-1 α) e das atividades funcionais de macrófagos de portadores da síndrome de Von Hippel Lindau (VHL).

Pesquisador: Solange dos Santos Costa

Versão: 2

Instituição: Faculdade de Ciências Médicas - UNICAMP

CAAE: 00574312.6.0000.5404

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Número do Parecer: 15620

Data da Relatoria: 02/05/2012

Apresentação do Projeto:

A síndrome de Von Hippel Lindau (VHL) é uma doença genética autossômica dominante, causada por mutações germinativas e somáticas no gene supressor tumoral VHL, que caracteriza a predisposição hereditária a diversas neoplasias tanto benignas quanto malignas. O produto do gene VHL, a proteína VHL (pVHL) é amplamente expressa em tecidos humanos normais, exceto em células endoteliais. As células desprovidas da pVHL não conseguem degradar HIF-1 α e, conseqüentemente, este se transloca para o núcleo e transcricionalmente ativa genes que contêm elementos de resposta a hipóxia. Estes genes estão envolvidos na glicose anaeróbica e angiogênese. Para confirmar o fenótipo parcial de hipóxia em neutrófilos VHL, os pesquisadores buscaram a evidência direta da ativação do HIF-1 α pela detecção, por PCR, de um gene alvo de HIF, PHD3, sendo este presente em neutrófilos VHL, mas ausente em neutrófilos controle. Esses dados não foram avaliados em macrófagos de pacientes com VHL. Os autores sugerem que HIF 1 α /via VHL regularia a resposta imune inata em humanos e que pacientes com VHL apresentam anomalias funcionais coerentes com a exacerbação da sinalização do HIF-1, o que justifica seu interesse na avaliação da expressão do HIF-1 α e a capacidade infectiva de *L. amazonensis* em macrófagos de pacientes com VHL.

Objetivo da Pesquisa:

Contribuir para a compreensão do papel do HIF-1 α nos macrófagos primários de portadores da síndrome de VHL. Os objetivos específicos são: Cultivar macrófagos (de sangue periférico) de pacientes VHL. Avaliar a expressão de HIF-1 α em macrófagos VHL em condições de normóxia e hipóxia. Avaliar a hipóxia celular pelo marcador pimonidazol em macrófagos VHL. Avaliar a capacidade de infecção com *L. amazonensis* de macrófagos VHL em condições normóxia e hipóxia. Avaliar a apoptose de macrófagos VHL.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Não há benefícios diretos para os sujeitos de pesquisa e indivíduos controle. Os maiores desconfortos se referem à coleta de sangue periférico (20ml) que será realizada por pessoa devidamente treinada e ocorrerá por três vezes em intervalos de 30 dias.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de estudo "in vitro" realizado a partir de amostras de sangue periférico de 20 sujeitos de pesquisa com a síndrome de Von Hippel Lindau (VHL) e quatro controles (indivíduos normais), para cultura de macrófagos. Serão avaliadas a expressão do fator induzido por hipóxia (HIF-1 α) nas culturas de macrófagos utilizando as técnicas de imunofluorescência indireta (IFI), Western blotting e a expressão de mRNA de HIF-1 α pelo método de RT-PCR. A hipóxia celular será avaliada com o marcador de hipóxia, pimonidazol por IFI, a apoptose celular pelo ensaio TUNEL (TdT-mediated dUTP Nick-End Labeling) e a infecção destes macrófagos com o parasita *Leishmania amazonensis* pela técnica de fixação e coloração. Pelo menos três repetições de cada um dos ensaios descritos acima serão realizados separadamente e os resultados de cada experimento serão expressos pela média + desvio padrão. As diferenças significativas entre os grupos experimentais serão analisadas usando-se o Teste T Student. Os sujeitos de pesquisa serão originários do Ambulatório de Aconselhamento Genético do Câncer do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP, enquanto a parte experimental será conduzida no Laboratório de Leishmaniose, Departamento de Biologia Animal do Instituto de Biologia da Unicamp. Serão incluídos entre 10 e 20 pacientes com esse diagnóstico, que serão submetidos à coleta da amostra de sangue periférico (20mL, por três vezes em intervalo de 30 dias). Quanto aos controles, a coleta de sangue periférico de indivíduos saudáveis e posterior culturas celulares serão realizados no Laboratório de Leishmaniose do Departamento de Biologia Animal, IB/Unicamp.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Além do relatório de pesquisa e após respostas às pendências, foi anexado TCLE e autorização do responsável pelo local de coleta das amostras de sangue dos indivíduos do grupo experimental.

Recomendações:

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Aprovado.

Situação do Parecer:

Aprovado

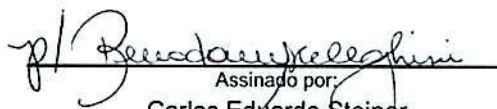
Necessita Apreciação da CONEP:

Sim

Considerações Finais a critério do CEP:

Mais uma vez este CEP entende que não há necessidade de apreciação do projeto pela CONEP, entretanto "o sistema" da Plataforma Brasil não nos permite corrigir essa informação, o que deverá sobrecarregar a CONEP e prejudicar o pesquisador ao gerar atraso no início de sua pesquisa.

CAMPINAS, 26 de Abril de 2012


Assinado por:
Carlos Eddardo Steiner

Dra. Renata Maria dos Santos Celeghini
Coordenadora de Comitê de Ética em Pesquisa
PRP/UNICAMP
Matrícula: 28700-9