

**ALEXANDRA PAIVA ARAÚJO VIEIRA**

**“AVALIAÇÃO DO PERFIL HIPÓXICO E DE MARCADORES  
DE INFLAMAÇÃO EM LESÕES LEISHMANIÓTICAS  
INDUZIDAS POR *Leishmania amazonensis*, NOS MODELOS  
MURINOS PRÉ E PÓS-TRATAMENTO ANTI LEISHMANIOSE”**

**CAMPINAS**

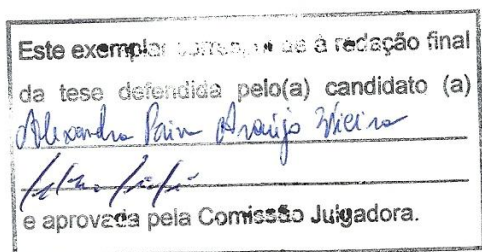
**2012**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS**  
**INSTITUTO DE BIOLOGIA**



**ALEXANDRA PAIVA ARAÚJO VIEIRA**

**“AVALIAÇÃO DO PERFIL HIPÓXICO E DE MARCADORES  
DE INFLAMAÇÃO EM LESÕES LEISHMANIÓTICAS  
INDUZIDAS POR *Leishmania amazonensis*, NOS MODELOS  
MURINOS PRÉ E PÓS –TRATAMENTO ANTI LEISHMANOSE”**



Tese apresentada ao Instituto de Biologia para obtenção do Título de Doutora em Parasitologia.

Orientador(a): Prof(a). Dr(a). Selma Giorgio

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR  
ROBERTA CRISTINA DAL' EVEDOVE TARTAROTTI – CRB8/7430  
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP

V673a	<p>Vieira, Alexandra Paiva Araújo, 1981- Avaliação do perfil hipóxico e de marcadores de inflamação em lesões leishmanióticas induzidas por <i>Leishmania amazonensis</i>, nos modelos murinos pré e pós-tratamento anti leishmaniose / Alexandra Paiva Araújo Vieira. – Campinas, SP: [s.n.], 2012.</p> <p>Orientador: Selma Giorgio. Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.</p> <p>1. Leishmaniose. 2. <i>Leishmania amazonensis</i>. 3. Hipóxia celular. 4. Neovascularização. 5. Inflamação. I. Giorgio, Selma, 1962-. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.</p>
-------	---

Informações para Biblioteca Digital

**Título em Inglês:** Evaluation of hypoxia and inflammatory markers in lesions induced by *Leishmania amazonensis* in murine models before and after leishmaniasis treatment

**Palavras-chave em Inglês:**

Leishmaniasis  
*Leishmania amazonensis*  
Cellular hypoxia  
Neovascularization  
Inflammation

**Área de concentração:** Parasitologia

**Titulação:** Doutor em Parasitologia

**Banca examinadora:**

Selma Giorgio [Orientador]  
Heitor Franco de Andrade Junior  
Sérgio Albuquerque  
Wagner Luiz Tafuri  
Regina Maura Bueno Franco

**Data da defesa:** 17-08-2012

**Programa de Pós Graduação:** Parasitologia

Campinas, 17 de agosto de 2012.

**BANCA EXAMINADORA**

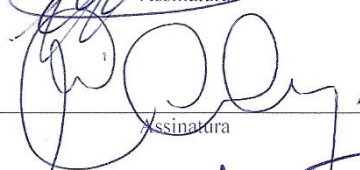
Prof(a). Dr(a). Selma Giorgio.(Orientadora)

  
Assinatura


Prof(a). Dr(a).Heitor Franco de Andrade Junior

  
Assinatura

Prof(a). Dr(a). Sérgio de Albuquerque

  
Assinatura

Prof(a). Dr(a). Wagner Luiz Tafuri

  
Assinatura

Prof(a). Dr(a). Regina Maura Bueno Franco

  
Assinatura

Prof(a). Dr(a). Geovanni Dantas Cassali

\_\_\_\_\_  
Assinatura

Prof(a). Dr(a). Paulo Pinto Joazeiro

\_\_\_\_\_  
Assinatura

Prof(a). Dr(a). Ana Maria Aparecida Guaraldo

\_\_\_\_\_  
Assinatura

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Leishmaniose do Departamento de Biologia Animal, Instituto de Biologia da UNICAMP, Campinas, São Paulo, com apoio financeiro da CAPES, CNPq e FAPESP.

*“Tudo o que te vier à mão para fazer,  
faze-o conforme as tuas forças,  
porque na sepultura para onde tu vais  
não há obra, nem indústria,  
nem ciência e nem sabedoria alguma.”*

Ec 9.10

Aos meus amores Olívio e Guilherme  
que tornam a minha vida cada dia mais bela.

## Agradecimentos

A profa. Dra. Selma Giorgio pela oportunidade de desenvolver este trabalho em seu grupo de pesquisa, por sua orientação, dedicação, ensinamentos, confiança e paciência durante estes 4 anos.

Aos professores do Departamento de Biologia Animal que tanto contribuíram para meu crescimento profissional.

A profa. Dra. Regina Maura pela orientação e pelos ensinamentos no período em que fui PED e a profa. Dra. Silmara pela orientação e paciência durante o desenvolvimento do trabalho de Avaliação da hipóxia e angiogênese em Esquistossomose Experimental.

Aos funcionários do Departamento de Biologia Animal pelo apoio e amizade.

Ao professor Dr. Geovanni Dantas Cassali (UFMG) que gentilmente cedeu o microscópio em seu laboratório para que eu obtivesse algumas imagens deste trabalho.

Aos amigos do Laboratório de Leishmaniose Adriana, Juliana, Larissa, Flávia Luna, Solange, Melissa Fessel, Marina Dal'Bó, Ademar, Bárbara e Myriam pela companhia agradável de todo dia, pela troca de experiências e pelo auxílio no meu crescimento pessoal e profissional.

As amigas parasitologistas Claudineide, Carina, Aline e Tarsila pela parceria, apoio e amizade.

Aos meus queridos pais Stephenson e Leila pelo incentivo constante, apoio, suporte emocional e amor dedicados a mim durante toda caminhada. Obrigada pela confiança!

Ao meu querido irmão Arthur e a cunhada Geise por todo carinho e amizade.

Ao meu grande amor Olívio por ter sido meu porto seguro durante este trabalho, pela paciência, pelo suporte emocional e por todo amor e cuidado comigo! Obrigada por valorizar meu sonho e por me fazer sorrir!

Ao Gui, meu pequeno príncipe, por trazer mais alegria a minha vida!

A Deus que me guia e me dá força e coragem para correr atrás dos meus sonhos!



## Resumo

A leishmaniose experimental murina causada por *Leishmania amazonensis* é um modelo parasitário que apresenta variações no desenvolvimento da lesão dependendo da linhagem de camundongo utilizada, bem como do local de inoculação do parasito, e tem contribuído para o entendimento da imunopatologia das doenças infecciosas. Em nosso trabalho, avaliamos o desenvolvimento da lesão, hipóxia tecidual (Hypoxyprobe<sup>TM</sup>-1, HIF-1 $\alpha$  e HIF-2 $\alpha$ ), angiogênese (VEGF) e dinâmica do processo inflamatório (COX-2, Gal-3 HO-1, HSP-70, MIF, MIP-2 e p38MAPk) no dorso e pata de camundongos susceptíveis à infecção (BALB/c/AnUnib) e na pata de camundongos capazes de controlar a infecção (C57BL/6/JUnib). Essa mesma avaliação foi feita após o tratamento com Glucantime e com Anfotericina B em camundongos BALB/c/AnUnib/ infectados. Para detecção das proteínas relacionadas a hipóxia, angiogênese e inflamação utilizamos as técnicas de imunohistoquímica e imunofluorescência. As lesões causadas por *L. amazonensis* no dorso de camundongos BALB/c/AnUnib são semelhantes a lesões em seres humanos. Na fase inicial da infecção foi observado um infiltrado com macrófagos parasitados, microambientes hipóxicos e expressão de COX-2, HSP-70, Gal-3 e MIP-2. MIF foi detectado a partir de 70 dias de infecção e HIF-1 $\alpha$ , HIF-2 $\alpha$ , HO-1 e p38MAPk foram detectados na fase crônica, concomitante ao aparecimento de infecção secundária na lesão. Nas lesões em pata de camundongos BALB/c/AnUnib observamos na fase inicial da infecção um infiltrado inflamatório com muitos macrófagos vacuolizados e parasitados, detectamos microambientes hipóxicos, HIF-1 $\alpha$ , HIF-2 $\alpha$  e proteínas inflamatórias como COX-2, HSP-70, MIF, Gal-3 e MIP-2. Na fase crônica da infecção detectamos HO-1 e p38MAPk, infecções secundárias e metástases. O fator angiogênico, VEGF, não foi detectado em nenhum dos tempos avaliados nas lesões de dorso e pata em BALB/c/AnUnib. Nas lesões em pata de camundongos C57BL/6/JUnib detectamos na fase inicial da infecção um infiltrado inflamatório rico em linfócitos T e as seguintes proteínas HIF-1 $\alpha$ , HIF-2 $\alpha$ , COX-2, Gal-3, HO-1, HSP-70, MIF e MIP-2. O fator angiogênico, VEGF, foi detectado aos 20 e

70 dias de infecção. Na fase crônica da infecção detectamos microambientes hipóxicos e a expressão de p38MAPk. Camundongos susceptíveis (BALB/c/AnUnib) infectados com *L. amazonensis* e tratados com Glucantime ou Anfotericina B apresentaram redução da carga parasitária, mas não houve cura. Foi detectada hipoxia tecidual, pelo método Hypoxyprobe<sup>TM</sup>-1 e expressão de HIF-1 $\alpha$ , HIF-2 $\alpha$  antes e após tratamento. Avaliamos as seguintes proteínas HO-1, p38MAPk e MIF importantes à manutenção da homeostase celular e ao controle da infecção que foram detectadas antes e após tratamento. O fator angiogênico, VEGF, foi detectado somente após tratamento com Glucantime ou com Anfotericina B em lesões de pata de BALB/c/AnUnib. O VEGF foi a única proteína expressa somente nas lesões em pata de camundongos C57BL/6/JUnib. Em lesões na pata de BALB/c/AnUnib só detectamos VEGF após o tratamento anti leishmaniose. Assim, sugerimos o VEGF como marcador relacionado ao controle da infecção e ao prognóstico dessa parasitose.

## Abstract

The experimental murine leishmaniasis caused by *Leishmania amazonensis* parasite is a useful model to understanding the immunopathogenesis of the infectious diseases. It has some differences on the lesion development in according with the mouse strain and the site of the parasite inoculation. We evaluated the lesion development, hypoxia microenvironments (Hypoxyprobe<sup>TM</sup>-1, HIF-1 $\alpha$  and HIF-2 $\alpha$ ), angiogenesis (VEGF) and the inflammatory dynamics (COX-2, Gal-3 HO-1, HSP -70, MIF, p38MAPk and MIP-2) in the rump and footpad lesions of susceptible mice (BALB/c/AnUnib) and footpad lesions of resistant mice (C57BL/6/JUnib) infected by *L. amazonensis*. We evaluated the hypoxia, angiogenesis and the inflammatory dynamics (HO-1, p38MAPk and MIF) in footpad lesions of BALB/c/AnUnib mice infected with *L. amazonensis* and treated with Glucantime and Amphotericin B. The immunohistochemistry and immunofluorescence techniques were used to detection the proteins related to hypoxia, angiogenesis and inflammation. The rump lesions caused by *L. amazonensis* in BALB/c/AnUnib mice are similar to human cutaneous leishmaniasis lesions. The parasitized macrophages, hypoxic microenvironments (Hypoxyprobe<sup>TM</sup>-1) and inflammatory proteins (COX-2, HSP-70, Gal-3 and MIP-2) were detected in 40 days of infection. MIF was detected in 70 days after infection. The HIF-1 $\alpha$ , HIF-2 $\alpha$ , HO-1 and p38MAPk were detected in the chronic phase (110 and 140 days of infection), concomitant with the secondary infection. Footpad lesions in BALB/c/AnUnib presents an inflammatory infiltrate with many vacuolated and parasitized macrophages, hypoxic microenvironments (Hypoxyprobe<sup>TM</sup>-1, HIF-1 $\alpha$  and HIF-2 $\alpha$ ) and inflammatory proteins (COX-2, HSP-70, MIF, Gal-3 and MIP-2) in the acute phase of the infection (20 days). In the chronic phase of infection (70 and 150 days) we detected HO-1 and p38MAPk, secondary infections and metastases. The angiogenic factor, VEGF, was not detected in any time evaluated on the rump and footpad lesions in BALB/c/AnUnib mice. Footpad lesions in C57BL/6/JUnib present an inflammatory infiltrate with predominance of the T lymphocytes and expression of HIF-1 $\alpha$ , HIF-2 $\alpha$ , COX-2, Gal-3, HO-1, HSP-70, MIF and MIP-2 in the acute phase of infection. The VEGF was detected at 20 and 70 days of

infection. In the chronic infection was detected the hypoxic microenvironments (Hypoxyprobe<sup>TM</sup>-1) and the p38MAPk expression. Susceptible mice (BALB/c/AnUnib) infected with *L. amazonensis* and treated with Glucantime or Amphotericin B showed a reduction of parasite burden, but there was no cure. Hypoxic microenvironments were detected on the footpad lesions in BALB/c/AnUnib mice before and after treatment with Glucantime and Anfotericin B. We detected the expression of HO-1, p38MAPK and MIF, before and after the treatments. These proteins were important to the maintenance of cellular homeostasis and control of infection. The VEGF was detected only after treatment with Glucantime or Amphotericin B. VEGF is the protein expressed in the footpad lesions in C57BL/6/JUnib mice. In footpad lesions of BALB/c/AnUnib mice VEGF was detected after the treatment by Glucantime and Anfotericin B. Thus, we suggest the VEGF is a marker related to infection control and a prognosis of experimental leishmaniasis.

## Sumário

1. Introdução.....	1
1.1 Aspectos gerais da leishmaniose.....	1
1.2 <i>Leishmania amazonensis</i> .....	2
1.3 Imunopatogênese das lesões cutâneas localizadas.....	3
1.4 Tratamento farmacológico da leishmaniose cutânea .....	6
1.5 Relevância fisiopatológica da hipóxia e seus marcadores .....	8
1.6 Angiogênese induzida pela hipóxia .....	11
1.7 Avaliação de proteínas inflamatórias.....	12
1.7.1 HO-1 - Heme Oxigenase-1 .....	12
1.7.2 p-38MAPk - Mitogen-Activated Protein Kinase.....	13
1.7.3 COX-2 - Ciclooxigenase 2 .....	14
1.7.4 MIF - Macrophage Migration Inhibitory Factor.....	15
1.7.5 HSP 70 – “Heat Shock Protein” .....	16
1.7.6 MIP-2 - Macrophage Inflammatory Protein-2 .....	16
1.7.7 Gal-3 - Galectina 3 .....	17
2. Objetivo Geral.....	19
2.1 Objetivos específicos .....	19
3. Materiais e Métodos .....	20
3.1 Parasitas .....	20
3.2 Animais.....	20

3.3	Infecção de camundongos com <i>L. amazonensis</i> .....	20
3.4	Avaliação da infecção de camundongos inoculados com <i>L. amazonensis</i> .....	21
3.5	Avaliação da hipóxia por Hypoxyprobe <sup>TM</sup> -1 .....	21
3.6	Avaliação da expressão de COX-2, Gal-3, HIF-1 $\alpha$ , HO-1, HSP-70, Mac-3, MIF, MIP-2, p38-MAPK e VEGF pelo método de imuno-histoquímica .....	22
3.7	Avaliação da expressão e localização de HIF-1 $\alpha$ e HIF-2 $\alpha$ pelo método de imunofluorescência .....	23
3.8	Protocolos de tratamentos dos camundongos BALB/c/AnUnib infectados com <i>L. amazonensis</i> .....	24
3.8.1	Esquema terapêutico utilizando Glucantime .....	24
3.8.2	Esquema terapêutico utilizando Anfotericina B .....	25
3.9	Análise estatística .....	25
4.	Resultados .....	26
4.1	Avaliação da infecção causada por <i>L. amazonensis</i> em camundongos BALB/c/AnUnib e C57BL/6/JUnib.....	26
4.1.1	Avaliação da infecção causada por <i>L. amazonensis</i> em camundongos BALB/c/AnUnib - Modelo dorso.....	26
4.1.2	Avaliação da infecção causada por <i>L. amazonensis</i> em camundongos BALB/c/AnUnib e C57BL/6/JUnib - Modelo Pata .....	28
4.2	Avaliação da hipóxia tecidual pelo método Hypoxyprobe <sup>TM</sup> -1 nas lesões de camundongos BALB/c/AnUnib e C57BL/6/JUnib causadas por <i>L. amazonensis</i> .....	33
4.2.1	Avaliação da hipóxia tecidual nas lesões de camundongos BALB/c/AnUnib infectados por <i>L. amazonensis</i> - Modelo dorso.....	33
4.2.2	Avaliação da hipóxia tecidual em lesões de camundongos BALB/c/AnUnib infectados por <i>L. amazonensis</i> - Modelo pata .....	35
4.2.3	Avaliação da hipóxia tecidual nas lesões de camundongos C57BL/6/JUnib infectados por <i>L. amazonensis</i> - Modelo pata .....	37

4.3	Avaliação da hipóxia tecidual em lesões causadas por <i>L. amazonensis</i> em camundongos BALB/c/AnUnib e C57BL/6/JUnib através da detecção de HIF-1 $\alpha$ e HIF-2 $\alpha$	39
4.3.1	Expressão de HIF-1 $\alpha$ e HIF-2 $\alpha$ em lesões nos camundongos BALB/c/AnUnib infectados com <i>L. amazonensis</i> – Modelo Dorso.....	39
4.3.2	Expressão de HIF-1 $\alpha$ e HIF-2 $\alpha$ em lesões nos camundongos BALB/c/AnUnib infectados com <i>L. amazonensis</i> – Modelo Pata .....	43
4.3.3	Expressão de HIF-1 $\alpha$ e HIF-2 $\alpha$ em lesões nos camundongos C57BL/6/JUnib infectados com <i>L. amazonensis</i> – Modelo Pata.....	46
4.4	Avaliação da angiogênese em lesões causadas por <i>L. amazonensis</i> em camundongos BALB/c/AnUnib e C57BL/6/JUnib através da detecção de VEGF .....	49
4.4.1	Expressão de VEGF em lesões no dorso de camundongos BALB/c/AnUnib infectados com <i>L. amazonensis</i> .....	49
4.4.2	Expressão de VEGF em lesões de pata de camundongos BALB/c/AnUnib infectados com <i>L. amazonensis</i> .....	51
4.4.3	Expressão de VEGF em lesões de pata de camundongos C57BL/6/JUnib infectados com <i>L. amazonensis</i> .....	53
4.5	Avaliação da expressão de Heme oxigenase (HO-1) em lesões causadas por <i>L. amazonensis</i> em camundongos BALB/c/AnUnib e C57BL/6/JUnib .....	55
4.5.1	Expressão de HO-1 em lesões de dorso de camundongos BALB/c/AnUnib infectados com <i>L. amazonensis</i> .....	55
4.5.2	Expressão de HO-1 em lesões de pata de camundongos BALB/c/AnUnib infectados com <i>L. amazonensis</i> .....	57
4.5.3	Expressão de HO-1 em lesões de pata de camundongos C57BL/6/JUnib infectados com <i>L. amazonensis</i> .....	59
4.6	Avaliação da expressão de “p38 Mitogen-Activated Protein Kinase” (p38MAPk) em lesões causadas por <i>L. amazonensis</i> em camundongos BALB/c/AnUnib e C57BL/6/JUnib .....	61
4.6.1	Expressão de p38MAPk em lesões de dorso de camundongos BALB/c/AnUnib infectados com <i>L. amazonensis</i> .....	61

4.6.2	Expressão de p38MAPk em lesões de pata de camundongos BALB/c/AnUnib infectados com <i>L. amazonensis</i> .....	63
4.6.3	Expressão de p38MAPk em lesões de pata de camundongos C57BL/6/JUnib infectados com <i>L. amazonensis</i> .....	65
4.7	Avaliação da expressão de “Macrophage Migration Inhibitory Factor” (MIF) em lesões causadas por <i>L. amazonensis</i> em camundongos BALB/c/AnUnib e C57BL/6/JUnib .....	67
4.7.1	Expressão de MIF em lesões de dorso de camundongos BALB/c/AnUnib infectados com <i>L. amazonensis</i> .....	67
4.7.2	Expressão de MIF em lesões de pata de camundongos BALB/c/AnUnib infectados com <i>L. amazonensis</i> .....	69
4.7.3	Expressão de MIF em lesões de pata de camundongos C57BL/6/JUnib infectados com <i>L. amazonensis</i> .....	71
4.8	Avaliação da expressão de Ciclooxygenase-2 (COX-2) em lesões causadas por <i>L. amazonensis</i> em camundongos BALB/c/AnUnib e C57BL/6/JUnib .....	73
4.8.1	Expressão de COX-2 em lesões do dorso de camundongos BALB/c/AnUnib infectados com <i>L. amazonensis</i> .....	73
4.8.2	Expressão de COX-2 em lesões de pata de camundongos BALB/c/AnUnib infectados com <i>L. amazonensis</i> .....	75
4.8.3	Expressão de COX-2 em lesões de pata de camundongos C57BL/6/JUnib infectados com <i>L. amazonensis</i> .....	77
4.9	Avaliação da expressão de Heat Shock Protein-70 (HSP-70) em lesões causadas por <i>L. amazonensis</i> em camundongos BALB/c/AnUnib e C57BL/6/JUnib .....	79
4.9.1	Expressão de HSP-70 lesões no dorso de camundongos BALB/c/AnUnib infectados com <i>L. amazonensis</i> .....	79
4.9.2	Expressão de HSP-70 em lesões de pata de camundongos BALB/c/AnUnib infectados com <i>L. amazonensis</i> .....	81
4.9.3	Expressão de HSP-70 em lesões de pata de camundongos C57BL/6/JUnib infectados com <i>L. amazonensis</i> .....	83



4.10	Avaliação da expressão de Galectina-3 (Gal-3) em lesões de camundongos BALB/c/AnUnib e C57BL/6/JUnib infectados com <i>L. amazonensis</i> .....	85
4.10.1	Expressão de Gal-3 em lesões no dorso de camundongos BALB/c/AnUnib infectados com <i>L. amazonensis</i> .....	85
4.10.2	Expressão de Gal-3 em lesões de pata de camundongos BALB/c/AnUnib infectados com <i>L. amazonensis</i> .....	87
4.10.3	Expressão de Gal-3 em lesões de pata de camundongos C57BL/6/JUnib infectados com <i>L. amazonensis</i> .....	89
4.11	Avaliação da expressão de MIP-2 (Macrophage Inflammatory Protein-2) em lesões causadas por <i>L. amazonensis</i> em camundongos BALB/c/AnUnib e C57BL/6/JUnib.....	91
4.11.1	Expressão de MIP-2 em lesões no dorso de camundongos BALB/c/AnUnib infectados com <i>L. amazonensis</i> .....	91
4.11.2	Expressão de MIP-2 em pata de camundongos BALB/c/AnUnib infectados com <i>L. amazonensis</i> .....	93
4.11.3	Expressão de MIP-2 em lesões de pata de camundongos C57BL/6/JUnib infectados com <i>L. amazonensis</i> .....	95
4.12	Avaliação da hipóxia, angiogênese, HO-1, p38MAPk e MIF após o tratamento da leishmaniose cutânea experimental.....	97
5.	Discussão.....	108
6.	Conclusões.....	127
7.	Referências Bibliográficas.....	129
8.	Anexos.....	143

## 1. Introdução

### 1.1 Aspectos gerais da leishmaniose

A leishmaniose é uma parasitose endêmica, causada por diferentes espécies de protozoários do gênero *Leishmania*, parasita intracelular obrigatório de células do sistema fagocitário mononuclear (KAYE & SCOTT, 2011). É considerada grave problema de saúde pública e predominante nas áreas tropicais e subtropicais do mundo, sendo encontrada em 98 países. Apresenta uma incidência anual 0,7 a 1,2 milhões casos de leishmaniose tegumentar e 0,2 a 0,4 milhões casos de leishmaniose visceral (WHO, 2010; ALVAR et al., 2012).

Os protozoários do gênero *Leishmania* apresentam duas formas no seu ciclo evolutivo. As formas promastigotas (alongadas, flageladas e móveis) se desenvolvem no hospedeiro invertebrado, dípteros do gênero *Phlebotomus* e *Lutzomyia*. As formas amastigotas são arredondadas (sem flagelo externo e imóveis), e se desenvolvem no hospedeiro vertebrado (REITHINGER et al., 2007; KAYE & SCOTT, 2011).

O flebotomíneo infectado transmite os promastigotas metacíclicos, presente na sua probóscide ao hospedeiro vertebrado no momento do repasto sanguíneo. As promastigotas são rapidamente fagocitadas por macrófagos teciduais (histiócitos). Nessas células há a formação do vacúolo parasitóforo, onde ocorre diferenciação dos promastigotas em amastigotas. Através de divisão binária, as amastigotas se multiplicam até o rompimento do macrófago, liberando novos parasitas, que são fagocitados por outros macrófagos. Durante o repasto sanguíneo, flebotomíneos não infectados podem ingerir macrófagos contendo amastigotas. No trato digestivo do inseto as amastigotas se diferenciam em promastigotas, estes se multiplicam por divisão binária. Parte destas formas flageladas se diferenciam em promastigotas metacíclicas, infectante aos vertebrados. Estas formas migram até a probóscide do inseto, durante repasto sanguíneo, são regurgitadas e entram em contato com o tecido subcutâneo do hospedeiro vertebrado, reiniciando o ciclo evolutivo da *Leishmania*

(HANDMAN, 2001; MURRAY et al., 2005; REITHINGER et al., 2007; KAYE & SCOTT, 2011).

A epidemiologia da leishmaniose é bem diversificada com cerca de 20 espécies patogênicas para os humanos e 70 espécies de dípteros descritos como vetores do parasito. O parasito pode realizar o ciclo zoonótico, onde hospedeiros reservatórios participam do ciclo de transmissão, e o ciclo antroponótico, em que os humanos são a única fonte de infecção ao vetor (MURRAY et al., 2005; SHAW, 2007).

As principais espécies de *Leishmania* que afetam os humanos são *L. major*, *L. tropica*, *L. aethiopica*, *L. donovani*, *L. infantum* (nos continentes Europeu, Asiático e Africano) e *L. chagasi*, *L. mexicana*, *L. panamensis*, *L. pifanoi*, *L. peruviana*, *L. guyanensis*, *L. brasiliensis* e *L. amazonensis* (no continente Americano) (MURRAY et al., 2005; KAYE & SCOTT, 2011).

Algumas espécies de *Leishmania* induzem a leishmaniose tegumentar, doença crônica com manifestações clínicas na pele ou mucosa do indivíduo. A leishmaniose tegumentar pode ser caracterizada por lesões cutâneas localizadas, ou cutâneo difusas ou mucocutâneas. Outras espécies de *Leishmania* se disseminam pelos órgãos internos como fígado, baço e medula óssea causando a leishmaniose visceral. O desenvolvimento da doença está relacionado a vários fatores dentre eles às características genéticas do parasito e do hospedeiro, suas condições imunológicas e nutricionais e as características químicas da saliva do inseto vetor (REITHINGER et al., 2007; KAYE & SCOTT, 2011).

## 1.2 *Leishmania amazonensis*

A espécie *Leishmania amazonensis* utilizada neste estudo, é comum principalmente na região da Amazônia. Esse parasito está associado a lesões cutâneas tanto localizadas quanto difusas. O modelo experimental murino de infecção por *L. amazonensis* é capaz de mimetizar muitas características fisiológicas da infecção em humanos (GRIMALDI et al., 1989; BARRAL et al., 1991; AWASTHI et al., 2004).

O modelo é bem estudado em linhagem BALB/c que, quando infectados com amastigotas de *L. amazonensis*, apresentam úlcera no local da inoculação do parasito, progressão do tamanho da lesão, aumento da carga parasitária, infiltrado de macrófagos e metástase na cauda e nariz. A mortalidade é muito alta. A presença de infecção bacteriana secundária com odor característico de fermentação anaeróbica é notável na área central necrótica das lesões leishmanióticas em estados avançados (AFONSO & SCOTT, 1993; GIORGIO et al., 1998; ARRAIS-SILVA et al., 2005, ARAÚJO et al., 2012). A expressão de HIF-1 $\alpha$  (Hypoxia Inducible Factor) também é observada nestas lesões em fase crônica (ARRAIS-SILVA et al., 2005; ARAÚJO et al., 2012).

### 1.3 Imunopatogênese das lesões cutâneas localizadas

A formação de um eritema seguido de pápula, no local da picada do vetor, é o primeiro sinal do desenvolvimento da infecção. Quando a pápula se desenvolve formando um nódulo que ulcera, gera lesão característica da leishmaniose cutânea localizada. A resposta imunológica do indivíduo é um fator determinante no resultado da infecção por *Leishmania* (AWASTI et al., 2004; REITHINGER et al., 2007). Modelos animais são utilizados para a avaliação do desenvolvimento da resposta imune diante da infecção com alguma espécie de *Leishmania*.

Modelos murinos infectados com *L. major* e *L. amazonensis* tem sido utilizados para descrição de diversos mecanismos de susceptibilidade e resistência. Quando o camundongo é infectado pelo parasito, macrófagos e células dendríticas atuam fagocitando o parasito, são as principais células apresentadoras de antígeno capazes de induzir a diferenciação e ativação de linfócitos T CD4<sup>+</sup> (Th1/Th2) (AFONSO & SCOTT, 1993; BEIL et al., 1992; GIORGIO et al., 1998; ROGERS et al 2002; AWASTHI et al., 2004; REITHINGER et al., 2007; TRIPATHI et al., 2007).

A resistência do organismo ao parasito ocorre mediante a diferenciação seletiva dos linfócitos T CD4<sup>+</sup> para o tipo 1 (resposta Th1). Essa resposta é caracterizada pela presença de citocinas pró-inflamatórias (INF- $\gamma$ , IL-12, IL-18, TNF- $\alpha$ ), que induzem a ativação de

macrófagos, produção de óxido nítrico e intermediários reativos de oxigênio necessários para destruir parasitas intracelulares (AFONSO & SCOTT, 1993; ROGERS et al., 2002; AWASTHI et al., 2004; TRIPATHI et al., 2007; LOPEZ-KOSTKA et al., 2009; NYLÉN & GAUTAM, 2010). Em hospedeiros susceptíveis, que não controlam a infecção com *Leishmania*, citocinas como IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13 regulam a resposta Th1 e são produzidas por linfócitos T CD4<sup>+</sup> tipo 2 (resposta Th2). A resposta Th2 impede a extensiva destruição tecidual e está associada à susceptibilidade de modelos murinos (BALB/c) à *L. major* e a *L. amazonensis*. Além disso, linfócitos T reguladores também produzem IL-10 e aliadas aos linfócitos Th17 são responsáveis pela manutenção da infecção crônica (AWASTHI et al., 2004; TRIPATHI et al., 2007; LOPEZ-KOSTKA et al., 2009; NYLÉN & GAUTAM, 2010).

Camundongos BALB/c infectados por *L. major* apresentam uma resposta Th2, no início da infecção, responsável pela susceptibilidade do animal ao parasito (JI et al., 2002; AWASTHI et al., 2004). Entretanto, camundongos C57BL/6, capazes de controlar a proliferação do parasito, apresentam uma resposta inicial Th1, com produção de IFN- $\gamma$  e IL-12. Porém, altos níveis de IL-10 são responsáveis pela persistência do parasito (AWASTHI et al., 2004).

Diferentemente da infecção por *L. major*, a infecção de BALB/c por *L. amazonensis* é caracterizada pela co-existência de resposta imune celular Th1/Th2 (JI et al., 2002). Quando há um desequilíbrio na resposta Th1/Th2, com predominância da resposta Th2, há uma progressão da doença (JI et al., 2003). Entretanto, a imunidade protetora está relacionada a um aumento da resposta Th1 (MC-MAHON-PRATT & ALEXANDER, 2004). Ji et al. (2003) sugeriram que a capacidade da *L. amazonensis* em evadir da resposta imune do hospedeiro murino reside no impedimento da produção de citocinas inflamatórias e de linfócitos T CD4<sup>+</sup> tipo1, no início da infecção, mesmo com baixos níveis de citocinas Th2.

Em lesões causadas por *L. amazonensis* que se curam espontaneamente, em humanos, é possível observar macrófagos pouco parasitados, abundância de células gigantes e células epitelióides. Há predominância da resposta Th1 com secreção de citocinas pro-

---

inflamatórias (IL-12, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ ). Esta resposta é regulada por citocinas como IL-4, IL-10, IL-13 e TGF- $\beta$ . Há uma completa re-epitelização com fibrose e diminuição do infiltrado inflamatório local (REITHINGER et al., 2007; NYLÉN & GAUTAM, 2010). Quando a célula hospedeira não consegue eliminar o parasito, as amastigotas se multiplicam, há aumento do infiltrado inflamatório, macrófagos intensamente vacuolizados e parasitados na derme, e poucos linfócitos. A infecção se cronifica, com presença baixos níveis de IFN- $\gamma$ , altos níveis de IL-4 e IL-10 e muitos linfócitos T regulatórios. Pode haver infecção secundária (HANDMAN, 2001; REITHINGER et al., 2007; SILVEIRA et al., 2009). Esses fatores são semelhantes em modelo murino (BALB/c e CBA) infectados com *L. amazonensis* (SILVEIRA et al., 2009).

Nas lesões cutâneas difusas, causadas por *L. amazonensis*, em humanos, os nódulos raramente se ulceram. No interior dos nódulos há um abundante número de macrófagos infectados, com constante multiplicação dos amastigotas e um infiltrado inflamatório intenso. A resposta Th2 é predominante, com presença de IL-4 e IL-5 e baixos níveis de IFN- $\gamma$  e IL-12 (SILVEIRA et al., 2004; REITHINGER et al., 2007).

Camundongos BALB/c são infectados com *L. amazonensis*, tanto no dorso quanto na pata, para estudos imunopatológicos (McELRATH et al., 1987; GIORGIO et al., 1998; ARRAIS-SILVA et al., 2005; HERNANDEZ-CHINEA, 2007; ARAÚJO et al., 2012). Em infecções no dorso de BALB/c, as lesões cutâneas tiveram aparecimento lento, quando comparadas as lesões em pata (McELRATH et al., 1987; GIORGIO et al., 1998; ARRAIS-SILVA et al., 2005; ARAÚJO et al., 2012). Na fase crônica da leishmaniose observa-se infecção secundária, tanto em lesões no dorso quanto em pata. Muitos macrófagos infectados e vacuolizados foram observados na derme e no tecido subcutâneo, além de um infiltrado eosinofílico e poucos linfócitos T e B, em lesões no dorso (McELRATH et al., 1987; AYRES et al., 2011). Nas lesões de pata observa-se um infiltrado celular com macrófagos intensamente parasitados e com grandes vacúolos parasitóforos, expressão de HIF-1 $\alpha$  e microrregiões hipóxicas (GIORGIO et al., 1998; ARRAIS-SILVA et al., 2005; HERNANDEZ-CHINEA, 2007; ARAÚJO et al., 2012). As lesões de dorso tem aspecto

circunscrito e quando ulceradas são semelhantes às lesões em humanos, diferente das lesões causadas por *L. amazonensis* na pata de BALB/c.

Diante de todas estas observações, camundongos BALB/c são considerados susceptíveis à infecção por *L. amazonensis*, tanto em pata quanto em dorso, apesar das diferenças no desenvolvimento da lesão dependendo do local de inoculação do parasito (MCEL RATH et al., 1987; GIORGIO et al., 1998; ARRAIS-SILVA et al., 2005; HERNANDEZ-CHINEA, 2007; ARAÚJO et al., 2012).

Ao contrário dos camundongos BALB/c, a linhagem C57BL/6 apresenta uma capacidade de controlar a infecção por *L. amazonensis*. As lesões tem um desenvolvimento mais lento, tanto no dorso quanto na pata, quando comparada as lesões em BALB/c. Também não são observadas áreas necróticas, infecções secundárias, nem metástases (MCEL RATH et al., 1987; GIORGIO et al., 1998; HERNANDEZ-CHINEA, 2007; CARDOSO et al., 2010; ARAÚJO et al., 2012). Giorgio et al. (1998) observaram uma diminuição da carga parasitária aos 90 dias de infecção nas lesões de pata em C57BL/6. Um infiltrado inflamatório com predominância de linfócitos T e poucos macrófagos infectados foram visualizados, porém não houve cura (GIORGIO et al., 1998; ARAÚJO et al., 2012).

#### **1.4 Tratamento farmacológico da leishmaniose cutânea**

O arsenal terapêutico contra a leishmaniose cutânea é restrito e possui severas limitações diante da toxicidade dos medicamentos disponíveis. Os fármacos convencionais utilizados no tratamento anti-leishmaniose como Glucantime® e Anfotericina B® apresentam graves efeitos colaterais tais como cardiotoxicidade, mialgia, insuficiência renal aguda e intolerância quando em uso em humano.

O Glucantime®, antimonial pentavalente, é o fármaco de primeira escolha no tratamento da leishmaniose. Este composto não possui um mecanismo de ação totalmente elucidado, mas sugere-se que atue como pró-droga e seja convertida em antimônio trivalente (Sb III), a forma responsável pelo efeito terapêutico e tóxico. O Sb III pode

interferir no processo de oxidação de ácidos graxos e glicólise do parasita, levando a uma depleção dos níveis de ATP intracelular (RATH et al., 2003; CROFT & OLLIARO, 2011). Esse medicamento é contra-indicado a gestantes e indivíduos portadores de doenças crônicas (cardiopatias, nefropatias, hepatopatias, Doença de Chagas) e nos casos de indivíduos com tuberculose, malária e alergias (RATH et al., 2003; OLIVEIRA et al., 2011).

A Anfotericina B é um antibiótico poliênico, droga de segunda escolha no tratamento da leishmaniose cutânea, sendo utilizado em casos que não respondem terapeuticamente ao tratamento com Glucantime® ou na impossibilidade do seu uso. A anfotericina B se liga a esteróis de parede celular, preferencialmente ao ergosterol, que é o principal esterol presente na membrana celular de fungos, bem como de *Leishmania*, mas não das membranas celulares de mamíferos. Assim, inibe selectivamente a síntese da membrana do parasita e promove formação de poros nesta membrana, levando-o a morte (SINGH & SIVAKUMAR, 2004). Deve ser administrada sob vigilância, em serviços especializados, com paciente hospitalizado. Possui alto custo, muitos efeitos colaterais por ser muito tóxica e é contra indicada a gestantes, cardiopatas, nefropatas e hepatopatas (MACHADO-PINTO et al., 2002; OLIVEIRA et al., 2011). Este fármaco pode ser incorporado a lipossomas carreadores sendo absorvido pelo sistema reticuloendotelial onde o parasita *Leishmania* reside (SINGH & SIVAKUMAR, 2004) e assim é pouco absorvido pelos rins, o maior órgão alvo para a toxicidade da anfotericina B, mas seu alto custo limita seu uso pelos pacientes (RATH et al., 2003; AMATO et al., 2004).

A Pentamidina é outro medicamento que apresenta bons resultados com baixas doses, na infecção por *L. guyanensis*. Tem as mesmas contra-indicações da Anfotericina B e vários efeitos colaterais como hipoglicemia, hipotensão, alterações cardiológicas e nefrotoxicidade (AMATO, 1997; OLIVEIRA et al., 2011). A Paramomicina tem sido testada em diferentes formulações químicas e apresenta resultados variáveis (CROFT & OLLIARIO, 2011). A Miltefosina oral tem apresentado resultados variáveis também em relação a lesões cutâneas induzidas por diferentes espécies de *Leishmania* (SERRANO-MARTÍN et al., 2009). Outros fármacos vêm sendo testados em lesões leishmanióticas

---



como o fluconazol, itraconazol e cetoconazol, mas até agora não tiveram resultados satisfatórios capazes de torná-los fármacos de escolha para o tratamento da leishmaniose cutânea.

### **1.5 Relevância fisiopatológica da hipóxia e seus marcadores**

Características das lesões leishmanióticas como intensa proliferação do parasito, infiltrado inflamatório nos tecidos infectados, microcirculação prejudicada com mudanças no fluxo sanguíneo tecidual, infecções secundárias com bactérias aeróbias e anaeróbias e detecção de HIF-1 $\alpha$  (Hypoxia Inducible Factor) são fortes indicativos da formação de um microambiente com baixos níveis de oxigênio, isto é, de hipóxia.

A hipóxia (reduzida pressão parcial de oxigênio) pode ser causada pela redução do suprimento de oxigênio ou por isquemia localizada. Muitos tumores sólidos apresentam regiões hipóxicas ( $pO_2 < 5$  mmHg) devido a incapacidade dos vasos em fornecer oxigênio suficiente ao rápido crescimento do tumor. Além disso, é reconhecida como um importante mecanismo patofisiológico de muitas doenças como arteriosclerose, fraturas ósseas, artrites e reações inflamatórias em geral (WENGER, 2002; KAELIN & RATCLIFFE, 2008; KOH et al., 2008). Entretanto, a hipóxia também tem um importante e benéfico papel na fisiologia dos mamíferos, constituindo um estímulo fisiológico que ocorre em resposta ao crescimento tecidual durante o desenvolvimento normal e a embriogênese (KOH et al., 2008; SEMENZA et al., 2009).

Existem evidências de que o microambiente hipóxico em lesões inflamatórias e tumorais esteja relacionado à cronicidade destas lesões e as dificuldades na difusão de quimio e radioterápicos durante o tratamento de carcinomas. Uma importante relação entre a hipóxia e o processo de cicatrização já foi relatado, com crescimento vascular e tecidual, em um modelo de lesão cutânea induzida em ratos (LOKMIC et al., 2006).

Estudos realizados em sistemas *in vitro* demonstraram que a hipóxia é um estímulo metabólico específico e um sinal que afeta as propriedades dos macrófagos (LEWIS et al., 1999; MURDOCH et al., 2005). Nosso grupo observou, *in vitro*, uma alteração no fenótipo

de macrófagos em relação à infecção com *L. amazonensis*, tornando-os mais resistentes à proliferação intracelular deste parasito (COLHONE et al., 2004; DEGROSSOLI et al., 2004). Degrossoli et al. (2011) avaliando os mecanismos pelos quais macrófagos são capazes de controlar a infecção por *L. amazonensis*, durante a hipóxia, observaram uma relação de ROS (intermediários reativos de oxigênio) com o efeito leishmanicida desses macrófagos. Além disso, foi relatado que a infecção por *L. amazonensis* induz, *in vitro*, a expressão de HIF-1 $\alpha$  e HIF-2 $\alpha$  pelos macrófagos, sugerindo que a hipóxia, condição presente nos tecidos infectados, altera o fenótipo dos macrófagos, modulando a resposta destes à infecção por *Leishmania* (DEGROSSOLI et al., 2011).

Uma forma de avaliar a presença de microambientes hipóxicos é através do pimonidazol, um marcador de hipóxia exógeno. O pimonidazol se liga irreversivelmente em células com baixa tensão de oxigênio em órgãos de animais vivos, formando adutos. A detecção destes adutos é feita pelo método Hypoxyprobe<sup>TM</sup>-1, que se baseia na técnica de imuno-histoquímica (TERADA et al., 2007). Estes adutos são imunogênicos e podem ser reconhecidos por anticorpos monoclonais e policlonais (ARTEEL et al., 1995). Vários trabalhos foram realizados com este sistema de detecção de hipóxia para a avaliação da pO<sub>2</sub> em órgãos como fígado, baço, pulmões, intestino, lesões cutâneas e tumores, avaliados em camundongos, humanos e cães (AZUMA et al., 1997; RALEIGH et al., 2001; AZUMA et al., 2003; PLOCK et al., 2007; TERADA et al., 2007; HUANG & CHEN, 2009; ARAÚJO et al., 2010; ARAÚJO et al., 2012).

Outro marcador de hipóxia é o fator de transcrição HIF (Hypoxia Inducible Factor), um heterodímero constituído pela subunidade  $\beta$  (HIF-1 $\beta$ /ARNT), constitutivamente expressa no núcleo das células, e por uma das três subunidades  $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ , HIF-2 $\alpha$  ou HIF-3 $\alpha$ ) que é regulada pela presença de oxigênio (GORDAN & SIMON, 2007; KAELIN & RATCLIFFE, 2008; NIZET & JONHSON, 2009). Em condições normais de oxigênio a subunidade  $\alpha$  do HIF sofre hidroxilação pós-transcricional realizada pelas enzimas dependentes de oxigênio, as prolil-hidroxilases, que levam HIF- $\alpha$  a uma rápida degradação proteossomal via complexo von Hippel-Lindau-E3 ligase (KOH et al., 2008; SEMENZA,

2009). Em condições hipóxicas a subunidade  $\alpha$  do HIF é estabilizada, uma vez que os mecanismos reguladores são inibidos, ocorrendo acúmulo nuclear e citoplasmático de HIF- $\alpha$ . O HIF- $\alpha$  presente no núcleo se complexa com HIF- $\beta$  desencadeando ativação e expressão de diversos genes envolvidos principalmente nos processos de angiogênese, metabolismo da glicose, proliferação celular e apoptose (KOH et al., 2008; SEMENZA, 2009; IMTYIAZ & SIMON, 2010).

HIF-1 $\alpha$  é um fator de transcrição presente em diversos tecidos com inflamação e ambientes com baixa pressão parcial de oxigênio (SEMENZA, 2001; ZINKERNAGEL & JOHNSON, 2007). Além disso, este fator é responsável pela atividade de vários genes envolvidos principalmente na glicólise anaeróbica, mas também no metabolismo do ferro, na sobrevivência, na proliferação celular, angiogênese e na apoptose a fim de aumentar a adaptação da célula ao microambiente hipóxico (ZINKERNAGEL & JOHNSON, 2007; SEMENZA, 2009; IMTYIAZ & SIMON, 2010).

Nosso grupo avaliou a expressão de HIF-1 $\alpha$  em lesões causadas *L. amazonensis* em pata de camundongos BALB/c e detectou HIF-1 $\alpha$  no citoplasma de macrófagos infectados a partir de 70 dias de infecção (ARRAIS-SILVA et al., 2005). Diferentemente do encontrado em lesões induzidas por *L. amazonensis* em BALB/c, alguns estudos têm demonstrado que em casos de tumores o acúmulo de HIF-1 $\alpha$  é predominantemente nuclear, no entanto, alguns macrófagos associados a tumores expostos a hipóxia expressam HIF-1 $\alpha$  tanto no núcleo quanto no citoplasma (CROWTHER et al., 2001; BURKE et al., 2002).

O HIF-2 $\alpha$  possui uma expressão limitada ao endotélio, rim, coração, pulmões, eptélio gastrointestinal, macrófagos de medula óssea e algumas células do sistema nervoso central. O HIF-2 $\alpha$  também é um importante regulador da imunidade inata e atua preferencialmente na ativação de VEGF e TGF- $\alpha$  em processos inflamatórios (GORDAN & SIMON, 2007; IMTIYAZ et al., 2010). Degrossoli et al. (2011) demonstraram *in vitro*, a expressão de HIF-1 $\alpha$  e HIF-2 $\alpha$  em macrófagos peritoneais de BALB/c, infectados ou não com *L. amazonensis* e submetidos a hipóxia. O HIF-2 $\alpha$  foi detectado tanto no núcleo quanto no citoplasma dos macrófagos, quando avaliado por imunofluorescência. A presença deste

fator no núcleo de células infectadas com *Leishmania* nos induz a avaliação da angiogênese principalmente pela indução da expressão de VEGF.

Abaixo faremos uma descrição do fator angiogênico, VEGF, e de algumas proteínas inflamatórias (COX-2, HO-1, HSP-70, Gal-3, MIF, MIP-2, p38MAPk) que avaliamos neste trabalho para o entendimento do desenvolvimento da infecção em diferentes modelos.

### 1.6 Angiogênese induzida pela hipóxia

O VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*) é um potente fator angiogênico relacionado principalmente ao aumento da permeabilidade vascular e neovascularização em câncer, retinopatia diabética, feridas, degeneração macular relacionada à idade e infecções parasitárias como a esquistossomose. Assim como HIF-1 $\alpha$ , ambientes com baixa pressão de oxigênio são estímulos à produção de VEGF por macrófagos (HARMEY et al., 1998; XIONG et al., 1998; KONNER & DUPONT, 2004; ARAÚJO et al., 2010). O VEGF também é importante em processos fisiológicos como o desenvolvimento vascular embrionário, onde a ausência de sua produção é letal ao embrião (FERRARA et al., 1996; ICHIHARA et al., 2011).

Bateman et al. (2007) demonstraram uma correlação positiva entre a expressão de HIF-1 $\alpha$  e VEGF durante a endotoxemia do miocárdio, em ratos. Poulaki et al. (2002) utilizando modelo murino, para retinopatia diabética, observaram que HIF-1 $\alpha$  induz a expressão de VEGF na retina, levando a angiogênese, remodelamento vascular e quebra da barreira hemato-retinal. Outros autores sugeriram uma relação entre o HIF-1 $\alpha$  e a expressão de VEGF com a progressão de tumores sólidos, e consequente prognóstico indesejável aos pacientes com câncer (GORDAN & SIMON, 2007; QING & SIMON, 2009; IMTIYAZ et al., 2010; ICHIHARA et al., 2011).

Araújo et al. (2010) observaram uma correlação positiva entre a presença de microrregiões hipóxicas (detectadas pelo método Hypoxyprobe<sup>TM</sup>-1) e expressão de HIF-1 $\alpha$  e VEGF nos tecidos de fígado, baço, intestino de camundongos infectados com

*Schistosoma mansoni*. Esse estudo sugeriu que a hipóxia exerce um papel na manutenção da resposta angiogênica em granulomas.

A avaliação da existência de correlação entre hipóxia e seus marcadores (Hypoxyprobe, HIF-1 $\alpha$  e HIF-2 $\alpha$ ) com a expressão de VEGF na leishmaniose cutânea em diferentes modelos de infecção na linhagem susceptível e resistente pode ser útil ao entendimento do desenvolvimento destas lesões. Assim como da interação destes fatores com algumas proteínas inflamatórias durante a infecção crônica e sua relação com o controle da proliferação do parasita pelo hospedeiro após o tratamento.

### **1.7 Avaliação de proteínas inflamatórias**

O microambiente tissular instalado após a infecção por *L. amazonensis* em modelos de infecção, como dorso ou pata, em linhagens BALB/c/AnUnib e C57BL/6/JUnib deve apresentar diferenças, como na expressão das proteínas inflamatórias descritas neste item. A avaliação da dinâmica de expressão destas proteínas, em cada modelo, pode auxiliar na elucidação dos variados desenvolvimentos da infecção.

#### **1.7.1 HO-1 - Heme Oxigenase-1**

A Heme oxigenase (HO) é uma importante enzima que atua em reações de óxido-redução intracelular, regula a degradação da proteína heme e do metabolismo do ferro, atua na supressão do estresse oxidativo através da formação de poderosos antioxidantes (bilirrubina e biliverdina) e contribui com a modulação de monóxido de carbono (CO) no endotélio vascular. A biliverdina e seus metabólitos possuem propriedades antioxidantes e antiinflamatórias. O CO liberado atua como um importante vasodilatador e é capaz de induzir p-38 MAPK em processos anti-inflamatórios e angiogênese (ABRAHAM & KAPPAS, 2008).

A duas principais isoformas são HO-1, isoenzima induzível também conhecida como uma “heat shock protein” – HSP 32, e HO-2, isoenzima constitutiva. Muitos fatores podem contribuir para o aumento da expressão de HO-1, dentre eles processos inflamatórios e

hipóxia crônica, sendo possível relacionar o aumento de HO-1 com HIF-1 $\alpha$ , óxido nítrico, intermediários reativos de oxigênio (BESCHORNER et al., 2000; MORITA et al., 2005; ABRAHAM & KAPPAS, 2008). E curiosamente, HO-1 também modula a imunidade inata e adaptativa, sendo considerada uma enzima citoprotetora com importante função na manutenção da homeostase celular, durante processos inflamatórios (SOARES et al., 2009; LUZ et al., 2012).

Sunderram et al., (2009) observaram expressão de HO-1 em camundongos submetidos a hipóxia crônica para indução de uma adaptação cardiorespiratória. Esta proteína foi observada no quarto dia de hipóxia e persistiu até o décimo dia. Lin et al., (2009) demonstraram que uma super expressão de HO-1 pode promover neovascularização em tecidos cardíacos isquêmicos através da indução de VEGF e pelo recrutamento de células progenitoras da medula óssea.

Pham et al. (2005) utilizando células RAW 264.7 infectadas com *L. pifanoi* observaram que os amastigotas podem induzir maior aumento da expressão de HO-1 quando comparado aos promastigotas. E com este mecanismo ambos inibem a produção de superóxidos pela célula hospedeira, e pode ser considerado um mecanismo de evasão do mesmo à resposta imune do hospedeiro.

Luz et al. (2012) observaram um aumento de HO-1 tanto em macrófagos murinos quando em amostras de soro humano de pacientes infectados com *L. chagasi*. Esse trabalho demonstrou que HO-1 regula produção de mediadores pró-inflamatórios e relacionados ao estresse oxidativo. Assim, o HO-1 contribui para persistência do parasito em macrófagos, reforçando a teoria de que a indução de HO-1 é um mecanismo de escape do parasito.

### 1.7.2 p-38MAPk - Mitogen-Activated Protein Kinase

As MAPk desempenham um papel chave na regulação de funções celulares de diversos estímulos extracelulares. A família de MAPk inclui quinase 1 e 2 (ERK1/2), p38 MAPK e JNK. A cascata ERK1/2 é ativada em resposta a mitógenos e fatores de crescimento e estão associados à regulação de proliferação, desenvolvimento e

diferenciação celular. As cascatas de p38MAPk e JNK se tornam ativadas em resposta a fatores fisiológicos, estresse e regula respostas inflamatórias. A cascata MAPk tem uma função importante em macrófagos, regulando seu envolvimento na inflamação e defesa do hospedeiro (HAMBLETON et al. 1996; BASU et al., 2006; RUHLAND & KIMA, 2009).

A p-38MAPk é uma proteína quinase com maior expressão e ativação pela presença de citocinas pró-inflamatórias (TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-12 e IL-17) e em casos de estresse provocado pela radiação ultravioleta, choque osmótico e hipóxia (ONO & HAN, 2000). A p-38 MAPk também contribui para o aumento da permeabilidade vascular (IRWIN et al., 2005). Kim et al. (2005) demonstraram que *Toxoplasma gondii* desencadeia uma ativação de MAPk em macrófagos de medula de camundongos, levando a indução de IL-12 dependente de p38. A produção de IL-12 também é alterada em macrófagos derivados de medula óssea de BALB/c e C57BL/6 infectados por *L. amazonensis*. Os resultados sugerem que p38 está relacionado a inibição da produção de IL-12, via PI3K/Akt, porém os dados ainda são inconclusivos (RUHLAND et al., 2009)

Basu et al. (2006) avaliaram a capacidade dos antimoniais pentavalente ativarem um mecanismo microbicida através da ativação de PI3K, PKC (proteína C quinase) e MAPks para eliminar *L. donovani* em macrófagos peritoneais de BALB/c e C57BL/6, e observaram que os antimoniais pentavalentes induziram a fosforilação de p38MAPk que levou um aumento da produção de NO e TNF- $\alpha$ .

### 1.7.3 COX-2 - Ciclooxigenase 2

A Ciclooxigenase 2 (COX-2), proteína clássica de inflamação, tem expressão elevada em vários tipos de câncer humano e vários processos inflamatórios em diversos órgãos. No caso de neoplasias, esta expressão indica um prognóstico indesejado para a progressão da doença (FERRANDINA et al., 2002; GAFFNEY et al., 2001; GHOSH et al., 2010). A COX-2 está relacionada ao metabolismo de prostaglandinas bloqueando a apoptose e promovendo angiogênese. Uma relação entre COX-2 e VEGF tem sido encontrada, onde a inibição da COX-2 *in vitro* e camundongos geneticamente modificados sem a expressão da

COX-2 apresentou síntese reduzida de VEGF (CHIARUGI et al., 1998; WILLIAMS et al., 2000). Vários autores já demonstraram uma relação entre VEGF e MIP-2, MCP-1, MIF e COX-2 em células tumorais (CHIARUGI et al., 1998; UENO et al., 2000; WILLIAMS et al., 2000; SCAPINI et al., 2004; GHOSH et al., 2010). Estas proteínas têm ação na indução da angiogênese e estão presentes em ambientes hipóxicos.

Matte et al. (2001) observaram que monócitos humanos (U937) infectados com *L. donovani* induzem expressão de COX-2, que está envolvida na produção de PGE<sub>2</sub>, molécula imunossupressora, estando este mecanismo relacionado ao processo de patofisiologia da leishmaniose. Shweash et al. (2011) observaram que macrófagos infectados com *L. mexicana* apresentam fosforilação da p38MAPk que está relacionado ao aumento da expressão de COX-2 e iNOS e diminuição de IL-12.

#### 1.7.4 MIF - Macrophage Migration Inhibitory Factor

MIF é uma proteína pró-inflamatória induzida pela hipóxia, importante na angiogênese, proliferação e diferenciação celular. É encontrada em casos de sepse, asma, isquemia cardíaca, inflamações crônicas, doenças autoimunes e processos tumorais (GABER et al., 2011; GAO et al., 2011). A influência de MIF na angiogênese pode ocorrer tanto em condições hipóxicas quanto em normóxia.

Em condições hipóxicas, a presença de MIF amplifica a expressão e atividade de HIF-1 $\alpha$ . Em tumores, MIF induzido por hipóxia pode se difundir para áreas não hipóxicas e aumentar a expressão de VEGF e IL-8, promovendo aumento da neovascularização (RENDON et al., 2009). MIF está relacionada a mau prognóstico do câncer, com desenvolvimento de metástases e é secretada pela glândula pituitária anterior e por macrófagos ativados (REN et al., 2003; BUCALA et al., 2007; BACH et al., 2008; GAO et al., 2011).

Em microambientes hipóxicos, a expressão de MIF é dependente de HIF-1 $\alpha$  tanto em células tumorais de modelo murino (BUCALA et al., 2007) como em linfócitos T humano (GABER et al., 2011). Ren et al., (2003) observaram um aumento de MIF na presença de



VEGF, em carcinoma hepatocelular em humanos. Santos-Oliveira et al. (2011) observaram uma correlação entre os altos níveis de LPS plasmático e o aumento de MIF e citocinas pró-inflamatórias, em indivíduos com leishmaniose visceral, sugerindo mau prognóstico da doença.

### 1.7.5 HSP 70 – “Heat Shock Protein”

HSP-70 é uma proteína de choque térmico (“*heat shock protein*”), produzida pelas células como uma das formas de se proteger de danos causados por estresse do tipo hipertermia, estresse oxidativo, hipóxia e exposição a toxinas (YUAN et al., 2010).

Nosso grupo de pesquisa avaliou a expressão de proteínas de choque térmico (HSP-70) em macrófagos, sendo observada uma redução na expressão de HSP-70 nessas células durante hipóxia e infecção com *Leishmania* (DEGROSSOLI et al., 2007). Em outro estudo desenvolvido pelo nosso grupo, subpopulações de macrófagos foram adaptados ao ambiente hipóxico (J774 resistentes à morte em hipóxia severa (1% O<sub>2</sub>) e selecionados *in vitro*, estes apresentaram uma modulação negativa da expressão de HSP 70, redução do número de macrófagos infectados e do número de parasitas por macrófagos. Estas células apresentaram uma modulação negativa da expressão de HSP 70, da produção de TNF- $\alpha$  e NO, além de apresentar uma susceptibilidade reduzida à infecção com *L. amazonensis* (DEGROSSOLI et al., 2004; 2007).

### 1.7.6 MIP-2 - Macrophage Inflammatory Protein-2

Uma proteína importante na angiogênese e também correlacionada a microambientes hipóxicos é a CXCL1/MIP-2 (*Macrophage Inflammatory Protein-2*). Scapini et al. (2004) observaram a relação entre MIP-2 e VEGF-A na angiogênese, em modelo murino (C57BL/6). A neutralização de VEGF-A por anticorpos específicos impedia a resposta angiogênica induzida por MIP-2, indicando que MIP-2 induz o recrutamento de neutrófilos que liberam VEGF, resultando na angiogênese.

Ji et al. (2003) avaliando a expressão de alguns mediadores inflamatórios nos estágios iniciais de infecção de camundongos C57BL/6 por *L. amazonensis* e *L. major*, observaram que a infecção por *L. amazonensis* não apresenta uma produção de citocinas inflamatórias no estágio inicial de infecção, concomitante à redução de MIP-2. Estas alterações foram acompanhadas pela diminuição da capacidade de resposta das células T o que contribuiu para a progressão da lesão nos animais infectados por *L. amazonensis*, diferentemente da infecção por *L. major*.

Robert-Gangneux et al. (2012) avaliaram o papel das células iNKT, de C57BL/6 infectados com *L. donovani*, na formação de granulomas hepáticos e eliminação do parasito. O grupo observou que estas células estão envolvidas na produção de quimiocinas, dentre elas MIP-2, e citocinas utilizadas para o recrutamento de células para formação do granuloma. Uma correlação positiva foi observada entre a produção de MIP-2 e a quantidade de granulomas maduros, que supostamente estão envolvidos na resolução da infecção.

### 1.7.7 Gal-3 - Galectina 3

A Galectina 3 é um membro da família das lectinas que se liga seletivamente a resíduos de  $\beta$ -galactosidase. Localiza-se predominantemente no citoplasma, mas pode se translocar para o núcleo. A Gal-3 está relacionada a processos de adesão, proliferação, diferenciação celular, angiogênese e metástase em tumores. Dependendo do tipo de tumor pode apresentar atividades pró-apoptótica ou anti-apoptótica (NAKAHARA et al., 2005; BROWN et al., 2012).

Outra ação da Gal-3 é na implantação do embrião, uma vez que há maior expressão desta proteína no endométrio e trofoblasto. Além disto, ela está relacionada ao processo de adesão celular eptelial do endométrio e proliferação (LEI et al., 2009; YANG et al., 2012)

Brown et al. (2012) relataram um pior prognóstico de melanomas humanos mediante maior expressão de Gal-3, sugerindo que esta molécula possui uma função importante na

patogênese do melanoma e que pode ser utilizada como marcador de prognóstico em melanoma primário

Uma relação de infecção por protozoários, *Trypanosoma cruzi*, em mamíferos e a Gal-3 foi observada por Villalta et al. (2009), onde o silenciamento da Gal-3 humana promoveu redução da adesão dos tripomastigotas nas células hospedeiras.

Diante da hipótese de que existem alterações no microambiente da lesão causada por *L. amazonensis*, como concentração de oxigênio, expressão de VEGF e de proteínas inflamatórias (COX-2, HO-1, HSP-70, Gal-3, MIF, MIP-2, e p38MAPk), e de que estas alterações estejam relacionadas ao curso da infecção, avaliamos o perfil destes marcadores em linhagens de camundongos susceptíveis (Balb/c) e capazes de controlar a infecção (C57BL/6). Além disso, as proteínas que tiveram alterações mais relevantes foram avaliadas, também após tratamentos farmacológicos convencionais. Como estes tratamentos reduzem a carga parasitária acreditamos que é possível uma alteração no microambiente, com mudanças no perfil destas proteínas em lesões murinas induzidas por *L. amazonensis*, confirmando ou não a importância destes fatores no controle da infecção.

## 2. Objetivo Geral

Compreender o papel do microambiente hipóxico e avaliar a expressão de algumas proteínas inflamatórias durante a infecção por *Leishmania amazonensis* em camundongos susceptíveis (BALB/c/AnUnib) e capazes de controlar a infecção (C57BL/6/JUnib).

### 2.1 Objetivos específicos

Avaliar a presença de microambiente hipóxico das lesões de pata e dorso de camundongos BALB/c/AnUnib e lesões de pata em C57BL/6/JUnib, infectados com *L. amazonensis*, pelo método Hypoxyprobe<sup>TM</sup>-1 e pela detecção de HIF-1 $\alpha$  e HIF-2 $\alpha$ .

Avaliar o perfil de expressão do fator angiogênico, VEGF, em lesões de pata e de dorso de camundongos BALB/c/AnUnib e em lesões de pata em C57BL/6/JUnib, infectados com *L. amazonensis*.

Avaliar o perfil de expressão de proteínas inflamatórias (COX-2, HO-1, HSP-70, Gal-3, MIF, MIP-2, p38MAPk) nas lesões de pata e de dorso de camundongos BALB/c/AnUnib e lesões de pata em C57BL/6/JUnib, infectados com *L. amazonensis*.

Avaliar se camundongos BALB/c/AnUnib infectados com *L. amazonensis* e submetidos ao tratamento com Glucantime<sup>®</sup> ou Anfotericina B<sup>®</sup> apresentam modificações no microambiente hipóxico (Hypoxyprobe<sup>TM</sup>-1, HIF-1 $\alpha$  e HIF-2 $\alpha$ ), fator angiogênico (VEGF) e perfil de expressão das seguintes proteínas inflamatórias (HO-1, MIF e p38MAPk).

### 3. Materiais e Métodos

#### 3.1 Parasitas

As amastigotas de *Leishmania amazonensis* (MHOM/BR/73/M2269) foram mantidas em camundongos isogênicos BALB/c/AnUnib, no coxim plantar da pata traseira direita. Estes amastigotas foram retirados das lesões através de raspagem, com bisturi estéril, em solução salina contendo gentamicina (25mg/l). A suspensão obtida foi filtrada em gaze estéril para a retirada de resíduos teciduais. O número de amastigotas foi contado em câmara de Neubauer (BARBIERI et al., 1993).

#### 3.2 Animais

Camundongos isogênicos da linhagem BALB/c/AnUnib e C57BL/6/JUnib (fêmeas, 4 semanas), SPF (*Specific Patogen Free*), fornecidos pelo CEMIB/Unicamp foram mantidos no isolador do Departamento de Biologia Animal do Instituto de Biologia da Unicamp, durante o decorrer dos experimentos. A Comissão de Ética em Experimentação Animal da Unicamp (CEEA-IB-UNICAMP) aprovou a utilização destes animais e a realização deste trabalho (Número 1891-1).

#### 3.3 Infecção de camundongos com *L. amazonensis*

Os camundongos foram infectados, via subcutânea, no coxim plantar da pata traseira direita com  $10^5$  amastigotas de *L. amazonensis* (GIORGIO et al., 1998; ARRAIS-SILVA et al., 2005). Alternativamente, para infecção no dorso, os camundongos foram infectados com  $10^5$  amastigotas de *L. amazonensis* próximo a cauda. Para este modelo foi necessário a retirada dos pêlos, 2 dias antes da infecção, com o auxílio de uma lâmina de barbear. Este mesmo procedimento foi realizado, quando necessário, durante o período de desenvolvimento da lesão, para que não houvesse pêlos no local (AYRES, 2007).

### 3.4 Avaliação da infecção de camundongos inoculados com *L. amazonensis*

O curso da infecção na pata foi monitorado pelo acompanhamento do aumento da lesão, através da medição do seu comprimento e largura, utilizando um paquímetro, como instrumento de medição. O tamanho da pata infectada foi comparado ao tamanho da pata não infectada (GIORGIO et al., 1998; ARRAIS-SILVA et al., 2005). Os camundongos infectados na pata foram sacrificados por deslocamento cervical nos tempos 2, 20, 70 e 150 dias após a infecção.

O curso da infecção no dorso foi avaliado através da determinação do diâmetro da lesão. Para isso, medidas como o comprimento e a largura da lesão foram determinadas por paquímetro, semanalmente (AYRES, 2007). Nos tempos de 40, 70, 110 e 140 dias após a infecção os camundongos com lesão no dorso foram sacrificados por deslocamento cervical.

### 3.5 Avaliação da hipóxia por Hypoxyprobe<sup>TM</sup>-1

Aos animais foi administrado intraperitonealmente 120µl de hidrocloreto de pimonidazol (60mg/Kg) (Hypoxyprobe<sup>TM</sup>-1) uma hora antes do sacrifício. Para isto, o pimonidazol foi diluído em soro fisiológico estéril, na concentração de 10mg/ml.

Os tecidos da pata e do dorso foram fixados em paraformaldeído 4%, durante 24 horas e processados em parafina. Cortes de 5µm foram obtidos no micrótomo (Leica). A técnica de imuno-histoquímica para o kit Hypoxyprobe<sup>TM</sup>-1 foi realizada de acordo com o protocolo do fabricante deste kit. Após a desparafinização e hidratação dos cortes foi realizado o consumo da peroxidase endógena com uma solução de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 5% em PBS 0,05M pH 7,4, durante 5 minutos, a temperatura ambiente. A recuperação antigênica foi realizada com uma solução de pronase (Sigma) 0,01%, à 40°C, durante 40 minutos. Para o bloqueio dos sítios inespecíficos foi realizado incubação com soro de cabra (1:50) por 30 minutos, em câmara úmida a temperatura ambiente. Todas as lavagens foram realizadas com PBS 0,05M pH 7,4 + 0,2% Brij 35. As secções teciduais foram incubados, durante 40 minutos a temperatura ambiente, com anticorpo primário monoclonal MAb1 (Hypoxyprobe<sup>TM</sup>-1) para

detecção dos adutos de pimonidazol. Após lavagem, foi adicionado ao tecido anticorpo secundário (IgG anti camundongo produzido em coelho conjugados com biotina), durante 10 minutos a temperatura ambiente. A incubação com a estreptavidina-peroxidase foi realizada em câmara úmida, a temperatura ambiente durante 10 minutos. A 3,3-diaminobenzidina e o peróxido de hidrogênio foram utilizados como substratos. A contra-coloração foi realizada com Hematoxilina aquosa de Harris. Após desidratação, diafanização dos cortes e montagem das lâminas as imagens foram observadas no microscópio Eclipse 50i (Nikon) e capturadas pelo software ACT-1 (Nikon). Como controle negativo um corte por lâmina não recebeu anticorpo primário.

### **3.6 Avaliação da expressão de COX-2, Gal-3, HIF-1 $\alpha$ , HO-1, HSP-70, Mac-3, MIF, MIP-2, p38-MAPK e VEGF pelo método de imuno-histoquímica**

A avaliação da expressão de COX-2, Gal-3, HIF-1 $\alpha$ , HO-1, HSP-70, Mac-3, MIF, MIP-2, p38-MAPK e VEGF nos tecidos de dorso e pata dos camundongos infectados com *L. amazonensis* foi realizada pelo método de imuno-histoquímica.

Os tecidos foram fixados em paraformaldeído 4% durante 24 horas, processados em parafina e cortados no micrótomo (5 $\mu$ m). Após a desparafinização e hidratação dos cortes foi realizado o consumo da peroxidase endógena com uma solução de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 5% em PBS 0,05M pH 7,4 durante 30 minutos, a temperatura ambiente.

A recuperação antigênica, realizada com Tampão citrato pH 6,0 no microondas (3 ciclos de 3 minutos cada), foi utilizada somente na detecção de Gal-3, HIF-1 $\alpha$ , HO-1, HSP-70, MIF, MIP-2, p38-MAPK e VEGF.

Em seguida o material foi incubado com PBS-BSA 1%, durante 30 minutos, a temperatura ambiente, para bloqueio de sítios inespecíficos. Todas as lavagens foram realizadas com PBS 0,05M pH 7,4 + 0,2% Tween 20.

Os anticorpos primários utilizados foram:

- policlonal anti-HIF-1 $\alpha$  produzido em coelho (Santa Cruz Biotechnology)
- policlonal anti-VEGF produzido em coelho (Calbiochem)

- policlonal anti-MIF produzido em coelho (Santa Cruz Biotechnology)
- policlonal anti-MIP-2 produzido em coelho (Santa Cruz Biotechnology)
- policlonal anti-HO-1 produzido em coelho (Abcam)
- policlonal anti-HSP-70 produzido em coelho (Abcam)
- policlonal anti-p38 produzido em coelho (Abcam)
- policlonal anti-galectina 3 produzido em coelho (Abcam)
- policlonal anti-COX-2 produzido em cabra (Abcam)
- monoclonal anti-mouse Mac-3 (BD Pharmingen)

Os anticorpos primários ficaram em contato com as secções teciduais, *overnight*, a 4°C. O anticorpo secundário conjugado com peroxidase (Sigma-Aldrich) foi incubado durante por 45 minutos em câmara úmida, a temperatura ambiente, e o substrato utilizado foi 3,3-diaminobenzidina associada ao peróxido de hidrogênio. A contracoloração foi realizada por Hematoxilina aquosa de Harris. Após desidratação, diafanização dos cortes e montagem das lâminas as imagens foram obtidas por um sistema de imagem digital em um microscópio de luz Eclipse 50i (Nikon) e capturadas pelo software ACT-1 (Nikon). Como controle negativo um corte por lâmina não recebeu anticorpo primário.

### **3.7 Avaliação da expressão e localização de HIF-1 $\alpha$ e HIF-2 $\alpha$ pelo método de imunofluorescência**

Os tecidos de pata traseira e dorso de camundongos BALB/c/AnUnib foram fixados em paraformaldeído 4% em PBS (0,1 M) pH 7,4, durante 24 horas, processados em parafina e cortados em 5 $\mu$ m de espessura. Após a desparafinização e hidratação, a recuperação antigênica foi realizada com Tampão Citrato pH: 6,0 no microondas (3 ciclos de 3 minutos cada). Todas as lavagens foram realizadas com PBS 0,05M pH: 7,4 + 0,2% Tween 20. Para bloqueio dos sítios inespecíficos foi utilizado PBS-BSA 1%, incubação em câmara úmida e a temperatura ambiente, durante 30 minutos. Anticorpos primários policlonais anti-HIF-1 $\alpha$  (Santa Cruz Biotechnology) e anti-HIF-2 $\alpha$  (produzido pelo laboratório do Dr. Darren Richard, da Universidade de Laval, Canadá, e gentilmente cedido



pelo Dr. Wagner W. Arrais- Silva) foram incubados, *overnight*, a 4°. O anticorpo secundário utilizado foi um IgG anti coelho conjugado com FITC (Sigma) e a incubação foi realizada em câmara escura durante 10 minutos, a temperatura ambiente. Em seguida, após lavagem os cortes foram incubados com Azul de Evans 0,01% (1:10) durante 10 minutos, em câmara escura. A montagem da lâmina foi realizada com meio de montagem contendo DABCO, glicerol 90% e DAPI em PBS. As imagens foram obtidas por um sistema de imagem digital em um microscópio de luz Eclipse 50i (Nikon) e capturadas pelo software ACT-1 (Nikon).

### **3.8 Protocolos de tratamentos dos camundongos BALB/c/AnUnib infectados com *L. amazonensis***

#### **3.8.1 Esquema terapêutico utilizando Glucantime**

Para avaliação do efeito do tratamento com Glucantime (N-methyl glucamine antimonite; Sanofi-Aventis), foram utilizados 20 camundongos BALB/c/AnUnib. Desses, 4 não foram infectados e 16 foram infectados com  $10^5$  amastigotas de *L. amazonensis* na pata direita.

Os animais foram divididos nos seguintes grupos:

- 4 camundongos BALB/c/AnUnib não infectados e não tratados (Grupo NINT)
- 8 camundongos BALB/c/AnUnib infectados com  $10^5$  amastigotas de *L. amazonensis* e não tratados (Grupo INFNT)
- 8 camundongos BALB/c/AnUnib infectados com  $10^5$  amastigotas de *L. amazonensis* e tratados com Glucantime (100mg/Kg/dia) (Grupo INFT).

O tratamento com Glucantime (100mg/Kg/dia) foi administrado intraperitonalmente durante 20 dias consecutivos, começando no 20° dia de infecção, conforme padronizado em nosso laboratório (ARRAIS-SILVA et al., 2006). Os camundongos foram examinados para detecção de úlceras cutâneas, metástase e infecção secundária, e posteriormente sacrificados por deslocamento cervical, 7 dias após o término do tratamento. A carga parasitária foi estimada nas lesões de 4 camundongos de cada grupo (INFNT e INFT).

---

Após o sacrifício as patas infectadas foram pesadas e o número total de amastigotas foi determinado como previamente descrito e padronizado em nosso grupo (ARRAIS-SILVA et al., 2005).

### 3.8.2 Esquema terapêutico utilizando Anfotericina B

Para avaliação do efeito do tratamento com Anfotericina B (Sigma-Aldrich) 20 camundongos BALB/c/AnUnib foram utilizados no experimento.

Os animais foram divididos nos seguintes grupos:

- 4 camundongos BALB/c/AnUnib não infectados e não tratados (Grupo NINT)
- 8 camundongos BALB/c/AnUnib infectados com  $10^5$  amastigotas de *L. amazonensis* e não tratados (Grupo INFNT)
- 8 camundongos BALB/c/AnUnib infectados com  $10^5$  amastigotas de *L. amazonensis* e tratados com Anfotericina B (5mg/Kg/dia) (Grupo INFT).

O tratamento com Anfotericina B (5mg/Kg/dia) foi administrado, intraperitonealmente, durante 15 dias consecutivos, começando no 20º dia de infecção.

Os camundongos foram examinados para detecção de úlceras cutâneas, metástase e infecção secundária, e posteriormente sacrificados, por deslocamento cervical, 2 dias após o término do tratamento. A carga parasitária foi estimada nas lesões de 4 camundongos de cada grupo (INFNT e INFT) de acordo com o descrito no item anterior (3.8.1).

### 3.9 Análise estatística

Todos os experimentos foram repetidos no mínimo por 3 vezes. Os resultados são apresentados como média  $\pm$  DP. Os dados obtidos para os ensaios de infecção com *L. amazonensis* em diferentes condições são analisados estatisticamente pelo Teste t-Students, com um nível de significância de  $p < 0.05$ .

## 4. Resultados

### 4.1 Avaliação da infecção causada por *L. amazonensis* em camundongos BALB/c/AnUnib e C57BL/6/JUnib

Primeiramente, avaliamos o curso da infecção nos dois modelos murinos escolhidos para esse trabalho.

#### 4.1.1 Avaliação da infecção causada por *L. amazonensis* em camundongos BALB/c/AnUnib - Modelo dorso

Camundongos BALB/c/AnUnib foram infectados no dorso, com  $10^5$  amastigotas de *L. amazonensis*, e foram monitorados durante 140 dias. Durante esse período, não se observou mortalidade no grupo de animais infectados.

O aparecimento de nódulo único, no dorso, onde o parasito foi inoculado, ocorreu com aproximadamente 15 dias de infecção. Houve um aumento progressivo do diâmetro da lesão (Figura 1), concomitante ao aumento do percentual de macrófagos no infiltrado celular, avaliado em material histológico das lesões (Tabela 1). A ulceração dos nódulos teve início aos 40 dias de infecção (Figura 2) e nesse tempo foram observados somente 17% de macrófagos no infiltrado celular da lesão (Tabela 1). Após 70 dias de infecção os animais apresentaram lesão ulcerada com bordas elevadas, semelhante a uma lesão leishmaniótica em humanos (Figura 2). E observou-se diminuição da espessura da borda da lesão e infecções secundárias aos 140 dias de infecção (Figura 2). Nesse tempo não ocorreram metástases, e as lesões apresentaram 62% de macrófagos no infiltrado celular (Tabela 1). Confirmamos que as células infectadas no dorso eram macrófagos, através da detecção de Mac-3, uma glicoproteína de superfície de macrófagos, pela técnica de imunohistoquímica (Figura 3). Todos os animais foram sacrificados até 140 dias após a infecção. Esses resultados confirmam que camundongos BALB/c/AnUnib, quando inoculados no dorso com amastigotas de *L. amazonensis* são susceptíveis a infecção.

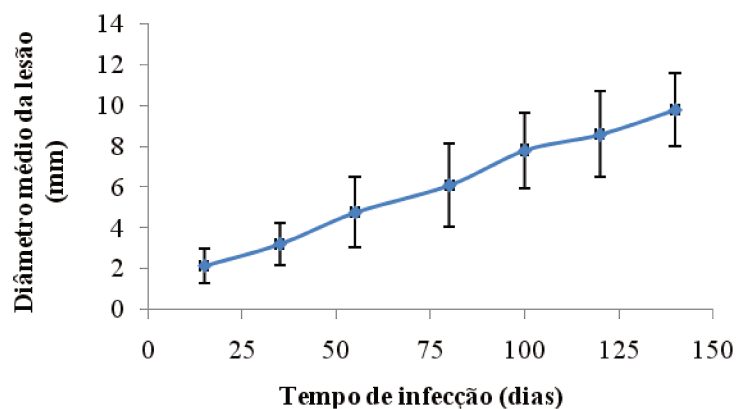


Figura 1. Progressão da lesão em camundongos BALB/c/AnUnib infectados no dorso com  $10^5$  amastigotas de *L. amazonensis*. Os valores representam média  $\pm$  DP (n: 20).



Figura 2. Camundongos BALB/c/AnUnib não infectados (NI) e infectados no dorso com  $10^5$  amastigotas de *L. amazonensis*, avaliados em 40, 70, 110 e 140 dias após a infecção.

Tabela 1. Percentual de macrófagos e outras células do infiltrado inflamatório em lesões induzidas por *L. amazonensis*, no dorso de camundongos BALB/c/AnUnib <sup>a</sup>.

Linhagem de camundongo	Tempo de infecção (dias)	Macrófagos (%) <sup>b</sup>	Outras células (%) <sup>c</sup>
BALB/c/AnUnib	40	17	83
BALB/c/AnUnib	70	33	67
BALB/c/AnUnib	110	46	54
BALB/c/AnUnib	140	62	38

<sup>a</sup> As lesões foram coradas com hematoxilina e as células foram contadas em 10 campos aleatórios.

<sup>b</sup> Macrófagos parasitados e não parasitados

<sup>c</sup> Células inflamatórias: células polimorfonucleares e linfócitos.

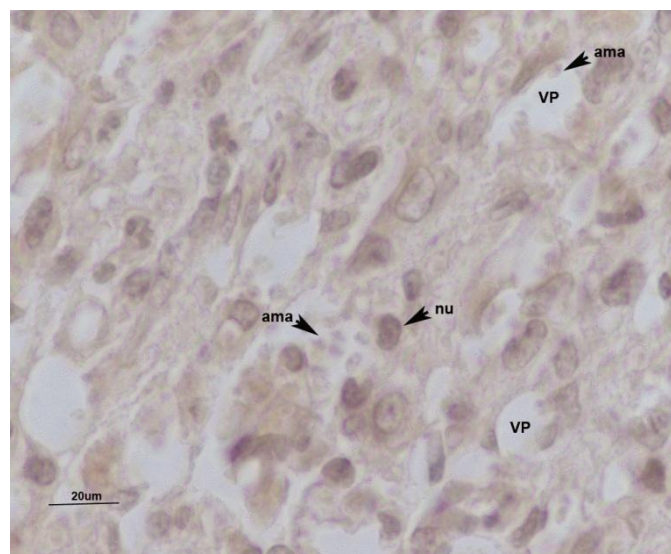


Figura 3. Determinação de macrófagos por imuno-histoquímica. Fotomicrografia do tecido de dorso de BALB/c/AnUnib infectado com *L. amazonensis* apresentando a imunomarcagem do antígeno de superfície de macrófagos (Mac-3). Amastigotas (ama), núcleo (nu) e vacúolo parasitóforo (VP).

#### 4.1.2 Avaliação da infecção causada por *L. amazonensis* em camundongos BALB/c/AnUnib e C57BL/6/JUnib - Modelo Pata

Camundongos BALB/c/AnUnib e C57BL/6/JUnib foram infectados com  $10^5$  amastigotas de *L. amazonensis* no coxim plantar da pata traseira direita. O desenvolvimento da lesão, no modelo pata, foi monitorado nos tempos de 2, 20, 70 e 150 dias de infecção (Figura 4).

Camundongos BALB/c/AnUnib apresentaram um progressivo aumento da pata infectada a partir do 20º dia de infecção (Figura 4). Esse aumento foi concomitante ao aumento do número de macrófagos no infiltrado celular na lesão (Tabela 2). Diferentemente da lesão induzida pelo parasita no dorso, a lesão na pata não foi circunscrita e nem possuiu bordas elevadas (Figuras 2 e 5A). Entre 20 a 70 dias de infecção houve um aumento na carga parasitária (Figura 6), e no percentual de macrófagos na lesão, de 58% (20º dia) a 91% (70º dia) (Tabela 2). Confirmamos que as células infectadas na pata eram macrófagos através da detecção de Mac-3, pela técnica de imuno-histoquímica (Figura 7).

As infecções secundárias foram observadas a partir do 70º dia de infecção (Figura 5A) e após 150 dias, assim como áreas de necrose e metástases na pata contralateral e no nariz dos animais (dados não mostrados).

Camundongos C57BL/6/JUnib apresentaram aumento da pata infectada até 40º dia de infecção (Figura 4). Após esse período ocorreu diminuição no tamanho da pata infectada quando comparada à pata não infectada (Figura 3) e no percentual de macrófagos na lesão (Tabela 2). Interessante notar que ocorreu aumento de outras células inflamatórias como os polimorfonucleares e os linfócitos (Tabela 2). A carga parasitária aumentou em menor intensidade do que em lesões de camundongos BALB/c/AnUnib (Figura 6). Ulceração nas lesões, infecções secundárias, áreas de necrose e metástases não foram observadas nesses animais (Figura 5B).

Quando comparamos as lesões em pata de camundongos BALB/c/AnUnib e C57BL/6/JUnib observamos uma nítida diferença no tamanho das patas infectadas a partir de 40 dias de infecção (Figuras 5 e 6). Os animais da linhagem BALB/c/AnUnib apresentaram uma variação de 12,5 a 17,5 mm no tamanho das lesões aos 150 dias de infecção. Nesse mesmo período camundongos C57BL/6/JUnib tiveram uma variação de 1,10 a 2 mm no tamanho da pata infectada (Figura 4). A carga parasitária apresentou aumento progressivo nos tempos de 20, 70 e 150 dias, nas duas linhagens, sendo esse maior nos camundongos BALB/c/AnUnib (Figura 6). Avaliando o nível de sobrevivência dos animais infectados, todos os BALB/c/AnUnib morreram em até 150 dias de infecção. Entretanto, nenhum C57BL/6/JUnib morreu nesse período de avaliação (Figura 8).

Os dados comprovam que a linhagem BALB/c/AnUnib é susceptível e a linhagem C57BL/6/JUnib controla a infecção com *L. amazonensis*.

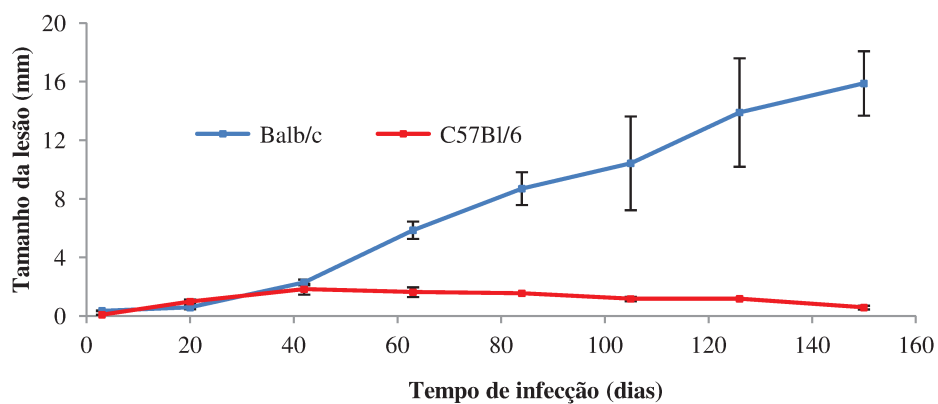


Figura 4. Evolução da lesão em camundongos BALB/c/AnUnib e C57BL/6/JUnib infectados no coxim plantar da pata traseira direita com  $10^5$  amastigotas de *L. amazonensis*. Os valores representam média  $\pm$  DP (n: 20).

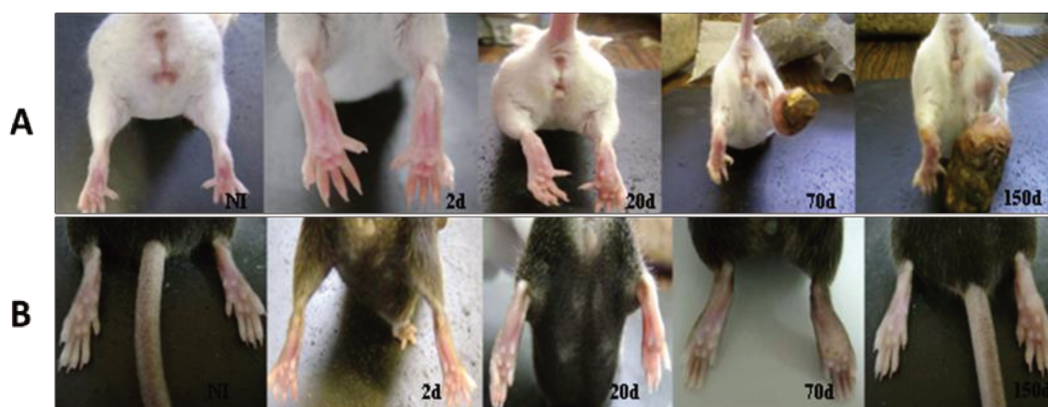


Figura 5. Evolução da leishmaniose cutânea experimental. Camundongos BALB/c/AnUnib (A) e C57BL/6/JUnib (B) não infectados (NI) e infectados no coxim plantar da pata traseira direita com  $10^5$  amastigotas de *L. amazonensis*, avaliados nos tempos de 2, 20, 70 e 150 dias após a infecção.

Tabela 2. Percentual de macrófagos e outras células do infiltrado inflamatório em lesões induzidas por *L. amazonensis*, em pata de camundongos BALB/c/AnUnib<sup>a</sup> e C57BL/6/JUnib<sup>a</sup>.

Linhagem de camundongo	Tempo de infecção (dias)	Macrófagos (%) <sup>b</sup>	Outras células (%) <sup>c</sup>
BALB/c/AnUnib	20	58	42
BALB/c/AnUnib	70	91	9
BALB/c/AnUnib	150	96	4
C57BL/6/JUnib	20	83	17
C57BL/6/JUnib	70	33	67
C57BL/6/JUnib	150	6	94

<sup>a</sup> As lesões foram coradas com hematoxilina e as células foram contadas em 10 campos aleatórios.

<sup>b</sup> Macrófagos parasitados e não parasitados

<sup>c</sup> Células inflamatórias: células polimorfonucleares e linfócitos.

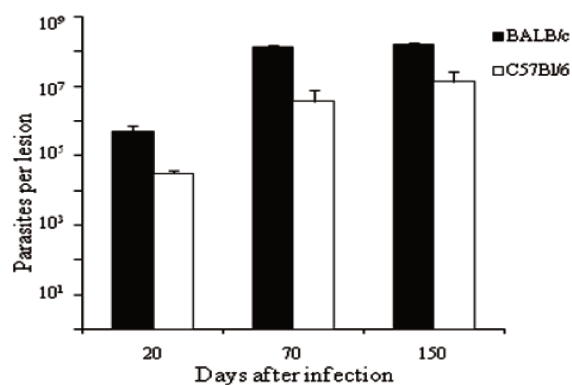


Figura 6. Carga parasitária das lesões. Nos tempos indicados 3 camundongos de cada grupo foram sacrificados, a pata infectada foi coletada para a contagem de parasitas como descrito no item “Materiais e métodos”.



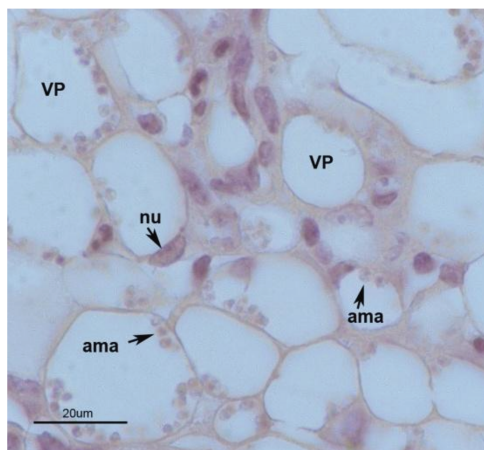


Figura 7. Determinação de macrófagos por imuno-histoquímica. Fotomicrografia do tecido de pata de BALB/c/AnUnib infectado com *L. amazonensis* apresentando a imunomarcção do antígeno de superfície de macrófagos Mac-3. Amastigotas (ama), núcleo (nu) e vacúolo parasitóforo (PV).

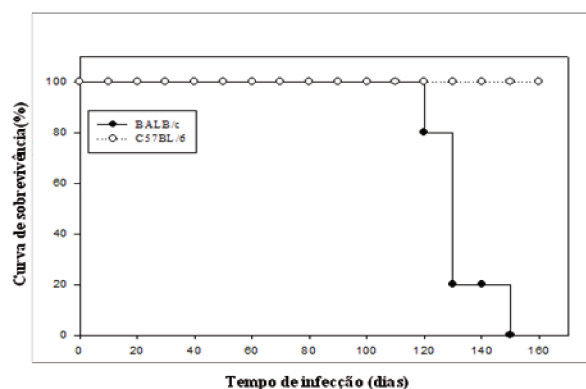


Figura 8. Curva de sobrevivência dos camundongos (BALB/c/AnUnib e C57BL/6/JUnib) infectados com *L. amazonensis* (n:10).

---

## 4.2 Avaliação da hipóxia tecidual pelo método Hypoxyprobe<sup>TM</sup>-1 nas lesões de camundongos BALB/c/AnUnib e C57BL/6/JUnib causadas por *L. amazonensis*

Após uma breve descrição das características histológicas da lesão, nosso próximo passo foi avaliar a presença de hipóxia tecidual nas lesões causadas por *L. amazonensis* nos dois modelos murinos escolhidos para este trabalho.

### 4.2.1 Avaliação da hipóxia tecidual nas lesões de camundongos BALB/c/AnUnib infectados por *L. amazonensis* - Modelo dorso

O tecido do dorso de camundongos BALB/c/AnUnib no 40° dia de infecção apresentou um intenso infiltrado celular composto principalmente por polimorfonucleares, linfócitos e macrófagos infectados pouco vacuolizados (Figura 9B). Nos períodos de 110 e 140 dias após infecção (fase crônica) houve um aumento do número de macrófagos infectados e vacuolizados em várias áreas do tecido. Porém, esses macrófagos apresentavam-se menos parasitados que os macrófagos observados em lesões da pata (Arrais-Silva et al., 2005) (Figuras 9 e 10). Um intenso infiltrado inflamatório presente em várias regiões do tecido de dorso durante todo o período da infecção sugere a formação de um microambiente hipóxico.

Através do método Hypoxyprobe<sup>TM</sup>-1, que tem como princípio a detecção de áreas hipóxicas, indicadas pela formação dos adutos de pimonidazol em locais com baixa pressão parcial de oxigênio, foi possível observar regiões do tecido imunomarcadas (coloração castanho), a partir do 40° dia de infecção (Figura 9B). Com a progressão da infecção mais regiões são marcadas pelo anticorpo anti-pimonidazol (Figuras 9B, 9C, 9D, 9E). Como controle negativo foi utilizado dorso de camundongo não infectado, que não apresentou marcação (Figura 9A).

Lesões no dorso de BALB/c/AnUnib apresentam-se hipóxicas, uma vez que adutos de pimonidazol foram detectados a partir de 40 dias de infecção.

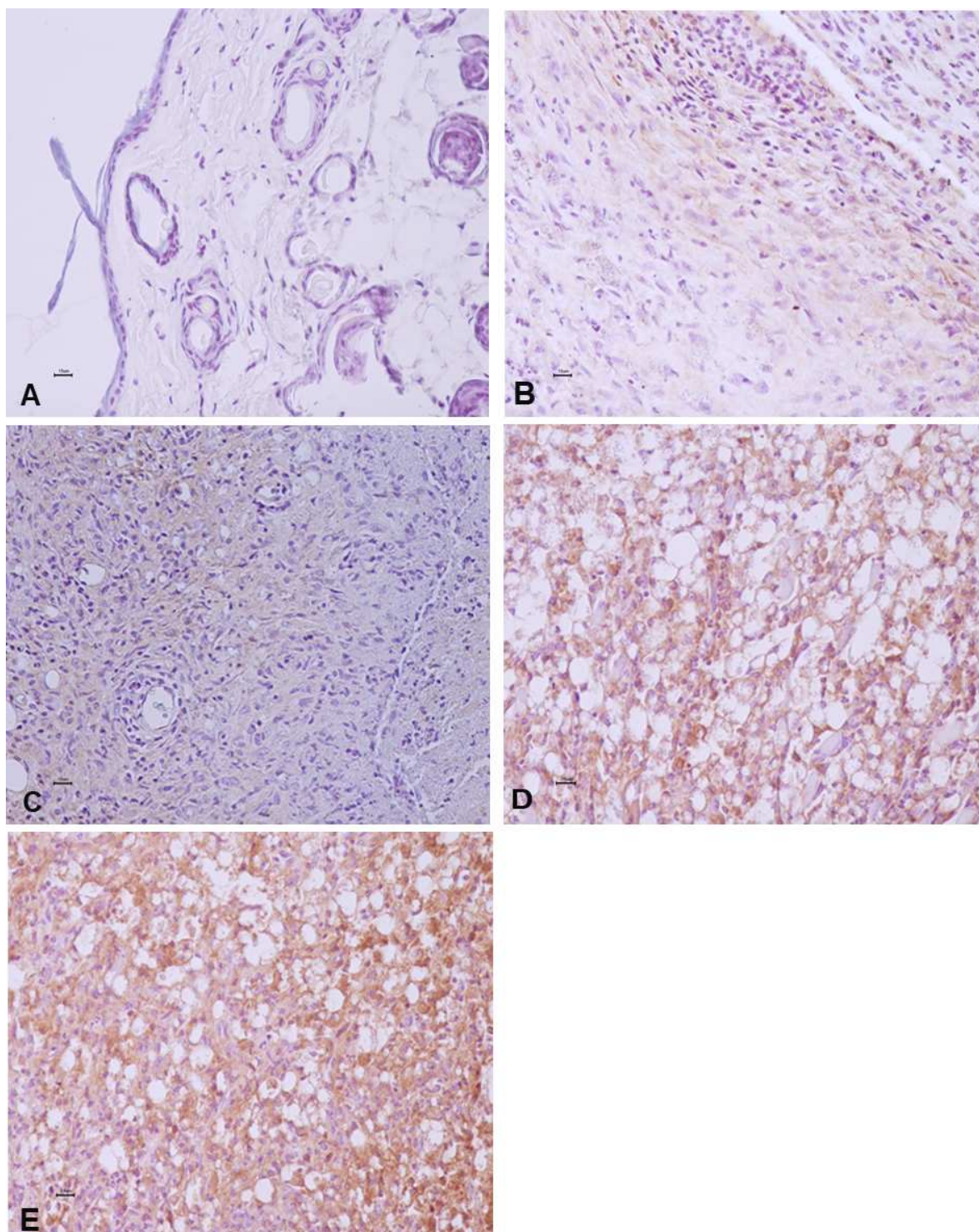


Figura 9. Avaliação da hipóxia tecidual, pelo método Hypoxyprobe™-1, no dorso de camundongos BALB/c/AnUnib. Tecidos de BALB/c/AnUnib não infectados (A) e infectados com  $10^5$  amastigotas

de *L. amazonensis* nos tempos de 40 (B), 70 (C), 110 (D) e 140 (E) dias de infecção. A cor castanha indica imunomarcção pelo anticorpo anti-pimonidazol. Aumento 200x. Os dados são representativos de 3 experimentos independentes.

#### 4.2.2 Avaliação da hipóxia tecidual em lesões de camundongos BALB/c/AnUnib infectados por *L. amazonensis* - Modelo pata

Lesões na pata de BALB/c/AnUnib infectados com amastigotas de *L. amazonensis* apresentam um infiltrado inflamatório composto por células polimorfonucleares e vários macrófagos intensamente parasitados e vacuolizados, a partir de 70 dias de infecção (Figuras 10D, 10E, 10F). Este infiltrado celular, a intensa multiplicação do parasito e a presença de infecção secundária sugere a formação de um microambiente hipóxico.

Através do método Hypoxyprobe<sup>TM</sup>-1, microambientes hipóxicos foram detectados, pela imunomarcção (coloração castanho) com o anticorpo anti-pimonidazol, a partir do 20º dia de infecção (Figura 10C). Com a progressão da infecção mais regiões foram marcadas com esse anticorpo nos 70º e 150º dias (Figuras 10D e 10E). Patas de camundongos BALB/c/AnUnib não infectados e com 2 dias de infecção não apresentaram marcação (Figuras 10A e 10B).

De acordo com nossos resultados lesões induzidas por *L. amazonensis* em pata de camundongos BALB/c/AnUnib apresentam microambientes hipóxicos, com formação de adutos de pimonidazol a partir de 20 dias de infecção.

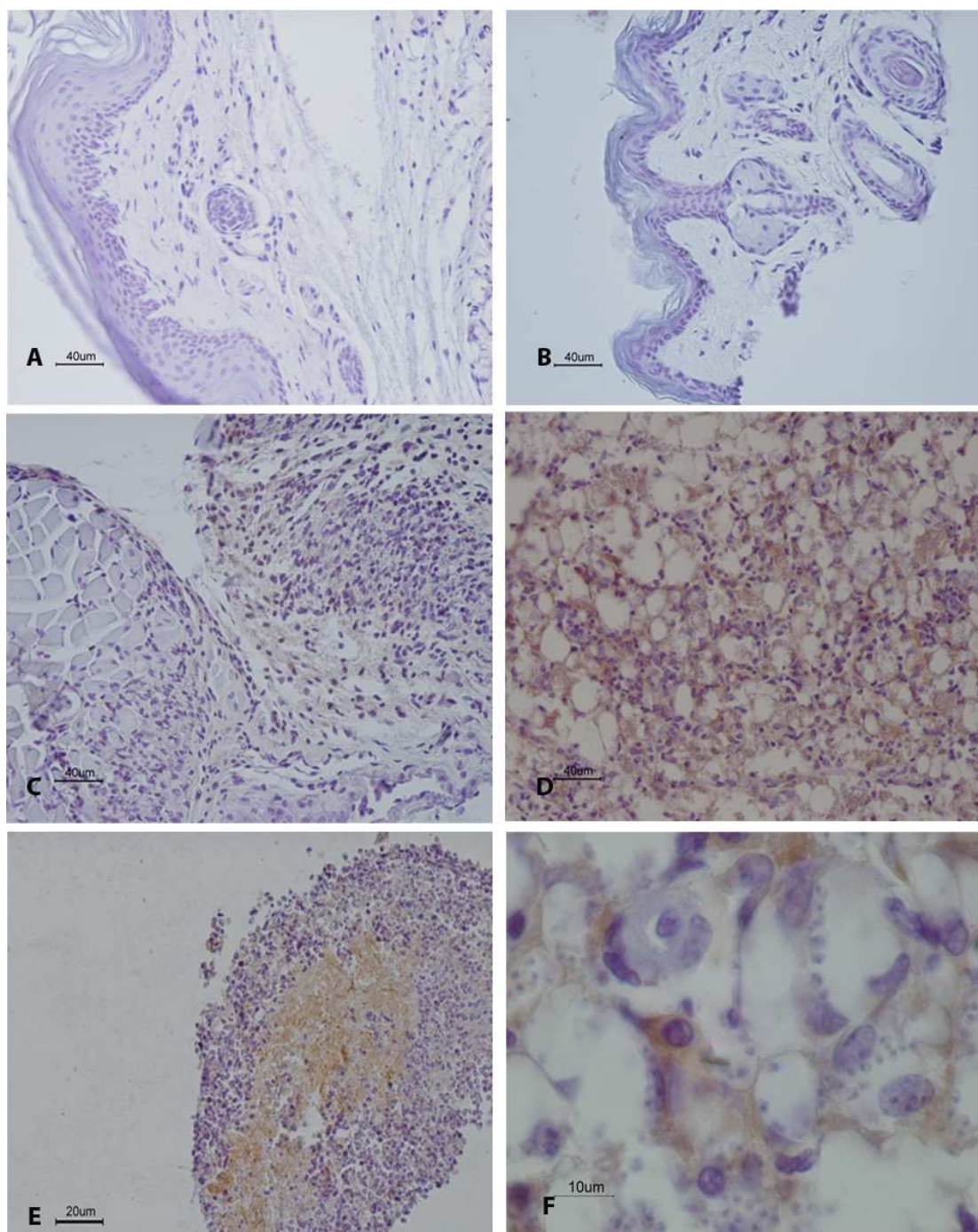


Figura 10. Avaliação da hipóxia tecidual, pelo método Hypoxyprobe™-1, em pata de camundongos BALB/c/AnUnib. Tecidos de BALB/c/AnUnib não infectado (A) e infectados com  $10^5$  amastigotas de *L. amazonensis* nos tempos de 2(B), 20 (C), 70 (D) e 150 (E) dias de infecção (Aumento:200x).

---

Tecido de pata de BALB/c/AnUnib no 150º dia de infecção com evidências de marcação de área hipóxica (F) (Aumento 1000x). A coloração castanho indica imunomarcação pelo anticorpo anti-pimonidazol. Os dados são representativos de 3 experimentos independentes.

#### 4.2.3 Avaliação da hipóxia tecidual nas lesões de camundongos C57BL/6/JUnib infectados por *L. amazonensis* - Modelo pata

Seções de tecidos da pata de camundongos C57BL/6/JUnib infectados por *L. amazonensis* apresentaram um intenso infiltrado inflamatório a partir do 2º dia de infecção (Figura 11B). Este infiltrado inflamatório persistiu até 150 dias de infecção e foi composto por células polimorfonucleares, linfócitos e macrófagos (Figura 11). Diferentemente da lesão de BALB/c/AnUnib, a quantidade de macrófagos parasitados no tecido de C57BL/6/JUnib e o número de parasitas no interior destas células foram menores (Figuras 10E e 11E). O precoce infiltrado inflamatório sugere a possibilidade de haver áreas hipóxicas nas lesões induzidas por *L. amazonensis* em C57BL/6/JUnib.

Através do ensaio para avaliação de hipóxia, foi possível identificar microrregiões com baixa concentração de oxigênio no tecido aos 70 e 150 dias de infecção (Figuras 11D e 11E). Patas de camundongos C57BL/6/JUnib não infectados e com 2 e 20 dias de infecção não apresentaram marcação (Figuras 11A, 11B e 11C).

De acordo com esses resultados, lesões induzidas por *L. amazonensis* em pata de camundongos C57BL/6/JUnib apresentaram microambientes hipóxicos, com formação de adutos de pimonidazol, aos 70 e 150 dias de infecção.

Na tabela 3 estão resumidos os resultados de detecção de microambientes hipóxicos pelo método Hypoxyprobe<sup>TM</sup>-1, em lesões de dorso e pata de camundongos BALB/c/AnUnib e pata de C57BL/6/JUnib.

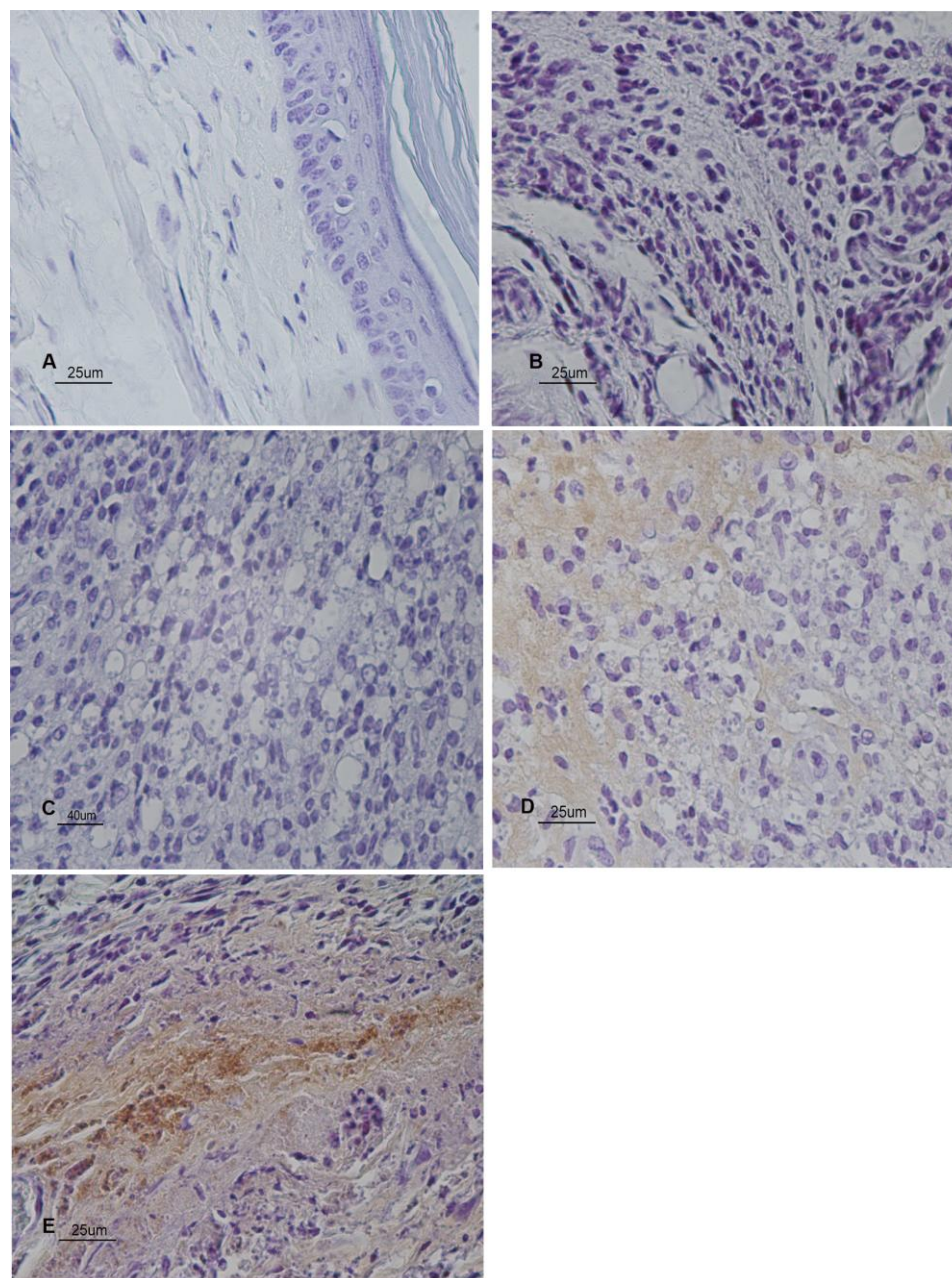


Figura 11. Avaliação da hipóxia tecidual, pelo método Hypoxyprobe<sup>TM</sup>-1, em pata de camundongos C57BL/6/JUnib. Tecidos de C57BL/6/JUnib não infectado (A) e infectados com  $10^5$  amastigotas de *L. amazonensis* nos tempos de 2(B), 20 (C), 70 (D) e 150 (E) dias de infecção (aumento: 400x). A coloração castanho indica imunomarcacão pelo anticorpo anti-pimonidazol. Os dados são representativos de 3 experimentos independentes.

Tabela 3. Detecção de microambientes hipóxicos através do Hypoxyprobe<sup>TM</sup>-1 em tecidos não infectados e infectados com 10<sup>5</sup> amastigotas *L. amazonensis* de dorso e pata de BALB/c/AnUnib e pata de C57Bl6/JUnib.

MARCADORES E PROTEÍNAS	TEMPO DE INFECCÃO (dias)	BALB/c/AnUnib	TEMPO DE INFECCÃO (dias)	BALB/c/AnUnib	C57BL/6/JUnib
		DORSO		PATA	
HYPOXYPROBE	NI	-	NI	-	-
	40	+	2	-	-
	70	+	20	+	-
	110	+	70	+	+
	140	+	150	+	+

#### 4.3 Avaliação da hipóxia tecidual em lesões causadas por *L. amazonensis* em camundongos BALB/c/AnUnib e C57BL/6/JUnib através da detecção de HIF-1 $\alpha$ e HIF-2 $\alpha$

##### 4.3.1 Expressão de HIF-1 $\alpha$ e HIF-2 $\alpha$ em lesões nos camundongos BALB/c/AnUnib infectados com *L. amazonensis* – Modelo Dorso

Como a lesão no dorso de camundongos BALB/c/AnUnib apresentou microambientes hipóxicos quando avaliada pelo método de Hypoxyprobe<sup>TM</sup>-1, avaliamos a expressão dos fatores de transcrição envolvidos na respostas a hipóxia, HIF-1 $\alpha$  e HIF-2 $\alpha$ .

A expressão de HIF-1 $\alpha$  foi avaliada tanto pelo método de imuno-histoquímica quanto pelo método de imunofluorescência. Utilizando a técnica de imuno-histoquímica foi possível observar imunomarcção (coloração castanho) apenas na fase crônica da infecção (110 e 140 dias) (Figura 12D e 12E). A marcação para HIF-1 $\alpha$  avaliada pela imuno-histoquímica não evidencia presença de HIF-1  $\alpha$  no núcleo, mas é predominante no citoplasma das células. Não houve marcação para HIF-1 $\alpha$  em tecido não infectado ou em tecido com 40 e 70 dias de infecção (Figuras 12A, 12B e 12C). Dados preliminares da expressão de HIF-2 $\alpha$ , pela técnica de imunoperoxidase, demonstraram a presença de HIF-



2 $\alpha$  na lesão leishmaniótica em dorso de camundongos BALB/c/AnUnib a partir de 110 dias de infecção (dados não mostrados).

Para determinar o local de expressão do HIF-1 $\alpha$  e HIF-2 $\alpha$  (citoplasma ou núcleo) foi utilizada a técnica de imunofluorescência. Como o anticorpo secundário era marcado com FITC, a coloração verde evidenciou expressão de HIF-1 $\alpha$  ou HIF-2 $\alpha$ . Quando houve marcação pelo anticorpo anti-HIF no citoplasma, observou-se cor verde. O marcador de núcleo foi DAPI (coloração azul). Assim, quando anticorpo anti-HIF marcou núcleo juntamente com DAPI foi observada uma cor ciano. Com marcação negativa do anticorpo anti-HIF no núcleo, a coloração se manteve azul. No tecido sadio e com 40 dias de infecção não houve imunomarcação para HIF-1 $\alpha$  e HIF-2 $\alpha$  (Figuras 13A, 13B, 13C e 13D). Na fase crônica da infecção (110 e 140 dias) foi observada imunomarcação para HIF-1 $\alpha$  e HIF-2 $\alpha$  predominantemente no citoplasma das células (Figuras 13E, 13F, 13G, 13H). Não foi observada expressão de HIF-1 $\alpha$  e HIF-2 $\alpha$  no núcleo das células em nenhum dos tempos avaliados (Figura 13).

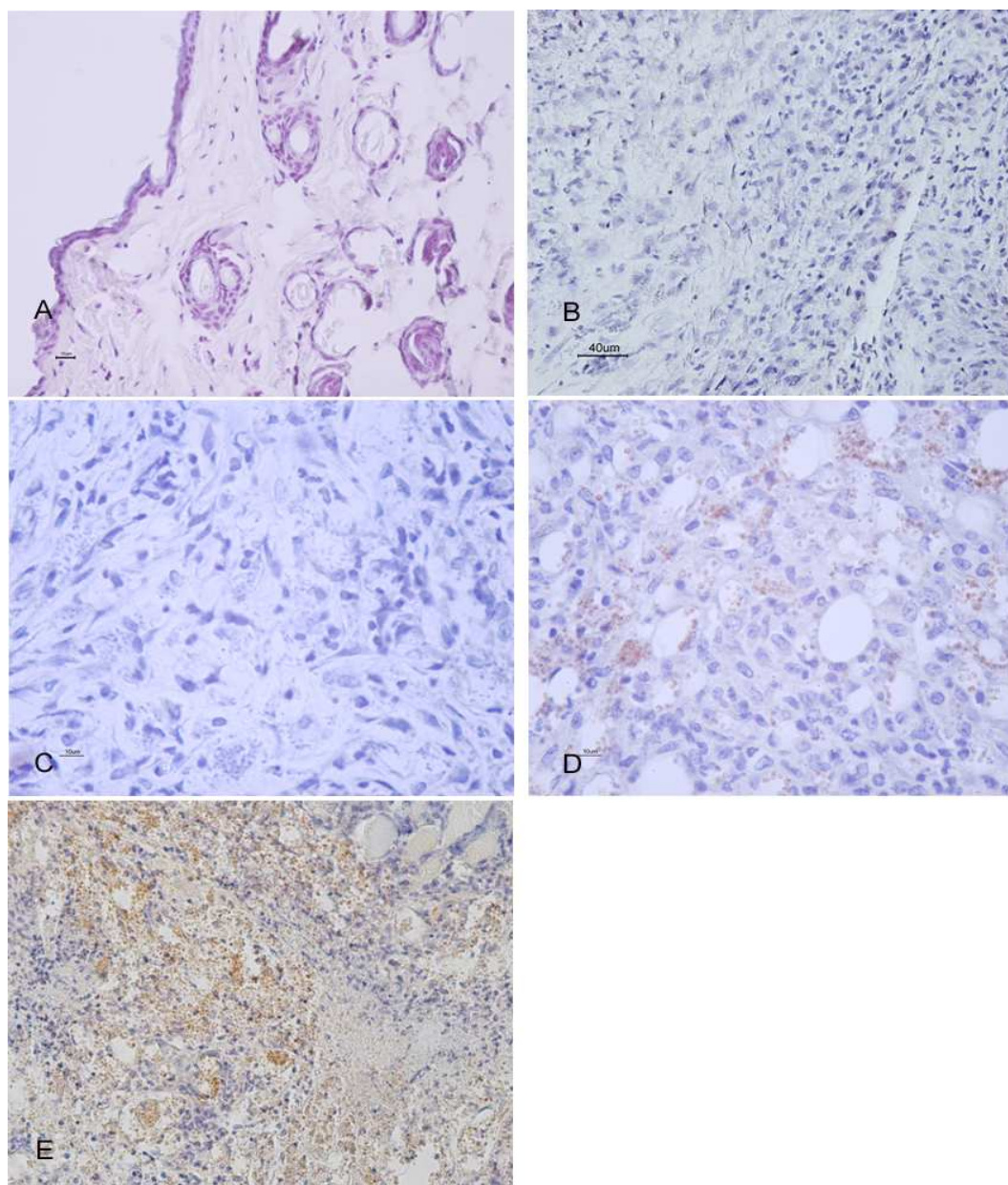


Figura 12. Avaliação da expressão de HIF-1 $\alpha$  no dorso de camundongos BALB/c/AnUnib por imuno-histoquímica. Tecidos de BALB/c/AnUnib não infectados (A) (aumento: 200x) e infectados com 10<sup>5</sup> amastigotas de *L. amazonensis* nos tempos de 40 (B) (aumento: 200x), 70 (C) (aumento: 400x), 110 (D) (aumento: 400x) e 140 (E) dias de infecção (aumento: 200x). A coloração castanho indica imunomarcção pelo anticorpo anti- HIF-1 $\alpha$ . Os dados são representativos de 3 experimentos independentes.

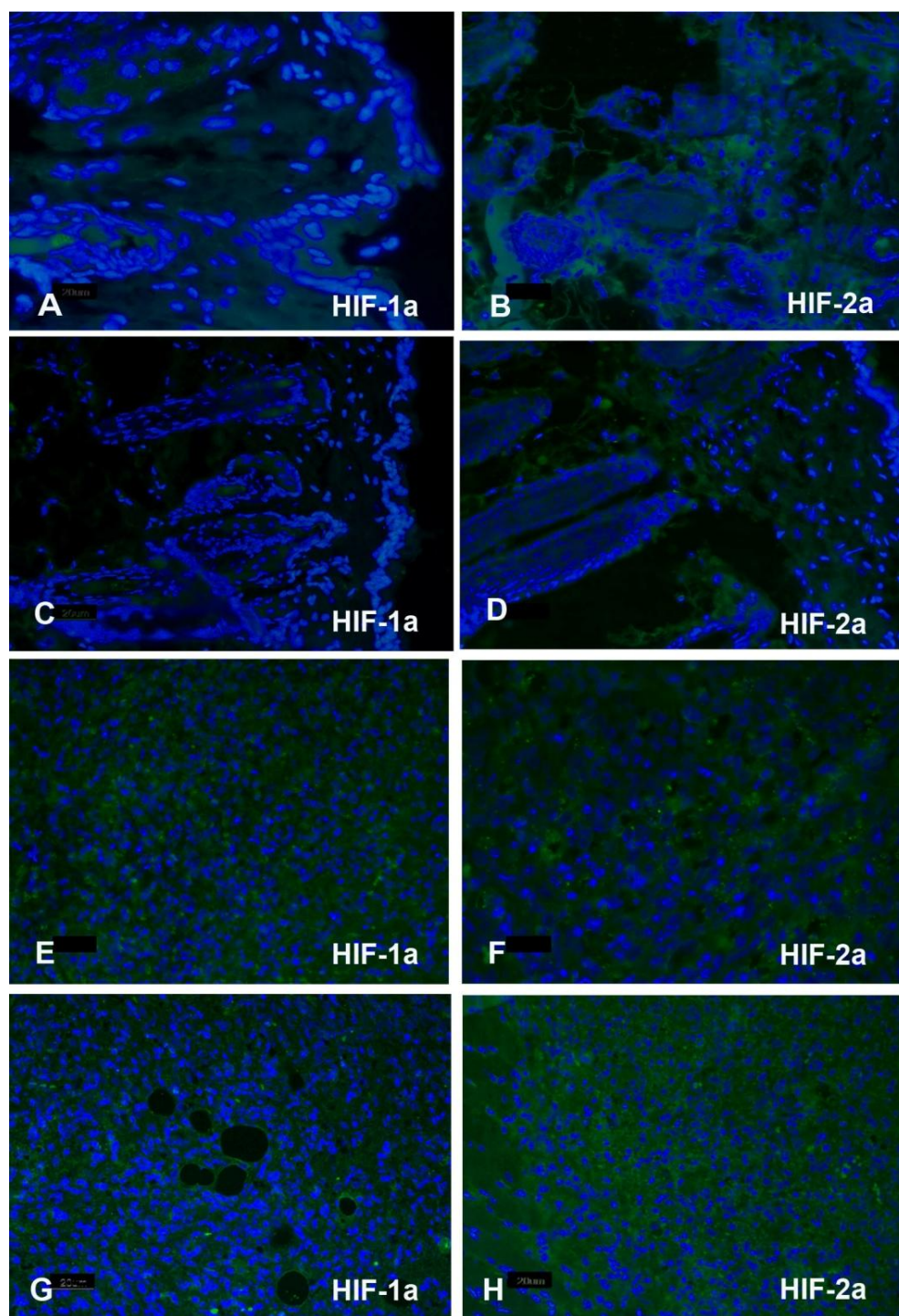


Figura 13. Avaliação da expressão de HIF-1 $\alpha$  e HIF-2 $\alpha$ , por imunofluorescência, em lesões de dorso de camundongos BALB/c/AnUnib infectados com *L. amazonensis*. Expressão de HIF-1 $\alpha$  em tecidos de dorso de camundongos não infectados (A), 40 (C), 110 (E) e 140 (G) dias de infecção.

Expressão de HIF-2 $\alpha$  em tecidos de dorso de camundongos não infectados (B), 40 (D), 110 (F) e 140 (H) dias de infecção. Coloração verde indica imunomarcção com anticorpo anti-HIF-1 $\alpha$  ou anti-HIF-2 $\alpha$ , coloração azul indica marcação nuclear por DAPI, coloração ciano indica sobreposição das marcações (aumento: 200x). Os dados são representativos de 3 experimentos independentes.

#### 4.3.2 Expressão de HIF-1 $\alpha$ e HIF-2 $\alpha$ em lesões nos camundongos BALB/c/AnUnib infectados com *L. amazonensis* – Modelo Pata

Microambientes hipóxicos foram observados em lesões de pata de BALB/c/AnUnib, através do Hypoxyprobe<sup>TM</sup>-1, assim o próximo passo foi avaliação da expressão de HIF-1 $\alpha$  e HIF-2 $\alpha$ , pelas técnicas de imuno-histoquímica e imunofluorescência.

Com a técnica de imuno-histoquímica foi observada imunomarcção apenas na fase crônica da infecção (70 e 150 dias) (Figuras 14D e 14E). Características histológicas, como infiltrado celular e macrófagos intensamente parasitados e vacuolizados, podem ser visualizadas na Figura 14. A imunomarcção para HIF-1 $\alpha$ , avaliada por esta técnica, não evidencia presença desse fator de transcrição no núcleo, sua expressão é observada predominantemente no citoplasma das células. Não houve marcação para HIF-1 $\alpha$  em tecido não infectado ou em tecido com 2 e 20 dias de infecção (Figuras 14A, 14B e 14C). Dados iniciais da expressão de HIF-2 $\alpha$  pela técnica de imunoperoxidase demonstraram a presença de HIF-2 $\alpha$  em pata de camundongos BALB/c/AnUnib, após 70 dias de infecção (dados não mostrados).

Através da técnica de imunofluorescência foi possível determinar o local de expressão de HIF-1 $\alpha$  e HIF-2 $\alpha$  (citoplasma ou núcleo). Pata de BALB/c/AnUnib não infectado (dados não mostrados) e com 2 dias de infecção (Figura 15A e 15B) não apresentaram imunomarcção para HIF-1 $\alpha$  e HIF-2 $\alpha$ . Porém, com 20 dias de infecção foi observada uma pequena marcação para HIF-1 $\alpha$  e uma marcação expressiva para HIF-2 $\alpha$  no citoplasma (verde) e no núcleo (ciano) de algumas células (Figuras 15C e 15D). Na fase crônica de infecção (70 e 150 dias) foi observada imunomarcção para HIF-1 $\alpha$  e HIF-2 $\alpha$  no citoplasma e núcleo das células (Figuras 15E, 15F, 15G e 15H).

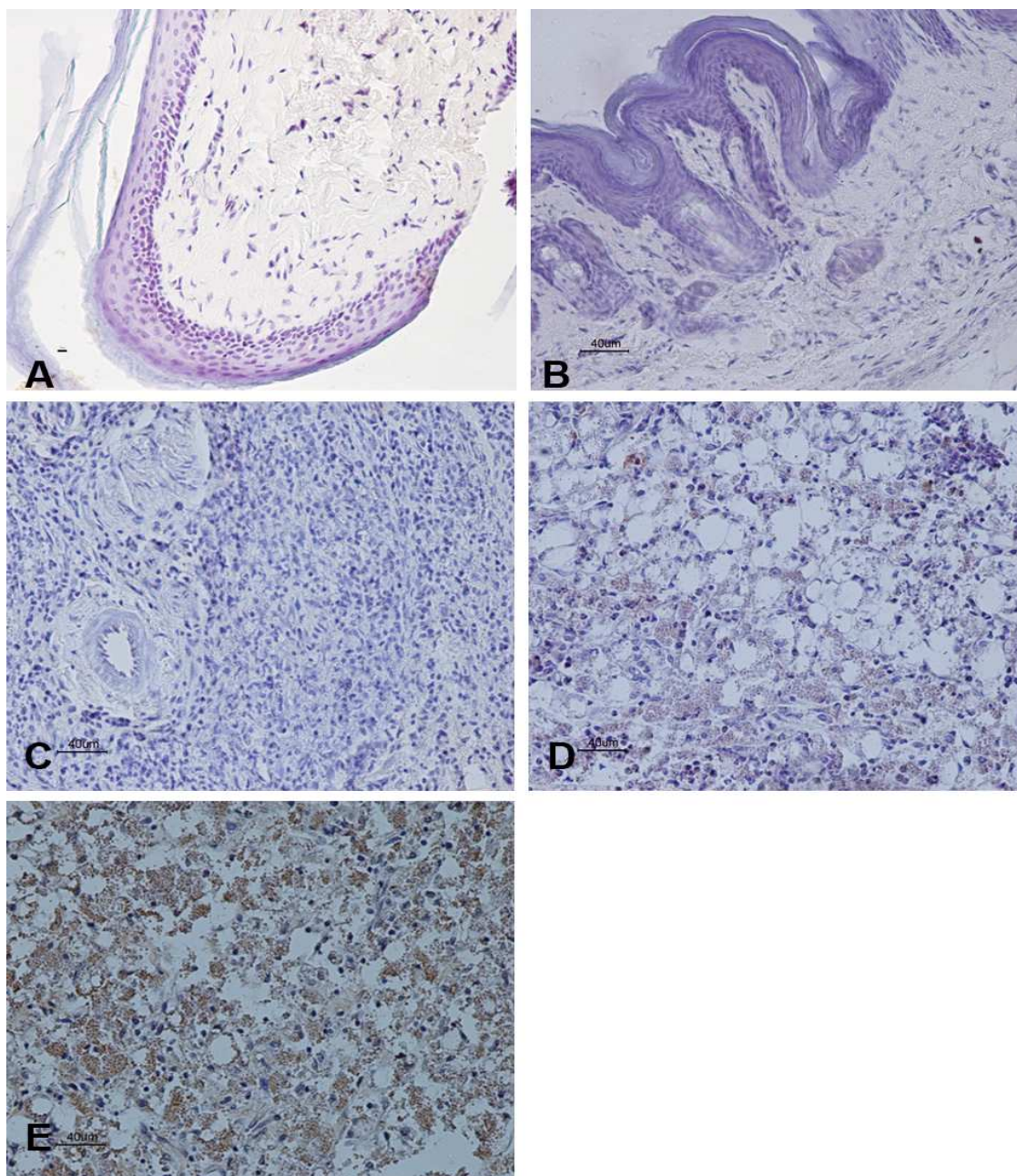


Figura 14. Avaliação da expressão de HIF-1 $\alpha$  em pata de camundongos BALB/c/AnUnib por imuno-histoquímica. Tecidos de BALB/c/AnUnib não infectados (A) e infectados com  $10^5$  amastigotas de *L. amazonensis* nos tempos de 2 (B), 20 (C), 70 (D) e 150 (E) dias de infecção (Aumento: 200x). A coloração castanho indica imunomarcagem pelo anticorpo anti- HIF-1 $\alpha$ . Os dados são representativos de 3 experimentos independentes.

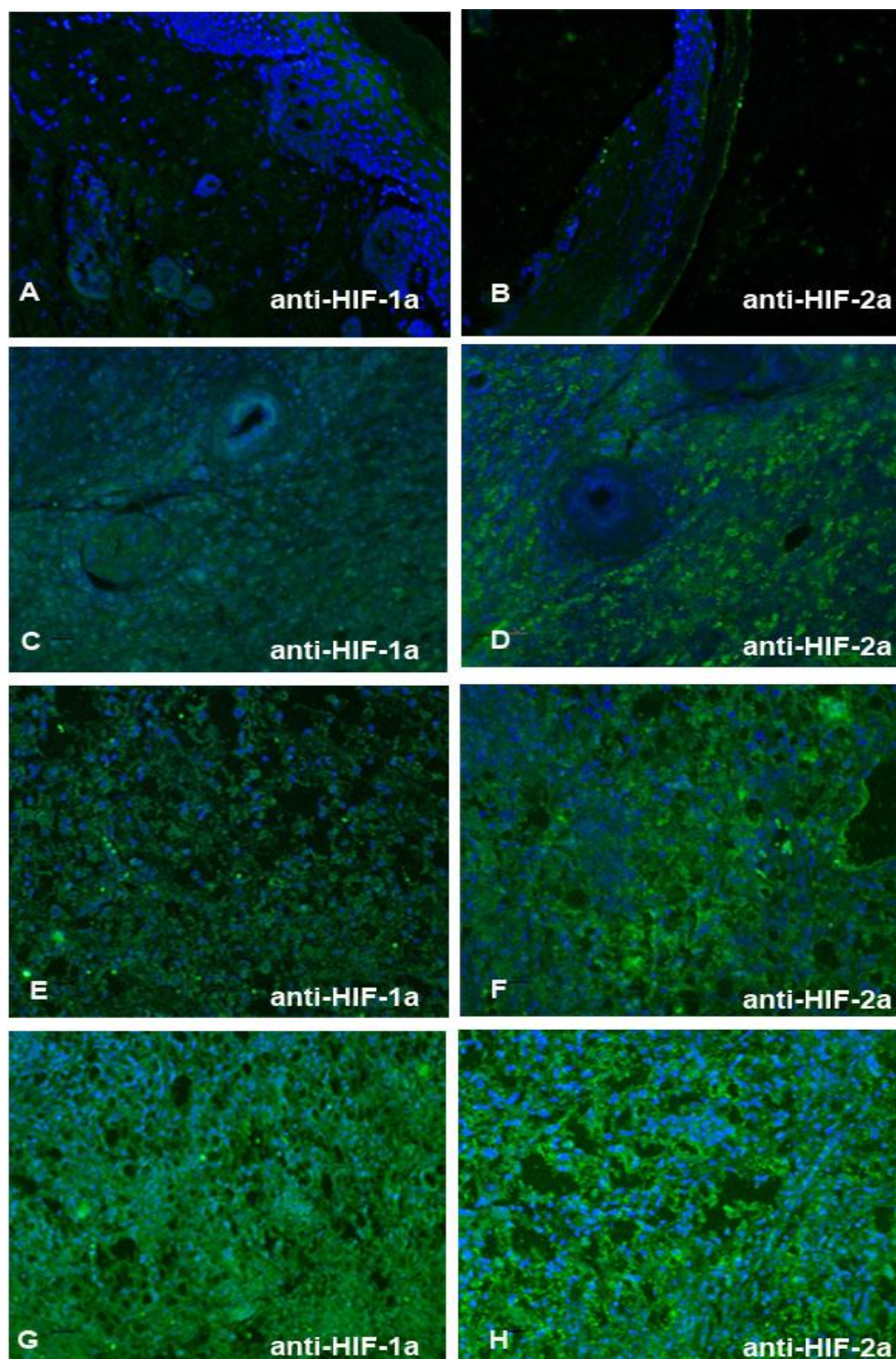


Figura 15. Avaliação da expressão de HIF-1 $\alpha$  e HIF-2 $\alpha$  por imunofluorescência, em lesões de dorso de camundongos BALB/c/AnUnib infectados com *L. amazonensis*. Expressão de HIF-1 $\alpha$  em

---

tecidos de pata de BALB/c/AnUnib com 2 (A), 20(C), 70 (E) e 150 (G) dias de infecção. Expressão de HIF-2 $\alpha$  em tecidos de pata de BALB/c/AnUnib com 2 (B), 20 (D), 70 (F) e 150 (H) dias de infecção. Coloração verde indica imunomarcacão com anticorpo anti-HIF-1 $\alpha$  ou anti-HIF-2 $\alpha$ , coloração azul indica marcação nuclear por DAPI, a cor ciano indica sobreposicão das marcações (aumento: 200x). Os dados são representativos de 3 experimentos independentes.

#### 4.3.3 Expressão de HIF-1 $\alpha$ e HIF-2 $\alpha$ em lesões nos camundongos C57BL/6/JUnib infectados com *L. amazonensis* – Modelo Pata

Com a técnica de imuno-histoquímica foi possível observar imunomarcacão com o anticorpo anti-HIF-1 $\alpha$  em 20, 70 e 150 dias de infecção em tecido de pata de camundongos C57BL/6/JUnib (Figura 16C, 16D e 16E). Não foi observada expressão de HIF-1 $\alpha$  em tecido de C57BL/6/JUnib não infectado e em tecido de animais com 2 dias de infecção (Figuras 16A e 16B).

A imunomarcacão para HIF-1 $\alpha$  e HIF-2 $\alpha$ , avaliadas por imunofluorescência, indicou a presença desses fatores de transcriçãõ no núcleo e citoplasma, em 20 e 70 dias de infecção (Figura 17C, 17D, 17E e 17F). No 150º dia observa-se uma predominância da expressãõ de HIF-1 $\alpha$  e HIF-2 $\alpha$  no citoplasma (Figura 17G e 17H). Nenhuma imunomarcacão para estes fatores de transcriçãõ foi observada em pata não infectada (dados não mostrados) e com 2 dias de infecção (Figuras 17A e 17B).

Em lesões de pata de C57BL/6/JUnib, HIF-1 $\alpha$  e HIF-2 $\alpha$  foram observados no núcleo e citoplasma aos 20 e 70 dias de infecção, porém em 150 dias de infecção a predominância de expressãõ destes fatores foi no citoplasma.

Na tabela 4 estão resumidos os resultados da expressãõ de HIF-1 $\alpha$  e HIF-2 $\alpha$  em lesões de dorso e pata de camundongos BALB/c/AnUnib e pata de camundongos C57BL/6/JUnib.

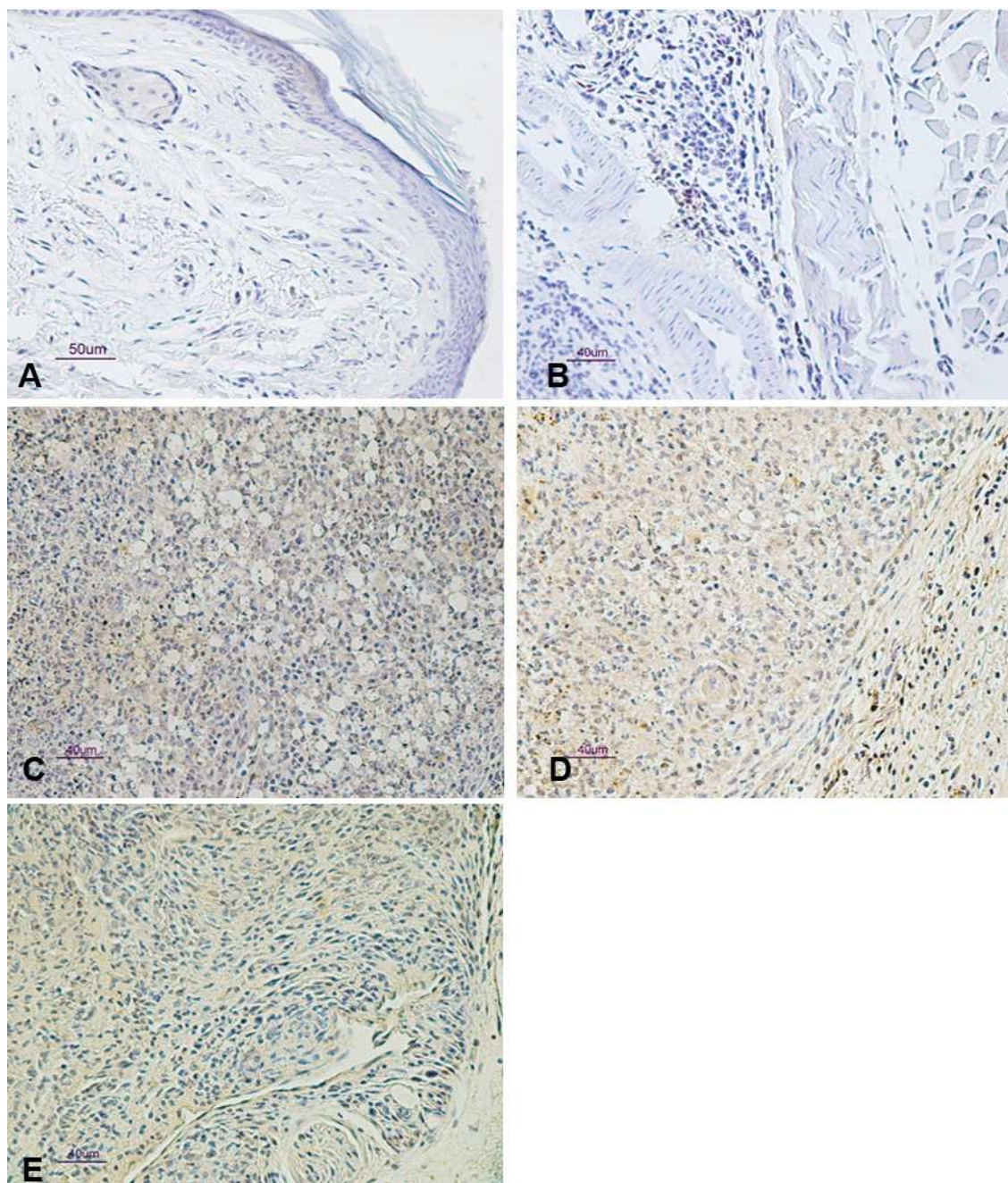


Figura 16. Avaliação da expressão de HIF-1 $\alpha$  em pata de camundongos C57BL/6/JUnib por imunohistoquímica. Tecidos de C57BL/6/JUnib não infectados (A) e infectados com  $10^5$  amastigotas de *L. amazonensis* nos tempos de 2 (B), 20 (C), 70 (D) e 150 (E) dias de infecção (Aumento: 200x). A coloração castanho indica imunomarcção pelo anticorpo anti-HIF-1 $\alpha$ . Os dados são representativos de 3 experimentos independentes.



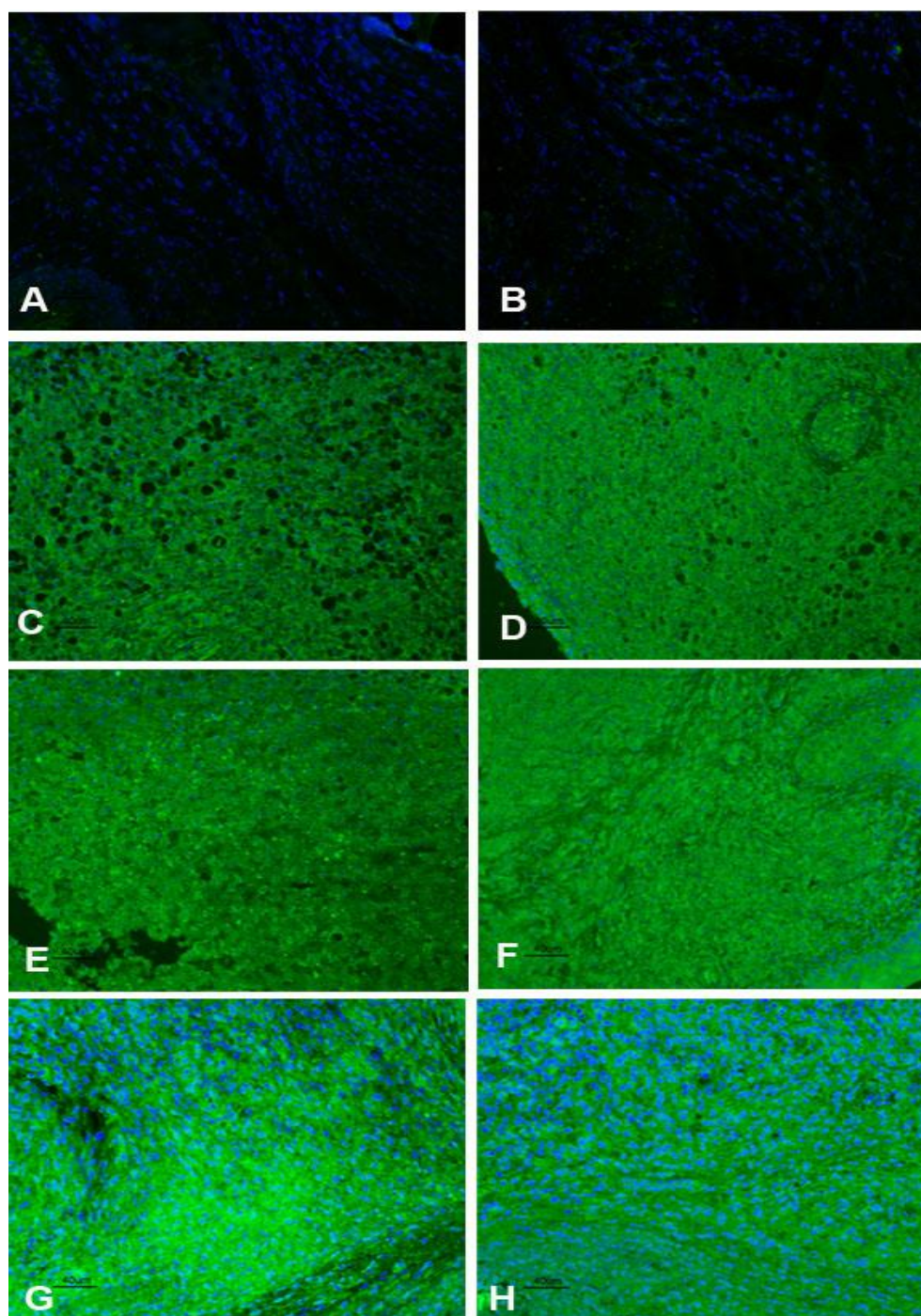


Figura 17. Avaliação da expressão de HIF-1 $\alpha$  e HIF-2 $\alpha$ , por imunofluorescência, em lesões de dorso de camundongos BALB/c/AnUnib infectados com *L. amazonensis*. Expressão de HIF-1 $\alpha$  em tecidos de pata de C57BL/6/JUnib com 2 (A), 20(C), 70 (E) e 150 (G) dias de infecção. Expressão de HIF-2 $\alpha$  em tecidos de pata de C57BL/6/JUnib com 2 (B), 20 (D), 70 (F) e 150 (H) dias de

infecção. Coloração verde indica imunomarcagem com anticorpo anti-HIF-1 $\alpha$  ou anti-HIF-2 $\alpha$ , coloração azul indica marcação nuclear por DAPI, cor ciano indica sobreposição das marcações (aumento: 200x). Os dados são representativos de 3 experimentos independentes.

Tabela 4. Detecção de HIF-1 $\alpha$  e HIF-2 $\alpha$  por imuno-histoquímica e imunofluorescência em tecidos não infectados e infectados com 10<sup>5</sup> amastigotas *L. amazonensis* de dorso e pata de BALB/c/AnUnib e pata de C57Bl6/JUnib.

MARCADORES E PROTEÍNAS	TEMPO DE INFECCÃO (dias)	BALB/c/AnUnib	TEMPO DE INFECCÃO (dias)	BALB/c/AnUnib	C57BL/6/JUnib
		DORSO		PATA	PATA
HIF-1 $\alpha$	NI	-	NI	-	-
	40	-	2	-	-
	70	-	20	+	+
	110	+	70	+	+
	140	+	150	+	+
HIF-2 $\alpha$	NI	-	NI	-	-
	40	-	2	-	-
	70	-	20	+	+
	110	+	70	+	+
	140	+	150	+	+

#### 4.4 Avaliação da angiogênese em lesões causadas por *L. amazonensis* em camundongos BALB/c/AnUnib e C57BL/6/JUnib através da detecção de VEGF

##### 4.4.1 Expressão de VEGF em lesões no dorso de camundongos BALB/c/AnUnib infectados com *L. amazonensis*

Lesões no dorso de camundongos BALB/c/AnUnib apresentaram microambientes hipóxicos a partir de 40 dias de infecção e presença de HIF-1 $\alpha$  e HIF-2 $\alpha$  a partir de 70 dias de infecção. Como esses fatores atuam diretamente na produção de VEGF, proteína angiogênica, o próximo passo foi avaliar sua expressão no tecido de dorso, pela técnica de imuno-histoquímica.

No dorso dos camundongos BALB/c/AnUnib infectados com *L. amazonensis* em nenhum dos tempos de infecção avaliados foi observada a expressão de VEGF (Fig 18)

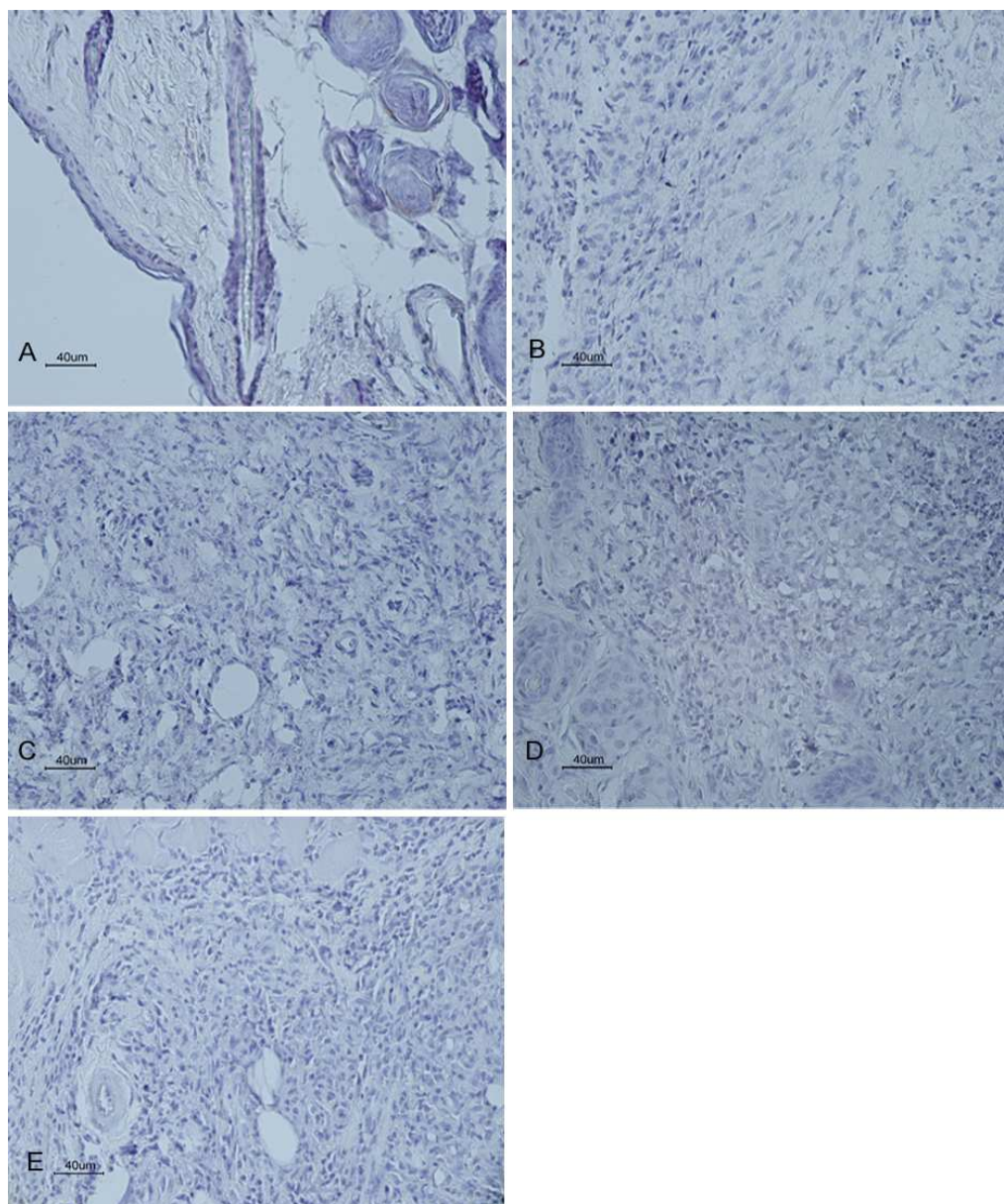


Figura 18. Avaliação da expressão de VEGF no dorso de camundongos BALB/c/AnUnib por imuno-histoquímica. Tecidos de BALB/c/AnUnib não infectados (A) e infectados com  $10^5$  amastigotas de *L. amazonensis* nos tempos de 40 (B), 70 (C), 110 (D) e 140 (E) dias de infecção (aumento: 200x). Os dados são representativos de 3 experimentos independentes.

#### 4.4.2 Expressão de VEGF em lesões de pata de camundongos BALB/c/AnUnib infectados com *L. amazonensis*

Assim como na lesão de dorso de camundongos BALB/c/AnUnib, também não foi observada expressão de VEGF na lesão de pata dessa linhagem, em nenhum dos tempos de infecção avaliados (Figura 19).

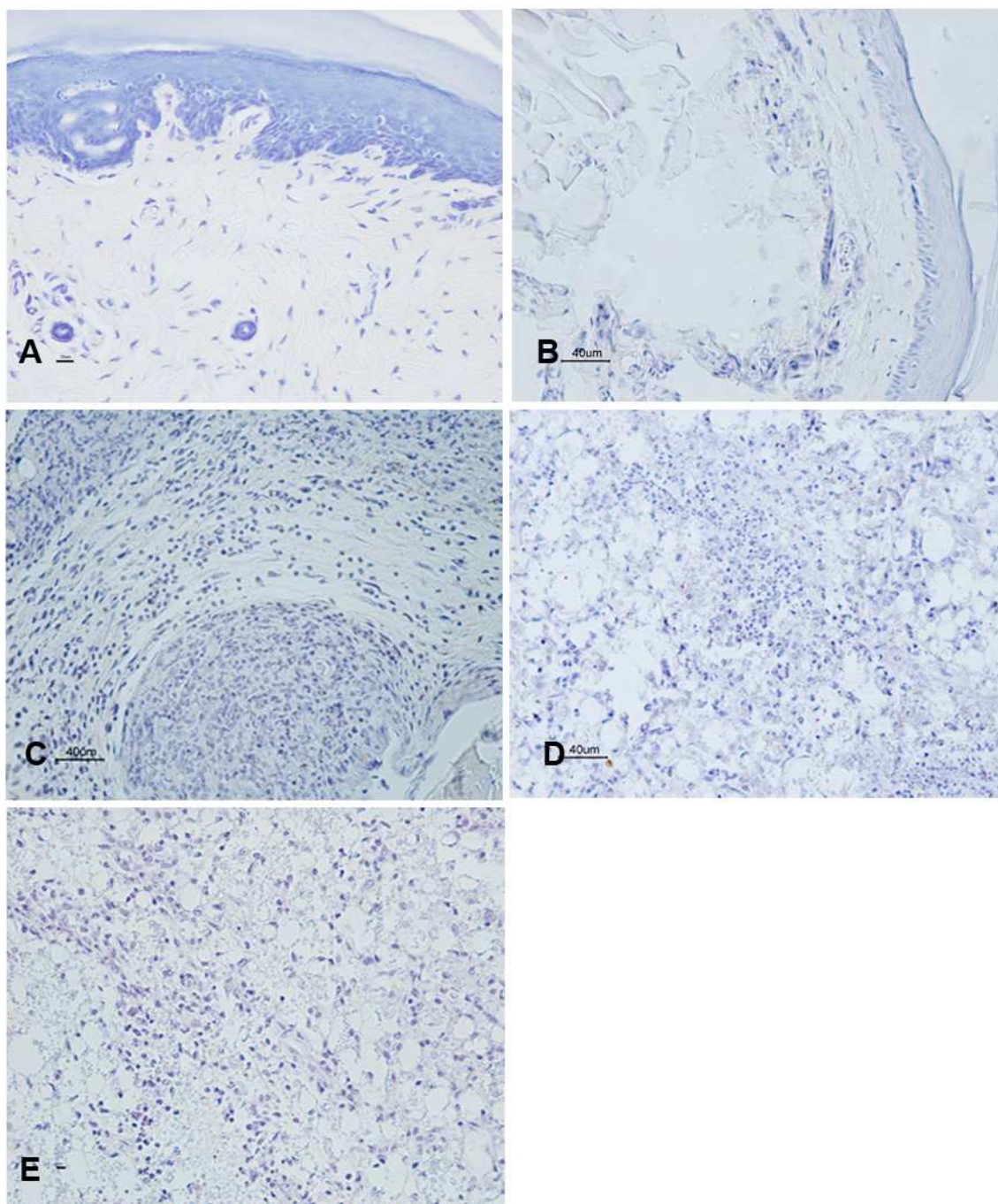


Figura 19. Avaliação da expressão de VEGF em pata de camundongos BALB/c/AnUnib por imunohistoquímica. Tecidos de BALB/c/AnUnib não infectados (A) e infectados com  $10^5$  amastigotas de *L. amazonensis* nos tempos de 2 (B), 20 (C), 70 (D) e 150 (E) dias de infecção (aumento: 200x). Os dados são representativos de 3 experimentos independentes.

#### 4.4.3 Expressão de VEGF em lesões de pata de camundongos C57BL/6/JUnib infectados com *L. amazonensis*

Lesões de camundongos C57BL/6/JUnib apresentaram um infiltrado inflamatório na fase inicial da infecção, hipóxia tecidual a partir de 70 dias de infecção e presença de HIF-1 $\alpha$  e HIF-2 $\alpha$  no núcleo das células aos 20° e 70° dia de infecção. Todos esses fatores sugerem a possibilidade da formação de novos vasos, necessários ao restabelecimento da homeostase em microambientes hipóxicos. O fator angiogênico VEGF é diretamente induzido por HIF-1 $\alpha$  e HIF-2 $\alpha$ .

Ao contrário do observado em lesões leishmanióticas em camundongos BALB/c/AnUnib, nas lesões em pata de C57BL/6/JUnib o VEGF foi detectado, por imunohistoquímica, no 20° e 70° dias de infecção (Figura 20C e 20D). Não houve marcação para VEGF em pata de camundongos C57BL/6/JUnib não infectados e com 2 e 150 dias de infecção (Figuras 20A, 20B e 20E).

Na tabela 5 estão resumidos os resultados da expressão de VEGF em lesões de dorso e pata de camundongos BALB/c/AnUnib e pata de camundongos C57BL/6/JUnib.

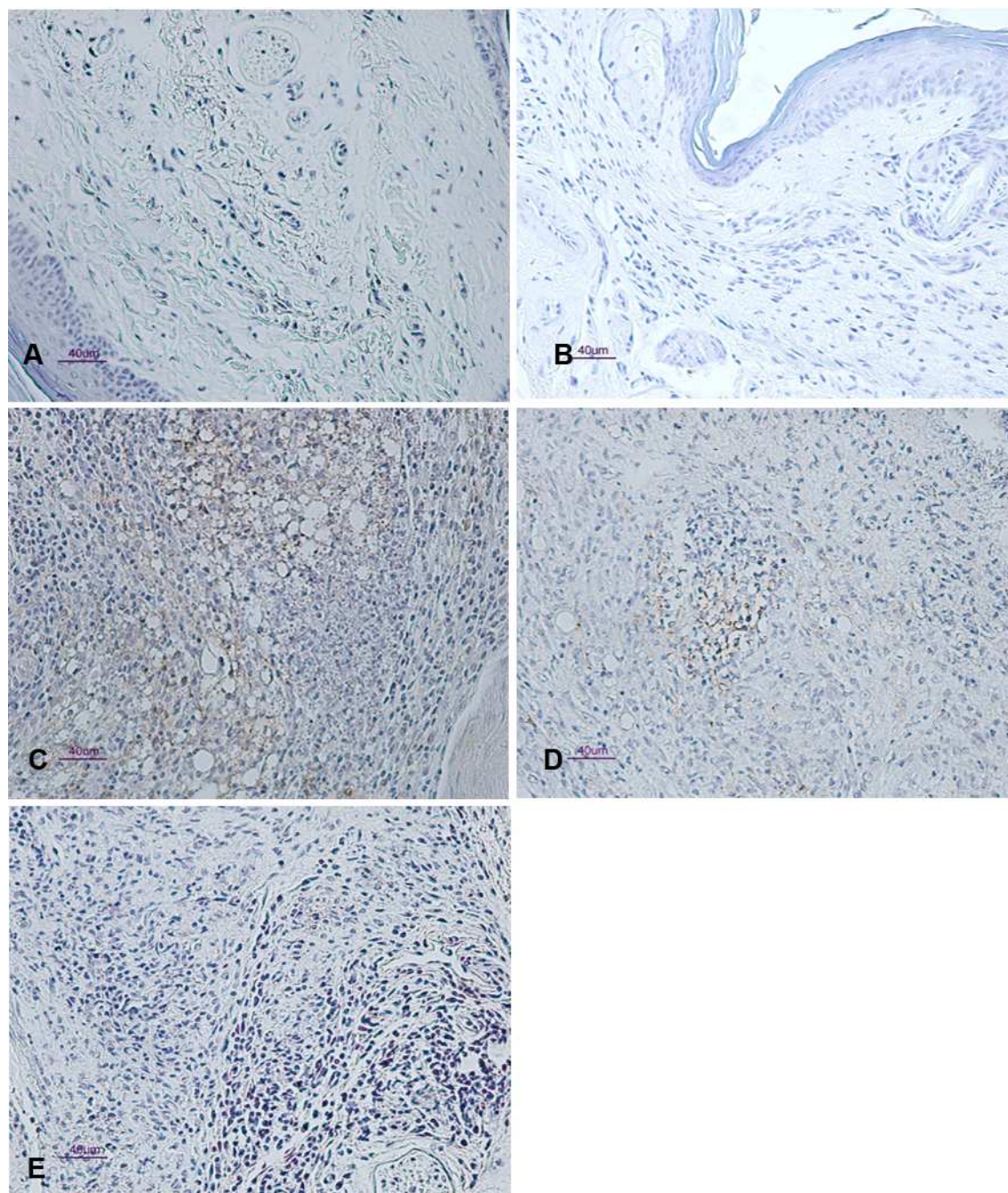


Figura 20. Avaliação da expressão de VEGF em pata de camundongos C57BL/6/JUnib por imunohistoquímica. Tecidos de C57BL/6/JUnib não infectados (A) e infectados com  $10^5$  amastigotas de *L. amazonensis* nos tempos de 2 (B), 20 (C), 70 (D) e 150 (E) dias de infecção (aumento: 200x). Os dados são representativos de 3 experimentos independentes.

Tabela 5. Detecção de VEGF por imuno-histoquímica em tecidos não infectados e infectados com  $10^5$  amastigotas *L. amazonensis* de dorso e pata de BALB/c/AnUnib e pata de C57Bl6/JUnib.

MARCADORES E PROTEÍNAS	TEMPO DE INFECCÃO (dias)	BALB/c/AnUnib	TEMPO DE INFECCÃO (dias)	BALB/c/AnUnib	C57BL/6/JUnib
		DORSO		PATA	
VEGF	NI	-	NI	-	-
	40	-	2	-	-
	70	-	20	-	+
	110	-	70	-	+
	140	-	150	-	-

#### 4.5 Avaliação da expressão de Heme oxigenase (HO-1) em lesões causadas por *L. amazonensis* em camundongos BALB/c/AnUnib e C57BL/6/JUnib

##### 4.5.1 Expressão de HO-1 em lesões de dorso de camundongos BALB/c/AnUnib infectados com *L. amazonensis*

Lesões no dorso de camundongos BALB/c/AnUnib foram avaliadas por imuno-histoquímica para detecção de HO-1, e essa proteína foi detectada nos tempos de 110 e 140 dias de infecção, tanto em células inflamatórias quanto em macrófagos infectados (Figura 21D e 21E). Não houve imunomarcagem para HO-1 no dorso de BALB/c/AnUnib não infectados (Figuras 21A) e com 40 e 70 dias de infecção (Figura 21B e 21C).

A HO-1 foi detectada apenas na fase crônica (110 e 140 dias) da infecção por *L. amazonensis*, modelo dorso.



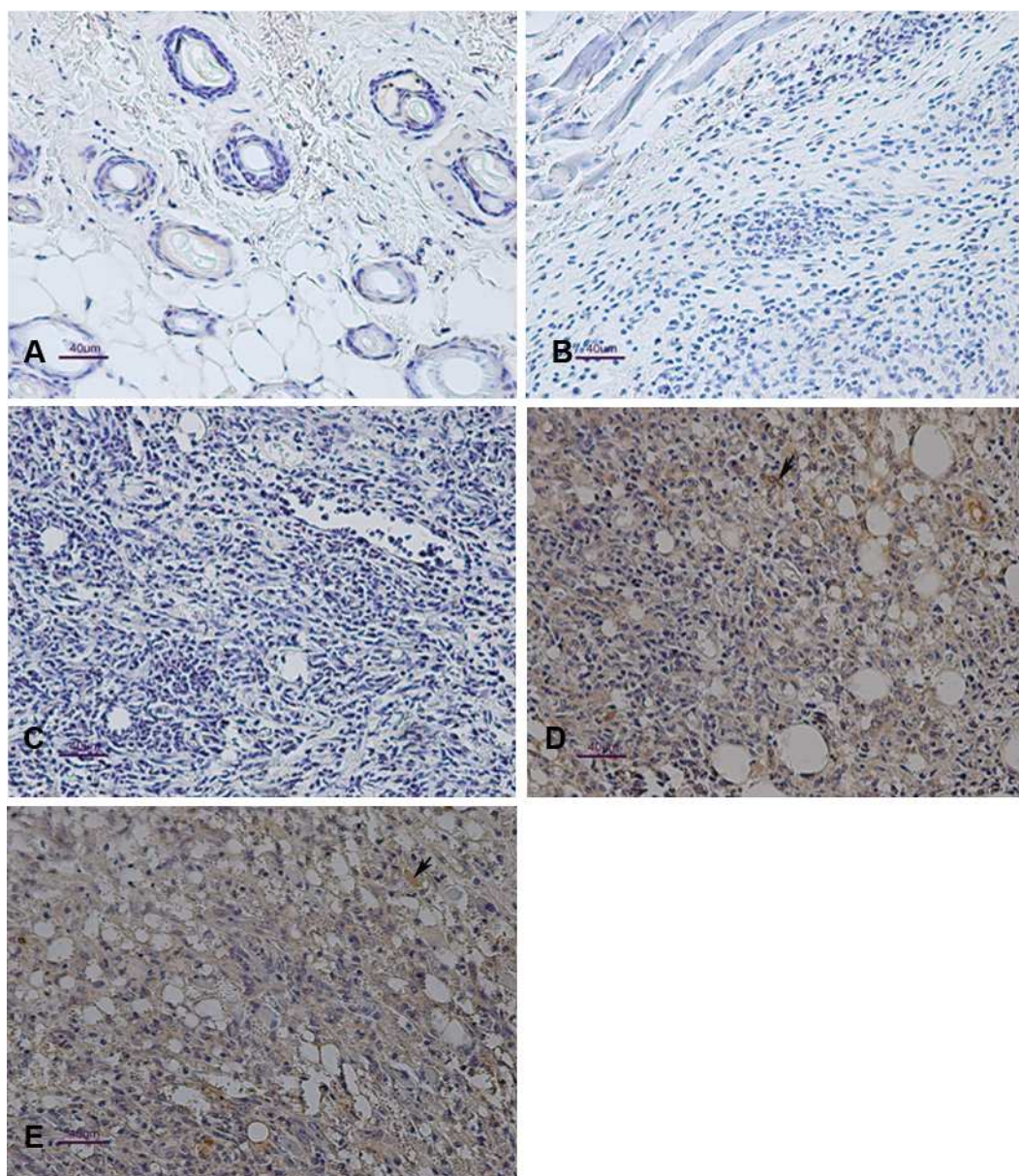


Figura 21. Avaliação da expressão de HO-1 no dorso de camundongos BALB/c/AnUnib por imunohistoquímica. Tecidos de BALB/c/AnUnib não infectados (A) e infectados com  $10^5$  amastigotas de *L. amazonensis* nos tempos de 40 (B), 70 (C), 110 (D) e 140 (E) dias de infecção (aumento: 200x). A coloração castanho indica imunomarcção pelo anticorpo anti-HO-1. As setas indicam célula imunomarcada para HO-1. Os dados são representativos de 3 experimentos independentes.

#### 4.5.2 Expressão de HO-1 em lesões de pata de camundongos BALB/c/AnUnib infectados com *L. amazonensis*

A HO-1 foi detectada nas lesões de animais com 70 e 150 dias de infecção (fase crônica), tanto em células inflamatórias quanto em macrófagos infectados (Figuras 22D e 22E). Não houve imunomarcagem anti-HO-1 em pata de animais não infectados (Figuras 22A) e com 2 e 20 dias de infecção (Figura 22B e 22C).

Assim como nas lesões de dorso, as lesões de pata de BALB/c/AnUnib expressaram HO-1 na fase crônica (70 e 150 dias) de infecção.

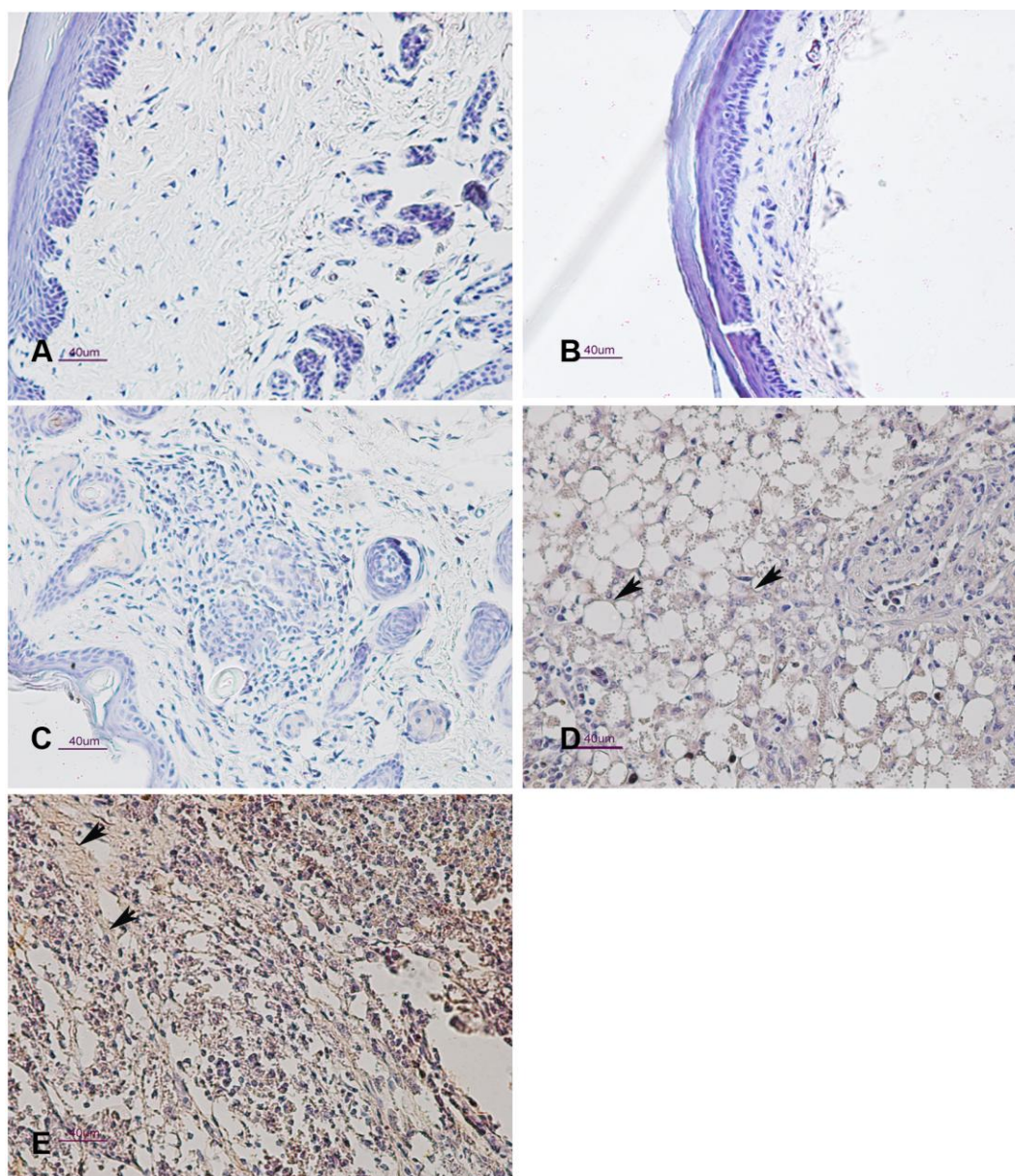


Figura 22. Avaliação da expressão de HO-1 em pata de camundongos BALB/c/AnUnib por imunohistoquímica. Tecidos de BALB/c/AnUnib não infectados (A) e infectados com  $10^5$  amastigotas de *L. amazonensis* nos tempos de 2 (B), 20 (C), 70 (D) e 150 (E) dias de infecção (aumento: 200x). A coloração castanho indica imunomarcção pelo anticorpo anti-HO-1. As setas indicam célula imunomarcada para HO-1. Os dados são representativos de 3 experimentos independentes.

---

#### 4.5.3 Expressão de HO-1 em lesões de pata de camundongos C57BL/6/JUnib infectados com *L. amazonensis*

Foi realizada a avaliação de HO-1 nas lesões leishmanióticas de pata de camundongos C57BL/6/JUnib. A HO-1 foi expressa aos 20, 70 e 150 dias de infecção, nas células inflamatórias e nos macrófagos infectados das lesões (Figuras 23C, 23D e 23E). Não houve imunomarcção anti-HO-1 em pata de animais não infectados (Figuras 23A) e com 2 dias de infecção (Figura 23B).

Diferentemente das lesões de dorso e pata em camundongos BALB/c/AnUnib, a HO-1, em C57BL/6/JUnib, foi detectada na fase inicial da infecção, a partir de 20 dias.

Na tabela 6 estão resumidos os resultados de detecção da expressão de HO-1, em lesões induzidas por *L. amazonensis* em dorso e pata de BALB/c/AnUnib e pata de C57BL/6/JUnib.

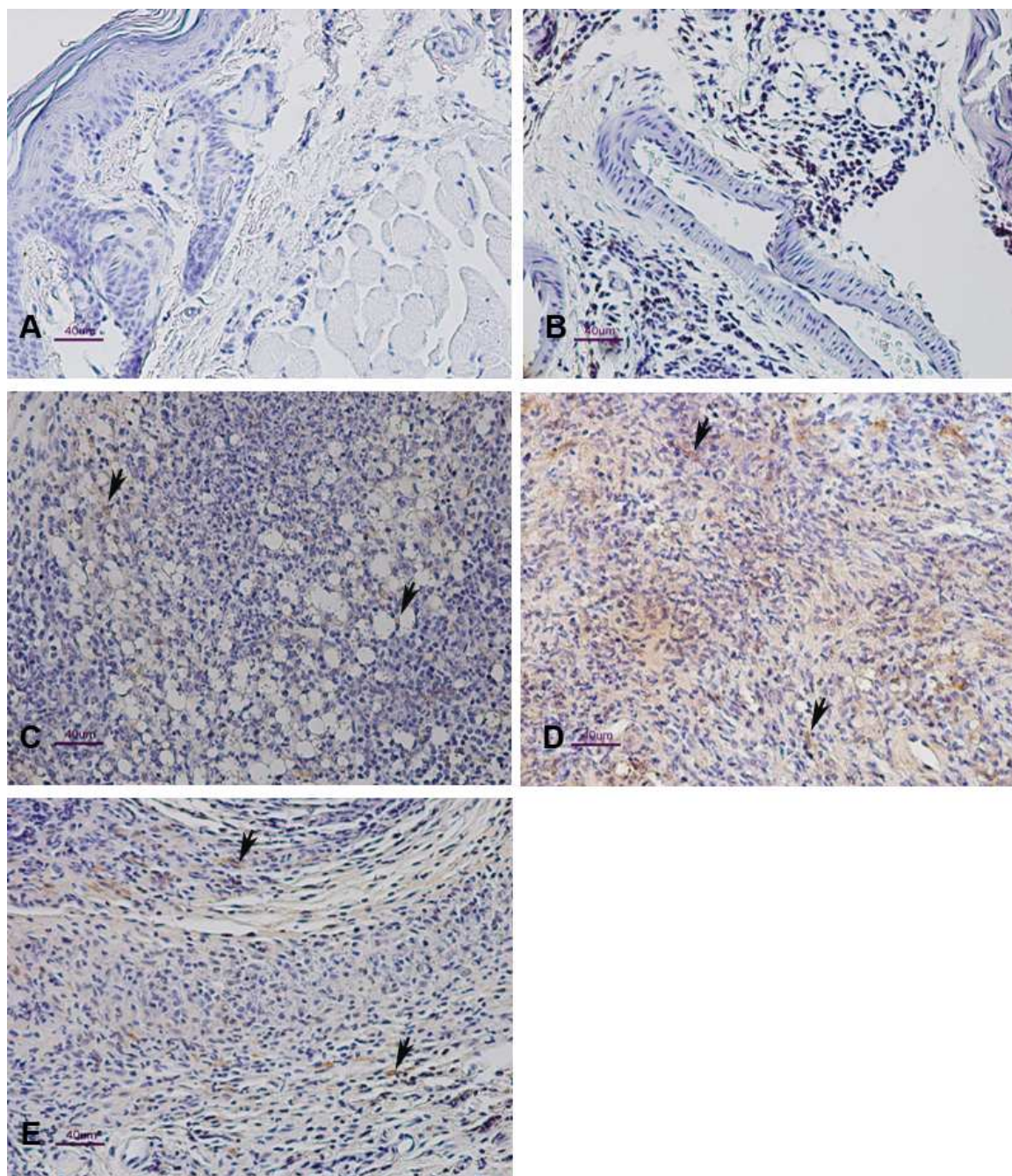


Figura 23. Avaliação da expressão de HO-1 em pata de camundongos C57BL/6/JUNIB por imunohistoquímica. Tecidos de C57BL/6/JUNIB não infectados (A) e infectados com  $10^5$  amastigotas de *L. amazonensis* nos tempos de 2 (B), 20 (C), 70 (D) e 150 (E) dias de infecção (aumento: 200x). A coloração castanho indica imunomarcção pelo anticorpo anti-HO-1. As setas indicam célula imunomarcada para HO-1. Os dados são representativos de 3 experimentos independentes.

Tabela 6. Detecção de HO-1 por imuno-histoquímica em tecidos não infectados e infectados com  $10^5$  amastigotas *L. amazonensis* de dorso e pata de BALB/c/AnUnib e pata de C57Bl6/JUnib.

MARCADORES E PROTEÍNAS	TEMPO DE INFECCÃO (dias)	BALB/c/AnUnib	TEMPO DE INFECCÃO (dias)	BALB/c/AnUnib	C57BL/6/JUnib
		DORSO		PATA	
HO-1	NI	-	NI	-	-
	40	-	2	-	-
	70	-	20	-	+
	110	+	70	+	+
	140	+	150	+	+

#### 4.6 Avaliação da expressão de “p38 Mitogen-Activated Protein Kinase” (p38MAPk) em lesões causadas por *L. amazonensis* em camundongos BALB/c/AnUnib e C57BL/6/JUnib

##### 4.6.1 Expressão de p38MAPk em lesões de dorso de camundongos BALB/c/AnUnib infectados com *L. amazonensis*

Lesões do dorso de camundongos BALB/c/AnUnib foram avaliadas por imuno-histoquímica para detecção de p38MAPk. A p38MAPk foi detectada nos tempos de 110 e 140 dias de infecção, em células inflamatórias e macrófagos infectados (Figura 24D e 24E). Não houve marcação para p38MAPk no dorso de BALB/c/AnUnib não infectados e nem com 40 e 70 dias de infecção (Figuras 24A, 24B e 24C).

Assim como HO-1, p38MAPk foi detectada somente na fase crônica da infecção (110 e 140 dias) por *L. amazonensis* em dorso de BALB/c/AnUnib.

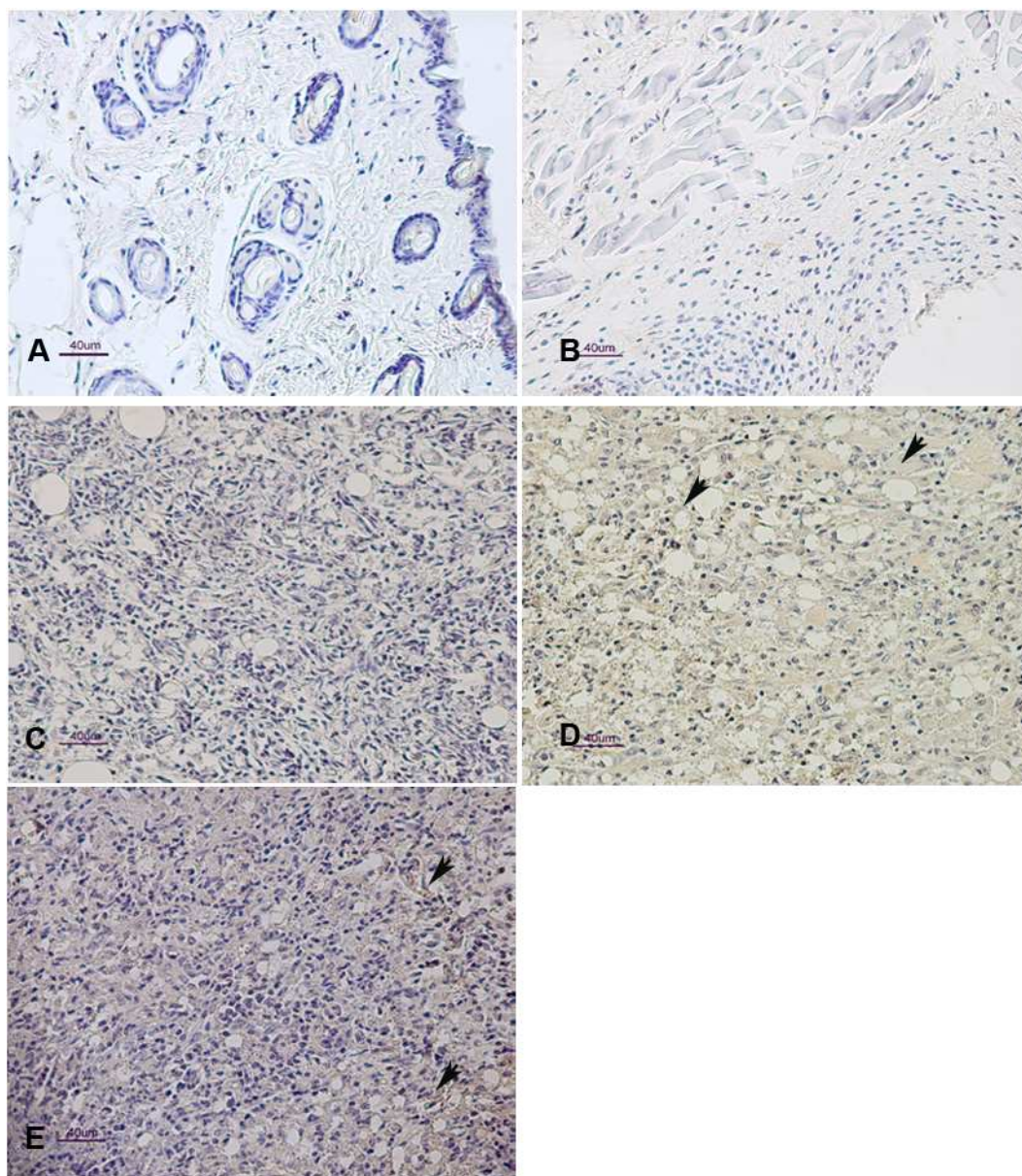


Figura 24. Avaliação da expressão de p38MAPk no dorso de camundongos BALB/c/AnUnib por imuno-histoquímica. Tecidos de BALB/c/AnUnib não infectados (A) e infectados com  $10^5$  amastigotas de *L. amazonensis* nos tempos de 40 (B), 70 (C), 110 (D) e 140 (E) dias de infecção (aumento: 200x). A coloração castanho indica imunomarcagem pelo anticorpo anti-p38MAPk. As setas indicam célula imunomarcada para p38MAPk. Os dados são representativos de 3 experimentos independentes.

#### 4.6.2 Expressão de p38MAPk em lesões de pata de camundongos BALB/c/AnUnib infectados com *L. amazonensis*

A p38MAPk foi detectada aos 70 e 150 dias de infecção em células inflamatórias e macrófagos infectados (Figuras 25D e 25E). Não houve marcação para p38MAPk em pata de BALB/c/AnUnib não infectados e nem com 40 e 70 dias de infecção (Figuras 25A, 25B e 25C).

A expressão de p38MAPk foi detectada na fase crônica da infecção causada por *L. amazonensis* em pata de BALB/c/AnUnib, concomitante a expressão de HIF-1 $\alpha$  e HO-1.



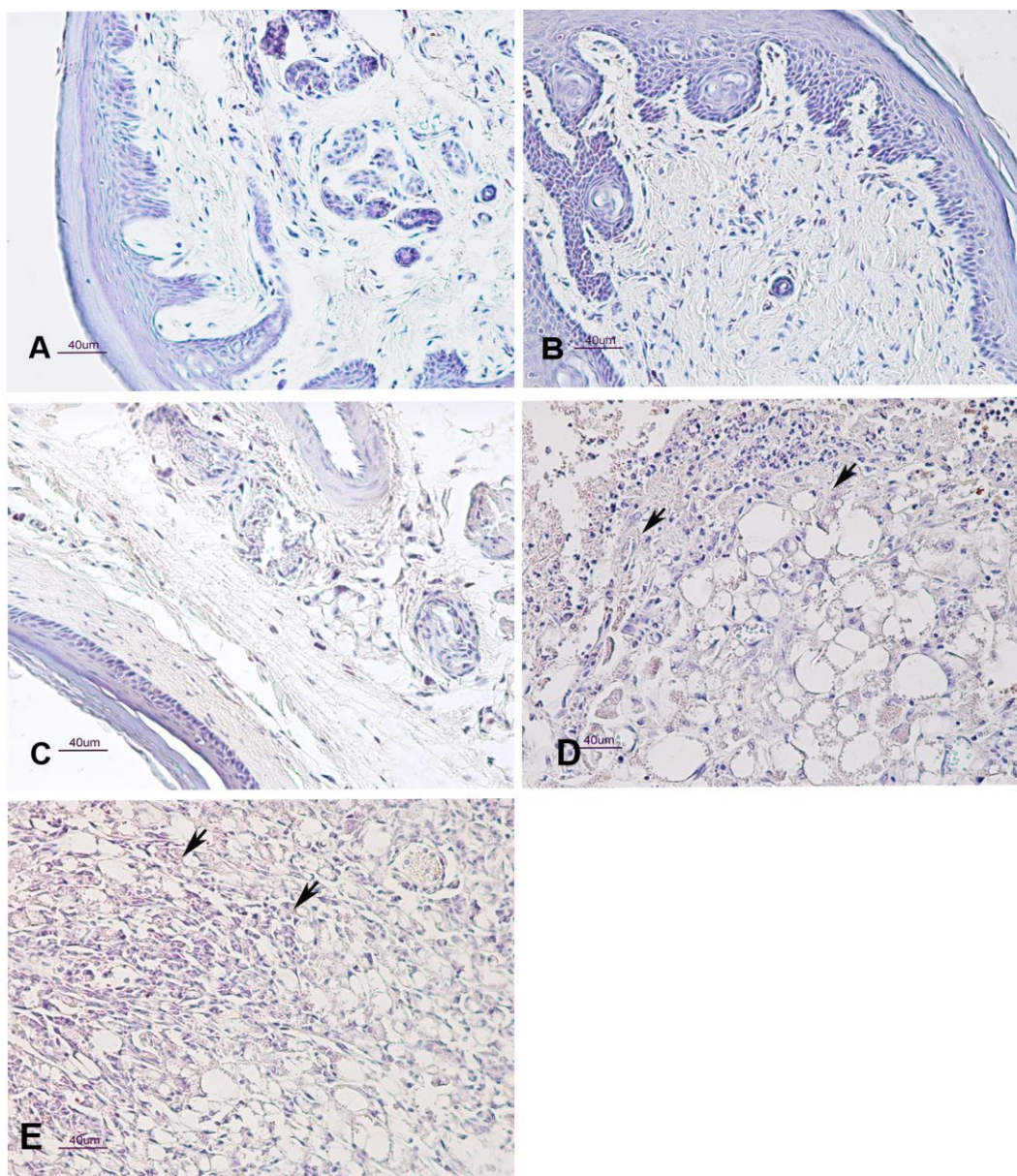


Figura 25. Avaliação da expressão de p38MAPk em pata de camundongos BALB/c/AnUnib, por imuno-histoquímica. Tecidos de BALB/c/AnUnib não infectados (A) e infectados com  $10^5$  amastigotas de *L. amazonensis* nos tempos de 2 (B), 20 (C), 70 (D) e 150 (E) dias de infecção (aumento: 200x). A coloração castanho indica imunomarcagem pelo anticorpo anti-p38MAPk. As setas indicam célula imunomarcada para p38MAPk. Os dados são representativos de 3 experimentos independentes.

#### 4.6.3 Expressão de p38MAPk em lesões de pata de camundongos C57BL/6/JUnib infectados com *L. amazonensis*

A expressão de p38MAPk foi detectada aos 70 e 150 dias de infecção em todo infiltrado inflamatório (Figuras 26D e 26E). Não houve marcação para p38MAPk em pata de C57BL/6/JUnib não infectados e nem com 2 e 20 dias de infecção (Figuras 26A, 26B e 26C).

A expressão de p38MAPk foi detectada na fase crônica da infecção causada por *L. amazonensis* em pata de C57BL/6/JUnib, linhagem murina, capaz de controlar essa infecção.

Na tabela 7 estão resumidos os resultados de detecção da expressão de p38MAPk, em lesões induzidas por *L. amazonensis* em dorso e pata de BALB/c/AnUnib e pata de C57BL/6/JUnib.

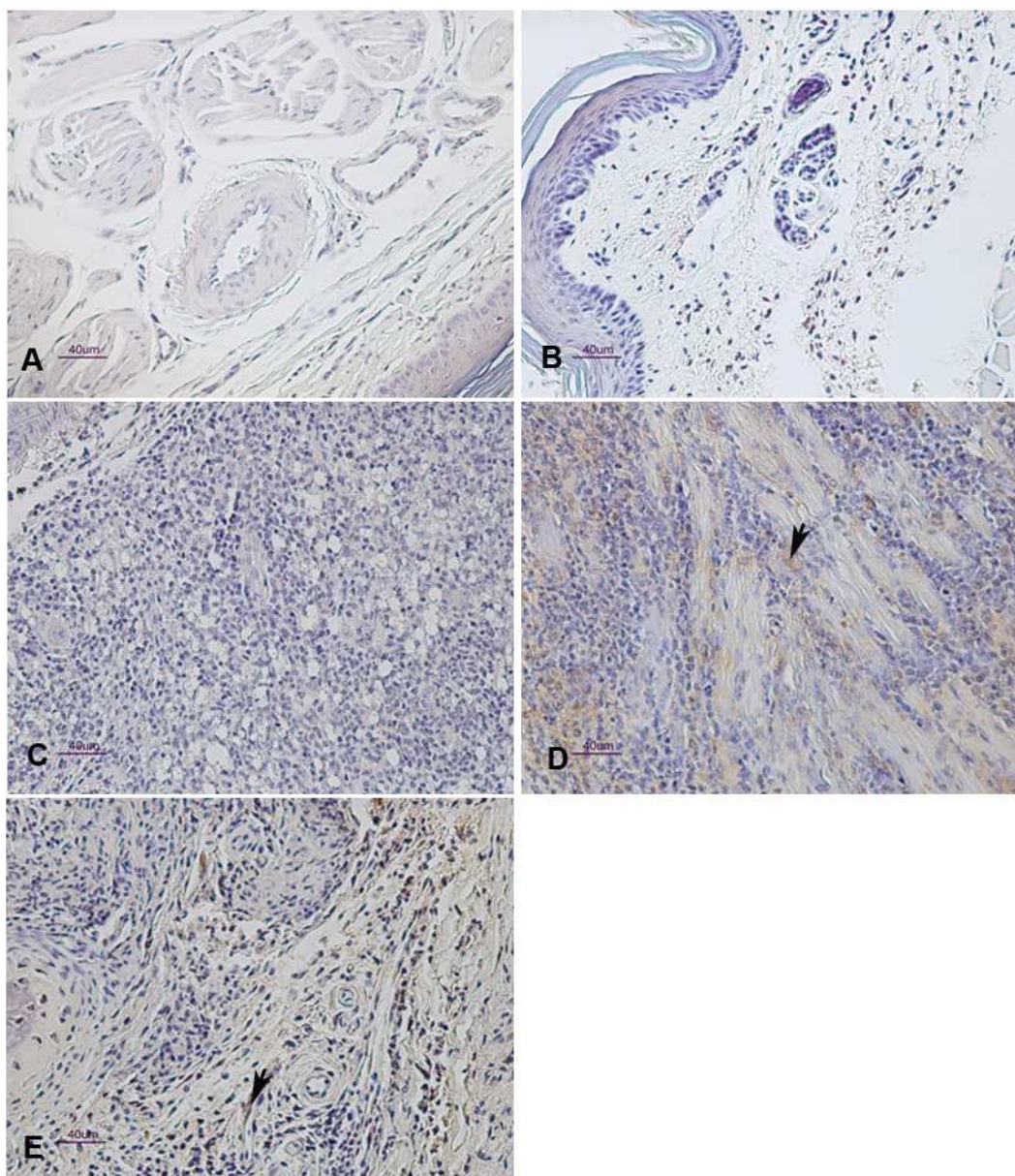


Figura 26. Avaliação da expressão de p38MAPk em pata de camundongos C57BL/6/JUnib, por imuno-histoquímica. Tecidos de C57BL/6/JUnib não infectados (A) e infectados com  $10^5$  amastigotas de *L. amazonensis* nos tempos de 2 (B), 20 (C), 70 (D) e 150 (E) dias de infecção (aumento: 200x). A coloração castanho indica imunomarcção pelo anticorpo anti-p38MAPk. As setas indicam célula imunomarcada para p38MAPk. Os dados são representativos de 3 experimentos independentes.

Tabela 7. Detecção de p38MAPk por imuno-histoquímica em tecidos não infectados e infectados com  $10^5$  amastigotas *L. amazonensis* de dorso e pata de BALB/c/AnUnib e pata de C57Bl6/JUnib.

MARCADORES E PROTEÍNAS	TEMPO DE INFECCÃO (dias)	BALB/c/AnUnib	TEMPO DE INFECCÃO (dias)	BALB/c/AnUnib	C57BL/6/JUnib
		DORSO		PATA	PATA
p-38MAPk	NI	-	NI	-	-
	40	-	2	-	-
	70	-	20	-	-
	110	+	70	+	+
	140	+	150	+	+

#### 4.7 Avaliação da expressão de “Macrophage Migration Inhibitory Factor” (MIF) em lesões causadas por *L. amazonensis* em camundongos BALB/c/AnUnib e C57BL/6/JUnib

##### 4.7.1 Expressão de MIF em lesões de dorso de camundongos BALB/c/AnUnib infectados com *L. amazonensis*

Lesões do dorso de camundongos BALB/c/AnUnib infectados com *L. amazonensis* foram avaliadas por imuno-histoquímica para detecção de MIF. A expressão de MIF foi observada em 70, 110 e 140 dias de infecção em células inflamatórias e macrófagos infectados (Figura 27C, 27D e 27E). Não houve marcação para MIF no dorso de animais não infectados e com 40 dias de infecção (Figuras 27A e 27B).

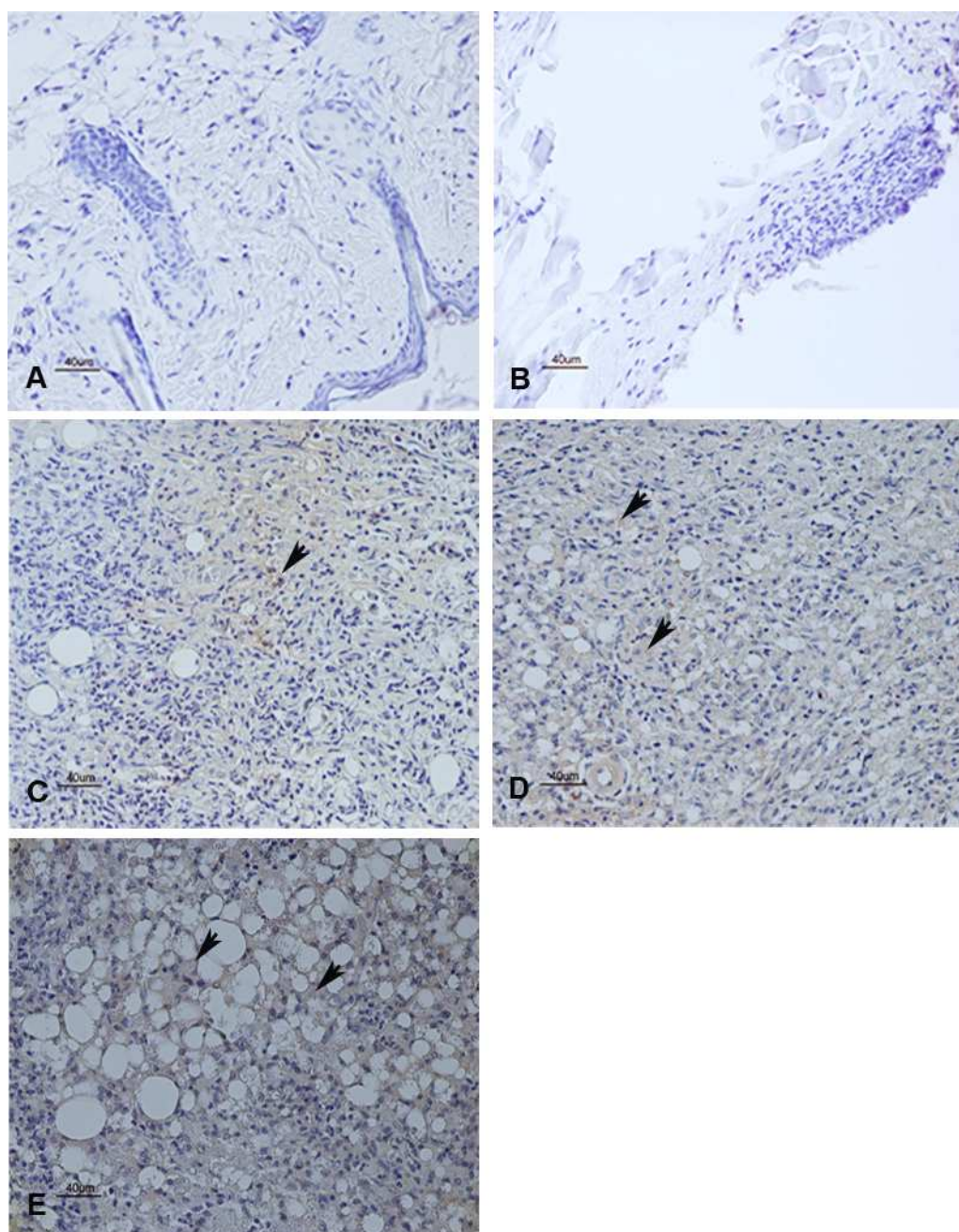


Figura 27. Avaliação da expressão de MIF no dorso de camundongos BALB/c/AnUnib por imunohistoquímica. Tecidos de BALB/c/AnUnib não infectados (A) e infectados com  $10^5$  amastigotas de *L. amazonensis* nos tempos de 40 (B), 70 (C), 110 (D) e 140 (E) dias de infecção (aumento: 200x). A coloração castanho indica imunomarcção pelo anticorpo anti-MIF. As setas indicam célula imunomarcada para MIF. Os dados são representativos de 3 experimentos independentes.

#### 4.7.2 Expressão de MIF em lesões de pata de camundongos BALB/c/AnUnib infectados com *L. amazonensis*

MIF foi detectada aos 20, 70 e 150 dias de infecção, tanto em células inflamatórias quanto em macrófagos infectados (Figuras 28C, 28D e 28E). No tempo de 2 dias de infecção observou-se marcação para o anticorpo anti-MIF nas células glandulares. Nas demais células que compõem a derme e a epiderme, a imunomarcação para o anticorpo anti-MIF foi negativa (Figura 28B). Pata de BALB/c/AnUnib não infectado não apresentou expressão de MIF (Figura 28A).

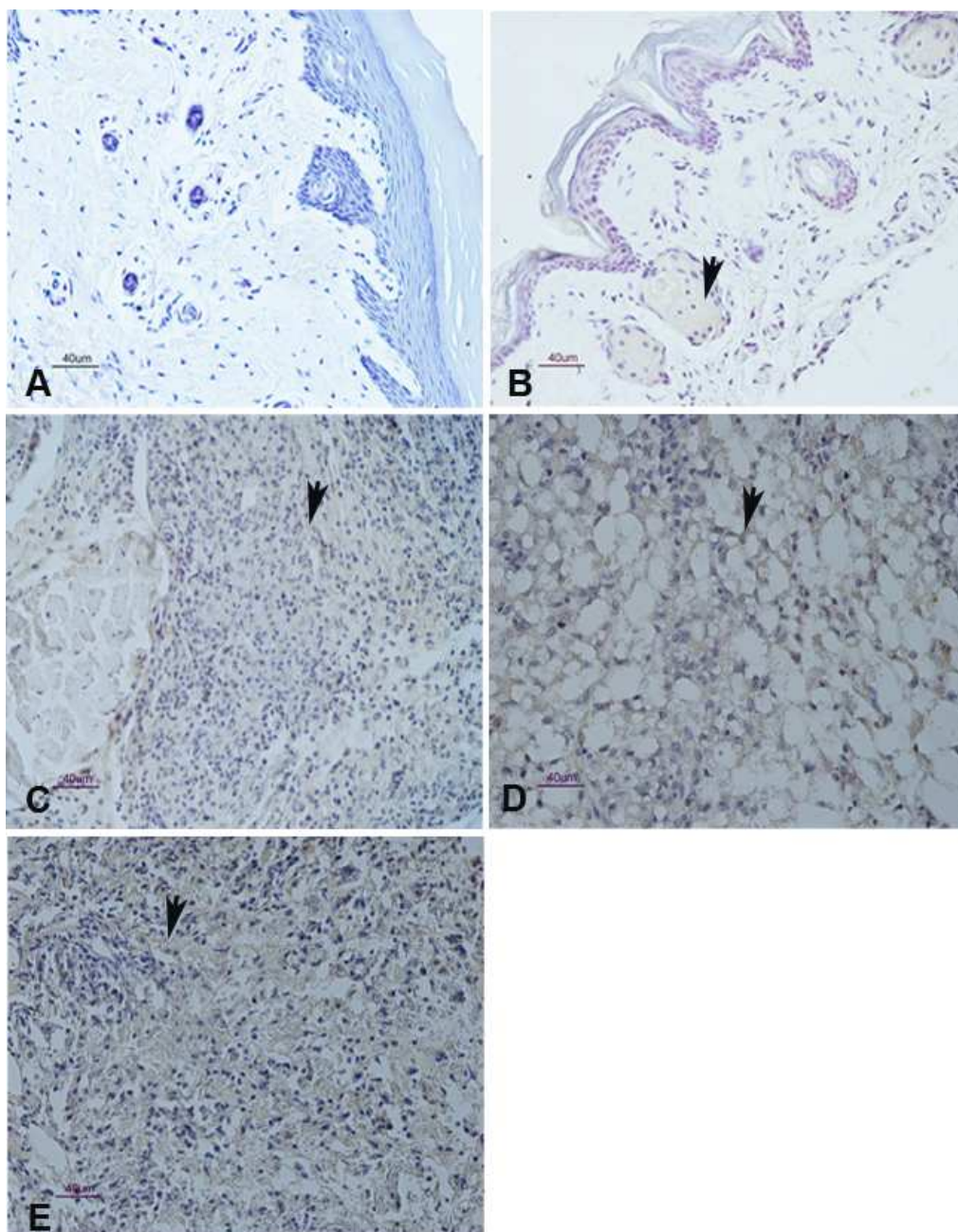


Figura 28. Avaliação da expressão de MIF em pata de camundongos BALB/c/AnUnib, por imunohistoquímica. Tecidos de BALB/c/AnUnib não infectados (A) e infectados com  $10^5$  amastigotas de *L. amazonensis* nos tempos de 2 (B), 20 (C), 70 (D) e 150 (E) dias de infecção (aumento: 200x). A coloração castanho indica imunomarcção pelo anticorpo anti-MIF. As setas indicam célula imunomarcada para MIF. Os dados são representativos de 3 experimentos independentes.

#### 4.7.3 Expressão de MIF em lesões de pata de camundongos C57BL/6/JUnib infectados com *L. amazonensis*

MIF foi detectado nas lesões em todos os tempos avaliados (2, 20, 70 e 150 dias de infecção) (Figuras 29B, 29C, 29D e 29E). No 2º dia de infecção MIF foi detectado em células da epiderme, células glandulares e células da derme (Figuras 29B). No 20º, 70º e 150º dias de infecção, a imunomarcação para MIF foi observada em células inflamatórias, principalmente macrófagos (Figuras 29C, 29D e 29E). Em pata de BALB/c/AnUnib não infectado observou-se imunomarcação para MIF na região da epiderme (Figura 29A).

Na tabela 8 estão resumidos os resultados de detecção da expressão de MIF, em lesões induzidas por *L. amazonensis* em dorso e pata de BALB/c/AnUnib e pata de C57BL/6/JUnib.



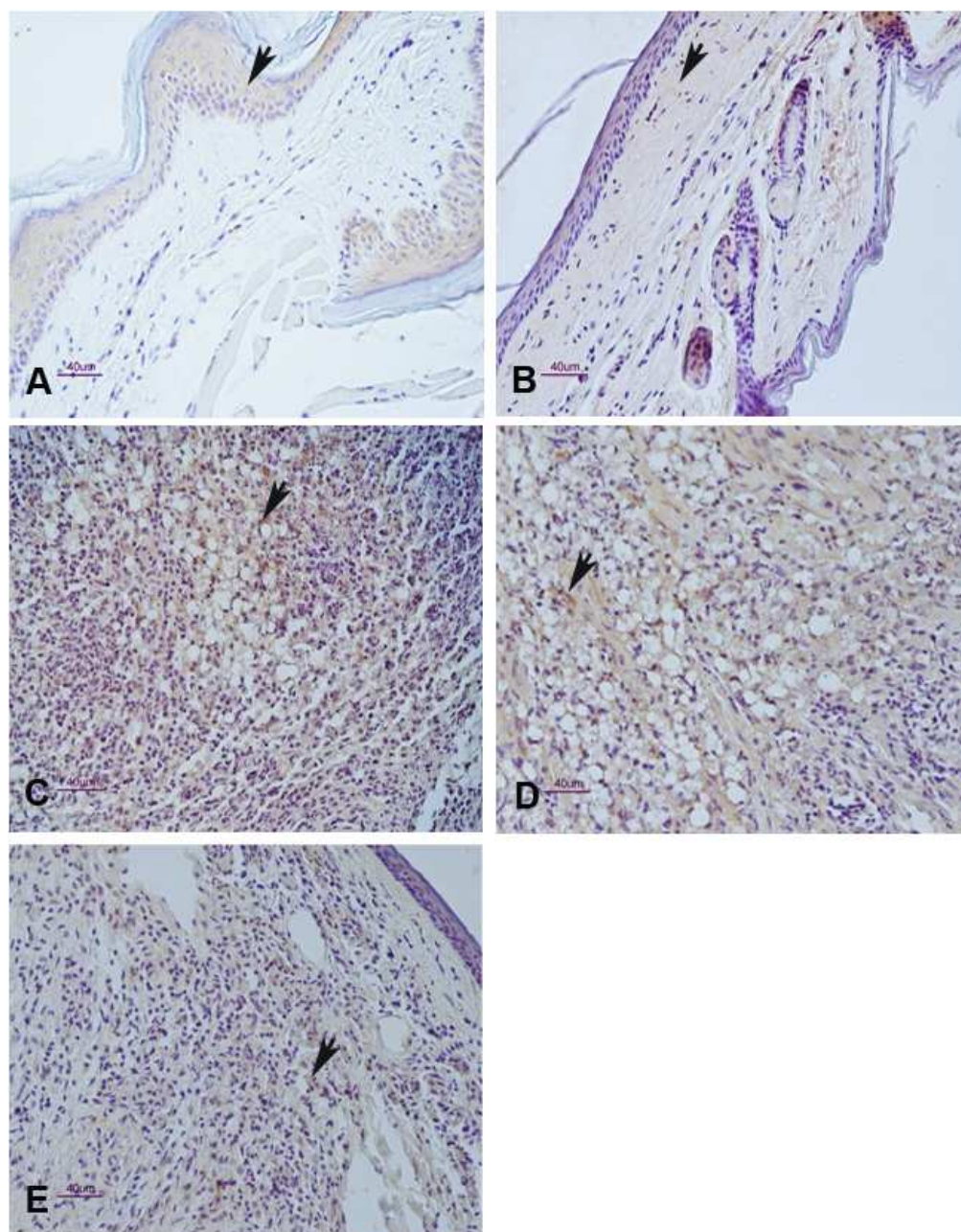


Figura 29. Avaliação da expressão de MIF em pata de camundongos C57BL/6/JUnib, por imunohistoquímica. Tecidos de C57BL/6/JUnib não infectados (A) e infectados com  $10^5$  amastigotas de *L. amazonensis* nos tempos de 2 (B), 20 (C), 70 (D) e 150 (E) dias de infecção (aumento: 200x). A coloração castanho indica imunomarcagem pelo anticorpo anti-MIF. As setas indicam célula imunomarcada para MIF. Os dados são representativos de 3 experimentos independentes.

Tabela 8. Detecção de MIF por imuno-histoquímica em tecidos não infectados e infectados com  $10^5$  amastigotas *L. amazonensis* de dorso e pata de BALB/c/AnUnib e pata de C57Bl6/JUnib.

MARCADORES E PROTEÍNAS	TEMPO DE INFECCÃO (dias)	BALB/c/AnUnib	TEMPO DE INFECCÃO (dias)	BALB/c/AnUnib	C57BL/6/JUnib
		DORSO		PATA	
MIF	NI	-	NI	-	+
	40	-	2	-	+
	70	+	20	+	+
	110	+	70	+	+
	140	+	150	+	+

#### 4.8 Avaliação da expressão de Ciclooxigenase-2 (COX-2) em lesões causadas por *L. amazonensis* em camundongos BALB/c/AnUnib e C57BL/6/JUnib

##### 4.8.1 Expressão de COX-2 em lesões do dorso de camundongos BALB/c/AnUnib infectados com *L. amazonensis*

Através da técnica de imuno-histoquímica foi avaliada a expressão de COX-2 nas lesões de dorso de BALB/c/AnUnib. Em todos os tempos avaliados (40, 70, 110 e 140 dias de infecção), tanto em macrófagos infectados quanto nas demais células do infiltrado inflamatório (Figuras 30B, 30C, 30D e 30E) ocorreu expressão de COX-2. Além disto, esta proteína foi detectada em células glandulares do dorso de BALB/c/AnUnib não infectados (Figura 30A).

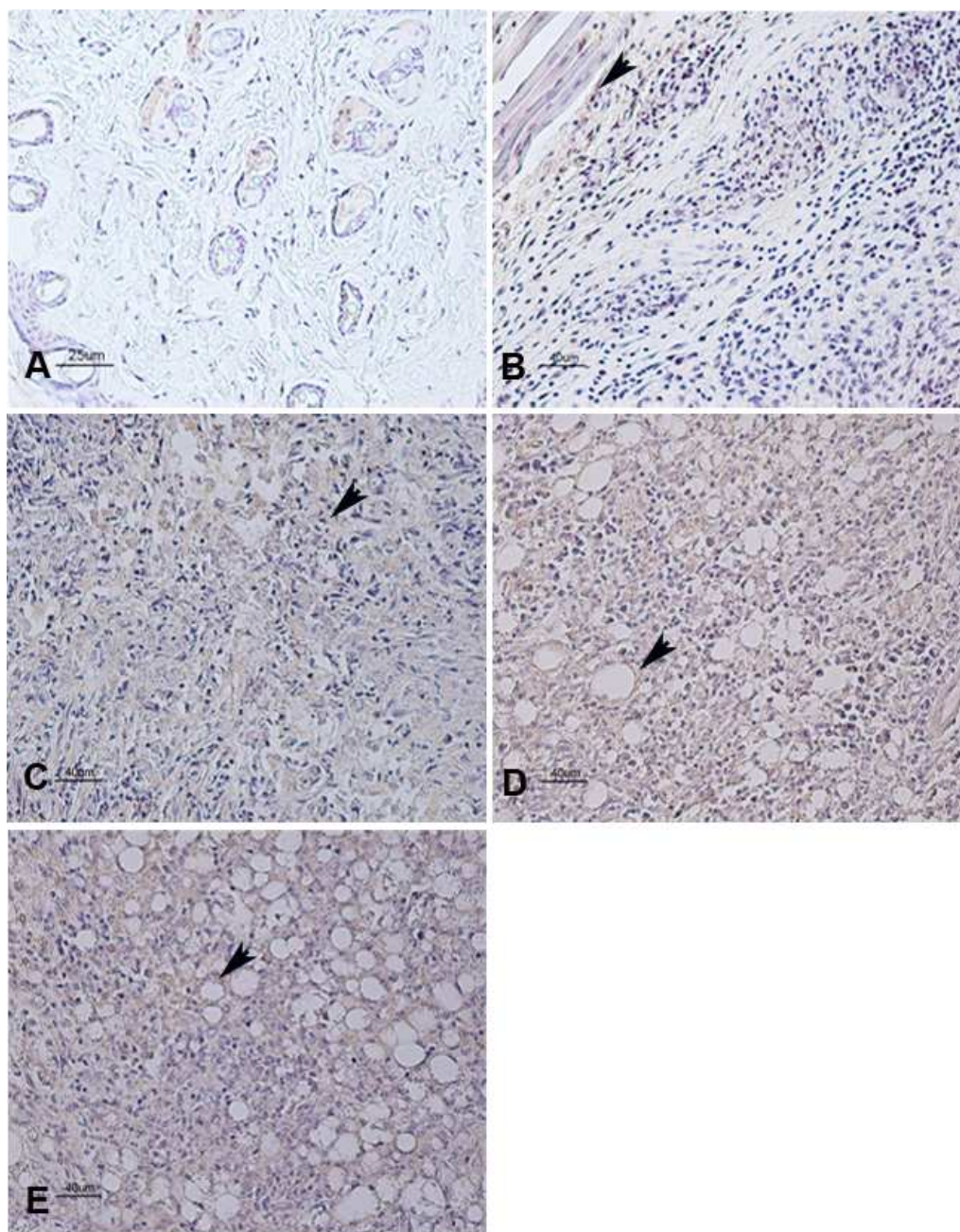


Figura 30. Avaliação da expressão de COX-2 no dorso de camundongos BALB/c/AnUnib por imuno-histoquímica. Tecidos de BALB/c/AnUnib não infectados (A) e infectados com  $10^5$  amastigotas de *L. amazonensis* nos tempos de 40 (B), 70 (C), 110 (D) e 140 (E) dias de infecção (aumento: 200x). A coloração castanho indica imunomarcção pelo anticorpo anti-COX-2. As setas

indicam célula imunomarcada para COX-2. Os dados são representativos de 3 experimentos independentes.

#### **4.8.2 Expressão de COX-2 em lesões de pata de camundongos BALB/c/AnUnib infectados com *L. amazonensis***

COX-2 foi expressa em lesões de animais com 2, 20, 70 e 150 dias de infecção nas células do infiltrado inflamatório (Figuras 31B, 31C, 31D e 31E). Não houve marcação para COX-2 na pata de animais não infectados (Figuras 31A).

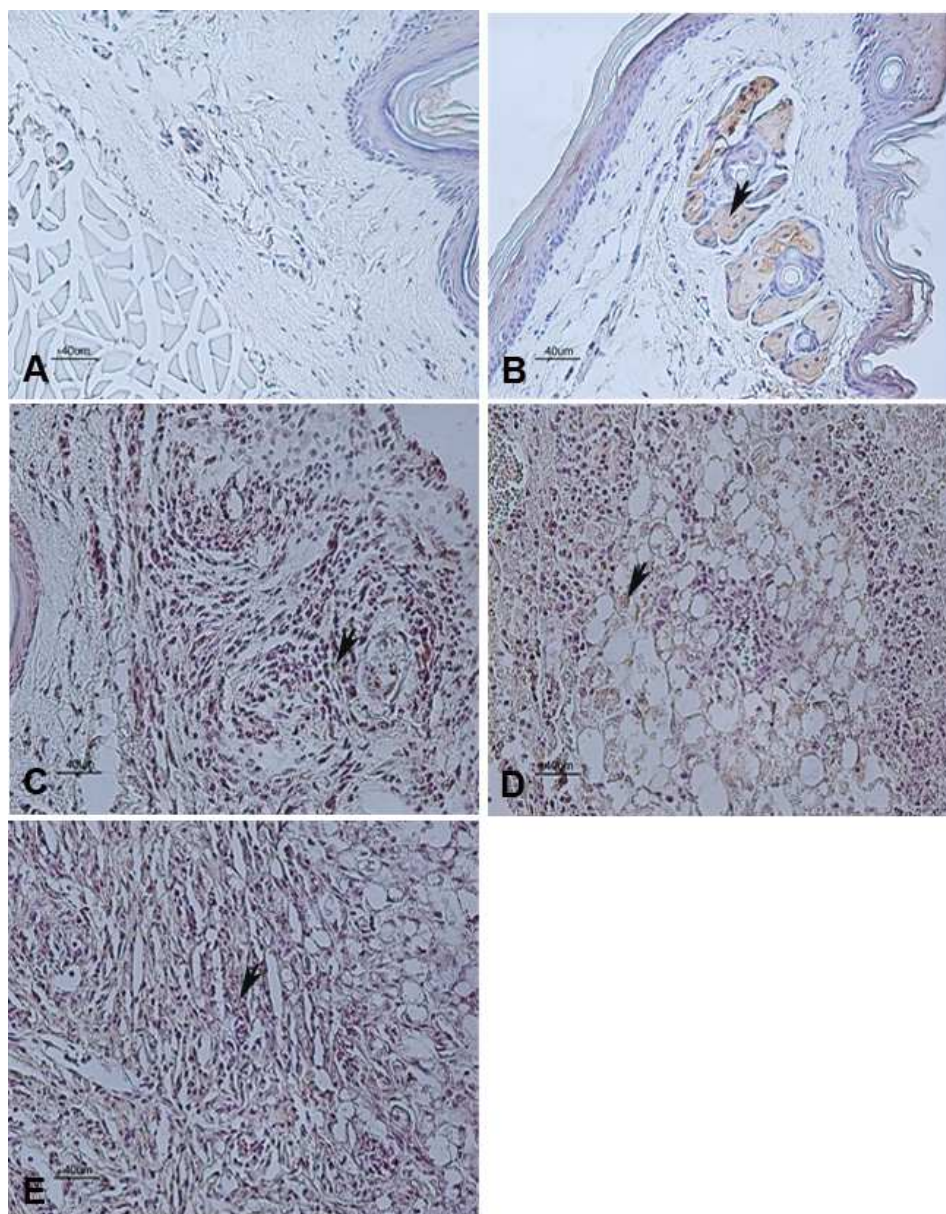


Figura 31. Avaliação da expressão de COX-2 em pata de camundongos BALB/c/AnUnib, por imuno-histoquímica. Tecidos de BALB/c/AnUnib não infectados (A) e infectados com  $10^5$  amastigotas de *L. amazonensis* nos tempos de 2 (B), 20 (C), 70 (D) e 150 (E) dias de infecção (aumento: 200x). A coloração castanho indica imunomarcção pelo anticorpo anti-COX-2. As setas indicam alguma célula imunomarcada para COX-2. Os dados são representativos de 3 experimentos independentes.

#### 4.8.3 Expressão de COX-2 em lesões de pata de camundongos C57BL/6/JUnib infectados com *L. amazonensis*

A COX-2 foi detectada em células glandulares no 2º dia de infecção (Figura 32B) e em células inflamatórias e macrófagos infectados das lesões aos 20, 70 e 150 dias de infecção (Figuras 32C, 32D e 32E). Não foi observada imunomarcagem para COX-2 em pata de C57BL/6/JUnib não infectados (Figuras 32A).

Na tabela 9 estão resumidos os resultados de detecção da expressão de COX-2, em lesões induzidas por *L. amazonensis* em dorso e pata de BALB/c/AnUnib e pata de C57BL/6/JUnib.

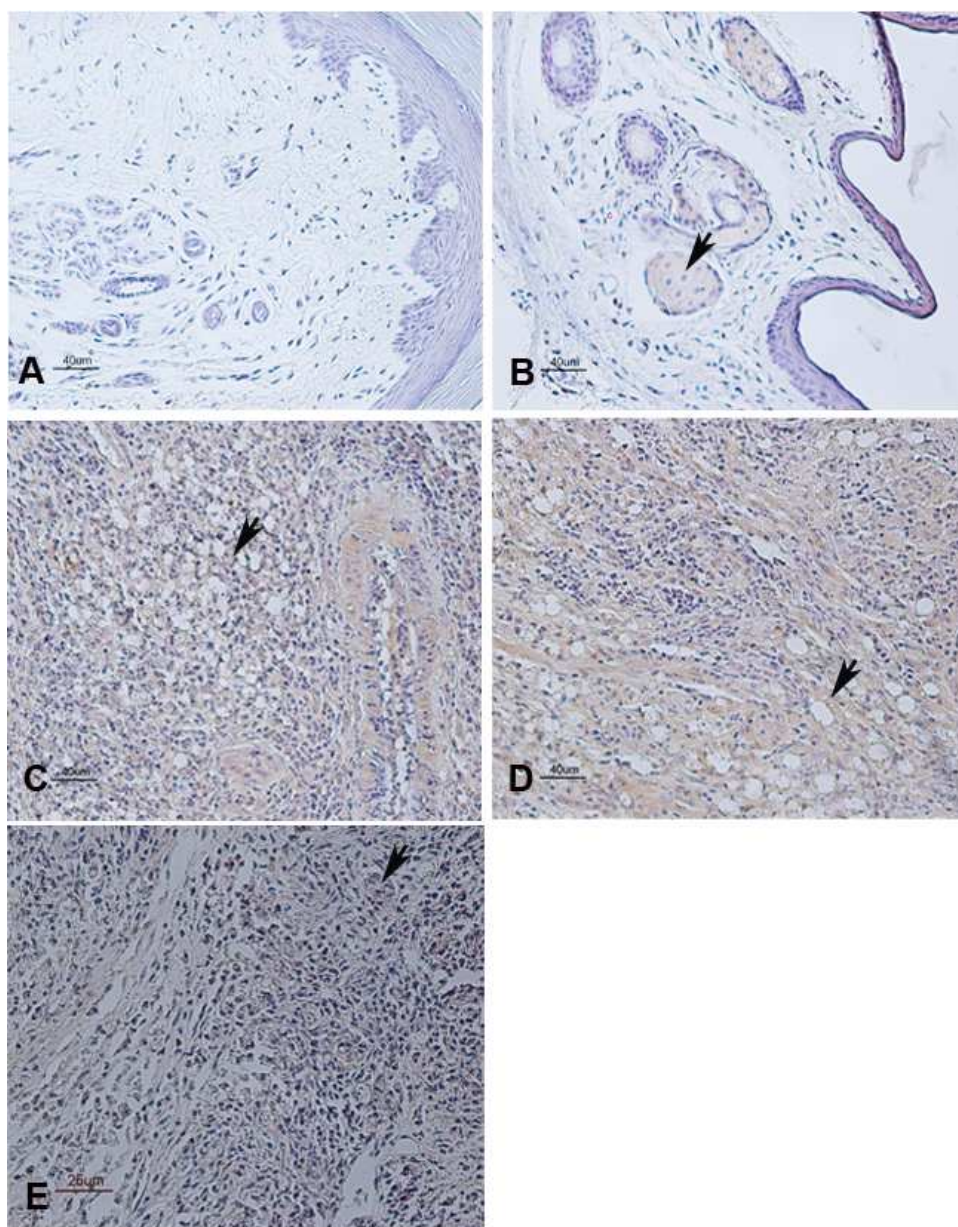


Figura 32. Avaliação da expressão de COX-2 em pata de camundongos C57BL/6/JUnib, por imuno-histoquímica. Tecidos de C57BL/6/JUnib não infectados (A) e infectados com  $10^5$  amastigotas de *L. amazonensis* nos tempos de 2 (B), 20 (C), 70 (D) e 150 (E) dias de infecção (aumento: 200x). A coloração castanho indica imunomarcção pelo anticorpo anti-COX-2. As setas indicam célula imunomarcada para COX-2. Os dados são representativos de 3 experimentos independentes.

Tabela 9. Detecção de COX-2, por imuno-histoquímica, em tecidos não infectados e infectados com  $10^5$  amastigotas *L. amazonensis* de dorso e pata de BALB/c/AnUnib e pata de C57Bl6/JUnib.

MARCADORES E PROTEÍNAS	TEMPO DE INFECCÃO (dias)	BALB/c/AnUnib	TEMPO DE INFECCÃO (dias)	BALB/c/AnUnib	C57BL/6/JUnib
		DORSO		PATA	PATA
COX-2	NI	+	NI	-	-
	40	+	2	+	+
	70	+	20	+	+
	110	+	70	+	+
	140	+	150	+	+

#### 4.9 Avaliação da expressão de Heat Shock Protein-70 (HSP-70) em lesões causadas por *L. amazonensis* em camundongos BALB/c/AnUnib e C57BL/6/JUnib

##### 4.9.1 Expressão de HSP-70 lesões no dorso de camundongos BALB/c/AnUnib infectados com *L. amazonensis*

A expressão de HSP-70 no dorso de BALB/c/AnUnib infectados com *L. amazonensis* foi detectada por imuno-histoquímica. A HSP-70 foi detectada em lesões de animais com 40, 70, 110 e 140 dias de infecção, sendo predominante nas células inflamatórias e nos macrófagos infectados (Figuras 33B, 33C, 33D e 33E). Não houve marcação para HSP-70 no dorso de animais não infectados (Figuras 33A).



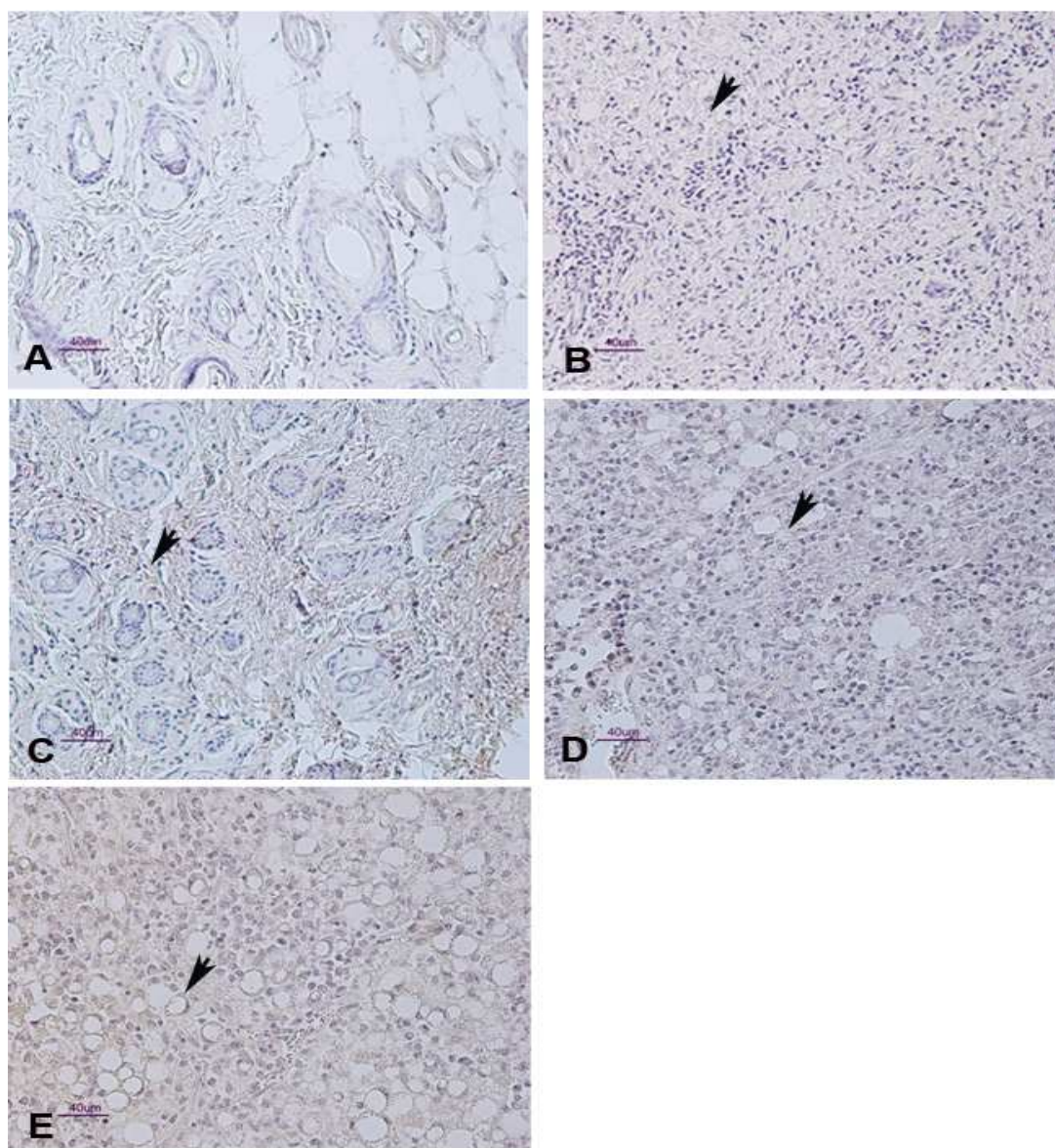


Figura 33. Avaliação da expressão de HSP-70 no dorso de camundongos BALB/c/AnUnib por imuno-histoquímica. Tecidos de BALB/c/AnUnib não infectados (A) e infectados com  $10^5$  amastigotas de *L. amazonensis* nos tempos de 40 (B), 70 (C), 110 (D) e 140 (E) dias de infecção (aumento: 200x). A coloração castanho indica imunomarcção pelo anticorpo anti- HSP-70. As setas indicam célula imunomarcada para HSP-70. Os dados são representativos de 3 experimentos independentes.

#### 4.9.2 Expressão de HSP-70 em lesões de pata de camundongos BALB/c/AnUnib infectados com *L. amazonensis*

A HSP-70 foi detectada nas lesões de pata de BALB/c/AnUnib aos 20, 70 e 150 dias de infecção, tanto em macrófagos infectados quanto nas demais células do infiltrado inflamatório (Figuras 34C, 34D e 34E). Não foi observada imunomarcagem para o anticorpo anti-HSP-70 em pata de BALB/c/AnUnib não infectado e com 2 dias de infecção (Figuras 34A e 34B).

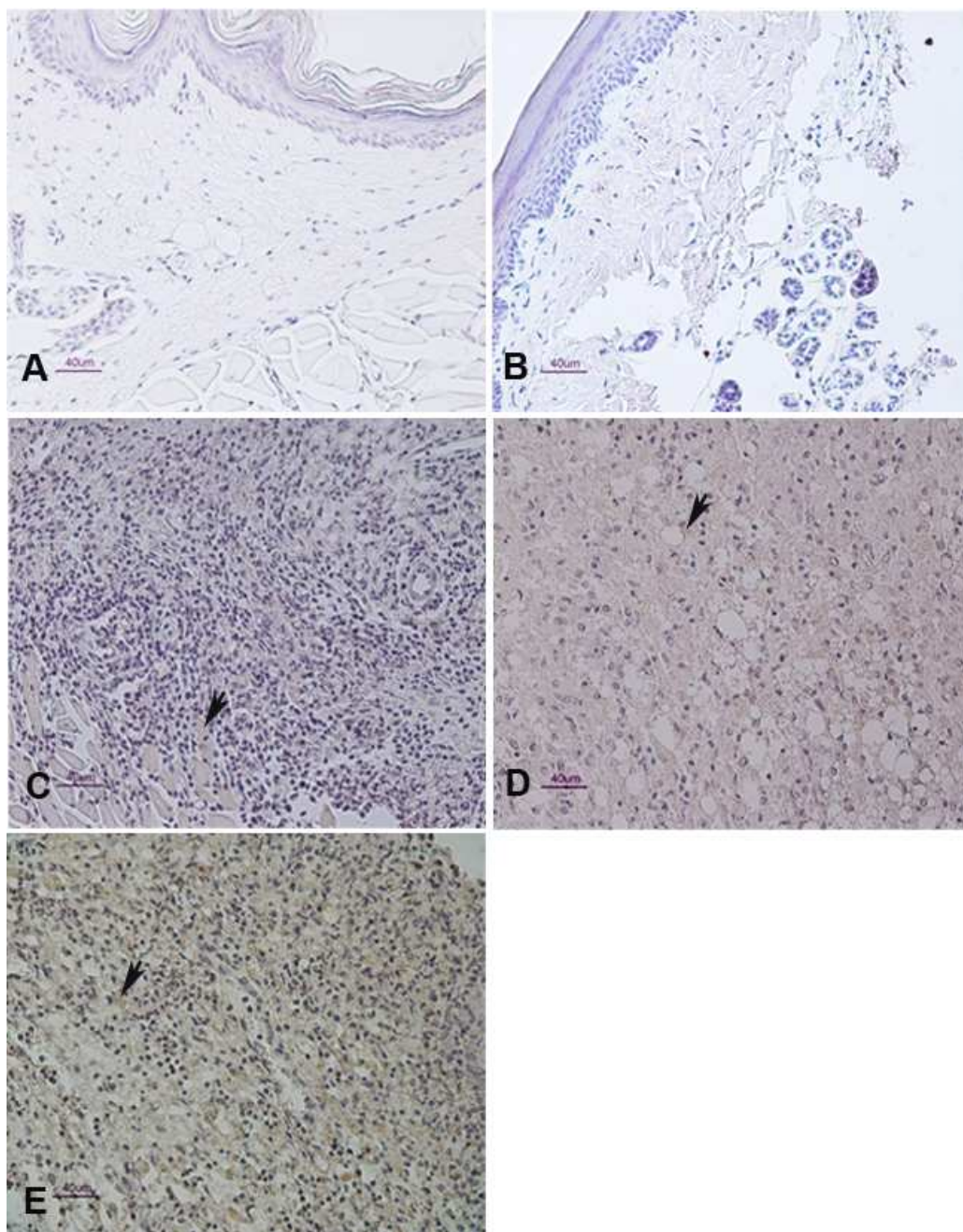


Figura 34. Avaliação da expressão de HSP-70 em pata de camundongos BALB/c/AnUnib, por imuno-histoquímica. Tecidos de BALB/c/AnUnib não infectados (A) e infectados com  $10^5$  amastigotas de *L. amazonensis* nos tempos de 2 (B), 20 (C), 70 (D) e 150 (E) dias de infecção (aumento: 200x). A coloração castanho indica imunomarcagem pelo anticorpo anti-HSP-70. As setas

indicam célula imunomarcada para HSP-70. Os dados são representativos de 3 experimentos independentes.

#### **4.9.3 Expressão de HSP-70 em lesões de pata de camundongos C57BL/6/JUnib infectados com *L. amazonensis***

A HSP-70 foi detectada nas lesões de C57BL/6/JUnib aos 20, 70 e 150 dias de infecção em todo infiltrado inflamatório (Figuras 35C, 35D e 35E). Não foi observada imunomarcagem para HSP-70 na pata de animais não infectados e nem no 2º dia de infecção (Figuras 35A e 35B).

Na tabela 10 estão resumidos os resultados de detecção da expressão de HSP-70, em lesões induzidas por *L. amazonensis* em dorso e pata de BALB/c/AnUnib e pata de C57BL/6/JUnib.

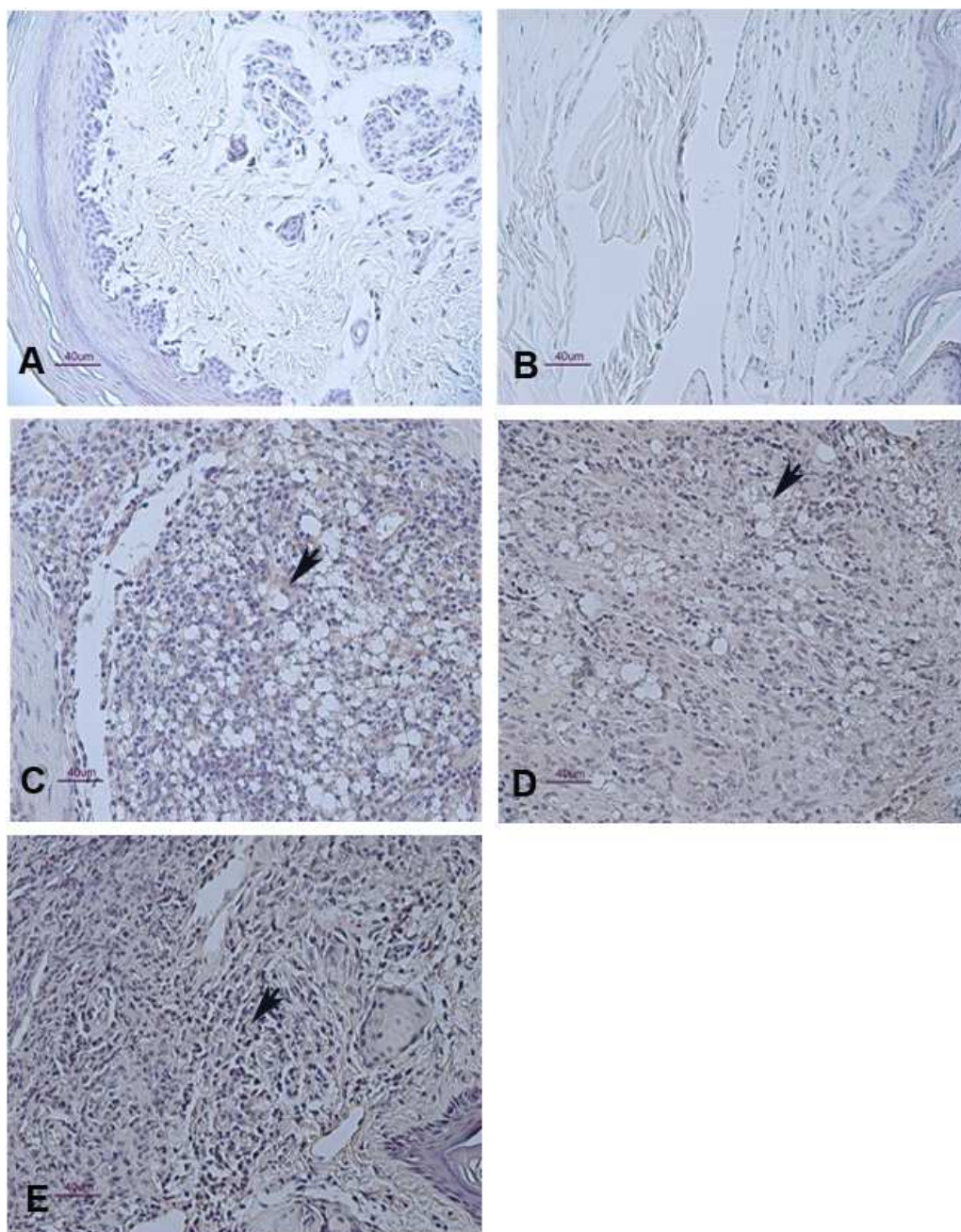


Figura 35. Avaliação da expressão de HSP-70 em pata de camundongos C57BL/6JUnib, por imuno-histoquímica. Tecidos de C57BL/6JUnib não infectados (A) e infectados com  $10^5$  amastigotas de *L. amazonensis* nos tempos de 2 (B), 20 (C), 70 (D) e 150 (E) dias de infecção (aumento: 200x). A coloração castanho indica imunomarcção pelo anticorpo anti-HSP-70. As setas

indicam célula imunomarcada para HSP-70. Os dados são representativos de 3 experimentos independentes.

Tabela 10. Detecção de HSP-70, por imuno-histoquímica, em tecidos não infectados e infectados com  $10^5$  amastigotas *L. amazonensis* de dorso e pata de BALB/c/AnUnib e pata de C57Bl6/JUnib.

MARCADORES E PROTEÍNAS	TEMPO DE INFEÇÃO (dias)	BALB/c/AnUnib	TEMPO DE INFEÇÃO (dias)	BALB/c/AnUnib	C57BL/6/JUnib
		DORSO		PATA	PATA
HSP-70	NI	-	NI	-	-
	40	+	2	-	-
	70	+	20	+	+
	110	+	70	+	+
	140	+	150	+	+

#### 4.10 Avaliação da expressão de Galectina-3 (Gal-3) em lesões de camundongos BALB/c/AnUnib e C57BL/6/JUnib infectados com *L. amazonensis*

##### 4.10.1 Expressão de Gal-3 em lesões no dorso de camundongos BALB/c/AnUnib infectados com *L. amazonensis*

A Gal-3 foi detectada em lesões do dorso de BALB/c/AnUnib em células do infiltrado inflamatório aos 70, 110 e 140 dias de infecção (Figura 36C, 36D e 36E). Também foi encontrada expressão de Gal-3 nas células adjacentes as células glandulares, em lesões no dorso aos 40 dias de infecção (Figura 36B). Não houve marcação para Gal-3 no dorso de animais não infectados (Figuras 36A).

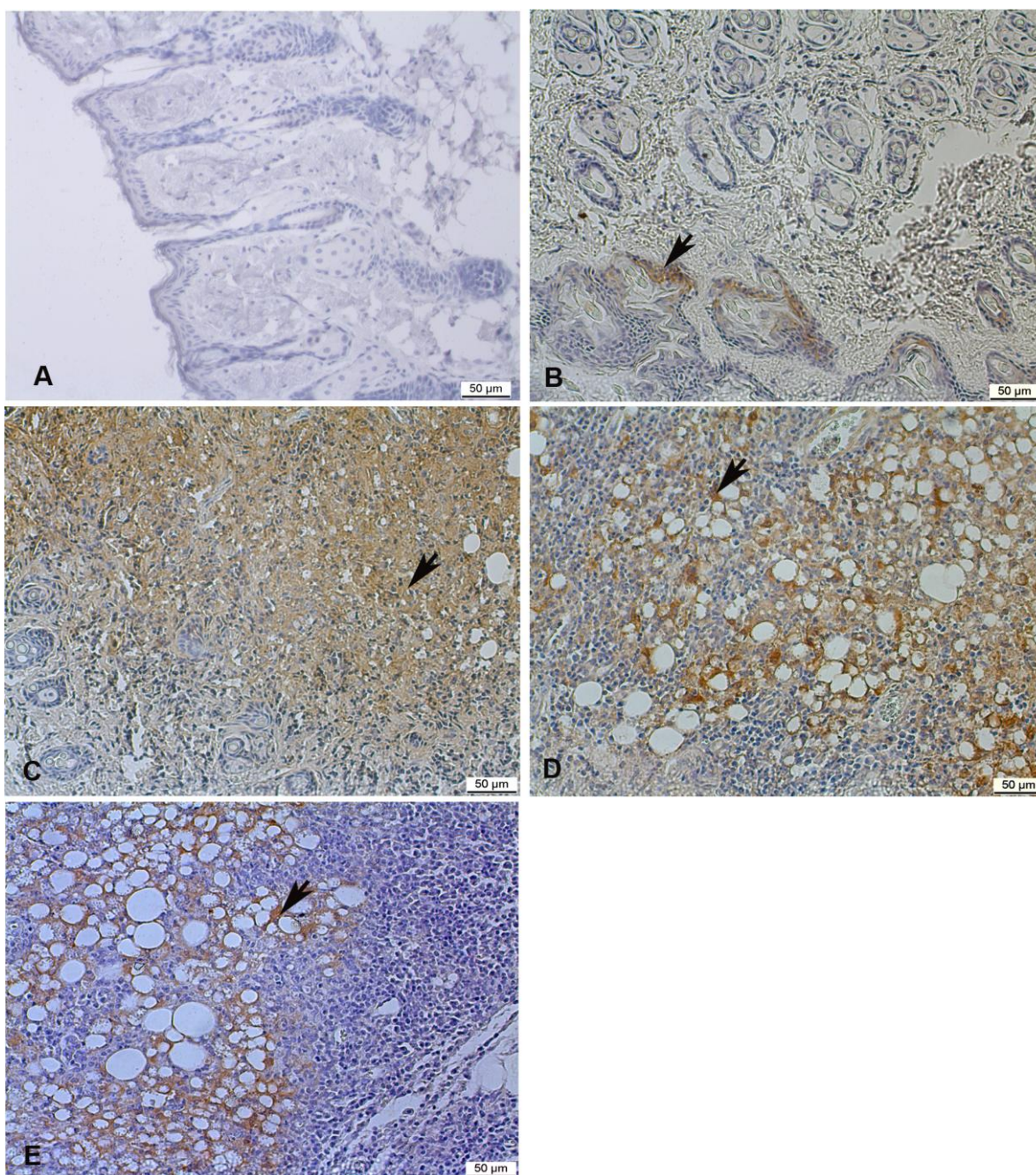


Figura 36. Avaliação da expressão de Gal-3 no dorso de camundongos BALB/c/AnUnib por imunohistoquímica. Tecidos de BALB/c/AnUnib não infectados (A) e infectados com  $10^5$  amastigotas de *L. amazonensis* nos tempos de 40 (B), 70 (C), 110 (D) e 140 (E) dias de infecção (aumento: 200x).

A coloração castanho indica imunomarcção pelo anticorpo anti-Gal-3. As setas indicam célula imunomarcada para Gal-3. Os dados são representativos de 3 experimentos independentes.

#### **4.10.2 Expressão de Gal-3 em lesões de pata de camundongos BALB/c/AnUnib infectados com *L. amazonensis***

A Gal-3 foi detectada na epiderme em lesões com 2 dias de infecção (Figura 37B). Em lesões de 20, 70 e 150 dias, a Gal-3 foi detectada em macrófagos infectados e não infectados (Figura 37C, 37D e 37E). A Gal-3 foi encontrada em pata de BALB/c/AnUnib não infectado, especificamente na epiderme, perfil semelhante ao tempo de 2 dias e infecção (Figuras 37A e 37B).



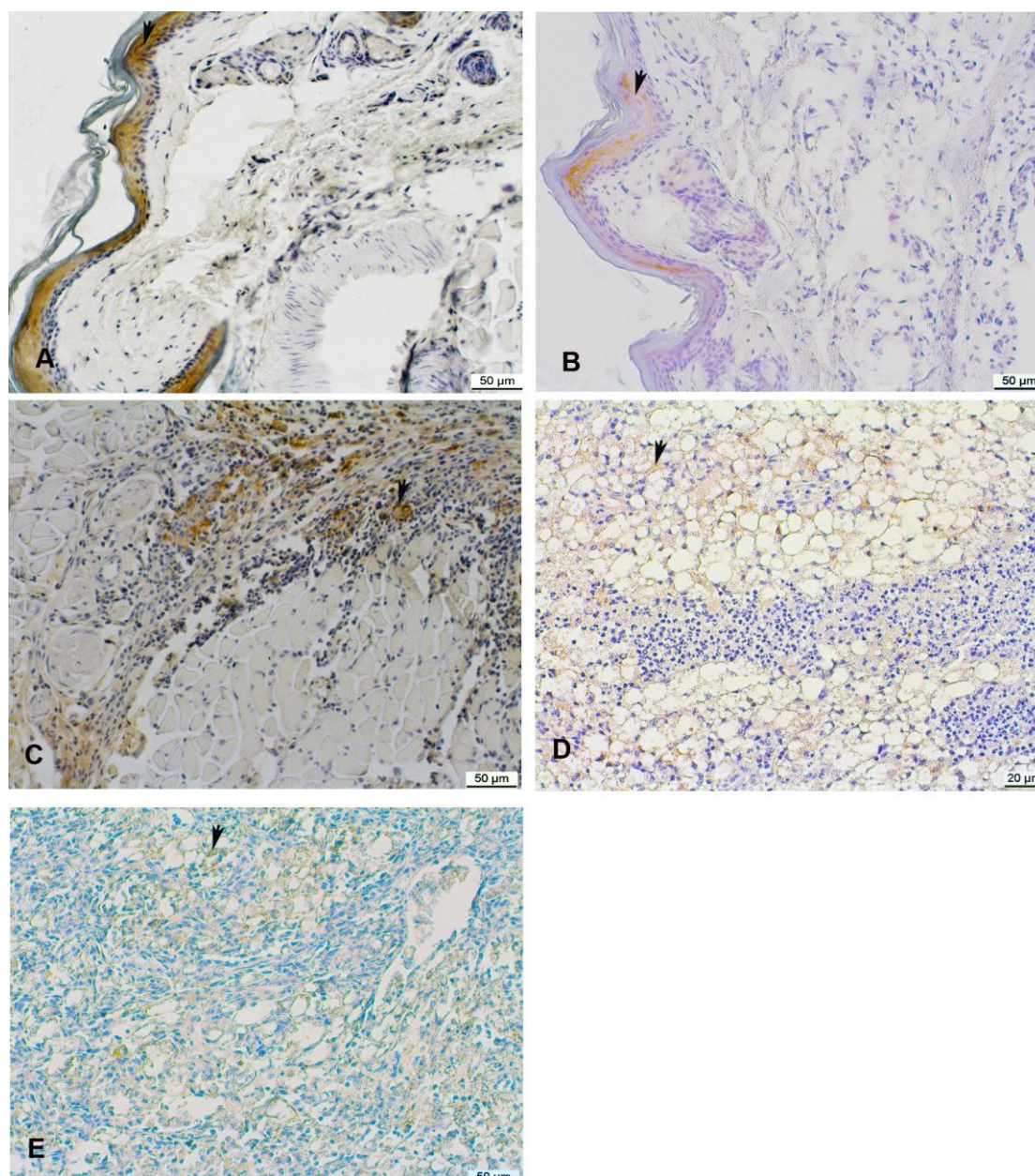


Figura 37. Avaliação da expressão de Gal-3 em pata de camundongos BALB/c/AnUnib, por imunohistoquímica. Tecidos de BALB/c/AnUnib não infectados (A) e infectados com  $10^5$  amastigotas de *L. amazonensis* nos tempos de 2 (B), 20 (C), 70 (D) e 150 (E) dias de infecção (aumento: 200x). A coloração castanho indica imunomarcagem pelo anticorpo anti- Gal-3. As setas indicam célula imunomarcada para Gal-3. Os dados são representativos de 3 experimentos independentes.

#### 4.10.3 Expressão de Gal-3 em lesões de pata de camundongos C57BL/6/JUnib infectados com *L. amazonensis*

Gal-3 foi detectada em lesões na pata de C57BL/6/JUnib aos 20,70 e 150 dias de infecção, principalmente em macrófagos e células polimorfonucleares (Figura 38C, 38D e 38E). Em pata de C57BL/6/JUnib não infectado e após 2 dias de infecção foi observada a expressão de Gal-3 na epiderme (Figura 38A e 38B).

Na tabela 11 estão resumidos os resultados de detecção da expressão de Gal-3, em lesões induzidas por *L. amazonensis* em dorso e pata de BALB/c/AnUnib e pata de C57BL/6/JUnib.

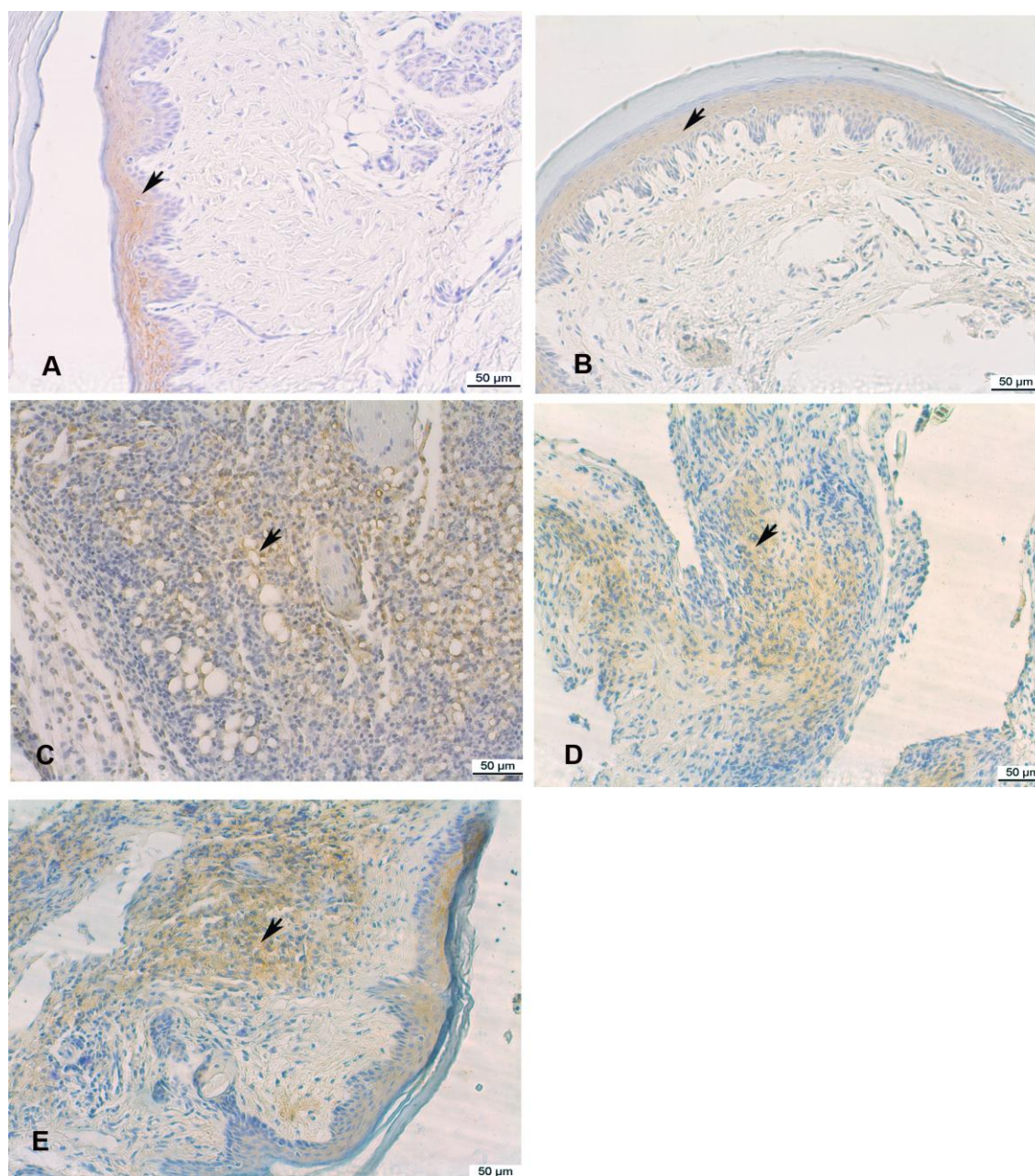


Figura 38. Avaliação da expressão de Gal-3 em pata de camundongos C57BL/6/JUnib, por imunohistoquímica. Tecidos de C57BL/6/JUnib não infectados (A) e infectados com  $10^5$  amastigotas de *L. amazonensis* nos tempos de 2 (B), 20 (C), 70 (D) e 150 (E) dias de infecção (aumento: 200x). A coloração castanho indica imunomarcção pelo anticorpo anti- Gal-3. As setas indicam célula imunomarcada para Gal-3. Os dados são representativos de 3 experimentos independentes.

Tabela 11. Detecção de Gal-3, por imuno-histoquímica, em tecidos não infectados e infectados com  $10^5$  amastigotas *L. amazonensis* de dorso e pata de BALB/c/AnUnib e pata de C57Bl6/JUnib.

MARCADORES E PROTEÍNAS	TEMPO DE INFECCÃO (dias)	BALB/c/AnUnib	TEMPO DE INFECCÃO (dias)	BALB/c/AnUnib	C57BL/6/JUnib
		DORSO		PATA	
GAL-3	NI	-	NI	+	+
	40	+	2	+	+
	70	+	20	+	+
	110	+	70	+	+
	140	+	150	+	+

#### 4.11 Avaliação da expressão de MIP-2 (Macrophage Inflammatory Protein-2) em lesões causadas por *L. amazonensis* em camundongos BALB/c/AnUnib e C57BL/6/JUnib

##### 4.11.1 Expressão de MIP-2 em lesões no dorso de camundongos BALB/c/AnUnib infectados com *L. amazonensis*

A expressão de MIP-2 foi detectada em macrófagos, a partir de 40 dias até 140 dias de infecção (Figura 39B, 39C, 39D e 39E). Células glandulares também apresentaram imunomarcagem para MIP-2 (Figura 39C). Não foi observada marcação para MIP-2 no dorso de BALB/c/AnUnib não infectado (Figura 39A)

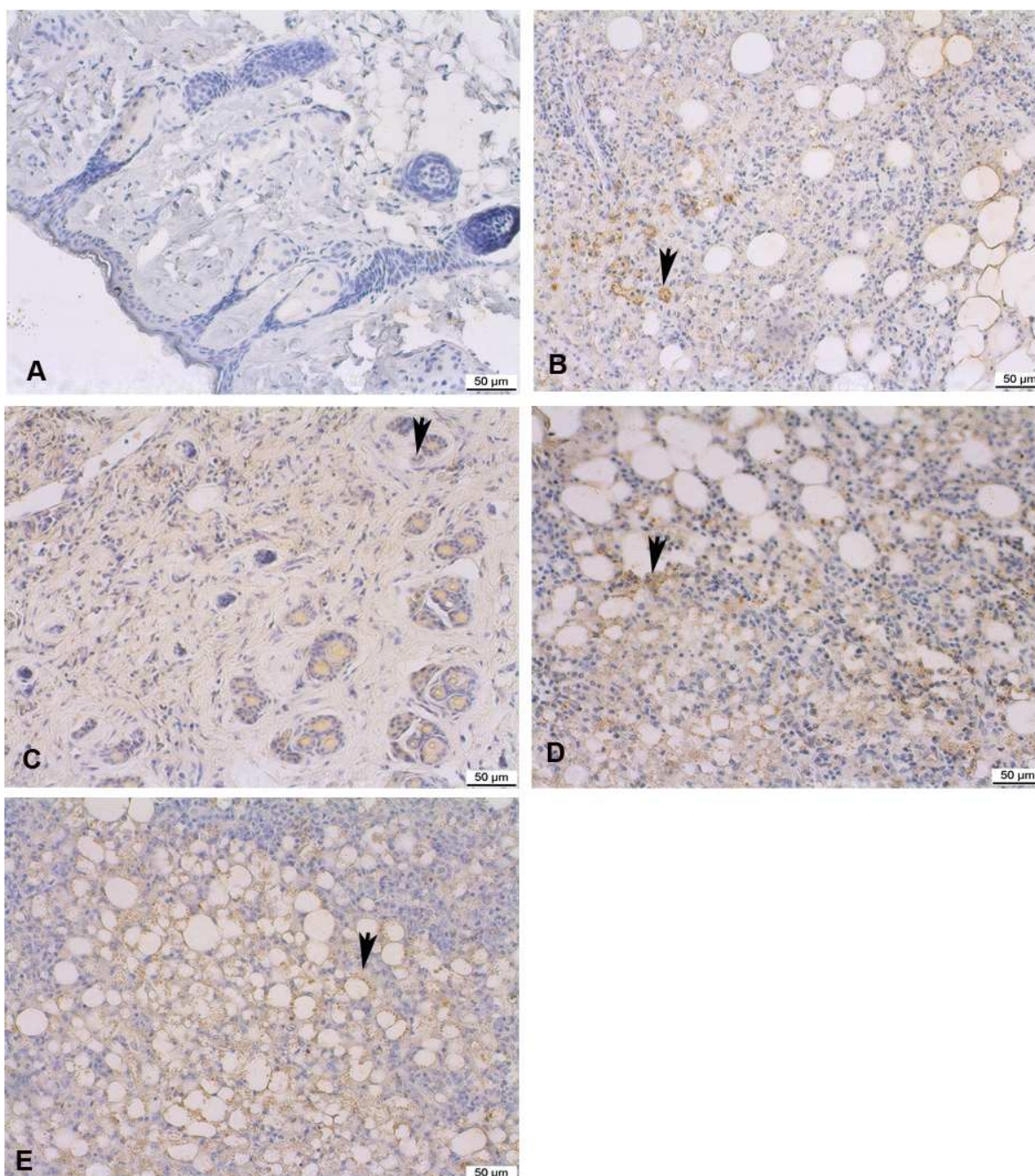


Figura 39. Avaliação da expressão de MIP-2 no dorso de camundongos BALB/c/AnUnib por imuno-histoquímica. Tecidos de BALB/c/AnUnib não infectados (A) e infectados com  $10^5$  amastigotas de *L. amazonensis* nos tempos de 40 (B), 70 (C), 110 (D) e 140 (E) dias de infecção (aumento: 200x). A coloração castanho indica imunomarcagem pelo anticorpo anti- MIP-2. As setas

indicam célula imunomarcada para MIP-2. Os dados são representativos de 3 experimentos independentes.

#### **4.11.2 Expressão de MIP-2 em pata de camundongos BALB/c/AnUnib infectados com *L. amazonensis***

MIP-2 foi detectado nas lesões de Balb/ infectados, em todos os tempos de infecção avaliados (2, 20, 70 e 150 dias) (Figura 40B 40C, 40D e 40E). A intensidade da marcação estava relacionada à quantidade de macrófagos no infiltrado inflamatório (Figura 40). Tecidos de pata de animais não infectados não apresentaram expressão de MIP-2 (Figura 40A).

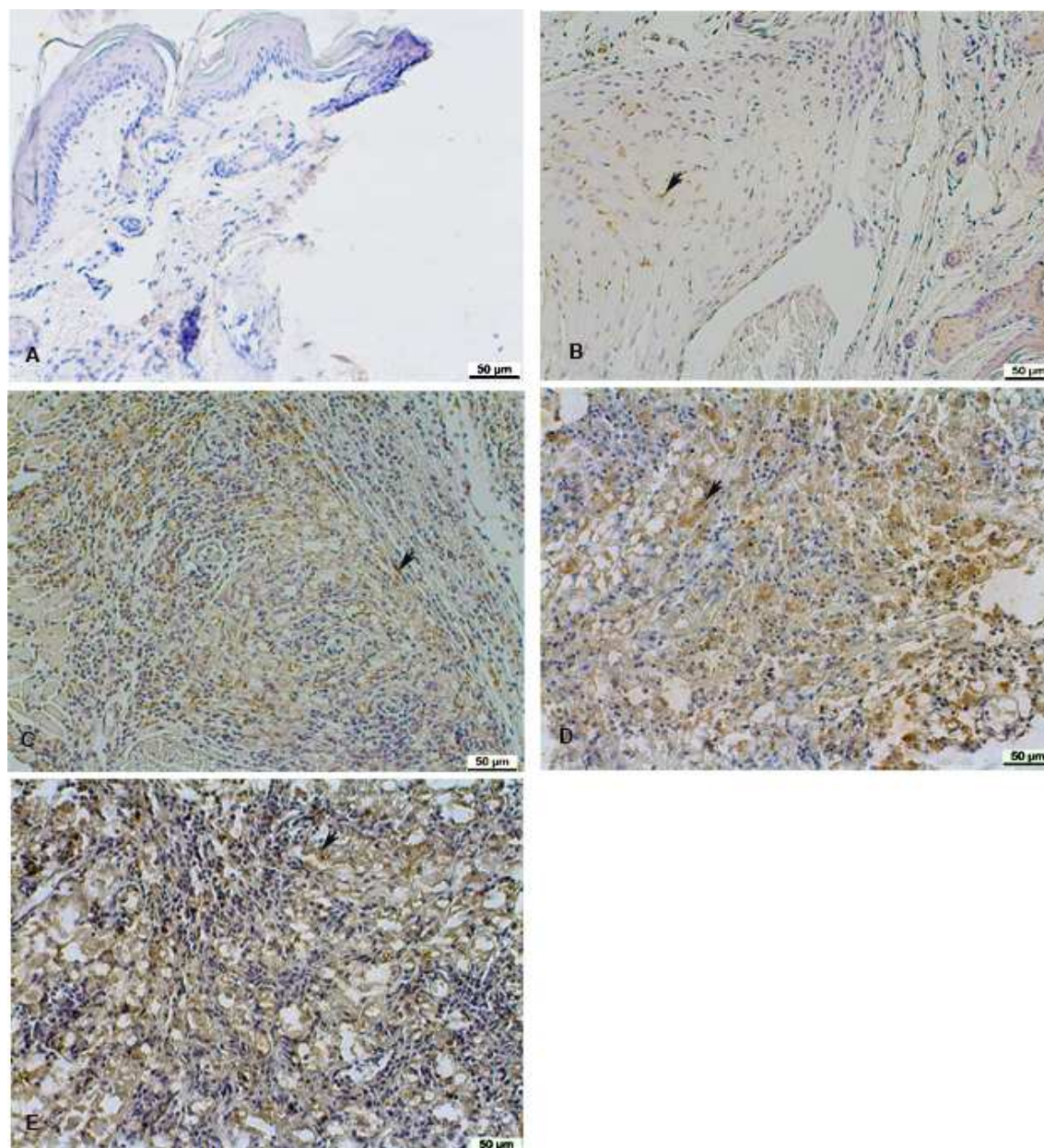


Figura 40. Avaliação da expressão de MIP-2 em pata de camundongos BALB/c/AnUnib, por imuno-histoquímica. Tecidos de BALB/c/AnUnib não infectados (A) e infectados com  $10^5$  amastigotas de *L. amazonensis* nos tempos de 2 (B), 20 (C), 70 (D) e 150 (E) dias de infecção (aumento: 200x). A coloração castanho indica imunomarcagem pelo anticorpo anti-MIP-2. As setas indicam célula imunomarcada para MIP-2. Os dados são representativos de 3 experimentos independentes.

#### 4.11.3 Expressão de MIP-2 em lesões de pata de camundongos C57BL/6/JUnib infectados com *L. amazonensis*

Lesões de camundongos C57BL/6/JUnib apresentaram imunomarcção para o anticorpo anti-MIP-2 desde o início da infecção (2 e 20 dias) até a fase crônica da infecção (70 e 150 dias) (Figura 41 B, 41C, 41D e 41E). Essa imunomarcção foi observada na superfície dos macrófagos. A expressão de MIP-2 não foi detectada em pata de C57BL/6/JUnib não infectado (Figura 41A).

Na tabela 12 estão resumidos os resultados de detecção da expressão de MIP-2, em lesões induzidas por *L. amazonensis* em dorso e pata de BALB/c/AnUnib e pata de C57BL/6/JUnib.



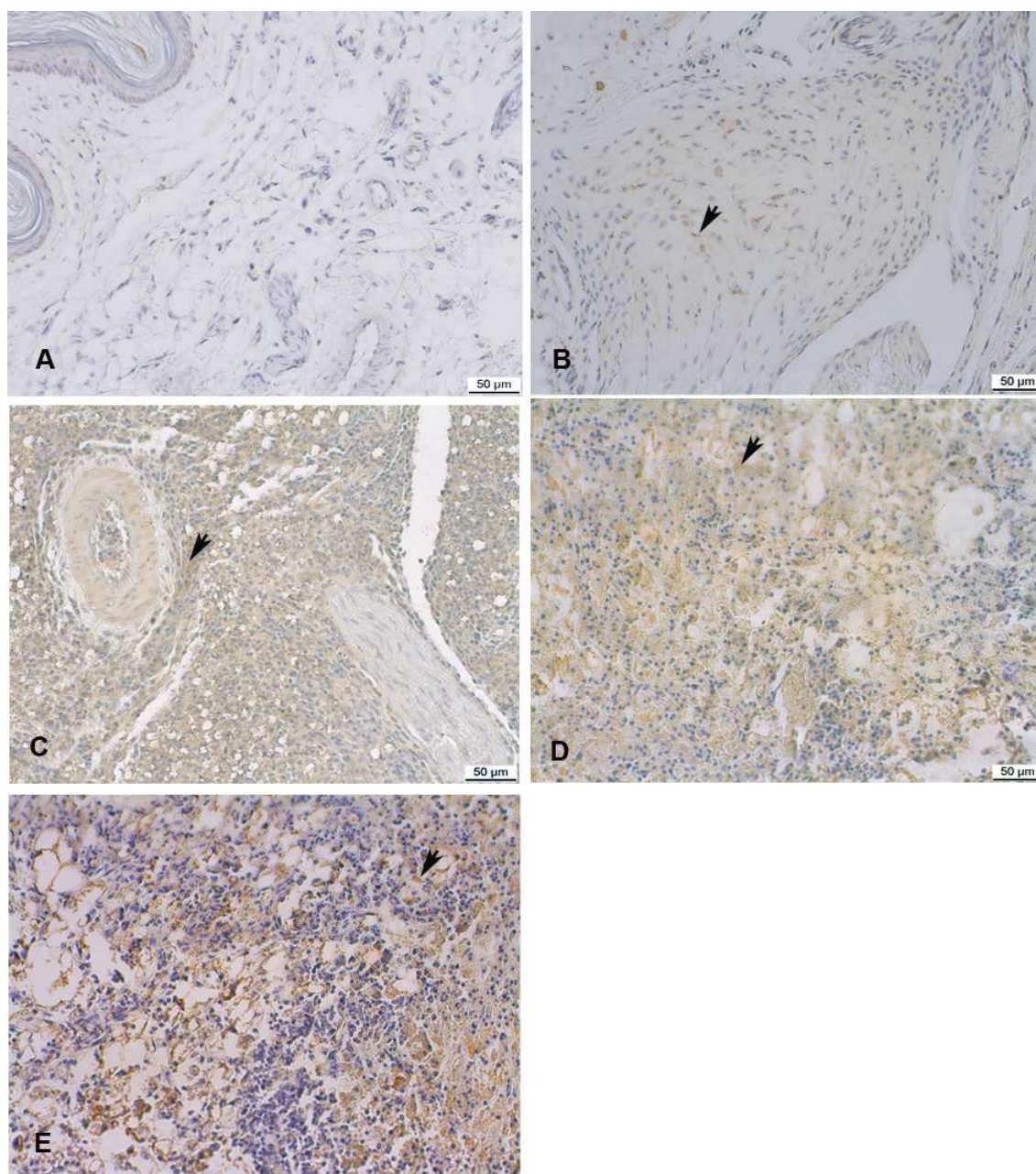


Figura 41. Avaliação da expressão de MIP-2 em pata de camundongos C57BL/6/JUnib, por imunohistoquímica. Tecidos de C57BL/6/JUnib não infectados (A) e infectados com  $10^5$  amastigotas de *L. amazonensis* nos tempos de 2 (B), 20 (C), 70 (D) e 150 (E) dias de infecção (aumento: 200x). A coloração castanho indica imunomarcção pelo anticorpo anti-MIP-2. As setas indicam célula imunomarcada para MIP-2. Os dados são representativos de 3 experimentos independentes.

Tabela 12. Detecção de MIP-2, por imuno-histoquímica, em tecidos não infectados e infectados com  $10^5$  amastigotas *L. amazonensis* de dorso e pata de BALB/c/AnUnib e pata de C57Bl6/JUnib.

MARCADORES E PROTEÍNAS	TEMPO DE INFECCÃO (dias)	BALB/c/AnUnib	TEMPO DE INFECCÃO (dias)	BALB/c/AnUnib	C57BL/6/JUnib
		DORSO		PATA	
MIP-2	NI	-	NI	-	-
	40	+	2	+	+
	70	+	20	+	+
	110	+	70	+	+
	140	+	150	+	+

#### 4.12 Avaliação da hipóxia, angiogênese, HO-1, p38MAPk e MIF após o tratamento da leishmaniose cutânea experimental

O tratamento da leishmaniose cutânea foi realizado com dois fármacos, o Glucantime® e Anfotericina B.

Camundongos BALB/c/AnUnib infectados na pata com *L. amazonensis* foram divididos em 3 grupos. Um grupo foi submetido ao tratamento com Glucantime outro grupo foi submetido ao tratamento com Anfotericina B, e outro recebeu salina, durante 20 dias.

Uma semana após o final do tratamento com Glucantime® foi possível observar uma diminuição no tamanho da pata dos animais do grupo tratado (Figura 42A). Avaliamos a carga parasitária dos animais tratados e não tratados. A quantidade de parasitas na lesão também foi menor no grupo tratado com Glucantime® quando comparado ao grupo controle (Figura 42B). Concluímos que esse tratamento causa redução nas lesões e na carga parasitária, mas não cura os animais.

Camundongos BALB/c/AnUnib infectados com *L. amazonensis* tratados e não tratados com Anfotericina B apresentaram semelhante progressão da lesão na pata. Dois dias após o tratamento as patas dos animais do grupo tratado e do grupo controle não

apresentaram diferença no tamanho (Figura 42C e 43). Em relação à carga parasitária o grupo tratado e o grupo controle não apresentaram diferença (Figura 42D).

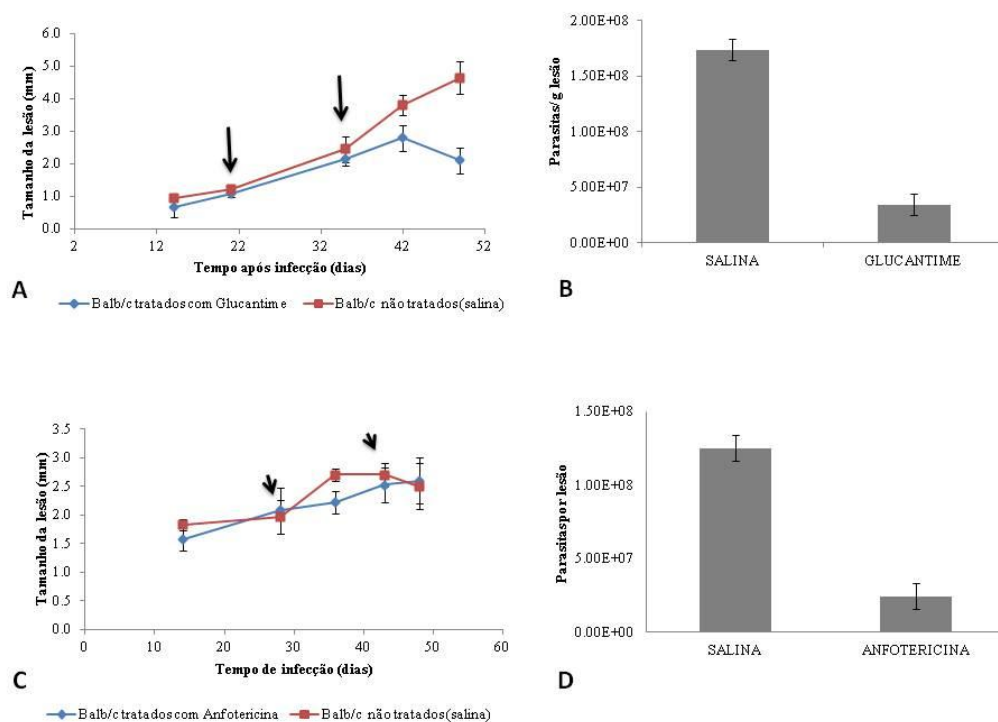


Figura 42. Tratamento da leishmaniose cutânea experimental. Curso da lesão induzida por *L. amazonensis* em pata de BALB/c/AnUnib submetidos ou não ao tratamento por Glucantime (100mg/Kg/dia) (A) e Anfotericina (5mg/Kg/dia) (B), durante 20 dias. n=8 (por grupo). As setas delimitam o período de tratamento. Efeito do tratamento com Glucantime (B) e Anfotericina (D) na carga parasitária da lesão. n=4 (por grupo).



Figura 43. Camundongos BALB/c/AnUnib não infectados e não tratados (NINT) e infectados na pata com  $10^5$  amastigotas de *L. amazonensis*, que foram submetidos ao tratamento placebo (salina), ou Glucantime (100mg/Kg/dia) ou Anfotericina (5mg/Kg/dia). Os camundongos tratados com salina ou com Glucantime tinham 47 dias de infecção no dia do sacrifício. Camundongos tratados com Anfotericina B tinham 37 dias de infecção no dia do sacrifício.

Após os tratamentos com Glucantime e Anfotericina B, foi avaliado se ocorre hipóxia tecidual utilizando-se o método do Hypoxyprobe, e avaliando-se a expressão de HIF-1 $\alpha$  e HIF-2 $\alpha$  (Figuras 44 e 45). BALB/c/AnUnib infectados e não tratados, tratados com Glucantime ou com Anfotericina B apresentaram imunomarcção para os anticorpos anti-pimonidazol (Figura 44), anti-HIF-1 $\alpha$  e anti-HIF-2 $\alpha$  (Figura 45). BALB/c/AnUnib não infectados e não tratados foram usados como controle negativo (Figuras 44A e 45A). Apesar de uma redução no tamanho das lesões e/ou da diminuição de macrófagos vacuolizados e de parasitos no interior dos macrófagos ainda assim ocorreu hipóxia tecidual nas lesões.

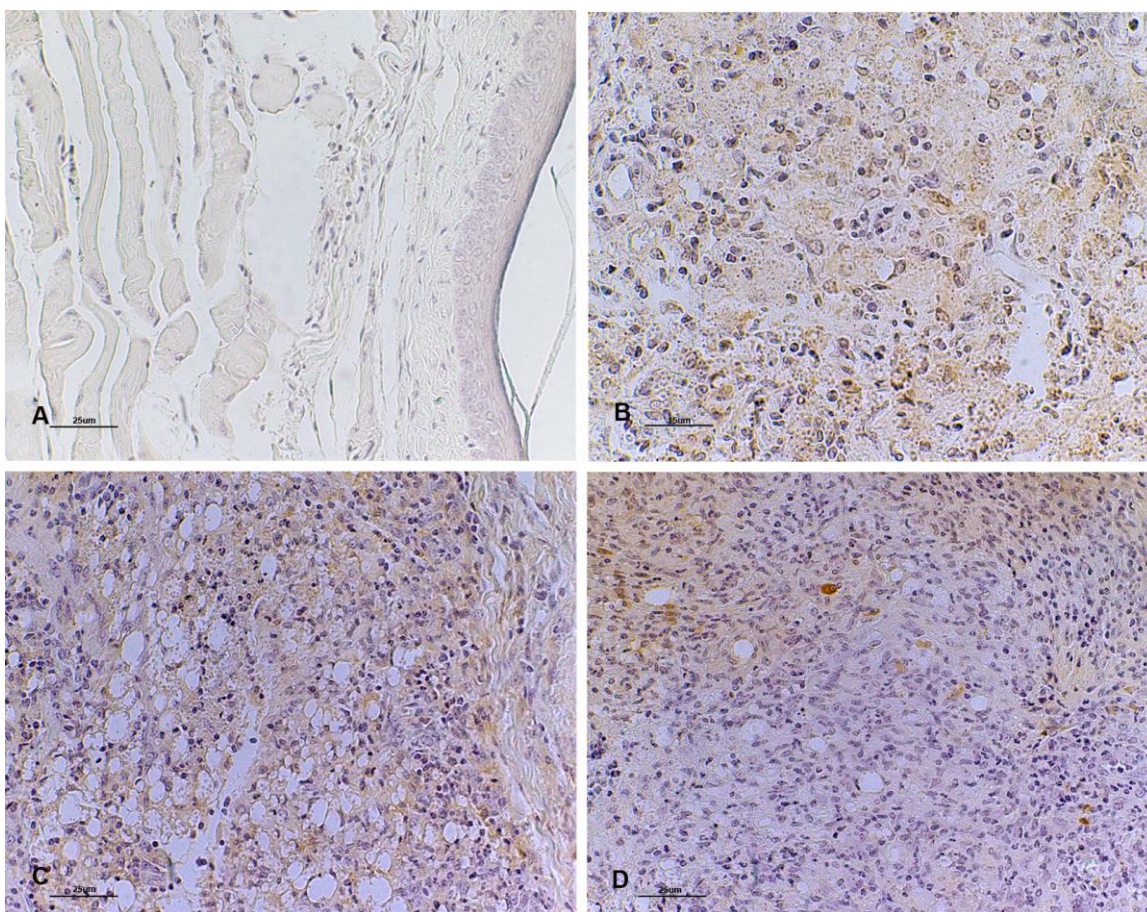


Figura 44. Avaliação da hipóxia tecidual, através do Hypoxyprobe<sup>TM</sup>-1, em pata de camundongos BALB/c/AnUnib infectados após o tratamento para leishmaniose cutânea, por imuno-histoquímica. Pata de BALB/c/AnUnib não infectados e não tratados (NINT) (A) (aumento: 400x), infectados não tratados (INF NT) (B) (aumento: 600x), e os infectados tratado com Glucantime (C) (aumento: 400x) e Anfotericina B (D) (aumento: 400x). A coloração castanho indica marcação pelo anticorpo utilizado neste experimento. Os dados são representativos de 3 experimentos independentes.

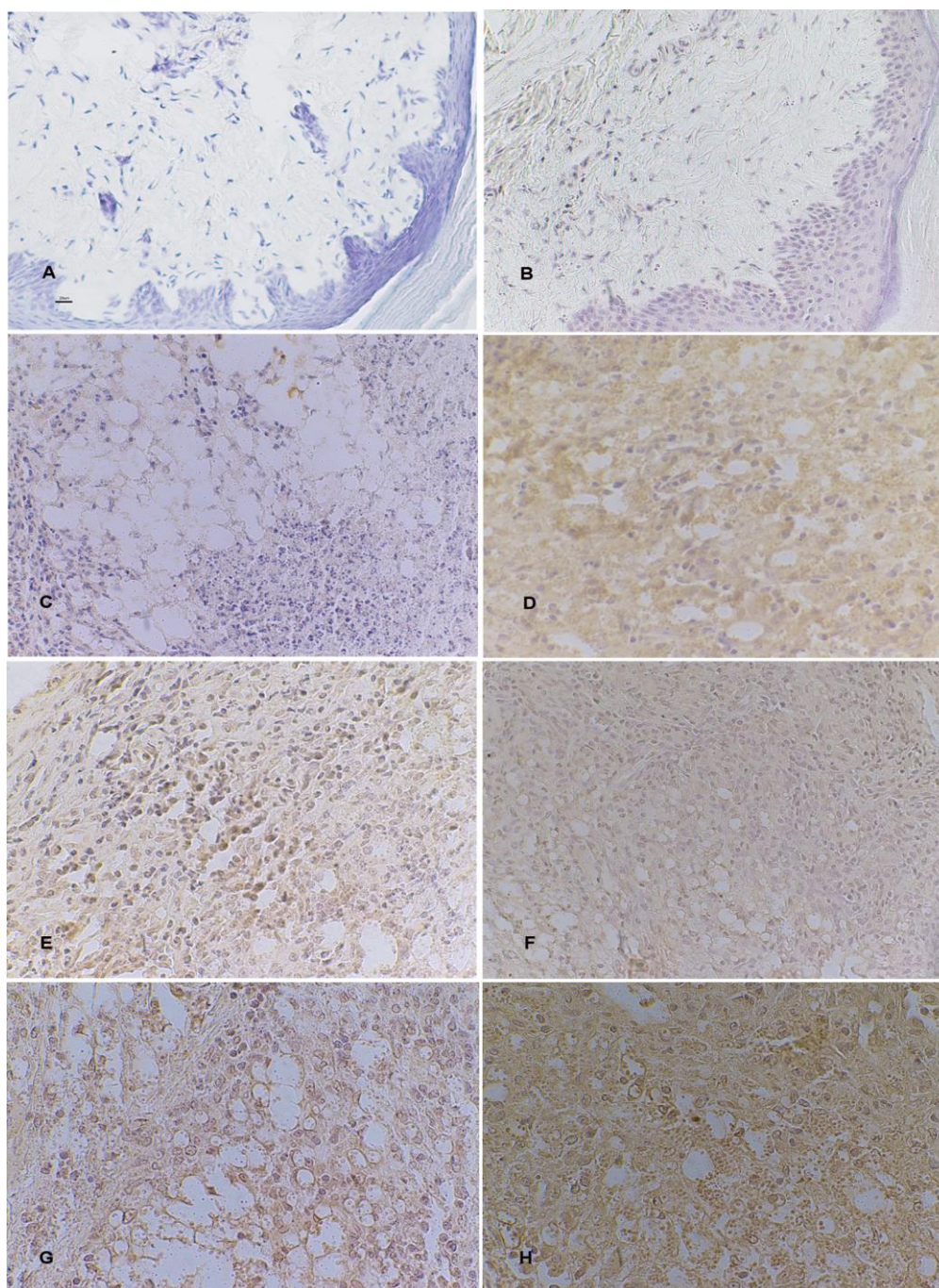


Figura 45. Avaliação da hipóxia tecidual, através da detecção de HIF-1 $\alpha$  e HIF-2 $\alpha$ , por imunohistoquímica, em pata de camundongos BALB/c/AnUnib infectados após o tratamento com Glucantime e Anfotericina B. Expressão de HIF-1 $\alpha$  em tecidos de BALB/c/AnUnib NINT (A) (aumento: 400x), INF NT (C) (aumento: 600x), e os infectados tratados com Glucantime (E)

(aumento: 400x) e Anfotericina B (G) (aumento: 600x). Expressão de HIF-2 $\alpha$  em tecidos de BALB/c/AnUnib NINT (B) (aumento: 400x), INF NT (D) (aumento: 400x), e os infectados tratados com Glucantime (F) (aumento: 400x) e Anfotericina B (H). (aumento: 600x). A coloração castanho indica marcação pelos anticorpos utilizados neste experimento. Os dados são representativos de 3 experimentos independentes.

O fator angiogênico VEGF não foi detectado na lesão leishmaniótica em camundongos susceptíveis (BALB/c/AnUnib), confirmando o dado mostrado anteriormente (Figuras 19 e 46). Mas como mostrado na figura 20 foi expresso no 20° e 70° dia de infecção em camundongos C57BL/6/JUnib. Assim, há possibilidade de que VEGF esteja relacionada ao processo de controle da infecção. Os camundongos BALB/c/AnUnib infectados com *L. amazonensis* foram submetidos ao tratamento com Glucantime ou com Anfotericina B, para posterior avaliação da expressão de VEGF. Essa proteína foi detectada por imuno-histoquímica, em lesões de BALB/c/AnUnib tratados com Glucantime e nos tratados com Anfotericina B (Figura 46C e 46D). O VEGF não foi detectado em tecidos de pata de BALB/c/AnUnib não infectados e infectados e não tratados (Figura 46A e 46B).

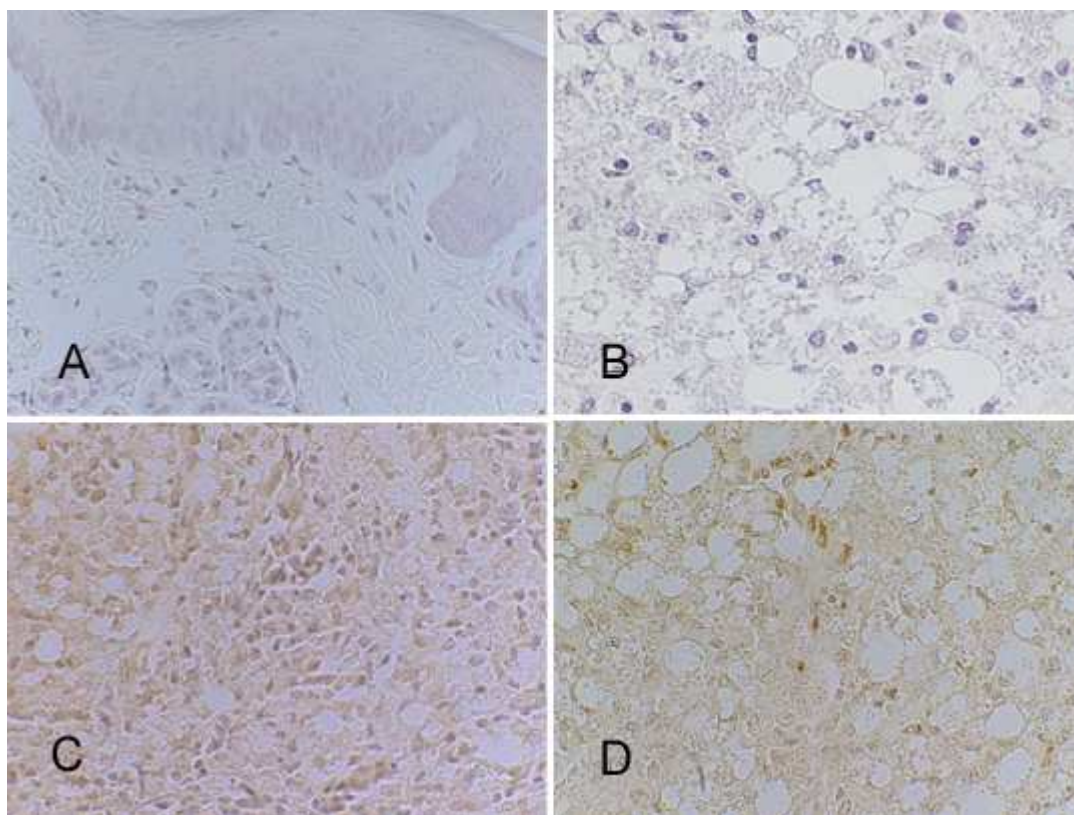


Figura 46. Avaliação da angiogênese, por imuno-histoquímica, em camundongos BALB/c/AnUnib infectados com *L. amazonensis* antes e após o tratamento para leishmaniose cutânea. Avaliação da angiogênese através da expressão de VEGF em tecidos de BALB/c/AnUnib não infectados e não tratados (NINT) (A), infectados não tratados (INF NT) (B), e os infectados tratado com Glucantime (C) e Anfotericina B (D). (aumento: 600x). A coloração castanho indica marcação pelos anticorpos utilizados neste experimento. Os dados são representativos de 3 experimentos independentes.

Utilizamos camundongos susceptíveis à infecção por *L. amazonensis* (BALB/c/AnUnib) infectados e tratados com fármacos convencionais, também para a avaliação da expressão de HO-1 e MIF. A HO-1 foi detectada em BALB/c/AnUnib infectado e não tratado (Figura 47B), tratados com Glucantime (Figura 47C) e tratados com Anfotericina B (Figura 47D). MIF também foi detectada em BALB/c/AnUnib infectado e não tratado (Figura 48B), tratados com Glucantime (Figura 48C) e tratados com



Anfotericina B (Figura 48D). Não foi observada imunomarcção para anticorpos anti-HO-1 e anti-MIF em tecidos de pata de BALB/c/AnUnib não infectados (Figura 47A e 48A).

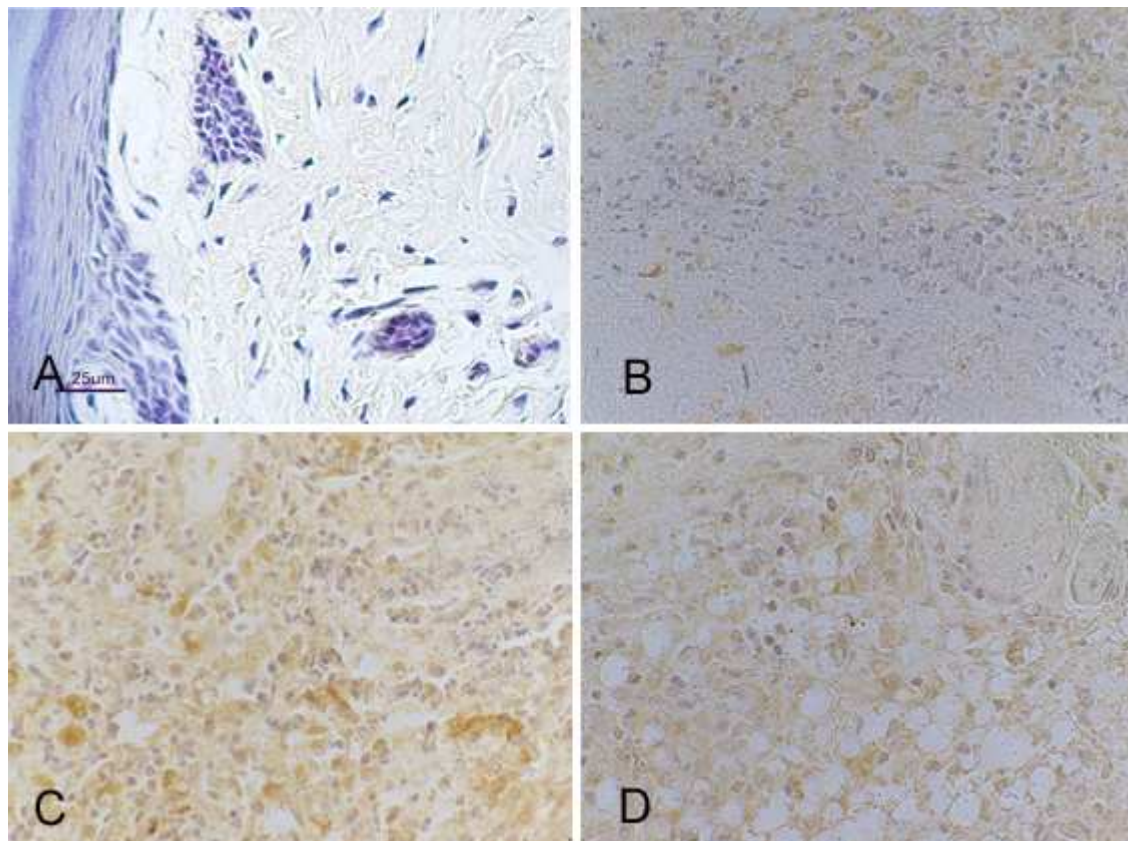


Figura 47. Avaliação da expressão de HO-1, por imuno-histoquímica, em camundongos BALB/c/AnUnib infectados com *L. amazonensis* antes e após o tratamento para leishmaniose cutânea. Detecção da expressão de HO-1 em tecidos de BALB/c/AnUnib não infectados e não tratados (NINT) (A) (aumento: 400x), infectados não tratados (INF NT) (B), e os infectados tratado com Glucantime (C) e Anfotericina B (D). (aumento: 600x). A coloração castanho indica marcação pelos anticorpos utilizados neste experimento. Os dados são representativos de 3 experimentos independentes.

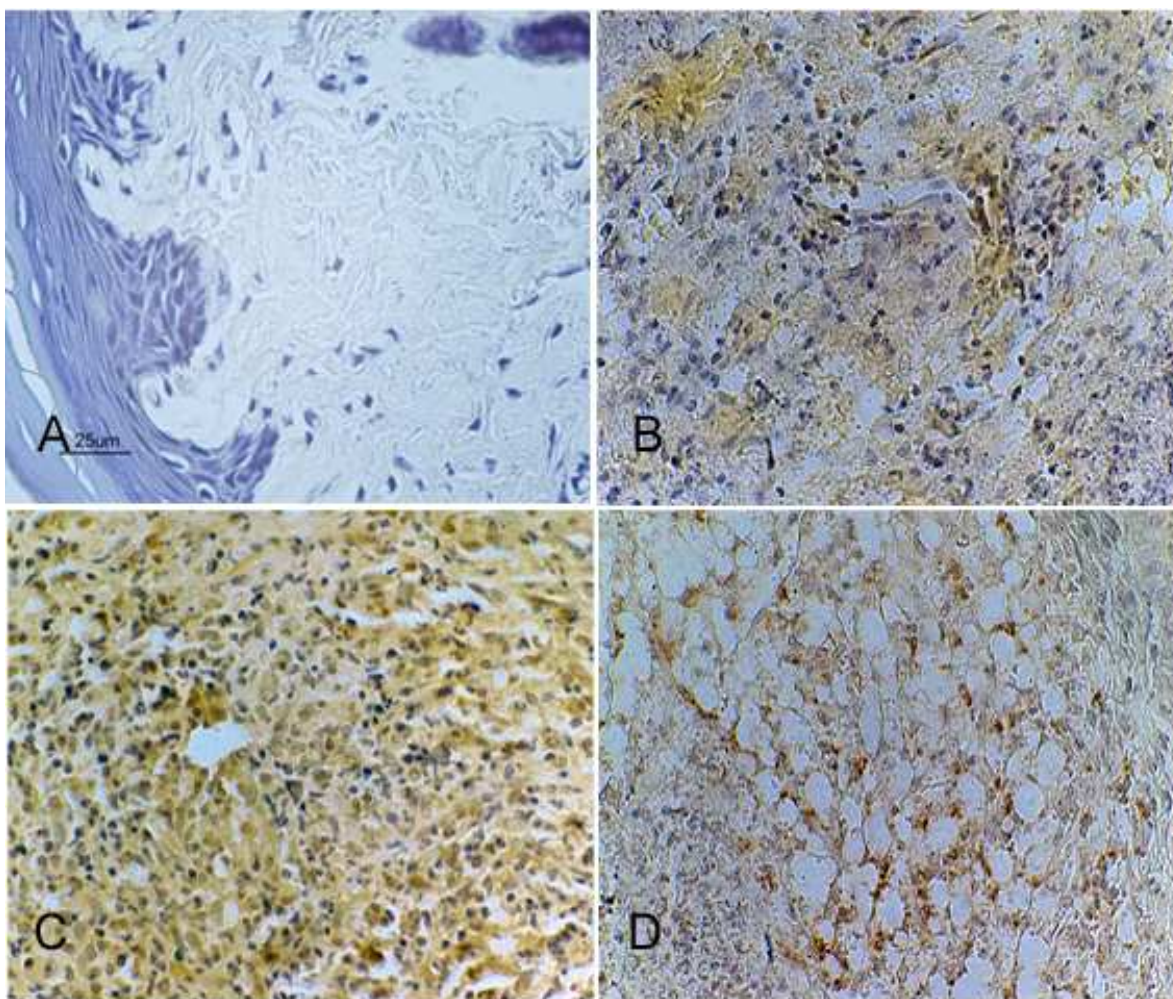


Figura 48. Avaliação da expressão de MIF, por imuno-histoquímica, em camundongos BALB/c/AnUnib infectados com *L. amazonensis* antes e após o tratamento para leishmaniose cutânea. Detecção da expressão de MIF em tecidos de BALB/c/AnUnib não infectados e não tratados (NINT) (A) (aumento: 400x), infectados não tratados (INF NT) (B), e os infectados tratado com Glucantime (C) e Anfotericina B (D). (aumento: 600x). A coloração castanho indica marcação pelos anticorpos utilizados neste experimento. Os dados são representativos de 3 experimentos independentes.

Em relação a p38MAPk, observamos que essa foi expressa em lesões de BALB/c/AnUnib infectados e não tratados (Figura 49B), tratados com Glucantime (Figura

49C) e tratados com Anfotericina B (Figura 49D). Não foi observada imunomarcacão para anticorpo anti-p38MAPk em tecidos de pata de BALB/c/AnUnib não infectados (Figura 49A).

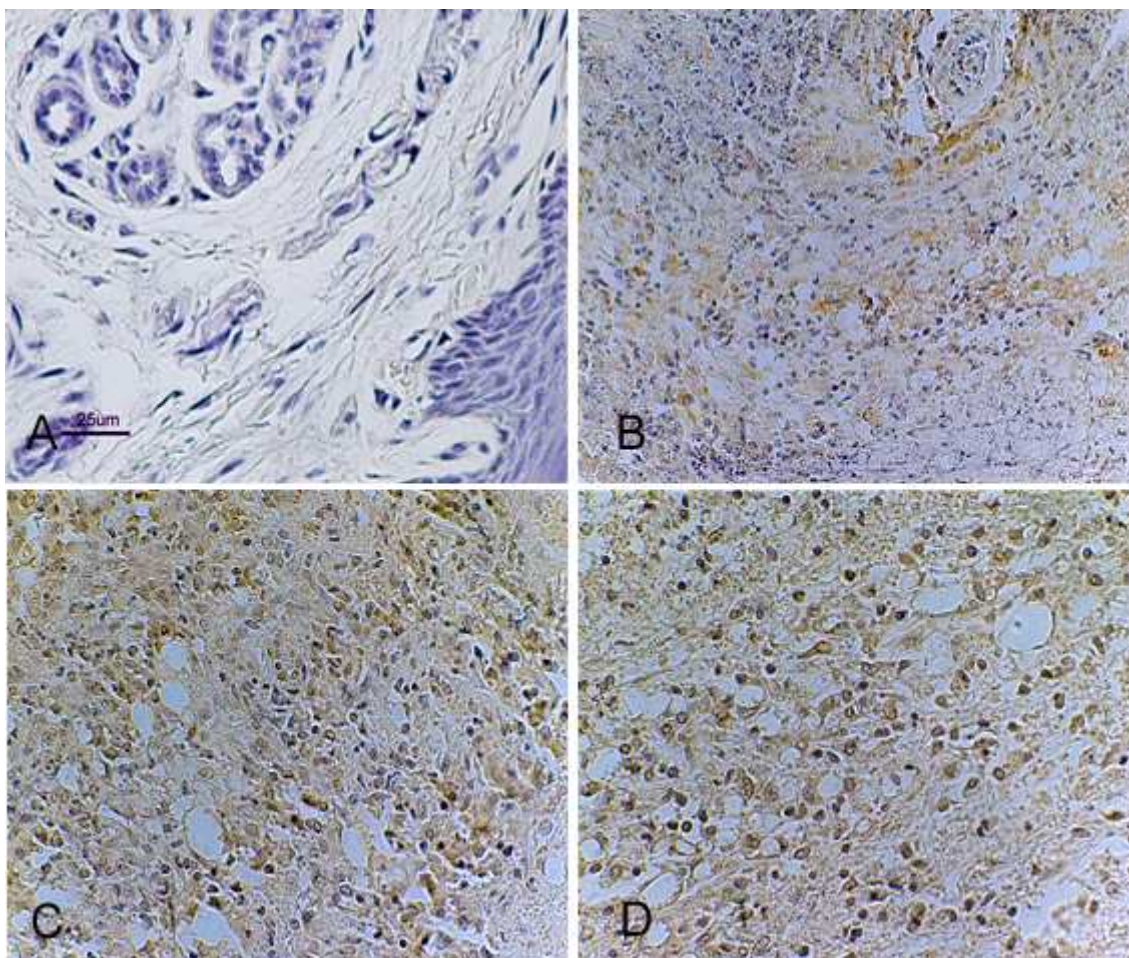


Figura 49. Avaliação da expressão de p38MAPk, por imuno-histoquímica, em camundongos BALB/c/AnUnib infectados com *L. amazonensis* antes e após o tratamento para leishmaniose cutânea. Detecção da expressão de p38MAPk em tecidos de BALB/c/AnUnib não infectados e não tratados (NINT) (A) (aumento: 400x), infectados não tratados (INF NT) (B) (aumento: 400x), e os infectados tratado com Glucantime (C) e Anfotericina B (D). (aumento: 600x). A coloração castanho indica marcação pelos anticorpos utilizados neste experimento. Os dados são representativos de 3 experimentos independentes.

Na tabela 13 estão resumidos os resultados da avaliação da hipóxia pelo método Hypoxyprobe<sup>TM</sup>-1 e da detecção da expressão de HIF-1 $\alpha$ , HIF-2 $\alpha$ , VEGF, HO-1 MIF e p38MAPk em lesões de pata de BALB/c/AnUnib infectados com *L. amazonensis* e submetidos ao tratamento com Glucantime e Anfotericina B.

Tabela 13. Resultado dos marcadores de hipóxia, angiogênese e proteínas inflamatórias avaliadas no tecido de pata de BALB/c/AnUnib infectados por *L. amazonensis* e submetidos ao tratamento com Glucantime e Anfotericina B.

MARCADORES E PROTEÍNAS	NINT	INF NT	TRAT GLUCANTIME	TRAT ANFOTERICINA B
<b>HYPOXYPROBE</b>	-	+	+	+
<b>HIF-1a</b>	-	+	+	+
<b>HIF-2a</b>	-	+	+	+
<b>VEGF</b>	-	-	+	+
<b>HO-1</b>	-	+	+	+
<b>p38MAPk</b>	-	+	+	+
<b>MIF</b>	-	+	+	+

NINT: BALB/c/AnUnib não infectado e não tratado;

INF NT: BALB/c/AnUnib infectado e não tratado;

TRAT GLUCANTIME: BALB/c/AnUnib infectados e tratados com Glucantime;

TRAT ANFOTERICINA: BALB/c/AnUnib infectados e tratados com Anfotericina B.

## 5. Discussão

A leishmaniose experimental murina tem sido um dos modelos parasitários mais estudados e tem contribuído para o entendimento da imunologia das doenças infecciosas (NYLÉN & GAUTAM, 2010). Alguns autores demonstraram diferenças no desenvolvimento da lesão causada por *L. amazonensis* dependendo da linhagem de camundongo utilizada (McELRATH et al., 1987; GIORGIO et al., 1998; ARRAIS-SILVA et al., 2005; AYRES, 2007; CARDOSO et al., 2010). Neste trabalho, para a avaliação do desenvolvimento da hipóxia tecidual, da angiogênese e da dinâmica do processo inflamatório em lesões causada por *L. amazonensis*, foram utilizados dois modelos que já são parcialmente estudados (dorso e pata) em uma linhagem susceptível (BALB/c/AnUnib). Destes, o modelo pata foi escolhido para avaliação e comparação com uma linhagem de camundongos que controlam a proliferação do parasito (C57BL/6/JUnib).

Na linhagem susceptível existem diferenças no desenvolvimento das lesões nos dois modelos de infecção, “dorso” e “pata”. A lesão no dorso surgiu como nódulo, com posterior ulceração e aumento progressivo do diâmetro. A lesão apresentou-se circunscrita e com bordas elevadas, semelhante à lesão em humanos (McELRATH et al., 1987; SILVEIRA et al., 2009). No tempo avaliado de 40 a 140 dias de infecção há um infiltrado celular composto principalmente por macrófagos infectados e pouco vacuolizados, polimorfonucleares e alguns linfócitos. Com a progressão da lesão, houve aumento do percentual de macrófagos. McElrath et al. (1987) sugeriu que a presença de um infiltrado inflamatório escasso de linfócitos T e uma resposta granulomatosa organizada está associada ao progressivo aumento da lesão de dorso em BALB/c/AnUnib; com acúmulo de macrófagos infectados na derme e no tecido subcutâneo. Até o final dos experimentos nenhum animal morreu decorrente da leishmaniose e não ocorreram metástases. Os resultados desse trabalho estão em concordância com os de McElrath et al. (1987) e Ayres, 2007.

Nos camundongos BALB/c/AnUnib infectados na pata, a lesão apresentou um rápido e progressivo aumento de tamanho durante o período avaliado (2 a 150 dias), com um

---

infiltrado inflamatório rico em macrófagos intensamente parasitados desde o início da infecção. Na fase crônica há foram observadas infecções secundárias, áreas de necrose e metástases na pata contra-lateral e no nariz dos animais. O mesmo perfil de infecção por *L. amazonensis*, em pata de BALB/c, foi observado por outros autores (GIORGIO et al., 1998; ARRAIS-SILVA et al., 2005).

Camundongos C57BL/6/JUnib infectados por *L. amazonensis* apresentaram menor lesão na pata infectada quando comparado às lesões na pata de camundongos BALB/c/AnUnib, após 40 dias de infecção. Além disso, não houve metástases e nem infecção secundária. Diferentemente das lesões de camundongos BALB/c/AnUnib, as lesões de pata em C57BL/6/JUnib apresentaram um intenso infiltrado inflamatório na fase inicial da lesão, com uma menor quantidade de macrófagos parasitados e de parasitos no interior dessas células. Com a progressão da infecção, houve um aumento de células polimorfonucleares e linfócitos no interior da lesão. Giorgio et al.(1998) relataram uma elevada produção de óxido nítrico (NO) na fase inicial da infecção por *L. amazonensis* em pata de C57BL/6/JUnib, quando a carga parasitária era baixa. O pico máximo de produção de NO na pata de C57BL/6/JUnib, coincidiu com o tempo em que a lesão começou a diminuir, sugerindo que o aumento de NO antes da presença de mais macrófagos infectados contribuiu para o controle da infecção. Em lesões de camundongos BALB/c o aumento da produção de NO foi observada na fase crônica da infecção, contribuindo para o agravamento do processo inflamatório e o aparecimento de infecções secundárias. Além disso, o percentual de macrófagos maduros presente em camundongos C57BL/6/JUnib foi maior que o de camundongos BALB/c/AnUnib. E de acordo com Beil et al. (1992), macrófagos imaturos são menos efetivos na eliminação do parasita que os maduros, o que poderia contribuir para as diferenças observadas nas duas linhagens em relação a infecção.

Os dados corroboram os da literatura que demonstraram que camundongos BALB/c eram susceptíveis a infecção por *L. amazonensis*, tanto quando inoculados no dorso quanto na pata. A linhagem de camundongos C57BL/6 foi capaz de controlar a infecção, mas não se curou. Fatores como a produção de NO e o infiltrado de linfócitos T no início da infecção parecem atuar no mecanismo de defesa do hospedeiro, controlando a infecção.

---

Outros fatores, como a hipóxia, angiogênese e proteínas relacionadas à inflamação devem estar envolvidos nesse processo.

Recentemente, modelos murinos têm sido utilizados para avaliação do papel da hipóxia e de diferentes subunidades de HIF durante processos patológicos, e tem permitido a identificação de moléculas alvo para futuros tratamentos do câncer e de doenças infecciosas crônicas, como esquistossomose, paracoccidiomicose e infecção pelo vírus sincicial respiratório (HAEBERLE et al., 2008, FERREIRA et al., 2009; ARAÚJO et al., 2010). A análise da hipóxia em linhagens de camundongos susceptíveis e resistentes para infecções experimentais permite um melhor entendimento dos mecanismos patológicos crônicos. Para a avaliação de hipóxia tecidual foi utilizado o método de Hypoxyprobe<sup>TM</sup>-1, que detecta adutos de pimonidazol formados em locais com baixa pressão parcial de oxigênio, usando um anticorpo anti-pimonidazol. Esse método é muito utilizado em pesquisas sobre aterosclerose, lesões hepáticas, leishmaniose cutânea, esquistossomose e tumores (AZUMA et al., 1997; RALEIGH et al., 2001; LOKMIC et al., 2006; PLOCK et al., 2007; TERADA et al., 2007; SLUIMER et al., 2008; HUANG & CHEN, 2009; ARAÚJO et al., 2010; ARAÚJO et al., 2012).

Algumas características, como infiltrado inflamatório, proliferação do parasito e infecções secundárias detectadas nas lesões causadas por *L. amazonensis*, no dorso e na pata de BALB/c/AnUnib, sugerem formação de microrregiões hipóxicas. Na lesão do dorso foi observado adutos de pimonidazol em todos os tempos avaliados (40 a 140 dias de infecção), assim como na pata de BALB/c/AnUnib (20 a 150 dias de infecção). Nesses dois modelos, quanto mais tempo de infecção e quanto maior a quantidade de macrófagos parasitados, mais regiões hipóxicas foram detectadas pelo Hypoxyprobe<sup>TM</sup>-1. Em C57BL/6/JUnib, marcação com o anticorpo anti-pimonidazol só foi detectada na fase crônica da infecção (70 e 150 dias), embora tenha sido observado um infiltrado inflamatório desde o 2º dia após a inoculação do parasito; a infecção foi controlada, o que pode justificar o tardio aparecimento de áreas hipóxicas. Além disso, em camundongos C57BL/6/JUnib foram detectadas bem menos áreas hipóxicas na lesão do que em lesões em BALB/c/AnUnib. Van der Bilt et al. (2007) utilizando o pimonidazol para detectar áreas

---

hipóxicas após isquemia induzida e reperfusão, relataram que em áreas hipóxicas houve estabilização de HIF-1 $\alpha$ , infiltrado de neutrófilos e células de Küpffer associados a acelerada proliferação das células tumorais no fígado de camundongos BALB/c com carcinoma, e também observaram hipóxia perinecrótica relacionada à presença de células inflamatórias. Nos dois modelos de infecção por *L. amazonensis* em camundongos BALB/c/AnUnib foi observada hipóxia tecidual concomitante ao aumento do infiltrado de macrófagos na lesão, aumento da carga parasitária e formação de áreas necróticas. Nos camundongos C57BL/6/JUnib não foram detectadas áreas necróticas e o aparecimento tardio de microrregiões hipóxicas pode estar relacionado à menor quantidade de macrófagos infectados, apesar de haver um infiltrado celular presente no início da infecção.

O outro método utilizado para a avaliação da hipóxia é a detecção de HIF-1 $\alpha$  e HIF-2 $\alpha$ , fatores de transcrição responsáveis pela atividade de vários genes envolvidos na adaptação das células a ambientes hipóxicos e neovascularização (WONG; WELLMAN; LOUNSBURY; 2003; ZINKERNAGEL & JOHNSON, 2007; HIGGINS et al., 2008; IIDA et al., 2012). Além disso, vários autores relataram a importância de HIF-1 $\alpha$  e HIF-2 $\alpha$  em processos inflamatórios e estresse oxidativo (ZINKERNAGEL et al., 2008; ARAÚJO et al., 2010; IMTIYAZ & SIMON, 2010; WERTH et al., 2010; WANG et al., 2011).

Nas lesões no dorso de BALB/c/AnUnib foram detectados HIF-1 $\alpha$  e HIF-2 $\alpha$  no citoplasma das células na fase crônica da infecção (110 e 140 dias), apesar de microambientes hipóxicos terem sido detectados por Hypoxyprobe<sup>TM</sup>-1, desde o início da infecção. Diferentemente das lesões no dorso, em pata de BALB/c/AnUnib HIF-1 $\alpha$  e HIF-2 $\alpha$  foram detectados, predominantemente no citoplasma das células, a partir de 20 dias de infecção, assim como os adutos de pimonidazol. Arrais-Silva et al.(2005) associou o quadro inflamatório da infecção por *L. amazonensis* em pata de camundongos BALB/c/AnUnib com a intensa atividade metabólica e o consumo de oxigênio pelo parasito e pelas células hospedeiras à uma expressão de HIF-1 $\alpha$  tempo-dependente. O mesmo foi observado durante esse trabalho, e os resultados sugerem que a presença de grande quantidade de macrófagos altamente parasitados nas lesões de pata de BALB/c/AnUnib contribuem para a



---

expressão de HIF-1 $\alpha$  e HIF-2 $\alpha$ ; estando esses fatores relacionados ao processo inflamatório, além da hipóxia.

Nas lesões de C57BL/6/JUnib, HIF-1 $\alpha$  e HIF-2 $\alpha$  foram detectados a partir de 20 dias de infecção, apesar dos microambientes hipóxicos terem sido detectados na fase crônica. Ao contrário das lesões em camundongos BALB/c/AnUnib, nas lesões em pata de C57BL/6/JUnib, HIF-1 $\alpha$  e HIF-2 $\alpha$  foram detectados predominantes no núcleo em 20 e 70 dias de infecção, local de ação destes fatores. Estes resultados sugerem que HIF-1 $\alpha$  e HIF-2 $\alpha$  também estejam mais relacionados ao processo inflamatório que à hipóxia, nas infecções por *L. amazonensis*, uma vez que esta linhagem de camundongos apresentou um intenso infiltrado inflamatório a partir de 2 dias de infecção que contribuiu para o controle da infecção. Ramadori et al. (2010) detectaram HIF-1 $\alpha$  no núcleo de hepatócitos e células de Küpffer e HIF-2 $\alpha$  no núcleo de células endoteliais, fibroblastos e células de Küpffer ativadas no fígado de camundongos C57BL/6 com uma reação inflamatória aguda induzida por LPS (lipopolissacarídeos). A partir disso, eles concluíram que HIF-1 $\alpha$  e HIF-2 $\alpha$  ativam simultaneamente vários genes envolvidos no processo inflamatório e hipóxico, dentre eles a eritropoietina. Peyssonnaud et al. (2007) também demonstraram que macrófagos ativados por LPS expressam HIF-1 $\alpha$  e estão relacionados a produção de citocinas pró inflamatórias na fase aguda da sepse. Nós sugerimos que a presença de HIF-1 $\alpha$  e HIF-2 $\alpha$  predominantemente no núcleo dos macrófagos nas lesões de C57BL/6/JUnib, induz a ativação de vários genes.

Neste trabalho determinamos um fenótipo diferente entre as linhagens de camundongos susceptíveis e os relativamente resistentes quanto ao fator angiogênico VEGF e várias proteínas presentes em processos inflamatórios.

O fator angiogênico, VEGF, é produzido por macrófagos e células endoteliais sob estímulos como hipóxia, HIF-1 $\alpha$  e HIF-2 $\alpha$  (HARMEY et al., 1998; XIONG et al., 1998; KONNER & DUPONT, 2004; KIM et al., 2008; SLUIMER et al., 2008; ARAÚJO et al., 2010; ICHIHARA et al., 2011). Em tumores a detecção de VEGF está relacionada a um mau prognóstico e a metástase (KANEMATSU et al., 2004; GORDAN & SIMON, 2007;

---

QING & SIMON, 2009; IMTIYAZ et al., 2010; ICHIHARA et al., 2011), por isso várias terapias anti-angiogênicas tem sido testadas (MATHONNET et al., 2006; ICHIHARA et al., 2011). O VEGF também já foi detectado em outras infecções causadas por vírus e helmintos (LOEFFLER et al., 2002; MATHONNET et al., 2006; HASSAN et al., 2009; ARAÚJO et al., 2010). Na esquistossomose experimental foi possível detectar uma relação positiva entre a presença de microrregiões hipóxicas no interior do granuloma e a expressão de HIF-1 $\alpha$  nuclear e VEGF, tanto no fígado, como no baço e no intestino de camundongos infectados (ARAÚJO et al., 2010).

Nas lesões de dorso e pata de BALB/c/AnUnib não foi detectada expressão de VEGF em nenhum dos tempos de infecção avaliados, embora tenha sido detectado ambiente hipóxico com presença de HIF-1 $\alpha$  e HIF-2 $\alpha$ . Montero et al. (2007) avaliando a proliferação de células tumorais em carcinoma gastrointestinal humano relacionaram a expressão de VEGF e p53 com um grave prognóstico da doença (aumento do tumor, infiltração de células e gastrite). Outra correlação da hipóxia, HIF e VEGF com mau prognóstico, foi detectado por Sluimer et al. (2008) na aterosclerose humana, com formação de intraplacas de ateroma e trombos. Entretanto, a presença de HIF-1 $\alpha$  e HIF-2 $\alpha$  em lesão de BALB/c/AnUnib (dorso e pata) foi observada predominantemente no citoplasma das células, sugerindo ausência de ação de HIF nessas células, e conseqüentemente ausência de ativação de genes relacionados, como o gene do VEGF.

Ao contrário do observado em BALB/c/AnUnib, a expressão de VEGF foi detectada em lesões de pata de C57BL/6/JUnib aos 20 e 70 dias de infecção, mesmo tempo em que há predominância da expressão de HIF-1 $\alpha$  e HIF-2 $\alpha$  no núcleo das células. Entretanto, aos 150 dias de infecção quando a expressão de HIF-1 $\alpha$  e HIF-2 $\alpha$  foi predominantemente citoplasmática, VEGF não foi expresso em células de lesão de pata de C57BL/6/JUnib. Esses resultados sugerem atividade transcricional de HIF-1 $\alpha$  e HIF-2 $\alpha$ , quando expressos no núcleo das células na indução de VEGF (angiogênese) e a importância desses fatores de transcrição e do VEGF no controle da infecção. Apesar de trabalhos com tumores (FANG et al., 2007; MONTERO; ABREU; TONINO, 2008; TONG et al., 2012) e aterosclerose

(SLUIMER et al., 2008) indicarem que a presença de VEGF está relacionada com mau prognóstico, na esquistossomose experimental a presença do VEGF foi relacionada a uma tentativa do organismo em reestabelecer a homeostase através da neovascularização, para reestabelecimento do fluxo sanguíneo normal nos órgãos afetados (LOEFLER et al., 2002; ARAÚJO et al., 2010). Nas lesões causadas por *L. amazonensis* em camundongos C57BL/6/JUnib, o VEGF deve estar relacionado à tentativa do organismo hospedeiro em controlar a infecção, facilitando o fluxo sanguíneo e a chegada de células inflamatórias na lesão. E, sugerimos que essa molécula possa ser um marcador de bom prognóstico para a resolução da infecção.

Neste trabalho foram avaliadas as expressões de: HO-1, p38MAPk, MIF, COX-2, HSP-70, Gal-3 e MIP-2, em diferentes tempos de infecção com o objetivo de elucidar seus papéis na dinâmica da infecção dos diferentes modelos e linhagens.

A enzima HO-1 desempenha um papel citoprotetor importante na manutenção da homeostase celular durante a inflamação (GOZZELINO; JENEY; SOARES, 2010), e sua expressão é aumentada numa variedade de doenças como púrpura de Henoch-Schönlein (CHEN et al., 2009), síndromes hemofagocítica de doenças hematológicas (KIRINO et al., 2005; MIYAZAKI et al., 2010), diabetes tipo 2 (BAO et al., 2010), câncer de próstata (BLANN et al., 2011) e leishmaniose visceral (LUZ et al., 2012). As ações de proteção de HO-1 durante a infecção são normalmente associadas à redução da imunopatologia causada pelo stress oxidativo e pela indução de angiogênese, via VEGF (LIN et al., 2009; PAE & CHUNG, 2009; LUZ et al., 2012).

Em lesões no dorso de BALB/c/AnUnib a HO-1 estava presente na fase crônica da infecção (110 e 140 dias) bem como em pata de BALB/c/AnUnib (70 e 150 dias). Os resultados demonstraram HO-1 nas lesões de dorso e pata de BALB/c/AnUnib na fase crônica, quando foi observada grande concentração de macrófagos vacuolizados e intensamente parasitados. Ao contrário das lesões de camundongos BALB/c/AnUnib, as lesões de pata de camundongos C57BL/6/JUnib apresentaram expressão de HO-1 a partir de 20 dias de infecção (fase inicial), concomitante com a maior quantidade de macrófagos infectados (20 e 70 dias de infecção). Esses dados mostram que a presença de HO-1 é

---

simultânea a presença de um infiltrado inflamatório rico em macrófagos, nos dois modelos e linhagens avaliados. A HO-1 pode ter uma ação protetora, isto é, auxiliar no controle da destruição das células hospedeiras causada pelo estresse oxidativo e na modulação da produção de citocinas pró-inflamatórias. Ao mesmo tempo contribui para a manutenção do parasito na célula hospedeira. De fato, Luz et al. (2012) demonstraram uma maior expressão de HO-1 em macrófagos peritoneais de camundongos C57BL/6 infectados com *L. chagasi* nas células com carga parasitária relativamente elevada. Os autores detectaram diminuição da produção de TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8 nos macrófagos infectados por *L. chagasi* com alta produção de HO-1 e sugeriram uma ação protetora de HO-1 associada com a redução da imunopatologia causada pelo estresse oxidativo e citocinas pró-inflamatórias.

Além disso, nas lesões em pata de camundongos C57BL/6/JUnib a presença de HO-1 a partir da fase inicial da lesão pode também induzir a produção de VEGF (20 e 70 dias de infecção). Lin et al., (2009) detectaram aumento de HO-1 em camundongos C57BL/6 com injúria vascular, e observaram que o aumento de HO-1 está relacionado ao aumento de VEGF e a re-endozelização de artérias danificadas. Os resultados desse trabalho mostraram que aos 150 dias de infecção tanto em pata de camundongos BALB/c/AnUnib quanto de C57BL/6/JUnib, foi observada a expressão de HO-1, que pode estar relacionada tanto com a proteção da célula aos danos causados pelo estresse oxidativo, quanto à persistência do parasito, mantendo a infecção.

Outra proteína avaliada nesse trabalho foi p38MAPk, uma quinase ativada em resposta a estresse oxidativo, hipóxia, citocinas pró-inflamatórias e outros processos fisiológicos (BASU et al., 2006; RUHLAND & KIMA, 2009) e que apresenta uma relação positiva com o aumento da permeabilidade vascular (IRWIN et al., 2005). Em lesões de dorso de BALB/c/AnUnib, há expressão de p38MAPk na fase crônica da infecção (110 e 140 dias), assim como em patas de BALB/c/AnUnib (70 e 150 dias). Nessa fase crônica ocorre intenso infiltrado inflamatório com presença de muitos macrófagos vacuolizados e parasitados e áreas hipóxicas, que podem ser estímulos à expressão e ativação de p38MAPk. Outros estímulos a ativação de p38MAPk são o aumento da produção de NO (GIORGIO et al., 1998) e o predominante perfil de citocinas pró-inflamatórias presentes na

---

fase crônica da infecção por *Leishmania* (REITHINGER et al., 2007; NYLÉN & GAUTAM, 2010). Os resultados da literatura são controversos em relação a p38MAPk, uma vez que em infecção por *Toxoplasma gondii* a indução de IL-12 foi dependente da ativação de p38MAPk (KIM et al., 2005), ao contrário na infecção por *L. amazonensis* a ativação de p38MAPk foi relacionada a inibição da produção de IL-12 (RUHLAND & KIMA, 2009). AL-MUTAIRI et al. (2011) também observaram que em infecções com *L. mexicana* em macrófagos de medula, *in vitro* e em camundongos C57BL/6/JUnib, *in vivo*, e houve uma regulação negativa de IL-12, via MKP-2 e p38MAPk.

Apesar dos camundongos C57BL/6/JUnib serem capazes de controlar a infecção, a expressão de p38MAPk também foi detectada na fase crônica (70 e 150 dias de infecção). Liu et al. (2006) utilizando células de medula óssea de camundongos C57BL/6 infectados com *L. donovani* observaram que a ativação de p38MAPk está relacionada ao controle da infecção. Entretanto, nesse trabalho não foi observada diferença no tempo de expressão de p38MAPk em lesões de pata de camundongos BALB/c/AnUnib (susceptível) e camundongos C57BL/6/JUnib (capazes de controlar a infecção). Provavelmente, as altas concentrações de IFN- $\gamma$  e o NO presentes nas lesões de patas de camundongos C57BL/6/JUnib no início da infecção por *L. amazonensis* (GIORGIO et al., 1998) tenham sido o estímulo a ativação de p38MAPk no final da infecção, uma vez que essa quinase é capaz de regular negativamente a resposta Th1. De acordo com os dados não é possível relacionar p38MAPk com a indução de VEGF em lesões em C57BL/6/JUnib, uma vez que VEGF foi detectado antes da expressão de p38MAPk. Há trabalhos na literatura, entretanto, que relacionam positivamente a presença dessas duas proteínas (IRWIN et al., 2005). Sugere-se que p38MAPk esteja relacionada à tentativa de manutenção da homeostase, atuando na modulação da resposta imune em lesões de dorso e pata de BALB/c/AnUnib e pata de C57BL/6/JUnib.

MIF é uma proteína pró-inflamatória induzida pela hipóxia, capaz de neutralizar os efeitos anti-inflamatórios dos glicocorticoides, participa na regulação da proliferação e diferenciação celular e atua no choque séptico, neoplasias, doenças autoimunes, problemas respiratórios, isquemia cardíaca e inflamações crônicas (GABER et al., 2011; GAO et al.,

---

2011). Como a leishmaniose é caracterizada como uma inflamação crônica, com hipóxia tecidual e HIF-1 $\alpha$  nas lesões, a expressão de MIF foi avaliada. Nas lesões no dorso de BALB/c/AnUnib, MIF foi detectada a partir de 70 dias de infecção, tempo em que a lesão já era hipóxica, mas HIF-1 $\alpha$  não era expresso. Em lesões de pata de BALB/c/AnUnib, MIF foi detectada ainda na fase inicial da infecção (a partir de 20 dias), mesmo tempo das imunomarcações positivas para Hypoxyprobe<sup>TM</sup>-1, HIF-1 $\alpha$  e HIF-2 $\alpha$ . Santos-Oliveira et al. (2011) avaliando a presença de LPS plasmático em indivíduos com leishmaniose visceral observaram que o aumento do nível de LPS induz aumento de MIF e citocinas pró-inflamatórias (IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-2, IL-6, IL-12, IL-17), e elevados níveis de MIF foram relacionados ao mau prognóstico da leishmaniose visceral.

No nosso trabalho, entretanto, MIF foi observado na fase inicial da infecção nas lesões de pata de C57BL/6/JUnib (a partir de 2 dias de infecção), linhagem que promoveu controle da infecção a partir de 70 dias. Neste tempo (2 dias) ainda não havia regiões hipóxicas e nem expressão de HIF-1 $\alpha$  e HIF-2 $\alpha$ . Considerando que MIF atua no recrutamento de células inflamatórias, indução de citocinas pró-inflamatórias (TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ ) e expressão de VEGF (BACH et al., 2008), sugere-se que a presença de MIF, tão precocemente em camundongos C57BL/6/JUnib, contribuiu para o controle da infecção e angiogênese. Por outro lado, não é observada cura da infecção por *L. amazonensis* em camundongos C57BL/6/JUnib. Kamir et al. (2008) demonstraram que MIF ortóloga de *Leishmania* apresenta uma atividade anti-apoptótica dos macrófagos infectados, o que facilitaria a persistência da *Leishmania* no interior dessas células, contribuindo para a evasão do parasito ao sistema imune do hospedeiro.

Um detalhe a se notar é a presença de MIF nas células glandulares da pata infectada de BALB/c/AnUnib no 2º dia de infecção e a expressão de MIF na epiderme do tecido de pata de camundongos C57BL/6/JUnib não infectados. Estes resultados foram similares aos de Bacher et al. (1997), que observaram expressão de MIF nos queratinócitos da epiderme e células das glândulas sebáceas e do folículo piloso, de pele de humanos e ratos saudáveis.

Diante disso, sugere-se que MIF esteja relacionado apenas à proliferação e diferenciação fisiológica das células da epiderme e células glandulares desse tecido.

Durante o processo inflamatório uma das enzimas importantes é a ciclooxigenase-2 (COX-2), necessária à produção de prostaglandinas e prostaciclina, mediadores inflamatórios. A COX-2 é normalmente ausente em tecidos normais, e dentre vários fatores, a hipóxia induz sua expressão, estimulando a angiogênese e o remodelamento vascular (CATHCART et al., 2008). Uma correlação positiva entre COX-2 e p38MAPk foi observada em doenças cardiovasculares (WILLETTE et al., 2009) e leishmaniose cutânea (AL-MUTAIRI et al., 2010; SHWEASH et al., 2011). Como a COX-2 é relacionada a processos inflamatórios, era esperado encontrar essa enzima em todos os tempos de avaliação da infecção e em todos os modelos e linhagens avaliadas.

Como previsto, em lesões de dorso de BALB/c/AnUnib há expressão de COX-2 em todos os tempos avaliados (40, 70, 110 e 140 dias de infecção). O mesmo foi observado em lesões de pata de BALB/c/AnUnib (2, 20, 70 e 150 dias de infecção). Porém, nessa linhagem, camundongos não infectados apresentaram marcação para o anticorpo anti-COX-2 nas glândulas sebáceas do dorso de BALB/c/AnUnib. Em lesões de pata de C57BL/6/JUnib foi detectada a presença de COX-2 também na fase inicial da infecção, aos dois dias, e persistiu até 150 dias de infecção. O aumento de COX-2 estaria relacionado ao mau prognóstico do câncer, diante de sua relação com processos inflamatórios e angiogênicos (MEYER et al., 2010). Shweash et al. (2011) demonstraram que promastigostas de *L. mexicana* inibem a produção de IL-12 via TLR-4 dependente da expressão de COX-2, iNOS e arginase-1, assim como Al-Muitari et al. (2010). Na leishmaniose experimental cutânea causada por *L. amazonensis* a COX-2 está relacionada ao desenvolvimento da infecção, tanto em dorso e pata de camundongos BALB/c/AnUnib, como em pata de camundongos C57BL/6/JUnib.

A proteína de choque térmico, HSP-70 protege as células dos danos causados pela alteração de temperatura, hipóxia e estresse oxidativo. Assim, era esperada a expressão de HSP-70 durante todo o tempo avaliado. Nas lesões de dorso de BALB/c/AnUnib, HSP-70 foi detectada dos 40 dias aos 140 dias de infecção. De acordo com os resultados desse

---

trabalho a lesão leishmaniótica em dorso de camundongos BALB/c/AnUnib se tornou hipóxica a partir de 40 dias de infecção, mesmo tempo em que observamos a expressão de HSP-70. Isso reforça a sugestão de Yuan et al. (2010), de que HSP-70 está relacionada a proteção das células em ambientes hostis. Esses autores observaram redução da apoptose de células epiteliais após injúria induzida por hipóxia e reoxigenação e concomitante ao aumento de HSP-70. Pei et al. (2012) também relacionaram a presença de HSP-70 à proteção de células de testículo de coelhos submetidos a estresse térmico crônico. Esses autores sugeriram que o choque térmico crônico desencadeia a apoptose em células germinativas, especialmente nas espermatogônias, onde ocorre expressão elevada de HSP70, proteína capaz de reduzir a apoptose celular.

Em lesões de pata de BALB/c/AnUnib e de C57BL/6/JUnib HSP-70 foi observada a partir do 20º dia de infecção persistindo até 150 dias de infecção. Nesse tempo, em camundongos BALB/c/AnUnib, há a instalação da infecção e é possível observar muitos macrófagos parasitados, o que favoreceria a produção de HSP-70. Já nas lesões em C57BL/6/JUnib, aos 2 dias de infecção pode ser detectado um infiltrado celular e a produção de IFN- $\gamma$  e NO (GIORGIO et al., 1998; ARAÚJO et al., 2012), características que também favorecem a expressão de HSP-70, devido seu caráter citoprotetor.

Em modelo “*in vitro*”, observou-se que macrófagos (J774) em hipóxia apresentaram uma diminuição da expressão de HSP-70, mas a subpopulação de macrófagos selecionados em hipóxia e cultivados em normóxia antes dos testes apresentaram um aumento de HSP-70 após estímulo hipóxico, confirmando que HSP-70 é um marcador de adaptação à hipóxia severa, além disso, observaram uma diminuição da susceptibilidade do macrófago à infecção por *Leishmania* (DEGROSSOLI et al., 2004; 2007). Nossos resultados, *in vivo* mostraram que houve um aumento na expressão de HSP-70 concomitante à progressão da lesão e ao aparecimento de regiões hipóxicas, tanto nas lesões de pata de camundongos BALB/c/AnUnib e C57BI/6/JUnib.

A Galectina-3 (Gal-3) é uma lectina expressa por macrófagos, fibroblastos, células dendríticas e queratinócitos e relacionada a processos de adesão, proliferação, diferenciação celular, angiogênese, metástase em tumores e adesão celular epitelial do endométrio e



imunomodulação (PELLETIER & SATO, 2002; NAKAHARA et al., 2005; LEI et al., 2009; BROWN et al., 2012; YANG et al., 2012). Nas lesões de dorso de BALB/c/AnUnib, Gal-3 foi detectada a partir de 70 dias de infecção, e células adjacentes às células glandulares apresentaram imunomarcação para o anticorpo anti-Gal-3. Nas lesões de pata de Balb/ e de C57BL/6/JUnib a Gal-3 foi observada na fase inicial da infecção (a partir de 20 dias). Tecido de pata de BALB/c/AnUnib não infectados e com 2 dias de infecção apresentam imunomarcação na epiderme para Gal-3, um resultado esperado, pois queratinócitos também são capazes de produzir essa lectina. Em lesão de BALB/c/AnUnib a expressão de Gal-3 coincide em tempo com a detecção de hipóxia tecidual, mas em lesão de C57BL/6/JUnib a Gal-3 foi detectada antes da formação de áreas hipóxicas.

Pelletier & Sato, 2002 utilizando macrófagos (linhagem J774) infectados com *L. major* ou com *L. donovani*, observaram que Gal-3 se liga a lipofosfoglicano de *L. major*, mas não às de *L. donovani*, e que esta ligação cliva Gal-3 impedindo sua oligomerização. Os autores sugeriram que a falta desta oligomerização de Gal-3 induz prolongada resposta Th1, *in vivo*, e com isso diminui a infecção. Com base nos resultados desse trabalho, não é possível afirmar se existe uma ligação entre Gal-3 e *L. amazonensis*, mas Gal-3 foi detectada em C57BL/6/JUnib infectados com *L. amazonensis*, os quais apresentam elevada resposta Th1 no início da infecção (GIORGIO et al., 1998), e são capazes de controlar a infecção. Trabalhos futuros serão necessários para consolidar o possível papel imunomodulador de Gal-3 na infecção por *L. amazonensis*.

Outra proteína avaliada em nesse trabalho foi o mediador inflamatório, MIP-2. Sua expressão está relacionada ao recrutamento de células inflamatórias, produção de citocinas pró-inflamatórias e controle da infecção, quando avaliado para infecções com *L. major*, *L. donovani* e *L. amazonensis* (JI et al., 2003; ROBERT-GANGNEUX et al., 2012). Ji et al. (2003) comparando o desenvolvimento da infecção por *L. amazonensis* e *L. major* em camundongos C57BL/6 observaram que durante as 4 primeiras semanas de infecção por *L. amazonensis* houve redução da produção de citocinas pró-inflamatórias como IL-12, IL-1, IFN- $\gamma$  e de mediadores inflamatórios como MIP-1 $\alpha$ , CCL4/MIP-1 $\beta$ , CCL5/RANTES e MIP-2 em lesões de pata e no linfonodo, resultando na redução de linfócitos T *in vitro* e *in*

*vivo*, com aumento da patogênese. Ao contrário, nas infecções causadas por *L. major* em camundongos C57BL/6 foi observado um aumento de citocinas pró-inflamatórias como IL-12, IL-1, IFN- $\gamma$  e de mediadores inflamatórios como MIP-1 $\alpha$ , CCL4/MIP-1 $\beta$ , CCL5/RANTES e MIP-2, nas 4 primeiras semanas de infecção, o que resultou num controle da infecção por ativação de uma resposta Th1. Nesse trabalho, MIP-2 foi detectada nas lesões de dorso de camundongos BALB/c/AnUnib em todos os tempos avaliados (40 a 140 dias de infecção), bem como nas lesões de pata de BALB/c/AnUnib e C57BL/6/JUnib (2 a 150 dias de infecção). Como não houve diferença na expressão de MIP-2 nos diferentes modelos e nas diferentes linhagens, esses resultados sugerem que essa proteína não é fundamental para a compreensão das diferenças no desenvolvimento das lesões em dorso e pata de camundongos BALB/c/AnUnib e pata de camundongos C57BL/6/JUnib.

De acordo com todos os resultados descritos, lesões causadas por *L. amazonensis* no dorso de camundongos BALB/c/AnUnib (susceptíveis) apresentaram microambientes hipóxicos desde a fase inicial, quando avaliados pelo marcador de hipóxia, pimonidazol. Nesta mesma fase foi detectada a expressão de COX-2, HSP-70, Gal-3 e MIP-2 proteínas encontradas em processos inflamatórios. MIF foi detectado a partir de 70 dias de infecção e HIF-1 $\alpha$ , HIF-2 $\alpha$  (no citoplasma), HO-1 e p38MAPk foram detectados na fase crônica da infecção. O fator angiogênico, VEGF, não foi detectado em nenhum dos tempos avaliados (Figura 50).

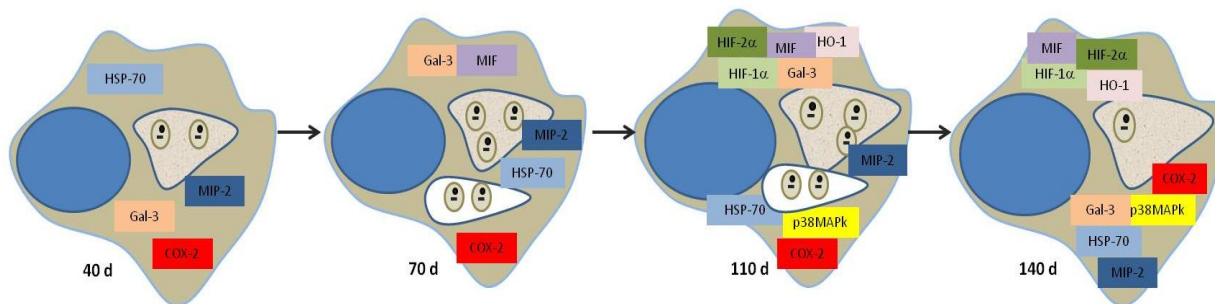


Figura 50. Esquema representativo da hipóxia tecidual, HIF-1 $\alpha$  e HIF-2 $\alpha$ , VEGF, COX-2, Gal-3, HO-1, HSP-70, MIF, MIP-2 e p38MAPk em macrófagos infectados com *L. amazonensis* de dorso de camundongos BALB/c/AnUnib. A cor marrom no interior das células representa hipóxia.

As lesões causadas por *L. amazonensis* em pata de camundongos BALB/c/AnUnib (susceptíveis) apresentam microambientes hipóxicos a partir de 20 dias de infecção quando avaliados pelo pimonidazol e por HIF-1 $\alpha$  e HIF-2 $\alpha$ . Nesta mesma fase foi detectada expressão de COX-2, HSP-70, MIF, Gal-3 e MIP-2. Na fase crônica da infecção foram detectadas HO-1 e p38MAPk. O fator angiogênico, VEGF, não foi detectado em nenhum dos tempos avaliados (Figura 51).

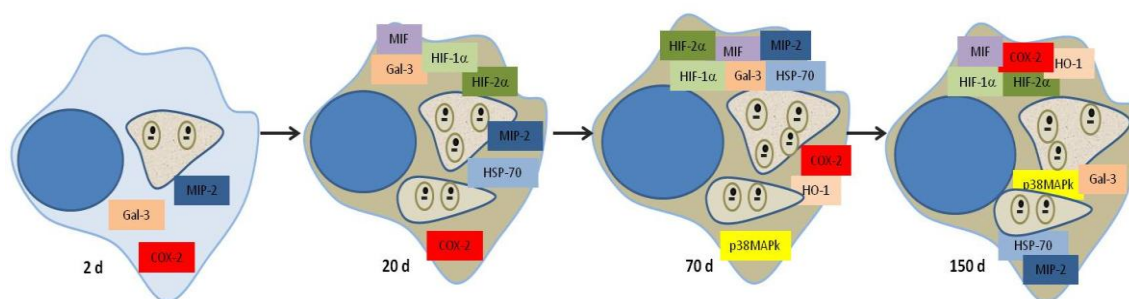


Figura 51. Esquema representativo da hipóxia tecidual, HIF-1 $\alpha$  e HIF-2 $\alpha$ , VEGF, COX-2, Gal-3, HO-1, HSP-70, MIF, MIP-2 e p38MAPk em macrófagos c infectados com *L. amazonensis* de pata de camundongos BALB/c/AnUnib. A cor marrom no interior das células representa hipóxia.

As lesões causadas por *L. amazonensis* em pata de camundongos C57BL/6/JUnib (controlam a infecção) apresentam microambientes hipóxicos na fase crônica, quando avaliados pelo marcador de hipóxia, pimonidazol. Porém, a expressão de HIF-1 $\alpha$  e HIF-2 $\alpha$  foram detectadas na fase inicial da infecção, bem como COX-2, HSP-70, MIF, HO-1, Gal-3 e MIP-2. Na fase crônica foi detectado p38MAPk. O fator angiogênico, VEGF, foi detectado aos 20 e 70 dias de infecção (Figura 52)

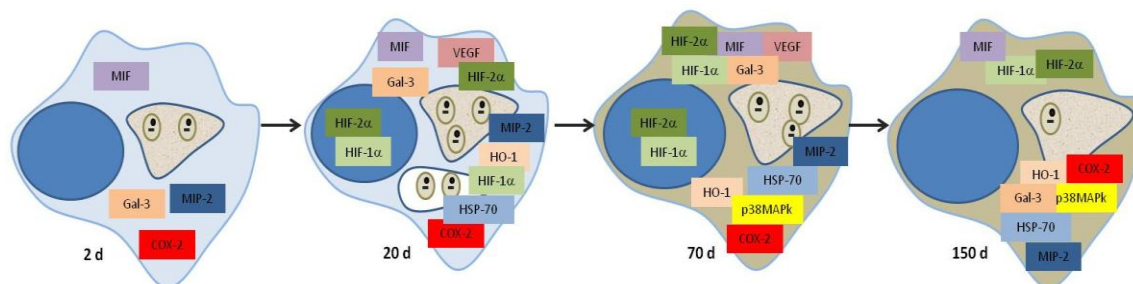


Figura 52. Esquema representativo da hipóxia tecidual, HIF-1 $\alpha$  e HIF-2 $\alpha$ , VEGF, COX-2, Gal-3, HO-1, HSP-70, MIF, MIP-2 e p38MAPk em macrófagos infectados com *L. amazonensis* de pata de camundongos C57BL/6/JUnib. A cor marrom no interior das células representa hipóxia.

Diante das diferenças entre o desenvolvimento da infecção causada por *L. amazonensis* e o perfil de proteínas de inflamação encontrado nas lesões de camundongos BALB/c/AnUnib quanto em C57BL/6/JUnib, decidimos avaliar a presença de hipóxia tecidual, e a expressão de HIF-1 $\alpha$ , HIF-2 $\alpha$ , MIF, HO-1, p38MAPk e VEGF em lesões de camundongos BALB/c/AnUnib infectados com *L. amazonensis* e tratados com Glucantime ou com Anfotericina B, dois fármacos usados na clínica (SINGH & SIVAKUMAR, 2004; CROFT & OLLIARIO, 2011; OLIVEIRA et al., 2011). Para isso, escolhemos dois protocolos de tratamentos com os fármacos. A hipóxia tecidual foi avaliada pelo método de Hypoxyprobe<sup>TM</sup>-1. As proteínas avaliadas por imuno-histoquímica foram HIF-1 $\alpha$ , HIF-2 $\alpha$ , MIF, HO-1, p38MAPk e VEGF. Estas proteínas foram selecionadas porque apresentam diferenças no perfil de expressão em lesões de pata entre BALB/c/AnUnib e C57BL/6/JUnib. A p38MAPk foi escolhida por estar diretamente relacionada à hipóxia e ao aumento da permeabilidade vascular (IRWIN et al., 2005).

Com os protocolos utilizados foi possível observar uma diminuição da lesão de camundongos BALB/c/AnUnib tratados com Glucantime. O mesmo não ocorreu com os animais tratados com Anfotericina B. Entretanto, uma diminuição da carga parasitária ocorre no final dos tratamentos com os dois fármacos. Acreditamos que, pelo fato da

---

linhagem de camundongos BALB/c/AnUnib ser extremamente susceptível ao parasita (ARRAIS-SILVA et al., 2005), a Anfotericina B não tenha sido eficaz na redução da lesão. Outro fator que contribuiu para uma baixa resposta à Anfotericina B foi o curto período de tratamento, que não pode ser prolongado devido a toxicidade do fármaco (RATH et al., 2003; AMATO et al., 2004; OLIVEIRA et al., 2011).

Quando a hipóxia tecidual foi avaliada, observou-se a formação de adutos de pimonidazol, evidenciando microambientes hipóxicos em lesões de camundongos BALB/c/AnUnib infectados não tratados e dos animais tratados com Glucantime ou Anfotericina B. HIF-1 $\alpha$  e HIF-2 $\alpha$  foram detectados em lesões de camundongos BALB/c/AnUnib infectados não tratados e tratados com Glucantime ou Anfotericina B. Conclui-se que apesar da redução no tamanho das lesões e diminuição de macrófagos parasitados após tratamento, não houve alteração da hipóxia e da expressão de HIF-1 $\alpha$  e HIF-2 $\alpha$ .

O fator angiogênico, VEGF não foi expresso em camundongos BALB/c/AnUnib infectados em nenhum dos momentos avaliados. Mas após o tratamento com Glucantime ou Anfotericina B, VEGF foi detectado em pata infectada. Com esses resultados foi possível sugerir que há uma importante relação do VEGF com a diminuição da carga parasitária e com o controle da infecção. O VEGF está relacionado à neovascularização e pode contribuir para maior migração de linfócitos T e macrófagos, auxiliando no controle da infecção. Vale salientar que VEGF foi detectado também em linhagem relativamente resistentes a infecção (C57BL/6/JUnib) infectados por *L. amazonensis*.

A proteína HO-1, anti-inflamatória e citoprotetora, foi detectada em camundongos BALB/c/AnUnib infectados e tratados com Glucantime ou Anfotericina B, assim como nos BALB/c/AnUnib infectados e não tratados. Estes resultados estão de acordo com os dados apresentados por Fadili et al. (2008), que demonstraram aumento da atividade do gene *HMOX-1*, responsável pela expressão de HO-1 em macrófagos infectados com *L. donovani* e submetidos ao tratamento com um antimonial pentavalente. De acordo os resultados, os protocolos de tratamento utilizados não levaram a cura, mas promoveram redução da carga

---

parasitária. Assim, sugere-se que fatores como a presença do parasito, resposta inflamatória e microrregiões hipóxicas na lesão serve de estímulo à indução de HO-1.

Como p38MAPk está relacionada ao controle da infecção por *L. donovani* (LIU et al., 2006) e ao aumento da permeabilidade vascular (IRWIN et al., 2005) sua expressão foi avaliada antes e após os tratamentos utilizados para leishmaniose cutânea. A expressão p38MAPk foi detectada em lesões de pata causadas por *L. amazonensis* em BALB/c/AnUnib não tratados e nos animais infectados e tratados com Glucantime ou Anfotericina B. A presença de p38MAPk pode estar relacionada a neovascularização, via indução de VEGF, ou a tentativa de manutenção celular da homeostase, que precisa ser mantida pois a pesar da diminuição da carga parasitária não houve cura e a hipóxia tecidual persistiu.

A proteína pró-inflamatória, MIF, foi detectada em pata de BALB/c/AnUnib infectados não tratados e tratados com Glucantime ou Anfotericina B. Entre os animais infectados não tratados observamos a expressão de MIF nas lesões em pata de BALB/c/AnUnib somente a partir de 20 dias. E em lesões de C57BL/6/JUnib a expressão de MIF é bem precoce (2º dia de infecção). O MIF pode estar relacionado ao processo de controle de infecção, via indução de uma resposta Th1 ou via angiogênese, tanto em camundongos C57BL/6/JUnib quanto em BALB/c/AnUnib infectados e submetidos aos tratamentos para leishmaniose cutânea.

Não houve cura dos animais tratados, mas ocorreu redução da carga parasitária. E foi possível detectar um perfil de proteínas importantes à manutenção da homeostase celular e ao controle da infecção, como HIF-1 $\alpha$ , HIF-2 $\alpha$ , HO-1, p38MAPk e MIF. A modulação da resposta imunológica do hospedeiro e indução da expressão de VEGF foram ações importantes para o reestabelecimento dessa homeostase. O VEGF foi a proteína que apresentou diferença de expressão mais relevante entre as linhagens de camundongos avaliadas, sendo expressa na linhagem capaz de controlar a infecção e na linhagem susceptível somente após os tratamentos que reduziram a carga parasitária. Assim, sugerimos que o VEGF é a proteína avaliada que está mais relacionada ao controle da

infecção, podendo ser utilizado como marcador de bom prognóstico, ao contrário dos tumores.

Trabalhos futuros como avaliação da hipóxia tecidual e do perfil das proteínas aqui estudadas nos modelos experimentais e em lesões de pacientes seriam interessantes e ampliariam o conhecimento da imunopatogênese da leishmaniose. Também possibilitaria o prognóstico e a identificação de proteínas como alvos na terapia complementar, como já vêm sendo desenvolvido em inúmeras neoplasias.

## 6. Conclusões

1. Lesões no dorso de camundongos BALB/c/AnUnib infectados por *L. amazonensis* apresentaram microambiente hipóxico na fase inicial da infecção, com imunomarcagem para o anticorpo anti-pimonidazol, a partir de 40 dias, mas HIF-1 $\alpha$  e HIF-2 $\alpha$  só foram detectados na fase crônica da infecção.
2. Lesões na pata de camundongos BALB/c/AnUnib infectados por *L. amazonensis* apresentaram microambiente hipóxico na fase inicial da infecção, com imunomarcagem para o anticorpo anti-pimonidazol e detecção de HIF-1 $\alpha$  e HIF-2 $\alpha$  a partir de 20 dias de infecção.
3. Lesões na pata de camundongos C57BL/6/JUnib infectados por *L. amazonensis* apresentaram microambiente hipóxico na fase tardia da infecção com imunomarcagem para o anticorpo anti-pimonidazol, a partir de 70 dias, mas HIF-1 $\alpha$  e HIF-2 $\alpha$  foram detectados na fase inicial da infecção (a partir de 20 dias).
4. Não foi detectada, por imuno-histoquímica, expressão do fator angiogênico VEGF em lesões de dorso e pata de camundongos BALB/c/AnUnib infectados por *L. amazonensis* em nenhum dos tempos avaliados.
5. Lesões na pata de camundongos C57BL/6/JUnib infectados por *L. amazonensis* apresentaram expressão de VEGF aos 20 e 70 dias de infecção.
6. Lesões no dorso de camundongos BALB/c/AnUnib infectados por *L. amazonensis* apresentaram expressão de COX-2, Gal-3, HSP-70 e MIP-2 no início da infecção (a partir de 20 dias), MIF foi detectada a partir de 70 dias de infecção e na fase crônica (110 e 140 dias) HO-1 e p38MAPk foram detectados.



7. Lesões em pata de camundongos BALB/c/AnUnib infectados por *L. amazonensis* apresentaram expressão de COX-2, Gal-3 e MIP-2 no início da infecção (a partir de 2 dias), MIF e HSP-70 a partir de 20 dias de infecção e na fase crônica (70 e 150 dias) HO-1 e p38MAPk foram detectados.

8. Lesões em pata de camundongos C57BL/6/JUnib infectados por *L. amazonensis* apresentaram expressão de COX-2, Gal-3, HO-1 e MIP-2 no início da infecção (a partir de 2 dias), HSP-70 e MIF a partir de 20 dias de infecção e na fase crônica (70 e 150 dias) p38MAPk foi detectada.

9. Camundongos BALB/c/AnUnib infectados com *L. amazonensis* e submetidos ao tratamento com Glucantime ou Anfotericina B não apresentam modificações no microambiente hipóxico (Hypoxyprobe<sup>TM</sup>-1, HIF-1 $\alpha$  e HIF-2 $\alpha$ ) e nem no perfil de expressão das seguintes proteínas inflamatórias (HO-1, MIF e p38MAPk). Porém, o fator angiogênico VEGF foi detectado em tecido de pata infectada de animais tratados com Glucantime ou com Anfotericina B.

10. O VEGF pode ser utilizado como marcador de prognóstico favorável ao controle da infecção na leishmaniose cutânea experimental.

## 7. Referências Bibliográficas

ABRAHAM, N.G; KAPPAS, A. Pharmacological and clinical aspects of heme oxygenase. *Pharmacol Rev*, 60: 79-127. 2008.

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

AMATO, V.S. Utilização do isotionato de pentamidina para o tratamento da leishmaniose mucosa. *Rev Soc Bras Med Trop*. 30:529-530. 1997.

AMATO, V.S. et al. Successful treatment of cutaneous leishmaniasis with lipid formulations of amphotericin B in two immunocompromised patients. *Acta Tropica*. 92 127–132. 2004.

AL-MUTAIRI et al. MAP kinase phosphatase-2 plays a critical role in response to infection by *Leishmania mexicana*. *PLoS Pathog*. 6(11):e1001-192.2010.

ALVAR, J. et al. Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence. *PLoS ONE*. 7(5): e35671. 2012.

ARTEEL, G.E. et al. Evidence that hypoxia markers detect oxygen gradients in liver: pimonidazol and retrograde perfusion of rat liver. *Br J Cancer*. 72(4): 889-95. 1995.

ARAÚJO, A.P. et al. Hypoxia, hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  and vascular endothelial growth factor in a murine model of *Schistosoma mansoni* infection. *Exp Mol Pathol*. 89:327–33. 2010.

ARAÚJO, A.P;ARRAIS-SILVA, W.W; GIORGIO, S. Infection by *Leishmania amazonensis* in mice: A potential model for chronic hypoxia. *Acta Histochem*. [Epub ahead of print] <<http://dx.doi.org/10.1016/j.acthis.2012.01.007>> 2012.

ARRAIS-SILVA, W. W. et al. Expression of hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  in the cutaneous lesions of BALB/c/AnUnib mice infected with *Leishmania amazonensis*. *Exp. Mol. Pathol*. 78(1):49-54, 2005.

ARRAIS-SILVA, W.W. et al. Hyperbaric oxygen therapy reduces the sizes of *Leishmania amazonensis*-induced soft tissues lesions in mice. *Parasitol International*. 98(2):130-6.2006.

AYRES, D.C. Avaliação da eficácia de diferentes compostos nos modelos *in vitro* e *in vivo* da Leishmaniose sob diferentes condições de oxigênio. 2007. Tese (Mestrado em Parasitologia) Unicamp.

AYRES, D.C. et al. Potential utility of hyperbaric oxygen therapy and propolis in enhancing the leishmanicidal activity of glucantime. *Rev Inst Med Trop*. 53(6): 329-34. 2011.

AWASTHI, A; MATHUR, R.K; SAHA, B. Immune response to *Leishmania* infection. *Indian J Med Res*. 119(6): 238-258. 2004.

AZUMA, C; RALEIGH, J.A; THRALL, D.E. Longevity of pimonidazol adducts in spontaneous canine tumors as an estimate of hypoxic cell lifetime. *Radiat Res*. 148(1): 35-42. 1997.

AZUMA, Y. et al. Hypoxia and differentiation in squamous cell carcinomas of the uterine cervix: pimonidazol and involucrin. *Clin Cancer Res*. 9(13):4944-52. 2003.

BACH, J.P. et al. Role of MIF in Inflammation and Tumorigenesis. *Oncology*. 75: 127-33. 2008.

BACHER, M. et al. Migration inhibitory factor expression in experimentally induced endotoxemia. *Am J Pathol*. 150: 235–246. 1997.

BAO, W.F. et al. Plasma Heme Oxygenase-1 Concentration Is Elevated in Individuals with Type 2 Diabetes Mellitus. *PLoS ONE*. 5:e12371.2010.

BARBIÉRI, C.L., et al. Glycosphingolipid antigens of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* amastigotes identified by use of a monoclonal antibody. *Infect Immun*. 61:2131–2137. 1993.

BARRAL, A. et al. Leishmaniasis in Bahia, Brazil: evidence that *Leishmania amazonensis* produces a wide spectrum of clinical disease. *Am J Trop Med Hyg*. 44:536–546. 1991.

BASU, J.M. et al., Sodium antimony gluconate induces generation of reactive oxygen species and nitric oxide via phosphoinositide 3-kinase and mitogen- activated protein kinase activation in *Leishmania donovani*-infected macrophages. *Antimicrob Agents Chemother.* 50(5):1788-97. 2006.

BATEMAN, R.M. et al. Myocardial hypoxia-inducible HIF-1 $\alpha$ , VEGF, and GLUT1 gene expression is associated with microvascular and ICAM-1 heterogeneity during endotoxemia. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 293:H448–H456. 2007.

BLANN, A. Increased levels of plasma haemoxygenase-1 in prostate cancer. *Prostate Cancer Prostatic Dis.* 14:114–117. 2011.

BEIL, W.J. et al. Differences in the onset of the inflammatory response to cutaneous leishmaniasis in resistant and susceptible mice. *J Leukoc Biol.* 52(2):135-42. 1992.

BESCHORNER, R. et al. Long-term expression of heme oxygenase-1 (HO-1, HSP-32) following focal cerebral infarctions and traumatic brain injury in humans. *Acta Neuropathol.* 100:377–384, 2000.

BROWN, E. R. et al., Association of galectin-3 expression with melanoma progression and prognosis. *Eur J Cancer.* 48(6):865-74. 2012.

BUCALA, R; DONNELLI, S.C. Macrophage Migration Inhibitory Factor: A Probable Link between Inflammation and Cancer. *Immunity.* 26(3):281-5.2007.

BURKE, B. et al. Expression of HIF-1 $\alpha$  by human macrophages: implications for the use of macrophages in hypoxia-regulated cancer gene therapy. *J Pathol.* 196:204–212. 2002.

CARDOSO, F.O. et al. Immunopathological Studies of *Leishmania amazonensis* Infection in Resistant and in Susceptible. Mice. *J Infect Dis.* 201(12):1933-1940. 2010.

CATHCART, M.C. et al. Cyclooxygenase-2-linked attenuation of hypoxia-induced pulmonary hypertension and intravascular thrombosis. *J Pharmacol Exp Ther.* 326(1):51-8. 2008.

CHEN, T. et al. Elevated serum heme oxygenase-1 and insulin-like growth factor-1 levels in patients with Henoch-Schonlein purpura. *Rheumatol Int.* 31:321–326. 2009.

CHIARUGI, V; MAGNELLI, L; GALLO, O. Cox-2, iNOS and p53 as play-makers of tumor angiogenesis. *Int J Mol Med.* 2:715–719. 1998.

COLHONE, M.C. et al. Effect of hypoxia on macrophage infection by *Leishmania amazonensis*. *J Parasitol.* 90(3):510-515. 2004.

CROFT, S.L; OLLIARO, P. Leishmaniasis chemotherapy—challenges and opportunities. *Clin Microbiol Infect.* 17:1478–1483.2011.

CROWTHER, M. et al. Microenvironmental influence on macrophage regulation of angiogenesis in wounds and malignant tumors. *J Leukoc Biol.* 70:478-490. 2001.

DEGROSSOLI, A. et al. Hypoxia modulates expression of the 70-kD heat shock protein and reduces *Leishmania* infection in macrophages. *J Biomed Sci.* 11(6):847-854. 2004.

DEGROSSOLI, A; GIORGIO, S. Functional alterations in macrophages after hypoxia selection. *Exp Biol Med.* 232(1):88-95, 2007.

DEGROSSOLI, A. et al. The influence of low oxygen on macrophage response to *Leishmania* infection. *Scand J Immunol.* 74(2):165-75. 2011.

FADILI, K. E. et al. Modulation of gene expression in human macrophages treated with the anti-leishmaniapentavalent antimonial drug sodium stibogluconate. *Antimicrob Agents Chemother.* 52(2):526-33. 2008.

FANG, J. et al. Apigenin inhibits tumor angiogenesis through decreasing HIF-1alpha and VEGF expression. *Carcinogenesis.* 28(4):858-64. 2007.

FERRANDINA, G. et al. Increased cyclooxygenase-2 expression is associated with chemotherapy resistance and poor survival in cervical cancer patients. *J Clin Oncol.* 15;20(4):973-81. 2002.

FERRARA, N. et al. Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene. *Nature.* 380:439-442. 1996.

FERREIRA, M.C. et al. Effect of low intensity helium–neon (HeNe) laser irradiation on experimental paracoccidioidomycotic wound healing dynamics. *Photochem Photobiol.* 85:227–33. 2009.

GABER, T. et al. CD4+ T Cell Proliferation under Hypoxia Function and Differentially Influences Human Suppression of Hypoxia-Inducible Factor-1a Counterregulates Dexamethasone-Mediated. *J Immunol.* 186:764-774.2011.

GAFFNEY, D.K. et al. Elevated cyclooxygenase-2 expression correlates with diminished survival in carcinoma of the cervix treated with radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 49: 1213-1217. 2001.

GAO, X.M. et al. Deletion of macrophage migration inhibitory factor protects the heart from severe ischemia-reperfusion injury: a predominant role of anti-inflammation. *J Mol Cell Cardiol.* 50(6):991-9. 2011.

GIORGIO, S. et al. In vivo formation of electron paramagnetic resonance-detectable nitric oxide and of nitrotyrosine is not impaired during murine leishmaniasis. *Infection and Immunity.* 66(2):807-814. 1998.

GHOSH, N. et al. COX-2 as a target for cancer chemotherapy. *Pharmacol Rep.*62(2):233-44. 2010.

GRIMALDI, G; TESH, R.B.J.R; MACMAHON-PRATT, D. A review of the geographic distribution and epidemiology of leishmaniasis in the New World. *Am J Trop Med Hyg.* 41:687–725. 1989.

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

GOZZELINO, R; JENEY V; SOARES M.P. Mechanisms of cell protection by heme oxygenase-1. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 50:323–354. 2010

HASSAN, M. et al. Hepatitis C virus core protein triggers hepatic angiogenesis by a mechanism including multiple pathways. *Hepatology.* 49(5):1469-82. 2009.

HAEBERLE, H.A. et al. Oxygen-independent stabilization of hypoxia inducible factor (HIF)-1 during RSV infection. *PLoS One.* 3(10):e3352. 2008

- HAMBLETON, J; WEINSTEIN, S.L; LEM, L; DEFRANCO, A.L. Activation of c-Jun N-terminal kinase in bacterial lipopolysaccharide-stimulated macrophages. *Proc Natl Acad Sci.* 93:2774–2778. 1996.
- HANDMAN, E. Leishmaniasis: Current Status of Vaccine Development. *Clin Microbiol Rev.* 14(2):229-43. 2001.
- HARMEY, J.H. et al. Regulation of macrophage production of vascular endothelial growth factor (VEGF) by hypoxia and transforming growth factor b-1. *Ann Surg Oncol.* 5: 271–278. 1998.
- HERNANDEZ-CHINEA, C. *Leishmania amazonensis*: Humoral response to amastigote excreted-antigens in murine leishmaniasis. *Exp Parasitol.* 116(4):492-496. 2007.
- HIGGINS, D.F. et al. Hypoxia-inducible factor signaling in the development of tissue fibrosis. *Cell Cycle.* 7(9):1128-32. 2008.
- HUANG, G; CHEN, L. Discrepancies between antiangiogenic and antitumor effects of recombinant human endostatin. *Cancer Biother Radiopharm.* 24(5):589-96. 2009.
- ICHIHARA, E; KIURA, K; TANIMOTO, M. Targeting angiogenesis in cancer therapy. *Acta Med Okayama.* 65(6):353-62. 2011.
- IIDA, Y. et al. Hypoxia promotes glycogen synthesis and accumulation in human ovarian clear cell carcinoma. *Int J Oncol.* 40(6):2122-30. 2012.
- IMTIYAZ, H.Z. et al. Hypoxia-inducible factor 2-alpha regulates macrophage function in mouse models of acute and tumor inflammation. *J Clin Invest.* 120(8):2699-714. 2010.
- IRWIN, D.C. et al. Direct ANP inhibition of hypoxia-induced inflammatory pathways in pulmonary microvascular and macrovascular endothelial monolayers. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 288: L849–L859, 2005.
- JI, J; SUN J; QI, H; SOONG, L. Analysis of T helper cell responses during infection with *Leishmania amazonensis*. *Am J Trop Med Hyg.* 66(4):338–345. 2002.

JI, J; SUN, J; SOONG, L. Impaired expression of inflammatory cytokines and chemokines at early stages of infection with *Leishmania amazonensis*. *Infect Immun*. 71(8):4278-88. 2003.

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

KAMIR, D. et al. A *Leishmania* ortholog of macrophage migration inhibitory factor modulates host macrophage responses. *J Immunol*. 180(12):8250-61. 2008.

KANEMATSU, M. et al. Expression of Vascular Endothelial Growth Factor in Hepatocellular Carcinoma and the Surrounding Liver: Correlation with Angiographically Assisted CT. *Am J Roentgenol*. 183(6):1585-93. 2004.

KAYE, P; SCOTT, P. Leishmaniasis: complexity at the host-pathogen interface. *Nat Rev Microbiol*. 9(8):604-15. 2011.

KIM, L. et al., p38MAPK Autophosphorylation Drives Macrophage IL-12 Production during Intracellular Infection. *J Immunol*. 174:4178-4184. 2005.

KIM, H.G; HWANG, Y.P; JEONG, H.G. Metallothionein-III induces HIF-1alpha-mediated VEGF expression in brain endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 369(2):666-71. 2008.

KIRINO, Y. et al. Increased serum HO-1 in hemophagocytic syndrome and adult-onset Still's disease: use in the differential diagnosis of hyperferritinemia. *Arthritis Res. Ther*. 7: R616-R624. 2005.

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

KONNER, J; DUPONT, J. Use of soluble recombinant decoy receptor vascular endothelial growth factor trap (VEGF Trap) to inhibit vascular endothelial growth factor activity. *Clin Colorectal Cancer*. 2: S81-S85. 2004.

LEI, C.X. et al. Interactions between galectin-3 and integrinbeta3 in regulating endometrial cell proliferation and adhesion. *Hum Reprod*. 24:2879-2889. 2009.



- LEWIS, J.S. et al. Macrophage responses to hypoxia: relevance to disease mechanisms. *J Leukocyte Biol.* 66: 889– 900. 1999.
- LIN, H.H. et al. After vascular injury, heme oxygenase-1/carbon monoxide enhances re-endothelialization via promoting mobilization of circulating endothelial progenitor cells. *J Thromb Haemost.* 7(8):1401-8. 2009.
- LIU, L. et al. Testosterone attenuates p38 MAPK pathway during *Leishmania donovani* infection of macrophages. *Parasitol Res.* 99:189–193. 2006.
- LOEFFLER, D.A. et al. Soluble egg antigens from *Schistosoma mansoni* induce angiogenesis-related processes by up-regulating vascular endothelial growth factor in human endothelial cells. *J Infect Dis.* 185, 1650–1656.2002
- LOKMIC, Z. et al. Time course analysis of hypoxia, granulation tissue and blood vessel growth, and remodeling in healing rat cutaneous incisional primary intention wounds. *Wound Repair Regen.* 14(3):277-88. 2006.
- LOPEZ-KOSTKA, S. et al. IL-17 promotes progression of cutaneous leishmaniasis in susceptible mice. *J Immunol.* 182(5):3039-46. 2009.
- LUZ, N.F. et al., Heme Oxygenase-1 Promotes the Persistence of *Leishmania chagasi*. Infection. *J Immunol.*188(9):4460-7.2012.
- MACHADO-PINTO, J. et al. Immunochemotherapy for cutaneous leishmaniasis: a controlled trial using killed *Leishmania (Leishmania) amazonensis* vaccine plus antimonial. *Int J Dermatol.*41(2):73-8.2002.
- MATHONNET, M. et al. VEGF in hepatocellular carcinoma and surrounding cirrhotic liver tissues. *World J Gastroenterol.*12(5):830-1. 2006.
- MATTE, C. et al. *Leishmania donovani*-induced macrophages cyclooxygenase-2 and prostaglandin E2 synthesis. *Parasite Immunol.* 23:177-184.2001.
- McELRATH, M.J. et al. Cutaneous leishmaniasis. The defect in T cell influx in BALB/c/AnUnib mice. *J Exp Med.* 165:546-559. 1987.

Mc-MAHON-PRATT D, ALEXANDER J. Does the *Leishmania major* paradigm of pathogenesis and protection hold for New World cutaneous leishmaniasis or the visceral disease. *Immunol Rev.* 201:206–224. 2004.

MEYER ,S. et al. Cyclooxygenase 2 (COX2) and Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma (PPARG) Are Stage-Dependent Prognostic Markers of Malignant Melanoma. *PPAR Res.* 2010:848645. 2009.

MIYAZAKI, T. et al. Serum HO-1 is useful to make differential diagnosis of secondary hemophagocytic syndrome from other similar hematological conditions. *Int. J. Hematol.* 91: 229–237.2010.

MONTERO,E; ABREU, C; TONINO P. Relationship between VEGF and p53 expression and tumor cell proliferation in human gastrointestinal carcinomas. *J Cancer Res Clin Oncol.* 134(2):193-201. 2008.

MORITA T. Heme Oxygenase and Atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 25:1786-1795. 2005.

MURDOCH, C; MUTHANA, M; LEWIS, C.E. Hypoxia regulates macrophages functions in inflammation. *J Immunol.* 175(10):6257-5263. 2005.

MURRAY, H.W. et al. Advances in Leishmaniasis. *The Lancet.* 366 (9496):1561-1577. 2005.

NAKAHARA, S; OKA, N; RAZ, A. On the role of galectin-3 in cancer apoptosis. *Apoptosis.*10:267–75. 2005.

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

NYLÉN, S; GAUTAM, S. Immunological Perspectives of Leishmaniasis. *J Glob Infect Dis.* 2(2): 135-46. 2010.

OLIVEIRA, L.F. et al. Systematic review of the adverse effects of cutaneous leishmaniasis treatment in the New World. *Acta Trop.* 118(2):87-96. 2011.

PAE, H.O; CHUNG, H.T. Heme oxygenase-1: its therapeutic roles in inflammatory diseases. *Immune Network*. 9:12–19. 2009.

PEI, Y; WU, Y; QIN, Y. Effects of chronic heat stress on the expressions of heat shock proteins 60, 70, 90, A2, and HSC70 in the rabbit testis. *Cell Stress Chaperones*. 17(1):81-7. 2012.

PELLETIER, I; SATO, S. Specific recognition and cleavage of galectin-3 by *Leishmania major* through species-specific polygalactose epitope. *J Biol Chem*. 277(20):17663-70. 2002.

PEYSSONNAUX, C. et al. Regulation of iron homeostasis by the hypoxia-inducible transcription factors (HIFs). *J Clin Invest*. 117(7):1926-32. 2007.

PHAM, N.K; MOURIZ, J; KIMA, P.E. *Leishmania pifanoi* amastigotes avoid macrophage production of superoxide by inducing heme degradation. *Infect Immun*. 73(12):8322-33. 2005.

POULAKI, V. Acute intensive insulin therapy exacerbates diabetic blood-retinal barrier breakdown via hypoxia-inducible factor-1 alpha and VEGF. *J Clin Invest*. 109: 805-15. 2002.

PLOCK, J. et al. Activation of non-ischemic, hypoxia-inducible signaling pathways up-regulate cytoprotective genes in the murine liver. *J Hepatol*. 47(4):538-45. 2007.

QING, G; SIMON, M.C. Hypoxia inducible factor-2alpha: a critical mediator of aggressive tumor phenotypes. *Curr Opin Genet Dev*. 19(1):60-6. 2009.

RALEIGH, J.A. et al. Semiquantitative immunohistochemical analysis for hypoxia in human tumors. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 49(2): 569-74. 2001.

RAMADORI, P; AHMAD, G; RAMADORI, G. Cellular and molecular mechanisms regulating the hepatic erythropoietin expression during acute-phase response: a role for IL-6. *Lab Invest*. 90(9):1306-24. 2010.

RATH, S. et al. Antimoniais empregados no tratamento da leishmaniose: estado da arte. *Quim Nova*. 26(4), 550-555. 2003.

---

- REITHINGER, R. et al. Cutaneous leishmaniasis. *Lancet Infect Dis.* 7:581-96. 2007.
- REN, Y. et al. Macrophage migration inhibitory factor: Roles in regulating tumor cell migration and expression of angiogenic factors in hepatocellular carcinoma. *Int J Cancer.* 107: 22–29. 2003.
- RENDON, B.E. et al. Mechanisms of macrophage migration inhibitory factor (MIF)-dependent tumor microenvironmental adaptation. *Exp Mol Pathol.* 86:180–185.2009.
- ROBERT-GANGNEUX, F. et al. Invariant NKT Cells Drive Hepatic Cytokinic Microenvironment Favoring Efficient Granuloma Formation and Early Control of *Leishmania donovani* Infection. *PLoS One.* 7(3):e33413.2012.
- ROGERS, K.A. et al. Type 1 and type 2 responses to *Leishmania major*. *FEMS Microbiology Letters.* 209:1-7. 2002.
- RUHLAND, A; KIMA, P.E. Activation of PI3K/Akt signaling has a dominant negative effect on IL-12 production by macrophages infected with *Leishmania amazonensis* promastigotes. *Exp Parasitol.* 122(1):28-36. 2009.
- SANTOS-OLIVEIRA, J.R. et al. Evidence That Lipopolisaccharide May Contribute to the Cytokine Storm and Cellular Activation in Patients with Visceral Leishmaniasis. *PLoS Negl Trop Dis.*5(7):e1198. 2011.
- SCAPINI, P. et al. CXCL1/Macrophage Inflammatory Protein-2-Induced Angiogenesis In Vivo Is Mediated by Neutrophil-Derived Vascular Endothelial Growth Factor-A. *The J of Immunol.* 172:5034-5040. 2004.
- SHAW, J. The leishmaniasis - survival and expansion in a changing world. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 102(5): 541-547. 2007.
- SEMENZA, G. L. Hypoxia-inducible factor 1: oxygen homeostasis and disease pathophysiology. *Trends Mol Med.* 7(8):345-350, 2001.
- SEMENZA, G.L. Regulation of oxygen homeostasis by hypoxia-inducible factor 1. *Physiology.* 24:97-106. 2009.

SERRANO-MARTÍN, X. et al. Amiodarone and Miltefosine Act Synergistically against *Leishmania mexicana* and Can Induce Parasitological Cure in a Murine Model of Cutaneous Leishmaniasis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 53 (12) 5108–5113.2009.

SHWEASH, M. et al. *Leishmania mexicana* promastigotes inhibit macrophage IL-12 production via TLR-4 dependent COX-2, iNOS and arginase-1 expression. *Mol Immunol*. 48(15-16): 1800–1808. 2011.

SILVEIRA, F.T; LAINSON, R; CORBETT, C.E.P. Clinical and Immunopathological Spectrum of American Cutaneous Leishmaniasis with Special Reference to the Disease in Amazonian Brazil - A Review. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 99(3):239-251. 2004.

SILVEIRA, F.T. et al. Immunopathogenic competences of *Leishmania (V.) braziliensis* and *L. (L.) amazonensis* in American cutaneous leishmaniasis. *Parasite Immunology*. 31:423–431. 2009.

SINGH, S.S; SIVAKUMAR, R.R. Recent advances in the diagnosis of leishmaniasis. *J Postgrad Med*. 49, 55– 60. 2003.

SLUIMER, J.C. et al. Hypoxia, hypoxia-inducible transcription factor, and macrophages in human atherosclerotic plaques are correlated with intraplaque angiogenesis. *J Am Coll Cardiol*. 51(13):1258-65.2008.

SOARES, M. P. et al. Immunoregulatory effects of HO-1: how does it work? *Curr Opin Pharmacol*. 9:482–489. 2009.

SUNDERRAM, J. et al. Heme oxygenase-1-dependent central cardiorespiratory adaptations to chronic hypoxia in mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 297: R300–R312. 2009.

TERADA, N. et al. Immunohistochemical detection of hypoxia in mouse liver tissues treated with pimonidazol using “in vivo cryotechnique”. *Histochem Cell Biol*. 128:253–261. 2007.

- TONG, Z, et al. Aprotective role by interleukin-17F in colon tumorigenesis. *PLoS One*.7(4):e34959. 2012.
- TRIPATHI, P; SINGH, V; NAIK, S. Immune response to *Leishmania*: paradox rather than paradigm. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 51:229–242. 2007.
- UENO, T. et al. Significance of Macrophage Chemoattractant Protein-1 in Macrophage Recruitment, Angiogenesis, and Survival in Human Breast Cancer. *Clin Cancer Research*. 6, 3282-3289. 2000.
- VAN DER BILT, J.W.D. et al. Perinecrotic Hypoxia Contributes to Ischemia/Reperfusion-Accelerated Outgrowth of Colorectal Micrometastases. *Am J Pathol*. 170(4):1379-88. 2007.
- VILLALTA, F. et al. Perspectives on the *Trypanosoma cruzi*-host cell receptor Interactions. *Parasitol Res*. 104(6): 1251–1260. 2009.
- WANG, T. et al. Oxidative stress and hypoxia-induced factor 1 $\alpha$  expression in gastric ischemia. *World J Gastroenterol*. 17(14):1915-22. 2011.
- WENGER, R.H. Cellular adaptation to hypoxia: O<sub>2</sub>-sensing protein hydroxylases, hypoxia-inducible transcription factors, and O<sub>2</sub>-regulated gene expression. *FASEB J*. 16:1151–1162. 2002.
- WERTH, N. et al. Activation of hypoxia inducible factor 1 is a general phenomenon in infections with human pathogens. *PLoS One*. 5(7):e11576. 2010.
- WILLETTE, R.N. et al. Differential effects of p38 mitogen-activated protein kinase and cyclooxygenase 2 inhibitors in a model of cardiovascular disease. *J Pharmacol Exp Ther*. 330(3):964-70. 2009.
- WILLIAMS, C.S. et al. Host cyclooxygenase-2 modulates carcinoma growth. *J Clin Invest*. 105:1589–1594. 2000.

WONG, C; WELLMAN, T.L; LOUNSBURY, K.M. VEGF and HIF-1alpha expression are increased in advanced stages of epithelial ovarian cancer. *Gynecol Oncol.* 91(3):513-7. 2003.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Control of the leishmaniasis: report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniasis, Geneva, 2010. Disponível em: [http://whqlibdoc.who.int/trs/WHO TRS 949 eng.pdf](http://whqlibdoc.who.int/trs/WHO_TRS_949_eng.pdf). Acesso em 13 junho 2012.

XIONG M. et al. Production of vascular endothelial growth factor by murine macrophages: regulation by hypoxia, lactate, and the inducible nitric oxide synthase pathway. *Am J Pathol.* 153: 587–598. 1998

YANG, H; LEI, C; ZHANG, W. Expression of galectin-3 in mouse endometrium and its effect during embryo implantation. *Reprod Biomed Online.* 24(1):116-22. 2012.

YUAN, Z.Q. et al. HSP70 protects intestinal epithelial cells from hypoxia/reoxygenation injury via a mechanism that involves the mitochondrial pathways. *Eur J Pharmacol.* 643:282-8. 2010.

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

## 8. Anexos

## Anexo I - Parecer da Comissão de Ética na Experimentação Animal CEEA/Unicamp



UNICAMP



CEEA/Unicamp

Comissão de Ética na Experimentação Animal  
CEEA/Unicamp

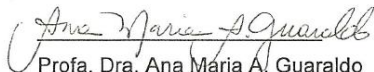
## CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 1891-1, sobre "Avaliação do perfil de marcadores de inflamação em lesões leishmanióticas induzidas por *Leishmania amazonensis*, nos modelos murinos pré e pós-tratamento anti Leishmaniose", sob a responsabilidade de Profa. Dra. Selma Giorgio / Alexandra Paiva Araújo Vieira, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal – CEEA/Unicamp em 06 de julho de 2009.

## CERTIFICATE

We certify that the protocol nº 1891-1, entitled "Evaluation of inflammatory markers in leishmaniasis lesions induced by *Leishmania amazonensis* in murine models before and after treatment", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - Unicamp) on July 6, 2009.

Campinas, 06 de julho de 2009.

  
Profa. Dra. Ana Maria A. Guaraldo  
Presidente

  
Fátima Alonso  
Secretária Executiva

CEEA – Unicamp  
Caixa Postal 6109  
13083-970 Campinas, SP – Brasil

Telefone: (19) 3521-6359  
E-mail: [comisib@unicamp.br](mailto:comisib@unicamp.br)  
<http://www.ib.unicamp.br/ceea/>



## DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins que o conteúdo de minha tese de Doutorado intitulada "Avaliação do perfil hipóxico e de marcadores de inflamação em lesões leishmanióticas induzidas por *Leishmania amazonensis*, nos modelos murinos pré e pós-tratamento anti leishmaniose"

( ) não se enquadra no § 3º do Artigo 1º da Informação CCPG 01/08, referente a bioética e biossegurança.

Tem autorização da(s) seguinte(s) Comissão(ões):

( ) CIBio – Comissão Interna de Biossegurança , projeto No. \_\_\_\_\_, Instituição: \_\_\_\_\_

( x ) CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais , projeto No. 1891-1, Instituição: Comissão de Ética na Experimentação Animal/ CEEA/Unicamp.

( ) CEP - Comissão de Ética em Pesquisa, protocolo No. \_\_\_\_\_, Instituição: \_\_\_\_\_

*\* Caso a Comissão seja externa ao IB/UNICAMP, anexar o comprovante de autorização dada ao trabalho. Se a autorização não tiver sido dada diretamente ao trabalho de tese ou dissertação, deverá ser anexado também um comprovante do vínculo do trabalho do aluno com o que constar no documento de autorização apresentado.*

Alexandra Paiva Araújo Vieira  
Aluno: (nome completo)

Selma Giorgio  
Orientador: (nome completo)

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:  
(X) Deferido ( ) Indeferido



Carimbo e assinatura

Prof. Dra. ANA MARIA APARECIDA GUARALDO  
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais  
CEUA/UNICAMP

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:  
( ) Deferido ( ) Indeferido

Carimbo e assinatura

## Anexo II

G Model  
ACTHIS-50585; No. of Pages 8

ARTICLE IN PRESS

Acta Histochemica xxx (2012) xxx–xxx



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Acta Histochemica

journal homepage: [www.elsevier.de/acthis](http://www.elsevier.de/acthis)

## Infection by *Leishmania amazonensis* in mice: A potential model for chronic hypoxia

Alexandra Paiva Araújo<sup>a</sup>, Wagner Welber Arrais-Silva<sup>b</sup>, Selma Giorgio<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Department of Animal Biology, Biology Institute, Universidade Estadual de Campinas, Caixa Postal 6109, 13083-970, Campinas, São Paulo, Brazil  
<sup>b</sup> Institute of Health and Biological Sciences, Campus II, Universidade Federal de Mato Grosso, CEP 78600-000, Barra do Graças, Mato Grosso, Brazil

## ARTICLE INFO

**Article history:**  
Received 3 December 2011  
Received in revised form 28 January 2012  
Accepted 30 January 2012  
Available online xxx

**Keywords:**  
Leishmaniasis  
*Leishmania amazonensis*  
Mouse  
Macrophage  
Hypoxia  
Hypoxia inducible factor  
Vascular endothelial growth factor

## ABSTRACT

Hypoxia is a common feature of injured and infected tissues. Hypoxia inducible factors 1 $\alpha$  and 2 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ , HIF-2 $\alpha$ ) are heterodimeric transcription factors mediating the cellular responses to hypoxia and also the vascular endothelial growth factor (VEGF). VEGF is a cytokine which can be induced by hypoxia, whose pathogenic mechanisms are still unclear and which is the subject of debate. Murine cutaneous lesions during *Leishmania amazonensis* parasite infection are chronic, although they are small and self-controlled in C57BL/6 mice and severe in BALB/c mice. In the present study we examined the presence of hypoxia, HIF-1 $\alpha$ , HIF-2 $\alpha$  and VEGF during the course of infection in both mouse strains. Hypoxia was detected in lesions from BALB/c mice by pimonidazole marking, which occurred earlier than in lesions from C57BL/6 mice. The lesions in the BALB/c mice showed HIF-1 $\alpha$  and HIF-2 $\alpha$  expression in the cytoplasm of macrophages and failed to promote any VEGF expression, while lesions in the C57BL/6 mice showed HIF-2 $\alpha$  nuclear accumulation and subsequent VEGF expression. In conclusion, the animal models of leishmaniasis demonstrated a diversity of patterns of expression, cell localization and activity of the main transducers of hypoxia and may be useful models for studying the pathogenic mechanisms of HIF-1 $\alpha$  and HIF-2 $\alpha$  during chronic hypoxic diseases.

© 2012 Published by Elsevier GmbH.

## Introduction

Hypoxia (low oxygen tension) can occur during various pathological conditions. Cellular responses to this condition are mainly regulated by the activation of heterodimeric transcription factors, called hypoxia inducible factors (HIFs), which are critical regulators of cellular responses for a variety of stressful conditions. HIFs consist of a constitutively expressed  $\beta$ -subunit and an oxygen-regulated  $\alpha$ -subunit (Kaelin, 2005). Under non-stressful conditions, the HIF  $\alpha$ -subunit is subjected to enzymatic proline hydroxylation, which targets it for proteasome degradation via the von Hippel-Lindau ubiquitin E3 ligase complex (Schofield and Ratcliffe, 2004). Under stressful conditions the ubiquitination of HIF is inhibited and the  $\alpha$ -subunit accumulates as a consequence of prolyl hydroxylase inhibition (Maxwell et al., 1999). The stabilized HIF  $\alpha$ -subunit dimerizes with the  $\beta$ -subunit, activating transcription of target genes that regulate angiogenesis and other factors important for responding to stressful conditions such as VEGF and glycolytic enzymes (Fukuda et al., 2003). There are several distinct  $\alpha$ -subunits, but the presence of HIF-1 $\alpha$  and HIF-2 $\alpha$  is more frequently elevated

in cancer cells and mainly associated with invasiveness, poor prognosis and angiogenesis (Favier et al., 2007; Imtiyaz et al., 2010).

Evidence suggests that HIF-1 $\alpha$  has both pro- and anti-proliferative properties, whereas HIF-2 $\alpha$  lacks anti-proliferative properties and is more strongly implicated in tumorigenesis (Gordan and Simon, 2007). Experimental studies, however, have led to discrepancies in results regarding their roles under stressful conditions, indicating varying functions according to the cell type (Kondo et al., 2002; Chen et al., 2003; Favier et al., 2007). Thus, the role of HIF-1 $\alpha$  and HIF-2 $\alpha$  in a variety of pathological contexts is complex and not fully described (Imtiyaz et al., 2010). To date, few studies have concomitantly evaluated the expression of HIF-1 $\alpha$  and HIF-2 $\alpha$  (Mowat et al., 2010; Imtiyaz et al., 2010; Yang et al., 2011; Barshishat-Kupper et al., 2011).

A potential experimental model for studying hypoxia and the differential functions of HIFs may include macrophages. These phagocytes are versatile hematopoietic cells that mediate a wide array of immune functions, e.g., initiating inflammatory responses, executing phagocytosis and parasitic killing or association with tumor angiogenesis (Stout and Suttles, 2004; Mosser and Edwards, 2008). When exposed to hypoxia, macrophages accumulate both HIF-1 $\alpha$  and HIF-2 $\alpha$ . An over-expression of HIF-2 $\alpha$  in tumor-associated macrophages is specifically correlated with high-grade human tumors and poor prognosis (Gordan and Simon, 2007).

\* Corresponding author.  
E-mail address: [sgioigio@unicamp.br](mailto:sgioigio@unicamp.br) (S. Giorgio).

0065-1281/\$ – see front matter © 2012 Published by Elsevier GmbH.  
doi:10.1016/j.acthis.2012.01.007

Please cite this article in press as: Araújo AP, et al. Infection by *Leishmania amazonensis* in mice: A potential model for chronic hypoxia. Acta Histochemica (2012), doi:10.1016/j.acthis.2012.01.007

G Model

ACTHIS-50585; No. of Pages 8

## ARTICLE IN PRESS

2

A.P. Araújo et al. / Acta Histochemica xxx (2012) xxx–xxx

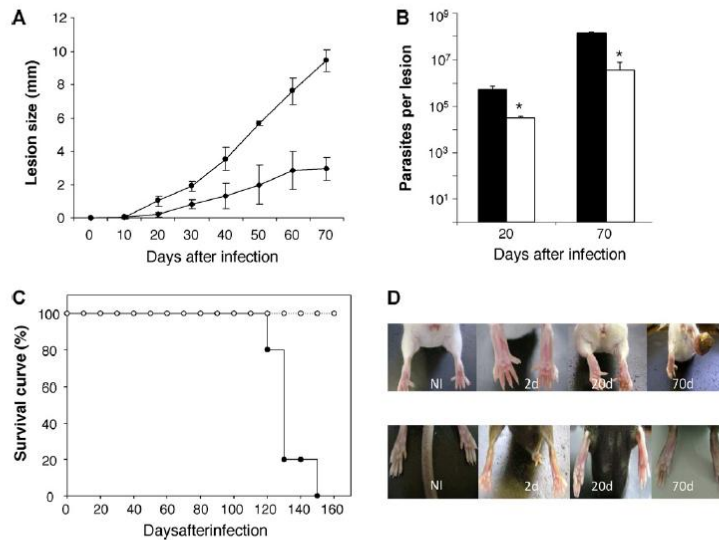


Fig. 1. Analysis of experimental *L. amazonensis* infection. (A) The evolution of infection in mice. Lesion size is expressed as the difference in size between the infected and contralateral non-infected footpad. BALB/c (●) and C57Bl/6 (■) mice.  $n = 10$ . (B) Parasite burden of lesions. At the times indicated three mice per group were sacrificed, infected footpads collected and parasite numbers determined as described in "Materials and methods section". BALB/c (■) and C57Bl/6 (□) mice. (C) Survival curves for mice infected with *L. amazonensis*. BALB/c (●) and C57Bl/6 (○) mice survival percentage.  $n = 10$ . (D) Evolution of cutaneous infection in mice. NI: non infected mouse. The significance of the difference between experimental conditions is indicated: \* $P < 0.05$  in B.

Leishmaniasis is an endemic parasitosis caused by several species of the genus *Leishmania*, an obligate intramacrophagic parasite (Nylén and Gautam, 2010). In addition, murine experimental leishmaniasis has become a useful model for dermal inflammation (Baumer et al., 2010) and for the study of certain aspects of chronic diseases such as myopathies (Paciello et al., 2010). The cutaneous lesions of mice during *Leishmania amazonensis* infection are chronic although they can be self-controlled in C57Bl/6 mice and severe in BALB/c mice (Giorgio et al., 1998). We previously observed HIF-1 $\alpha$  expression in lesions from BALB/c mice (Arrais-Silva et al., 2005). In addition, using an *in vitro* system, we demonstrated HIF-1 $\alpha$  and HIF-2 $\alpha$  expression in infected macrophages (Degrossoli et al., 2007, 2011). The aim of the present study was to examine the presence of hypoxia in both mouse strains during the course of chronic *L. amazonensis* infection and to evaluate the expression patterns of HIF-1 $\alpha$ , HIF-2 $\alpha$  and VEGF within lesions.

## Materials and methods

### Parasite and infection

The experimental protocols were approved by the Institute of Biology/Universidade Estadual de Campinas Ethical Committee for Animal Research. *L. amazonensis* (MHOM/BR/73/M2269) was maintained by regular passage in BALB/c mice as described previously (Barbieri et al., 1993). Female BALB/c and C57Bl/6 mice (6 weeks old) were obtained from the Centro de Bioterismo-UNICAMP, Campinas, SP, Brazil, and 10<sup>5</sup> amastigotes were injected subcutaneously in the right hind footpad (Arrais-Silva et al., 2005).

### Evaluation of infection

The course of the infection was monitored by measuring the increase in footpad thickness, compared with the contralateral

uninfected footpad, with a dial caliper (Giorgio et al., 1998). In order to estimate parasite burden in the lesions, mice were sacrificed at designated periods, the entire infected footpads were removed and weighed and amastigotes were recovered from the lesions and counted (Arrais-Silva et al., 2005). The survival rate of the animals was monitored throughout the experimental period. Three independent experiments involving 10 mice each were performed in order to evaluate infection and allow the immunohistochemical study.

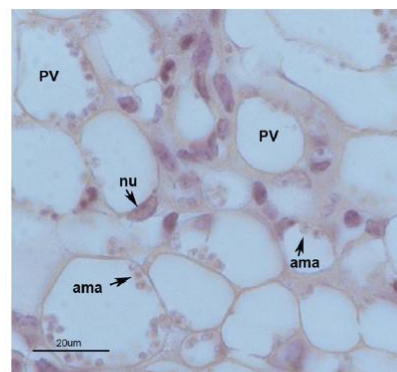


Fig. 2. Immunostaining for macrophages. Representative Mac-3 staining of infected macrophages in footpad lesion of BALB/c mouse infected with *L. amazonensis*. Amastigotes (ama), nucleus (nu), vacuole parasitophorous (PV).

Please cite this article in press as: Araújo AP, et al. Infection by *Leishmania amazonensis* in mice: A potential model for chronic hypoxia. Acta Histochemica (2012), doi:10.1016/j.acthis.2012.01.007

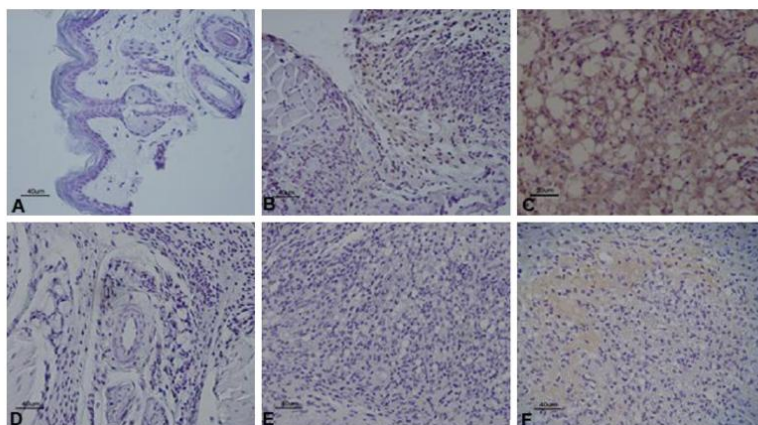


Fig. 3. Evaluation of hypoxia by immunohistochemistry in footpad lesions of mice infected with *L. amazonensis*. Mouse lesion tissue was stained with anti-pimonidazole complex antibody as described in "Materials and methods section". BALB/c mouse lesion at 2 days p.i. (A), 20 days p.i. (B) and 70 days p.i. (C). C57BL/6 mouse lesion at 2 days p.i. (D), 20 days p.i. (E) and 70 days p.i. (F).

#### Tissue hypoxia analyses

The mice were administered intraperitoneally with pimonidazole hydrochloride (Hypoxyprobe-1, Chemicon Int., Temecula, CA, USA) dissolved in sterile, filtered physiological saline at 60 mg/kg body weight. After 90 min, the footpad lesion was perfusion fixed with 4% paraformaldehyde and embedded in paraffin, followed by immunohistological detection of pimonidazole protein adducts, in accordance with the manufacturer's recommendations and as described previously (Araújo et al., 2010). Briefly, serial 5  $\mu$ m thick paraffin sections of lesions were treated as follows: deparaffinization, rehydration, endogenous quenching and citrate buffer microwave antigen retrieval. To detect pimonidazole, the sections were incubated with a mouse anti-pimonidazole antibody (Chemicon, Temecula, CA, USA), developed with a secondary polyclonal anti-mouse antibody conjugated with peroxidase (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) and visualized with a peroxidase substrate solution containing 3,3'-diaminobenzidine (DAB) and hydrogen peroxide. Tissue sections were counterstained with hematoxylin, dehydrated in serial alcohol solutions and mounted in cytoaseal-60 mounting medium (Sigma-Aldrich). The images were recorded using a digital imaging system, a Nikon light microscope (Eclipse E800, Nikon, Tokyo, Japan), a Cool Snap-Pro Color camera (Media Cybernetics, Bethesda, MD, USA) and the Image-Pro plus capture software (Media Cybernetics).

#### HIF-1 $\alpha$ , HIF-2 $\alpha$ immunofluorescence

The footpad tissues from BALB/c and C57BL/6 mice were fixed for 24 h with paraformaldehyde and processed into paraffin blocks. Tissue sections (5  $\mu$ m) were deparaffinized, dehydrated and the antigen retrieval was performed by using citrate buffer 10 mM (pH 6.0) in a microwave oven. Non-specific binding sites were blocked with 1% bovine serum albumin (Amresco, Dallas, TX, USA) for 30 min. Tissue sections were then incubated with primary antibodies: rabbit polyclonal anti-HIF-1 $\alpha$  antibody (H-206) (Santa Cruz) or rabbit polyclonal anti HIF-2 $\alpha$  antibody (a gift from Dr. Darren Richard), overnight at 4 °C in a humidified room; followed by an FITC-conjugated goat anti-rabbit secondary antibody (Sigma-Aldrich) for 1 h at room temperature. The tissues were

mounted with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI)-containing DABCO mounting media (Sigma-Aldrich). The cells were visualized under a Nikon Eclipse 50i fluorescence microscope (Nikon). All images were captured and analyzed with a digital camera (Nikon DXM1200-F) and imaging software (ACT-1, Nikon).

#### Immunohistochemistry

Tissue sections were deparaffinized and dehydrated, treated with 5% hydrogen peroxide for 30 min, and washed with PBS. Antigen retrieval was performed by citrate buffer 10 mM (pH 6.0) in a microwave oven. Non-specific binding sites were blocked with 1% BSA (Amresco, Solon, OH, USA) for 30 min. Tissue sections were then incubated with primary antibody rabbit polyclonal anti-VEGF antibody (Chemicon) and with a secondary goat polyclonal anti-rabbit antibody conjugated with peroxidase (Sigma-Aldrich). A rat anti-mouse Mac-3 (BD Biosciences Pharmingen, San Diego, CA, USA) and a secondary goat anti-rat conjugated with peroxidase (Sigma-Aldrich) were used to identify macrophages. Tissue sections were visualized with a peroxidase substrate solution containing 3,3'-diaminobenzidine (DAB) and hydrogen peroxide (Araújo et al., 2010) and counterstained with hematoxylin, dehydrated in graded alcohol solutions and mounted in cytoaseal-60 mounting medium (Sigma). The images were recorded as described above.

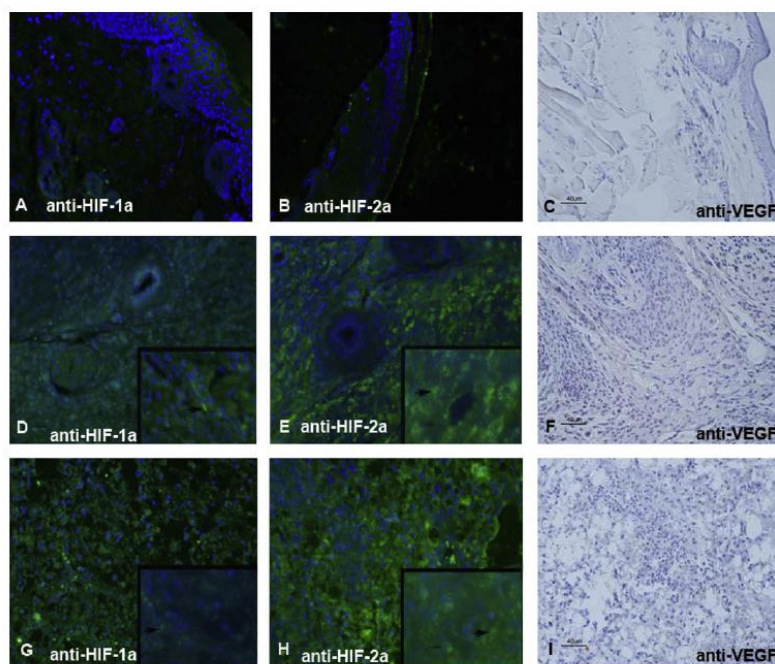
#### Statistical evaluation

All experiments were repeated at least three times. The results are expressed as the mean  $\pm$  SD. Data obtained under different conditions were analyzed statistically by the Student *t*-test, with a level of significance set at  $P < 0.05$  for *L. amazonensis* infection assays.

#### Results

##### *L. amazonensis* infection in mice

Mice were inoculated with *L. amazonensis* and lesion progression, tissue parasite burden and survival period were monitored. The lesions from the BALB/c mice increased progressively faster during the course of the infection and most of the animals had



**Fig. 4.** Evaluation of HIF-1 $\alpha$  and HIF-2 $\alpha$  by immunofluorescence, and VEGF by immunohistochemistry in footpad lesions of BALB/c mice infected with *L. amazonensis*. Lesion tissue at 20 days p.i. stained with anti-HIF-1 $\alpha$  polyclonal antibody (A), anti-HIF-2 $\alpha$  polyclonal antibody (B), and anti-VEGF polyclonal antibody (C). Lesion tissue at 20 days p.i. stained anti-HIF-1 $\alpha$  polyclonal antibody (D), anti-HIF-2 $\alpha$  polyclonal antibody (E), and anti-VEGF polyclonal antibody (F). Lesion tissue at 70 days p.i. stained anti-HIF-1 $\alpha$  polyclonal antibody (G), anti-HIF-2 $\alpha$  polyclonal antibody (H), and anti-VEGF polyclonal antibody (I). The blue color indicates DAPI staining in the nuclei of macrophages. The green color indicates HIF-1 $\alpha$  or HIF-2 $\alpha$  in the cytoplasm of macrophages (arrowheads). (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of the article.)

infected footpad skin ulcer sizes ranging from 8.5 to 10 mm at 70 days post-infection (p.i.) (Fig. 1A and D). The mice showed lesions with necrotic areas and bacterial contamination following this period. In contrast, lesions from the C57BL/6 mice progressed slowly and did not display any ulceration (Fig. 1A and D). Parasites were not detectable in lesions at 2 days p.i. Although the parasitic burden in both mouse strains increased progressively, the number of parasites found in the lesions from the BALB/c mice was approximately 100 and 10 times-higher than the number of parasites found in the lesions from the C57BL/6 mice, at 20 and 70 days p.i. respectively (Fig. 1B). The BALB/c mice presented metastatic lesions on their ears and/or face, and died after 120 days p.i. while the C57BL/6 mice survived during the entire experimental period (Fig. 1C). These results confirmed previous observations (Giorgio et al., 1998) that BALB/c mice are susceptible and C57BL/6 mice are relatively resistant to *L. amazonensis* infection.

#### Hypoxia detection in lesions of mice infected with *L. amazonensis*

Hypoxia was evaluated using pimonidazole as a surrogate for hypoxia. Pimonidazole was administered to the mice and 90 min later they were sacrificed and pimonidazole adducts with thiol containing protein were detected by a peroxidase-antibody (Via et al., 2008). Footpad lesions at 2 days p.i. had the epidermis and glandular structures conserved in both mice. No evidence of pimonidazole immunostaining was observed in lesion tissue from

either mouse strain (Fig. 2, BALB/c upper row, A–C and C56BL/6, lower row, D–F) at this phase. At 20 days p.i. a cellular population infiltrating the tissue, parasitized macrophages and pimonidazole immunostaining were observed in the lesions of BALB/c mice. Later in the infection (70 days p.i.) lesions showed many pimonidazole positive vacuolated and parasitized macrophages (Fig. 2C). In contrast, lesions from the C57BL/6 mice at 20 days p.i. were characterized by few parasitized macrophages and no pimonidazole immunostaining, however inflammatory cells, parasitized macrophages and pimonidazole immunostaining were observed at 70 days p.i. (Fig. 2F). It should be noted that no significant pimonidazole immunostaining of footpad tissue was observed in uninfected mice (data not shown). Immunohistochemical studies of lesions consistently showed staining of infected macrophages for the macrophage surface antigens Mac-3 (Fig. 3), F4/80 and Mac-1 (McElrath et al., 1987). Macrophages are found to be the predominant infiltrating cell type in the lesions with inflammatory cells polymorphonuclear leukocytes and lymphocytes in smaller numbers during BALB/c mice infection and at 20 days p.i. in C57BL/6; later it consists predominantly of the inflammatory cells (Table 1). These results indicate that *L. amazonensis* infection induces lesions containing hypoxic areas and macrophage infiltration.

#### HIF-1 $\alpha$ , HIF-2 $\alpha$ and VEGF expression in lesions of mice infected with *L. amazonensis*

We then addressed whether *L. amazonensis* infection affects HIF-1 $\alpha$  and HIF-2 $\alpha$  stabilization in mice lesions. At 2 days p.i. there was

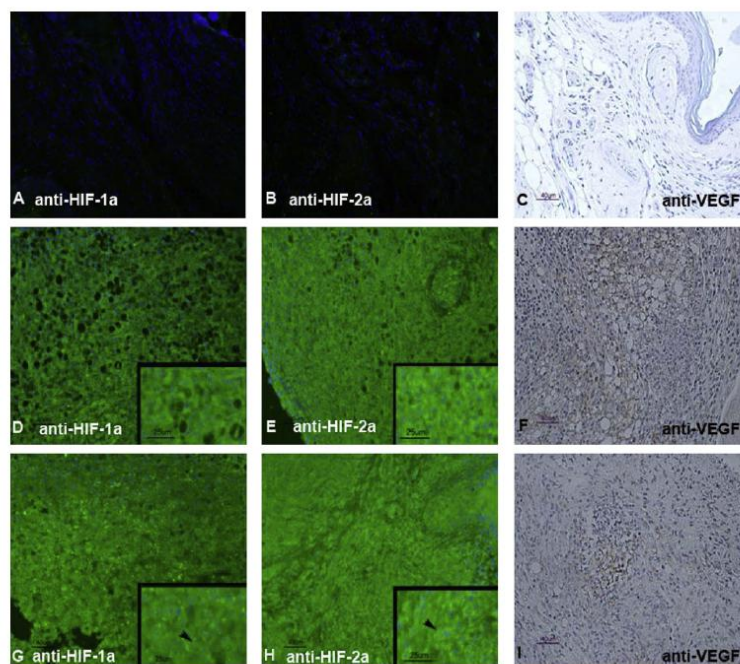


Fig. 5. Determination of HIF-1 $\alpha$  and HIF-2 $\alpha$  by immunofluorescence, and VEGF by immunohistochemistry in footpad lesions of C57Bl/6 infected with *L. amazonensis*. Lesion tissue at 2 days p.i. stained with anti-HIF-1 $\alpha$  polyclonal antibody (A), anti-HIF-2 $\alpha$  polyclonal antibody (B), and anti-VEGF polyclonal antibody (C). Lesion tissue at 20 days p.i. stained anti-HIF-1 $\alpha$  polyclonal antibody (D), anti-HIF-2 $\alpha$  polyclonal antibody (E), and anti-VEGF polyclonal antibody (F). Lesion tissue at 70 days p.i. stained anti-HIF-1 $\alpha$  polyclonal antibody (G), anti-HIF-2 $\alpha$  polyclonal antibody (H), and anti-VEGF polyclonal antibody (I). The yellow color indicates DAPI and HIF-1 $\alpha$  or HIF-2 $\alpha$  staining in the nuclei of macrophages (arrowheads). (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of the article.)

no evidence of HIF-1 $\alpha$ , HIF-2 $\alpha$  or VEGF expression (Fig. 4A–C) in the lesions from the BALB/c mice. The chronic stabilization of infection dramatically increased HIF-1 $\alpha$  and HIF-2 $\alpha$  expression (Fig. 4D and E) in the lesions at 20 days p.i. without any evidence of VEGF expression (Fig. 4F). The same staining pattern persisted during the experimental period, i.e. HIF-1 $\alpha$  and HIF-2 $\alpha$  expression without VEGF expression up to 70 days p.i. (Fig. 4G–I) in the lesions of the BALB/c mice and localized predominantly in the cytoplasm of infiltrated cells and parasitized macrophages. In contrast, distinct staining for HIFs was noticed in the lesions from the relatively resistant C57Bl/6 mice. As shown in Fig. 5, *L. amazonensis* infection did not induce cellular HIF-1 $\alpha$  and HIF-2 $\alpha$  stabilization or VEGF expression in the lesions at 2 days p.i. (Fig. 5A–C). On the

other hand, during the chronic period the lesions showed HIF-1 $\alpha$ , HIF-2 $\alpha$  and VEGF expression at 20 days p.i. (Fig. 5D–F) and 70 days p.i. (Fig. 5G–I). Through merged images, the localization of HIF-1 $\alpha$  in the cytoplasm and nucleus (Fig. 5D and G) and predominant localization of HIF-2 $\alpha$  in the nuclei (Fig. 5E and H) became evident. We also observed that in nuclei, HIF-1 $\alpha$  and HIF-2 $\alpha$  accumulation persisted at least until 70 days p.i. in infected macrophages.

## Discussion

The discovery of disease models for studying the role of hypoxia and different subunits of HIF during pathological processes is important to allow the identification of molecular targets in the treatment of cancer and chronic infectious diseases. Previous studies made in various groups demonstrated HIF-1 $\alpha$  expression in murine models of infectious diseases such as schistosomiasis, paracoccidiomycosis and respiratory syncytial virus infection (Haeblerle et al., 2008; Ferreira et al., 2009; Araújo et al., 2010). However, the *in vivo* models represented the susceptible phenotypes to these infections. The analyses of hypoxia and hypoxia related parameters of susceptible and resistant inbred mouse strains to an experimental infection may allow better understanding of the chronic pathological mechanisms. The experimental infection of mice by *Leishmania* constitutes one of the most studied models of parasitic disease (Nylén and Gautam, 2010). A comparison of clinical and immunological parameters recorded in infected mice with those

**Table 1**  
Cell infiltration in lesions of mice infected with *L. amazonensis*.<sup>a</sup>

Mouse strain	Days p.i.	Macrophages <sup>b</sup>	Other cells <sup>c</sup>
Balb/c	20	58	42
Balb/c	70	91	9
C57Bl/6	20	83	17
C57Bl/6	70	33	67

<sup>a</sup> The lesions were stained with hematoxylin and cells were counted in 10 random fields.

<sup>b</sup> Parasitized and non-parasitized macrophages.

<sup>c</sup> Inflammatory cells: polymorphonuclear cells and lymphocytes.

Please cite this article in press as: Araújo AP, et al. Infection by *Leishmania amazonensis* in mice: A potential model for chronic hypoxia. Acta Histochemica (2012), doi:10.1016/j.acthis.2012.01.007

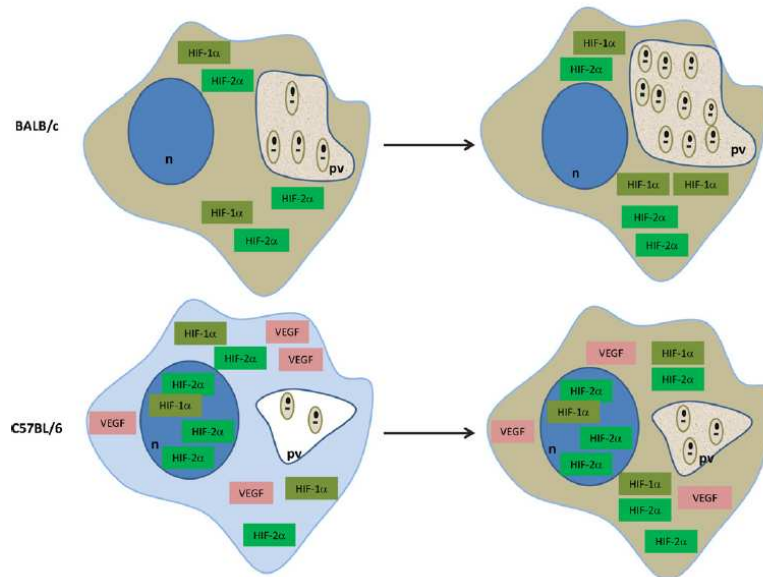


Fig. 6. Scheme illustrating the presence of hypoxia, HIF-1 $\alpha$ , HIF-2 $\alpha$  and VEGF in *L. amazonensis* infected macrophages present in the lesions of BALB/c and C57BL/6 mice during the experimental period (20 p.i. and 70 p.i.). Blue cell is normoxic and brown cells are hypoxic. Nucleus (n) and parasitophorous vacuole (pv) containing *Leishmania* amastigotes are represented in the figure. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of the article.)

observed in naturally infected humans has led to the conclusion that they are analogous (Alexander et al., 1999; Nylén and Gautam, 2010). In this study, we confirmed that the BALB/c mice failed to control *L. amazonensis* infection, while the C57BL/6 mice infection leads to controlled progressive lesions. These results may be explained by the experimental findings demonstrating a greater level of nitric oxide occurring in the early stages of infection in the C57BL/6 mice compared with susceptible mice (Giorgio et al., 1998). Despite the immunological paradigm, it was established that there are multiple factors which can determine the resistance and susceptibility to *Leishmania* infection (Bhardwaj et al., 2010). For example, our previous studies indicated that hypoxia may induce functional alterations in macrophages cultured *in vitro* and infected with *L. amazonensis*, including HIF-1 $\alpha$  and HIF-2 $\alpha$  expression (Degrossoli et al., 2007, 2011). We also demonstrated that infected macrophages accumulate HIF-1 $\alpha$  in non-controlled cutaneous lesions in BALB/c mice (Arrais-Silva et al., 2005). In the present study we demonstrated that infected footpads present hypoxic areas in both BALB/c and C57BL/6 mice after 20 and 70 days p.i. respectively. Indeed, hypoxia within lesions is to be expected since, metabolic demand for leukocyte infiltration into infected tissues, parasite proliferation and microcirculatory impairment (Kanan, 1975; Grimaldi and Tesh, 1993; Giorgio et al., 1998; McElrath et al., 1987) should result in increased demand for oxygen (Arrais-Silva et al., 2005). We hypothesized that hypoxia occurs later in the lesions of C57BL/6 mice because the parasite burdens are lower than those of BALB/c mice lesions and consequently the characteristics described above appear later in C57BL/6 mice lesions as shown in the scheme in Fig. 6.

In this study, we also determined the differential phenotype of the susceptible or relatively resistant mice regarding HIF-1 $\alpha$ , HIF-2 $\alpha$  and VEGF expression. Surprisingly, the results demonstrated

that HIF-1 $\alpha$  is expressed most of the time during the experimental periods in both mouse strains, and localized predominantly in the cytoplasm of infected macrophages and inflammatory cells (Fig. 5). The reasons why HIF-1 $\alpha$ , a transcription factor known to accumulate in the nuclei of hypoxic cells, was localized in the cytoplasm of cells within leishmanial lesions are not known. Although HIF-1 $\alpha$  has appeared predominantly in nuclei of many mammalian cell types, HIF-1 $\alpha$  accumulation was observed in the cytoplasm and nuclei of tumor-associated macrophages and macrophage cell lines under hypoxia (Talks et al., 2000; Crowther et al., 2001; Burke et al., 2002). Previous studies suggested that HIF-1 $\alpha$  nuclear accumulation may be impaired by MAPK-dependent phosphorylation (Triantafyllou et al., 2008). Recent reports suggested that reduced importin- $\alpha$  in endothelial cells increases cytoplasmic accumulation of HIF-1 $\alpha$  protein (and its absence in the nucleus indicates impaired nuclear transport) and a decrease in transcriptional activation of the VEGF gene (Ahluwalia et al., 2010). Nonetheless, the exact mechanism of decreasing HIF-1 $\alpha$  nuclear translocation is still poorly understood. Interestingly, HIF-2 $\alpha$  protein in susceptible BALB/c lesions had also been shown to accumulate in the cytoplasm, while in C57BL/6 lesions HIF-2 $\alpha$  is translocated to the nucleus and VEGF is produced in footpad tissue by macrophages (Fig. 6). The fact of these small lesions in relatively resistant mice having cells within HIF-2 $\alpha$  nuclear sites, strongly suggests that this transcription factor can activate VEGF and cytokine production which are able to induce migration and activation of immunocompetent cells, consequently leading to the control of the infection.

In conclusion, in our study we demonstrated that murine leishmaniasis is a chronic hypoxic disease and it could be useful to analyze hypoxia and hypoxia-related parameters. It may be a valuable experimental tool for examining the nature and order of events

that lead to chronic hypoxia and accumulation of HIFs within macrophages. An increased understanding of the mechanisms of HIF-1 $\alpha$  and HIF-2 $\alpha$  stabilization will be important for devising new drugs for treatment of chronic infectious and inflammatory diseases and tumor disorders.

#### Acknowledgments

This study was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior.

#### References

- Ahluwalia A, Narula J, Jones MK, Deng X, Tarnawski AS. Impaired angiogenesis in aging myocardial microvascular endothelial cells is associated with reduced importin  $\alpha$  and decreased nuclear transport of hif1 $\alpha$ : mechanistic implications. *J Physiol Pharmacol* 2010;61:133–9.
- Alexander J, Satoskar AR, Russell DG. *Leishmania* species: models of intracellular parasitism. *J Cell Sci* 1999;112:2993–3002.
- Araújo AP, Frezza TF, Allegritti SM, Giorgio S. Hypoxia, hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  and vascular endothelial growth factor in a murine model of *Schistosoma mansoni* infection. *Exp Mol Pathol* 2010;89:327–33.
- Arrais-Silva W, Paffaro Jr VA, Yamada AT, Giorgio S. Expression of hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  in the cutaneous lesions of BALB/c mice infected with *Leishmania amazonensis*. *Exp Mol Pathol* 2005;78:49–54.
- Barbieri CL, Giorgio S, Merjan AJ, Figueiredo EM. Glycosphingolipid antigens from *Leishmania (Leishmania) amazonensis* amastigotes identified by use of a monoclonal antibody. *Infect Immun* 1993;61:2131–7.
- Barshishat-Kupper M, Mungunsukh O, Tipton AJ, McCart EA, Panganiban RA, Davis TA, et al. Captopril modulates hypoxia-inducible factors and erythropoietin responses in a murine model of total body irradiation. *Exp Hematol* 2011;39:293–304.
- Baumer W, Wlaz P, Jennings G, Rundfeldt C. The putative lipid raft modulator miltefosine displays immunomodulatory action in T-cell dependent dermal inflammation models. *Eur J Pharmacol* 2010;628:226–32.
- Bhardwaj S, Srivastava N, Sudan R, Saha B. *Leishmania* interferes with host cell signaling to devise a survival strategy. *J Biomed Biotechnol* 2010, ID 109189.
- Burke B, Tang N, Corke KP, Tazzyman D, Ameri K, Wells M, et al. Expression of HIF-1 $\alpha$  by human macrophages: implications for the use of macrophages in hypoxia-regulated cancer gene therapy. *J Pathol* 2002;196:204–12.
- Chen J, Zhao S, Nakada K, Kuge Y, Tamaki N, Okada F, et al. Dominant-negative hypoxia-inducible factor-1  $\alpha$  reduces tumorigenicity of pancreatic cancer cells through the suppression of glucose metabolism. *Am J Pathol* 2003;162:1283–91.
- Crowther M, Brown NJ, Bishop ET, Lewis CE. Microenvironmental influence on macrophage regulation of angiogenesis in wounds and malignant tumors. *J Leukoc Biol* 2001;70:478–90.
- Degrossoli A, Arrais-Silva WW, Colhone MC, Gadelha FR, Joazeiro PP, Giorgio S. The influence of low oxygen on macrophage response to *Leishmania* infection. *Scand J Immunol* 2011;74:165–75.
- Degrossoli D, Bosetto MC, Lima CBC, Giorgio S. Expression of hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  in mononuclear phagocytes infected with *Leishmania amazonensis*. *Immunol Lett* 2007;114:119–25.
- Favier J, Lapointe S, Maliba R, Sirois MG. HIF-2 $\alpha$  reduces growth rate but promotes angiogenesis in a mouse model of neuroblastoma. *BMC Cancer* 2007;7:139.
- Ferreira MC, Gameiro J, Nagib PR, Brito VN, Vasconcelos Eda C, Verinaud L. Effect of low intensity helium–neon (HeNe) laser irradiation on experimental paracoccidioidomycotic wound healing dynamics. *Photochem Photobiol* 2009;85:227–33.
- Fukuda R, Kelly B, Semenza GL. Vascular endothelial growth factor gene expression in colon cancer cells exposed to prostaglandin E2 is mediated by hypoxia-inducible factor 1. *Cancer Res* 2003;63:2330–4.
- Giorgio S, Linares E, Ischiropoulos H, Von Zuben FJ, Yamada A, Augusto O. In vivo formation of electron paramagnetic resonance-detectable nitric oxide and of nitrotyrosine is not impaired during murine leishmaniasis. *Infect Immun* 1998;2:807–14.
- Gordan JD, Simon MC. Hypoxia-inducible factors: central regulators of the tumor phenotype. *Curr Opin Genet Dev* 2007;17:71–7.
- Grimaldi Jr G, Tesh RB. Leishmaniasis of the new world: current concepts and implications for future research. *Clin Microbiol Rev* 1993;6:230–50.
- Haeberle HA, Dürrstein C, Rosenberger P, Hosakote YM, Kuhllicke J, Kempf VA, et al. Oxygen-independent stabilization of hypoxia inducible factor (HIF)-1 during RSV infection. *PLoS One* 2008;3(10):e3352.
- Imtiyaz HZ, Williams EP, Hickey MM, Patel SA, Durham AC, Yuan L, et al. Hypoxia-inducible factor 2 $\alpha$  regulates macrophage function in mouse models of acute and tumor inflammation. *J Clin Invest* 2010;120:2699–714.
- Kaelin WG. The von Hippel-Lindau tumor suppressor protein: roles in cancer and oxygen sensing. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 2005;70:159–66.
- Kanan MW. Mucocutaneous leishmaniasis in guinea-pigs inoculated intravenously with *Leishmania enriettii*. *Br J Dermatol* 1975;92:663–73.
- Kondo K, Klcó J, Nakamura E, Lechpammer M, Kaelin WG. Inhibition of HIF is necessary for tumor suppression by the von Hippel-Lindau protein. *Cancer Cell* 2002;1:237–46.
- Maxwell PH, Wiesener MS, Chang GH, Clifford CS, Vaux EC, Cockman ME, et al. The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis. *Nature* 1999;399:271–5.
- McElrath MJ, Kaplan G, Nurat A, Cohn ZA. Cutaneous leishmaniasis. The defect in T cell influx in BALB/c mice. *J Exp Med* 1987;165:546–59.
- Mosser DM, Edwards JP. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol* 2008;8:958–69.
- Mowat FM, Luhmann UF, Smith AJ, Lange C, Duran Y, Harten S, et al. HIF-1 $\alpha$  and HIF-2 $\alpha$  are differentially activated in distinct cell populations in retinal ischaemia. *PLoS One* 2010;5(6):e11103.
- Nylén S, Gautam S. Immunological perspectives of leishmaniasis. *J Glob Infect Dis* 2010;2:135–46.
- Paciello O, Wojcik S, Gradoni L, Oliva G, Trapani F, Iovane V, Politano L, Papparella S. Syrian hamster infected with *Leishmania infantum*: a new experimental model for inflammatory myopathies. *Muscle Nerve* 2010;41:355–61.
- Schoefield CJ, Ratcliffe PJ. Oxygen sensing HIF hydroxylases. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2004;5:343–54.
- Stout RD, Suttles J. Functional plasticity of macrophages: reversible adaptation to changing microenvironments. *J Leukoc Biol* 2004;76:509–13.

Please cite this article in press as: Araújo AP, et al. Infection by *Leishmania amazonensis* in mice: A potential model for chronic hypoxia. *Acta Histochemica* (2012), doi:10.1016/j.acthis.2012.01.007



GModel

ACTHIS-50585; No. of Pages 8

## ARTICLE IN PRESS

8

A.P. Araújo et al. / Acta Histochemica xxx (2012) xxx–xxx

Talks KL, Turley H, Gatter KC, Maxwell PH, Pugh CW, Ratcliffe PJ, et al. The expression and distribution of the hypoxia inducible factors HIF-1 $\alpha$  and HIF-2 $\alpha$  in normal human tissues, cancers, and tumor-associated macrophages. *Am J Pathol* 2000;157:411–21.

Triantafyllou A, Mylonis I, Simos G, Bonanou S, Tsakalof A. Flavonoids induce HIF-1 $\alpha$  but impair its nuclear accumulation and activity. *Free Radic Biol Med* 2008;44:657–70.

Via LE, Lin PL, Ray SM, Carrillo J, Allen SS, Eum SI, et al. Tuberculous granulomas are hypoxic in guinea pigs, rabbits, and nonhuman primates. *Infect Immun* 2008;76:2333–40.

Yang H, Li TW, Peng J, Tang X, Ko KS, Xia M, Aller MA. A mouse model of cholestasis-associated cholangiocarcinoma and transcription factors involved in progression. *Gastroenterology* 2011;141:378–88.

Please cite this article in press as: Araújo AP, et al. Infection by *Leishmania amazonensis* in mice: A potential model for chronic hypoxia. *Acta Histochemica* (2012), doi:10.1016/j.acthis.2012.01.007

### **Anexo III**

#### Avaliação da hipóxia, HIF-1 $\alpha$ e VEGF na Esquistossomose Experimental

Como nosso grupo de pesquisa possui experiência no estudo das alterações da concentração de oxigênio em doenças parasitárias, este trabalho foi proposto, paralelo ao projeto inicial do doutorado, juntamente com a professora Dra. Silmara Marques Allegretti e Dra. Tarsila Ferraz Frezza. A presença de um microambiente hipóxico e a expressão de HIF-1 $\alpha$  e VEGF foi avaliada através de imuno-histoquímica nos tecidos de fígado, baço, intestino e pulmões contendo granulomas causados por *Schistosoma mansoni* em camundongos Swiss.



UNICAMP



CEEA/Unicamp

Comissão de Ética na Experimentação Animal  
CEEA/Unicamp

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 1892-1, sobre "Avaliação da hipóxia em Esquistossomose experimental", sob a responsabilidade de Profa. Dra. Selma Giorgio / Alexandra Paiva Araújo Vieira, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal – CEEA/Unicamp em 06 de julho de 2009.

CERTIFICATE

We certify that the protocol nº 1892-1, entitled "Evaluation of hypoxia during Schistosomiasis", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - Unicamp) on July 6, 2009.

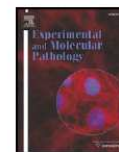
Campinas, 06 de julho de 2009.

  
Profa. Dra. Ana Maria A. Guarnaldo  
Presidente

  
Fátima Alonso  
Secretária Executiva

CEEA – Unicamp  
Caixa Postal 6109  
13083-970 Campinas, SP – Brasil

Telefone: (19) 3521-6359  
E-mail: [comisib@unicamp.br](mailto:comisib@unicamp.br)  
<http://www.ib.unicamp.br/ceea/>



## Hypoxia, hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$ and vascular endothelial growth factor in a murine model of *Schistosoma mansoni* infection

Alexandra Paiva Araújo, Tarsila Ferraz Frezza, Silmara Marques Allegretti, Selma Giorgio\*

Department of Animal Biology, Biology Institute, Universidade Estadual de Campinas, Caixa Postal 6109, Cep 13083-970, Campinas, SP, Brazil

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 22 June 2010  
and in revised form 9 September 2010  
Available online 18 September 2010

#### Keywords:

*Schistosoma mansoni*  
Granuloma  
Hypoxia  
Angiogenesis  
Mice

### ABSTRACT

*Schistosomiasis mansoni* is a chronic parasitic disease where much of the symptomatology is attributed to granuloma formation, an immunopathological reaction against *Schistosoma* eggs. To more clearly understand the immunopathology of schistosomiasis, the tissue microenvironment generated by *S. mansoni* infected mice was investigated. Using the hypoxia marker pimonidazole, we provide immunohistochemical evidence that hypoxia occurred in inflammatory cells infiltrated around the eggs and cells surrounding granulomas in the liver, intestine, spleen and lungs of infected mice. Hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) was mainly expressed in inflammatory cells surrounding the eggs and in hepatocytes surrounding cellular and fibrocellular granulomas in infected mouse liver. HIF-1 $\alpha$  expression was also verified in granulomas in the other tissues tested (intestine, spleen and lungs). Vascular endothelial growth factor (VEGF) expression was observed in the extracellular space surrounding inflammatory cells in liver granuloma. The VEGF expression pattern verified in infected mouse liver was very similar to that observed in the other tissues tested. A strong positive correlation occurred between pimonidazole binding and HIF-1 $\alpha$  and VEGF expression in the tissues tested, except for lung. This work is the first evidence that infection by a helminth parasite, *S. mansoni*, produces a hypoxic tissue microenvironment and induces HIF-1 $\alpha$  and VEGF expression.

© 2010 Elsevier Inc. All rights reserved.

### Introduction

*Schistosomiasis mansoni* is a chronic parasitic disease and a serious public health problem in many parts of the tropical and subtropical areas of the world (Pearce and MacDonald, 2002). The disease is mainly caused by eggs released by adult worm pairs residing in mesenteric veins (Burke et al., 2009). Some eggs are trapped in the microvasculature of the liver, where they induce a vigorous granulomatous response (Stavitsky, 2004). The granulomas destroy the eggs and sequester or neutralize otherwise pathogenic egg antigens, but this process also leads to fibrinogenesis in host tissues (Stavitsky, 2004). Egg granulomas can occur in several organs, including the spleen, lungs and intestine. Consequently, much of the symptomatology of schistosomiasis is attributed to this egg-induced granulomatous response (Wilson et al., 2007). Studies in mice, rhesus monkeys and pigs have demonstrated that the granulomatous response around the *Schistosoma* egg is characterized by transitory stages (Cheever et al., 2002). It is a gradual accumulation of mononuclear cells, neutrophils and eosinophils that surrounds the freshly deposited egg. Mature granulomas show histiocytes and epithelioid cells and, in the later stages, fibrocytes and collagen fibers become prominent, while the eggs degenerate and disintegrate (Stavitsky, 2004; Cheever et al., 2002; Lenzi et al., 2006).

Thus, granulomas are the main cause of the lesion responsible for morbidity and mortality in schistosomiasis (Pearce and MacDonald, 2002; Burke et al., 2009). Interestingly, a role in the development and growth of the granulomas has been attributed to the degree of angiogenesis (Baptista and Andrade, 2005). Newly formed blood vessels within and throughout the periphery of granulomas has been demonstrated, although in one third of granulomas, angiogenesis is minimal in both outbred and inbred mice (Baptista and Andrade, 2005). Angiogenesis is also minimal or absent in older granulomas (Baptista and Andrade, 2005). Since a deficient oxygen supply is one consequence of poor angiogenesis and inadequate perfusion, we hypothesized that schistosomal granulomas are hypoxic. To test the presence of hypoxia in infected tissues, a chemical hypoxia marker, pimonidazole, was used. Pimonidazole is metabolically reduced under hypoxia to produce adducts that can be detected using antibodies, it is also used as an investigational oncology probe (Raleigh et al., 1999). Recently, it has been used to demonstrate hypoxia in pulmonary granulomas induced by *Mycobacterium tuberculosis* (Via et al., 2008).

In the present study, the expression of hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ), a prominent regulator of genetic response to hypoxia, was also examined in murine *S. mansoni* infected tissues. HIF-1 $\alpha$  is composed of  $\alpha$  and  $\beta$  subunits and while the  $\beta$  subunit is constitutively expressed, the  $\alpha$  subunit is degraded under normoxic conditions (Semenza et al., 2000), such that the intracellular content of HIF-1 $\alpha$  increases immediately following a decrease in oxygen tension. HIF-1 $\alpha$  is up regulated in several tumors and, for a number of persistent infections,

\* Corresponding author. Fax: +55 19 32393124.  
E-mail address: [sgiorgio@unicamp.br](mailto:sgiorgio@unicamp.br) (S. Giorgio).

HIF-1 $\alpha$  has been shown to be activated in *in vitro* and *in vivo* systems (Zinkernagel et al., 2007; Nizet and Johnson, 2009). Its activation is also apparent during viral (e.g. respiratory tract respiratory syncytium virus) and bacterial infection (Haeberle et al., 2008; Kempf et al., 2005). HIF-1 $\alpha$  in association with parasites has been much less studied. *Toxoplasma gondii* induces HIF-1 $\alpha$  in infected fibroblasts and cutaneous lesions in mice infected with *Leishmania amazonensis* express HIF-1 $\alpha$  (Arrais-Silva et al., 2005; Spear et al., 2006).

Since hypoxia and HIF-1 $\alpha$  transactivate vascular endothelial growth factor (VEGF), a cytokine which can induce angiogenesis in schistosomal granulomas (Loeffler et al., 2002), VEGF expression in the tissues of mice infected with *S. mansoni* was also investigated.

## Materials and methods

### Mice and parasite

Four-week-old female Swiss mice were purchased from the Animal Center of the Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, Brazil. All experiments and procedures were approved by the University's Animal Research Ethics Committee (protocol number 1892-1). The mice were tail-infected for 2 h with 70 cercariae each of the BH *S. mansoni* strain (Belo Horizonte, MG, Brazil), in water, shed from *Biomphalaria glabrata* snails.

### Tissue hypoxia analyses

The mice were intraperitoneally administered pimonidazole hydrochloride (Hypoxprobe-1, Chemicon International Inc., Billerica, MA) dissolved in sterile, filtered physiological saline at 60 mg/kg of body weight. After 90 min, the liver, intestine, spleen and lungs were perfused fixed with 4% paraformaldehyde and embedded in paraffin, followed by immunohistological detection of pimonidazole protein adducts, in accordance with the manufacturer's recommendations and as detailed. Serial 5  $\mu$ m thick paraffin sections of liver, intestine, spleen and lungs were treated as follows: deparaffination, rehydration, endogenous quenching and citrate buffer microwave antigen retrieval using citrate buffer. To detect pimonidazole, the sections were incubated with mouse anti-pimonidazole antibody (Chemicon), developed with secondary polyclonal anti-mouse antibody conjugated with peroxidase (Sigma Chemical Co., Saint Louis, MO) and visualized with a peroxidase substrate solution containing 3,3'-diaminobenzidine and hydrogen peroxide (Arrais-Silva et al., 2005; Shi et al., 1991). Tissues sections were counterstained with hematoxylin, dehydrated in serial alcohol solutions and mounted in cytoaseal-60 mounting medium (Sigma). The images were recovered with a digital imaging system, a light microscope (Eclipse E800, Nikon), a Cool Snap-Pro Color camera (Media Cybernetics, Silver Spring, MD), and capture software Image-Pro plus (Media Cybernetics).

### Evaluation of infection

The mice were sacrificed by cervical dislocation, the adult worms were collected, counted and sorted by sex after perfusion of the portal system. The number of granulomas in each organ was determined by analyzing six random optical fields within each tissue section of at least three slides, as described previously in Yoshioka et al., 2002.

### Immunohistochemical analysis

Immunochemical analyses of HIF-1 $\alpha$  and VEGF were performed using rabbit polyclonal anti-HIF-1 $\alpha$  antibody (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA) and rabbit polyclonal anti-VEGF antibody (Chemicon), respectively, and developed with goat polyclonal anti-rabbit antibody conjugated with peroxidase (Sigma). Serial 5  $\mu$ m thick paraffin sections of liver, intestine, spleen and lungs were treated as

follows: deparaffination, rehydration, endogenous quenching and citrate buffer microwave retrieval and visualized with a peroxidase substrate solution containing 3,3'-diaminobenzidine and hydrogen peroxide, as previously described (Arrais-Silva et al., 2005; Shi et al., 1991). Control sections were incubated with normal rabbit serum, rabbit polyclonal antibody and mouse normal serum as primary antibodies. Tissues sections were counterstained with hematoxylin, dehydrated in serial alcohol solutions and mounted in cytoaseal-60 mounting medium (Sigma). The images were recovered with a digital imaging system, a light microscope (Eclipse E800, Nikon), a Cool Snap-Pro Color camera (Media Cybernetics) and capture software Image-Pro plus (Media Cybernetics).

### Data presentation

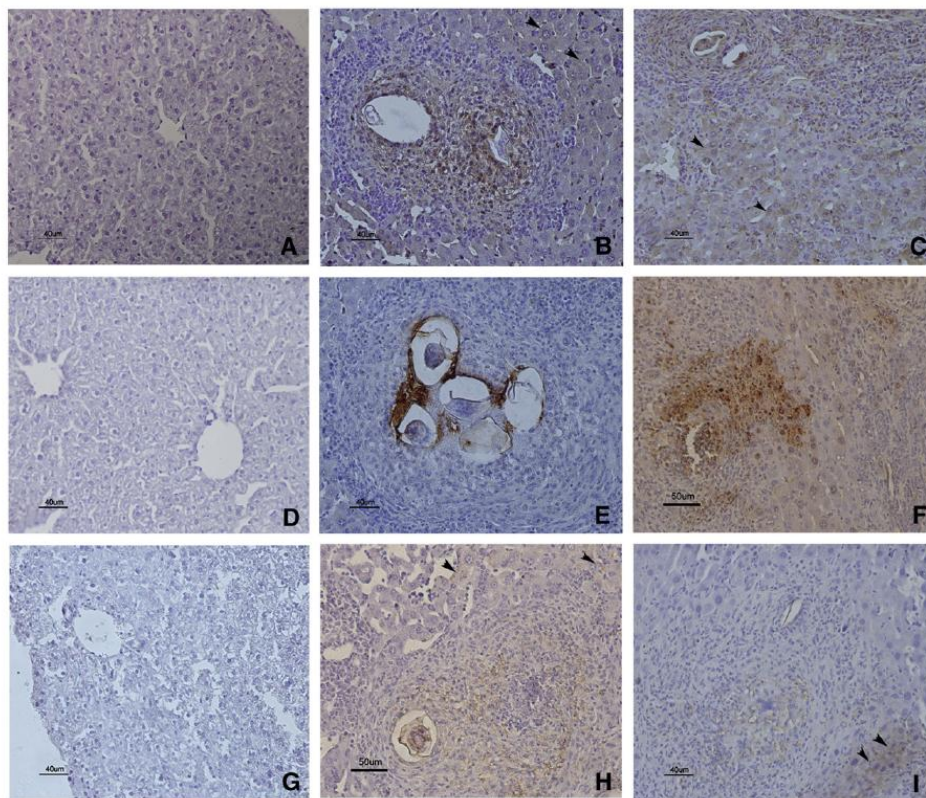
The results presented were verified in four mice for each time point after *S. mansoni* infection. Control mice (four per time point) remained uninfected. For each mouse, at least three sections per slide of four slides from each organ were quantitatively analyzed for immunohistochemical detection of pimonidazole protein adducts, HIF-1 $\alpha$  and VEGF. The data are presented as the mean  $\pm$  SD or percentage and analyzed by Student t test to determine which groups were divergent. The level of significance was set at  $p < 0.05$ .

## Results

All the mice exposed to 70 cercariae became infected, which was easily verified after perfusion by the recovery of worms in the portal system and mesenteric veins. Worm burden was similar at 8 weeks (a median of 49 worms per mouse) and 12 weeks postinfection (a median of 30 worms per mouse). Parasite eggs were detected in the liver, spleen, lungs and intestine in mice at 8 and 12 weeks postinfection (data not shown). Periportal granulomas occurred in all infected mice; the number of hepatic granulomas was similar at 8 and 12 weeks postinfection ( $6 \pm 0.6$  and  $5 \pm 0.7$  per  $0.84 \text{ mm}^2$  of liver, respectively). Hepatic granulomas with an intense inflammatory reaction composed of mononuclear and polymorphonuclear cells (i.e. cellular granulomas) were observed at 8 weeks postinfection; while granulomas with similar features and more fibrotic granulomas (i.e. fibrocellular granulomas) due to diminished cellularity, were observed in mouse liver at 12 weeks postinfection.

The question whether infection with *S. mansoni* leads to tissular hypoxia was evaluated using pimonidazole as a surrogate of hypoxia (Via et al., 2008). Pimonidazole was administered to the mice and 90 min later they were sacrificed and adducts produced by pimonidazole with thiol containing protein were detected by peroxidase-antibody (Via et al., 2008). Mouse liver at 8 week postinfection showed evidence of pimonidazole immunostaining located in inflammatory cells infiltrated around the eggs (Fig. 1B). Most of the granulomas (97%) were pimonidazole positive. Many hepatocytes surrounding the granuloma and Kupffer cells also presented positive immunostaining for pimonidazole (Fig. 1). Most of the granulomas (84%) observed in the mouse liver at 12 weeks postinfection showed fibrocytes and disintegrated eggs, while hepatocytes within these areas showed clear evidence of pimonidazole immunostaining (Fig. 1C). It should be noted that extensive areas of infected liver without granulomas were uniformly pimonidazole negative (Fig. 1C). As shown in Fig. 1A, no significant pimonidazole immunostaining of liver tissue was observed in uninfected mice.

Since HIF-1 $\alpha$  accumulation is triggered primarily by hypoxia, the expression of HIF-1 $\alpha$  immunoreactivity was analyzed in the tissues studied. As shown in Fig. 1D, liver from uninfected mice showed no immunostaining for HIF-1 $\alpha$ . Immunostaining revealed the presence of infiltrated inflammatory cells around the schistosomal eggs expressing HIF-1 $\alpha$  at 8 weeks postinfection. Hepatocytes presenting positive nuclear and cytoplasmic staining for HIF-1 $\alpha$  around the granulomas

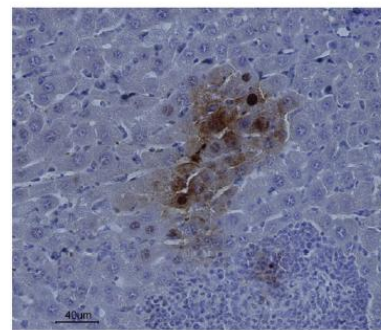


**Fig. 1.** Evaluation of hypoxia, HIF-1 $\alpha$  and VEGF expression in mouse liver tissue. Liver tissue of uninfected mouse stained with anti-pimonidazole complex antibody, note that no immunoreactivity was observed (A); *S. mansoni* infected mouse at 8 weeks postinfection stained with anti-pimonidazole complex antibody, the arrow indicates positively stained hepatocytes (B); *S. mansoni* infected mouse at 12 weeks postinfection stained with anti-pimonidazole complex antibody, the arrow indicates positively stained hepatocytes (C); uninfected mouse stained with anti-HIF-1 $\alpha$  polyclonal antibody, note that no immunoreactivity was observed (D); *S. mansoni* infected mouse at 8 weeks postinfection stained with anti-HIF-1 $\alpha$  polyclonal antibody (E); *S. mansoni* infected mouse at 12 weeks postinfection stained with anti-HIF-1 $\alpha$  polyclonal antibody (F); uninfected mouse stained with anti-VEGF polyclonal antibody, note that no immunoreactivity was observed (G); *S. mansoni* infected mouse at 8 weeks postinfection stained with anti-VEGF polyclonal antibody, the arrow indicates positively stained hepatocytes (H); *S. mansoni* infected mouse at 12 weeks postinfection stained with anti-VEGF polyclonal antibody, the arrow indicates positively stained hepatocytes (I). All sections were counterstained with hematoxylin. Data are representative of three independent experiments. 200 $\times$  magnification for all photomicrographs.

(Figs. 1G and 2) and no necrosis were observed in infected hepatic tissue. Examination of the liver at 12 weeks postinfection verified inflammatory cells (Fig. 1F) and many hepatocytes staining positive for HIF-1 $\alpha$  surrounding cellular and fibrocellular granulomas (data not shown). On average, 83% and 64% of the liver granulomas expressed HIF-1 $\alpha$  at 8 and 12 weeks postinfection, respectively.

VEGF expression in diseased tissues can be governed by hypoxia and HIF-1 $\alpha$  (Pugh and Ratcliffe, 2003) and angiogenesis appears to be a factor in the development of the granuloma (Baptista and Andrade, 2005; Loeffler et al., 2002). VEGF expression was investigated in *S. mansoni* infected murine liver, as shown in Fig. 1. VEGF staining was located in the extracellular space surrounding inflammatory cells in granulomas (Fig. 1); 92% and 61% of the granulomas were positive for VEGF at 8 and 12 weeks postinfection, respectively. In addition, VEGF staining was also verified in a small percentage of hepatocytes in mouse livers at 8 and 12 weeks postinfection (data not shown).

Others organs may be affected in schistosomiasis (Burke et al., 2009). Intestine, spleen and lungs contained periportal granulomas. Granulomas were observed in the serosa and mucosa of the large intestine of mice at 12 weeks postinfection (data not shown and



**Fig. 2.** Determination of HIF-1 $\alpha$  in hepatocytes. Liver tissue of *S. mansoni* infected mouse at 8 weeks postinfection stained with anti-HIF-1 $\alpha$ . Note HIF-1 $\alpha$  immunostaining in the nuclei and cytoplasm of hepatocytes. Liver tissue was counterstained with hematoxylin. 200 $\times$  magnification for all photomicrographs.

Edungbola and Shiller, 1979; Lopes et al., 2006). The staining of intestine with antibody against pimonidazole demonstrated hypoxia in smooth muscle cells and in granulomas at different stages of development; 92% of the granulomas presented pimonidazole immunostaining. Granulomas were observed in the submucosal layer (Fig. 3D). A similar pattern of immunoreactivity was observed for HIF-1 $\alpha$ , i.e., staining of smooth muscle cells and granuloma inflammatory cells; 89% of the granulomas showed evidence of HIF-1 $\alpha$  (Fig. 3E). VEGF reactivity was observed in the extracellular space surrounding inflammatory cells in granulomas and in smooth muscle cells; 70% of the intestinal granulomas were positive for VEGF (Fig. 3F). Pimonidazole, HIF-1 $\alpha$  and VEGF were consistently nonreactive in normal intestinal tissue (Figs. 3A and C). Granulomas were also present in the white and red pulps of mouse spleen at 12 weeks postinfection (data not shown and (Stavitsky, 2004; Lopes et al., 2006). Pimonidazole and HIF-1 $\alpha$  immunostaining were located in inflammatory cells surrounding schistosomal eggs and splenic cells, as shown on Figs. 4D and E; 86% and 63% of these granulomas were positive for pimonidazole and HIF-1 $\alpha$ , respectively. VEGF expression was restricted to the extracellular space surrounding inflammatory cells in 50% of splenic granulomas (Fig. 4F). Granulomas frequently occurred in all the lobes of both the right and left lungs (data not shown and Lopes et al., 2006). In lung tissue, pimonidazole-positive areas were more extensive than that of HIF-1 $\alpha$  and VEGF positive immunostaining regions (Figs. 5D, E, F). On average, 100% of the lung granulomas presented pimonidazole immunostaining, but only 21% were positive for HIF-1 $\alpha$  and 18% were positive for VEGF. It should be noted that pimonidazole, HIF-1 $\alpha$  and VEGF were consistently nonreactive in normal spleen and lung tissues (Figs. 4B, C, 5B and C).

## Discussion

The importance of tissue and cellular response to hypoxia in the pathogenesis of tumors is well appreciated (Höckel and Vaupel, 2001;

Vaupel and Harrison, 2004); however, these processes are much less frequently examined in infectious diseases (Zinkernagel et al., 2007; Nizet and Johnson, 2009). For example, hypoxic and HIF-1 $\alpha$  induction were demonstrated in experimental infection with *T. gondii*, *L. amazonensis* and *Bartonella* (Arrais-Silva et al., 2005; Kempf et al., 2005; Spear et al., 2006). To our knowledge, there are no studies involving hypoxia and hypoxia-induced factors for helminth infection. The summarized findings of this study are: 1) hypoxia, determined by pimonidazole staining, occurred in inflammatory cells infiltrated around the eggs and cells surrounding the granulomas in the liver, intestine, spleen and lungs of mice infected with *S. mansoni*; 2) HIF-1 $\alpha$  was mainly expressed in periovular inflammatory cells and hepatocytes surrounding cellular and fibrocellular granulomas in the liver of infected mice. HIF-1 $\alpha$  expression was observed for granulomas in the other three tissues tested, intestine, spleen and lungs; 3) VEGF expression was observed in the extracellular space surrounding inflammatory cells in the granulomas, such that the pattern of VEGF expression verified in infected mouse liver was very similar to that in the other tissues tested; and 4) a strong positive correlation occurred between pimonidazole binding and HIF-1 $\alpha$  and VEGF expression in the tissues tested, except for lung tissue.

Between 84 and 100% of the granulomas in the liver, intestine, spleen and lungs of mice infected with *S. mansoni* were pimonidazole positive. Indeed, the presence of hypoxic regions within tissues presenting *Schistosoma* egg granulomas is to be expected, since proliferation and increased migration of immunologically active cells into granulomas (Stadecker, 1999) and the deposition of eggs containing live embryos should result in increased demand for oxygen (Feldman et al., 1990). We also hypothesized that the vascular obstructive process occurring during infection (Andrade and Cheever, 1971) is involved in the development of hypoxia. Consistent with the data obtained here, the presence of hypoxia in granuloma lesions induced by *M. tuberculosis* was recently demonstrated by analyzing pimonidazole adducts (Via et al., 2008). Lung tissue from guinea pig, rabbit and nonhuman primate showed more hypoxic necrotic lesions than hypoxic diffuse inflammatory infiltrate (Via et al.,

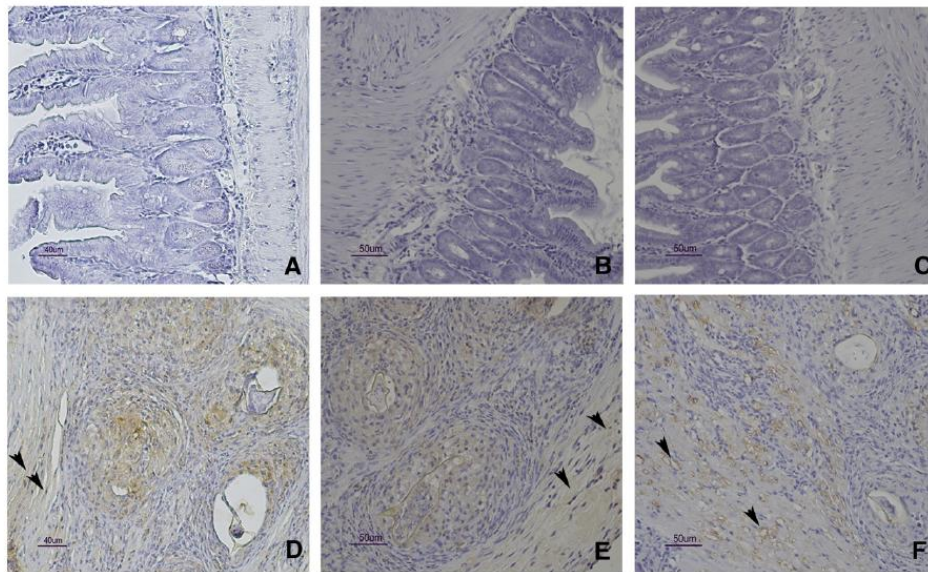


Fig. 3. Evaluation of hypoxia, HIF-1 $\alpha$  and VEGF expression in mouse intestine tissue. Intestine tissue of uninfected mouse stained with anti-pimonidazole complex antibody (A) or anti-HIF-1 $\alpha$  polyclonal antibody (B) or anti-VEGF polyclonal antibody (C); note that no immunoreactivity was observed. Intestine tissue of *S. mansoni* infected mouse at 12 weeks postinfection stained with anti-pimonidazole complex antibody (D) or anti-HIF-1 $\alpha$  polyclonal antibody (E) or anti-VEGF polyclonal antibody (F). The arrows indicate positively stained smooth muscle cells. All sections were counterstained with hematoxylin. Data are representative of three independent experiments. 200 $\times$  magnification for all photomicrographs.

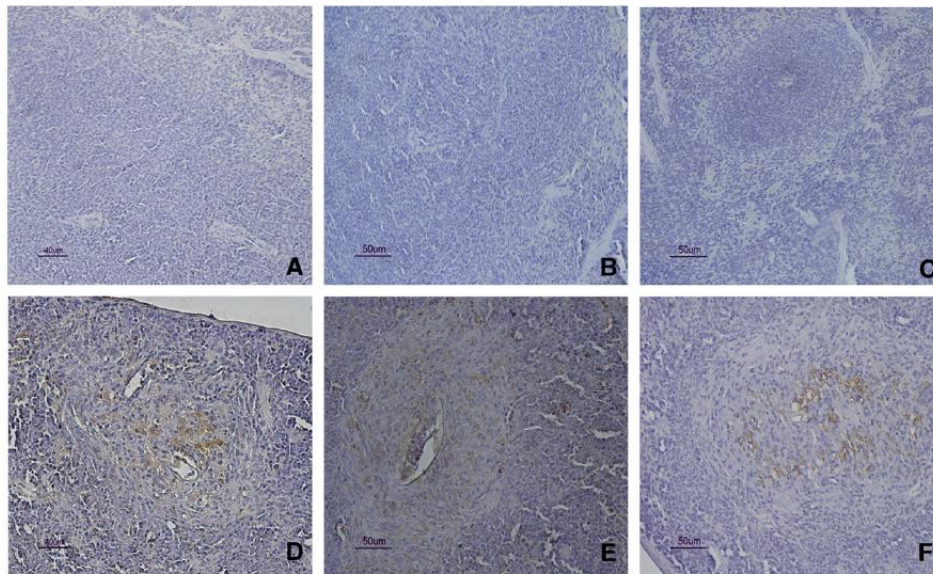


Fig. 4. Evaluation of hypoxia, HIF-1 $\alpha$  and VEGF expression in mouse spleen tissue. Spleen tissue of uninfected mouse stained with anti-pimonidazole complex antibody (A) or anti-HIF-1 $\alpha$  polyclonal antibody (B) or anti-VEGF polyclonal antibody (C); note that no immunoreactivity was observed. Spleen tissue of *S. mansoni* infected mouse at 12 weeks postinfection stained with anti-pimonidazole complex antibody (D) or anti-HIF-1 $\alpha$  polyclonal antibody (E) or anti-VEGF polyclonal antibody (F). All sections were counterstained with hematoxylin. Data are representative of three independent experiments. 200 $\times$  magnification for all photomicrographs.

2008). However, in a granuloma model of latent tuberculosis (mouse hollow-fiber model), hypoxic perifer containing inflammatory cells and encapsulated live bacilli stained positive for pimonidazole (Klinkenberg

et al., 2008). The fact that pimonidazole adducts are considered to form only when O<sub>2</sub> tension is below 1–2% (Rasey et al., 1999; Bassnett and McNulty, 2003; Sobhanifar et al., 2005) and that HIF-1 $\alpha$  presents half

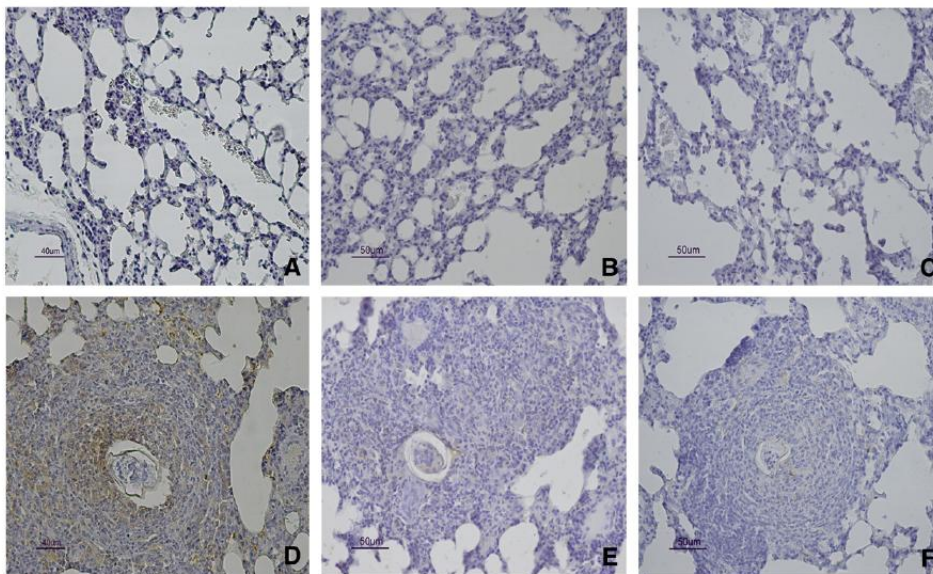


Fig. 5. Evaluation of hypoxia, HIF-1 $\alpha$  and VEGF expression in mouse lung tissue. Lung tissue of uninfected mouse stained with anti-pimonidazole complex antibody (A) or anti-HIF-1 $\alpha$  polyclonal antibody (B) or anti-VEGF polyclonal antibody (C); note that no immunoreactivity was observed. Lung tissue of *S. mansoni* infected mouse at 12 weeks postinfection stained with anti-pimonidazole complex antibody (D) or anti-HIF-1 $\alpha$  polyclonal antibody (E) or anti-VEGF polyclonal antibody (F). All sections were counterstained with hematoxylin. Data are representative of three independent experiments. 200 $\times$  magnification for all photomicrographs.



maximal activation at O<sub>2</sub> tension between 1.5 and 2% (Jiang et al., 1996), led us to suppose that hypoxic schistosomal lesions induces HIF-1 $\alpha$ . Indeed, a strong positive correlation between HIF-1 $\alpha$  expression and pimonidazole binding occurred in the tissues studied. Liver, intestine, spleen and lungs exhibited HIF-1 $\alpha$  staining that was primarily located in infiltrated inflammatory cells surrounding the schistosomal eggs, both in cellular and fibrocellular granulomas. Although expression independent of hypoxia has been demonstrated by our group and other researchers using an *in vitro* model of *Leishmania* infection, lipopolysaccharides, proinflammatory cytokines and reactive oxygen species (Albina et al., 2001; Blouin et al., 2004; Kietzmann and Görlach, 2005; Degrossoli et al., 2007; Pagé et al., 2008), in this report, the results strongly suggest hypoxia-dependent HIF-1 $\alpha$  activation in *S. mansoni* infected mice. In agreement with these findings, several studies have shown that HIF-1 $\alpha$  is present in many common diseases, such as cancer, pulmonary hypertension and myocardial ischemia (Semenza et al., 2000).

In schistosomiasis, angiogenesis plays a role in the neovascularization of granulomas and the remodeling of blood vessels (Lenzi et al., 2006; Baptista and Andrade, 2005). VEGF released from accumulating leukocytes and shown to be upregulated in endothelial cells *in vitro* due to egg-derived factors may contribute to these vascular changes (Freedman and Ottesen, 1988; Carmeliet, 2005; Kanse et al., 2005). This study demonstrated for the first time that VEGF expression is increased in schistosomal infection. Since hypoxia and HIF-1 $\alpha$  are major inducers of VEGF, we expected that VEGF would be expressed in tissues of *S. mansoni* infected mice. Observation revealed that VEGF is located in the extracellular space surrounding inflammatory cells in granulomas present in the liver, intestine, spleen and lungs. These findings are in agreement with previous reports that VEGF is located mainly on cell surfaces and within extracellular matrixes (Ramos et al., 1998; Park et al., 1993); for example VEGF is located in the extracellular space surrounding smooth muscle cells and macrophage-derived foam cells in atherosclerotic lesions (Ramos et al., 1998). The present data for *S. mansoni* infected murine liver, intestine and spleen showed that a positive correlation occurred between pimonidazole binding and HIF-1 $\alpha$  and VEGF expression, suggesting that hypoxia plays a role in the maintenance of the angiogenic response in granulomas.

Interestingly, the results obtained revealed a lack of correlation between pimonidazole binding and HIF-1 $\alpha$  and VEGF expression in lung tissue, such that 100%, 21%, and 18% of lung granulomas were positive for pimonidazole, HIF-1 $\alpha$  and VEGF, respectively. The reasons why pulmonary granulomas do not respond to hypoxia by expressing HIF-1 $\alpha$  and VEGF, as demonstrated in granulomas of the other organs, are not clear. One possible explanation is that when immature worms pass through the lung, rupturing the blood vessels and enter the alveoli, during the pre-granuloma stage, this attracts an inflammatory response that causes nonspecific damage (von Lichtenberg et al., 1977; Gobert et al., 2007) that may produce molecular sequelae in the tissue. The present results appear to support previous reports showing unexpected lack of hypoxic-induced HIF-1 $\alpha$  in lung epithelial cells, xenografts of human pharyngeal carcinoma, colon carcinoma, astrocytoma, biopsies of human head-and-neck tumor, and diabetic ulcers (Sobhanifar et al., 2005; Vordermark et al., 2005; Uchida et al., 2004; Janssen et al., 2002; Botusan et al., 2008). *In vitro* studies have identified HIF-1 $\alpha$  inhibition by hyperglycemia in hypoxic primary dermal fibroblasts and endothelial cells (Catrina et al., 2004), and by hypoglycemia and serum depletion in several tumor cell lines (Sobhanifar et al., 2005; Vordermark et al., 2005). In the latter studies, the authors demonstrated that normal glucose and serum concentrations restore the HIF-1 $\alpha$  response to hypoxia (Sobhanifar et al., 2005; Vordermark et al., 2005), suggesting that inadequate delivery of nutrients leads to lack of HIF-1 $\alpha$  expression in tissues. Although hypoglycemia, i.e., low serum glucose concentration, has been verified in *S. mansoni* infected mice (Couto et al., 2008), the extent of nutrient and glucose depletion in different mouse organs remains unknown and requires further investigation. Since VEGF, a HIF-1 $\alpha$ -regulated

gene, was repressed in the lungs of *S. mansoni* infected mice, it seems probable that HIF-1 $\alpha$  is the causative link for VEGF suppression in this tissue.

In conclusion, the findings presented a first hint that murine *S. mansoni* infection generates a local hypoxic microenvironment and that a strong positive correlation exists between hypoxia and HIF-1 $\alpha$  and VEGF expression in the liver, intestine and spleen, but not in the lungs. Further clinical and experimental studies are required to substantiate these findings.

#### Conflict of interest statement

The authors declare that there are no conflicts of interest.

#### Acknowledgments

This work was supported by the Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior.

#### References

- Albina, J.E., Mastrofrancesco, B., Vessella, J.A., Louis, C.A., Henry Jr., W.L., Reichner, J.S., 2001. HIF-1 expression in healing wounds: HIF-1 $\alpha$  induction in primary inflammatory cells by TNF- $\alpha$ . *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 281, C1971–C1977.
- Andrade, Z.A., Cheever, A.W., 1971. Alterations of the intrahepatic vasculature in hepatosplenic *Schistosomiasis mansoni*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 20, 425–432.
- Arrais-Silva, W.W., Paffaro Jr., V.A., Yamada, A.T., Giorgio, S., 2005. Expression of hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  in the cutaneous lesions of BALB/c mice infected with *Leishmania amazonensis*. *Exp. Mol. Pathol.* 78, 49–54.
- Baptista, A.P., Andrade, A.A., 2005. Angiogenesis and schistosomal granuloma formation. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 100, 183–185.
- Bassnett, S., McNulty, R., 2003. The effect of elevated intraocular oxygen on organelle degradation in the embryonic chicken lens. *J. Exp. Biol.* 206, 4353–4361.
- Blouin, C.C., Page, E.L., Soucy, G.M., Richard, D.E., 2004. Hypoxic gene activation by lipopolysaccharide in macrophages: implication of hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$ . *Blood* 103, 1124–1130.
- Botusan, I.R., Sunkari, V.G., Savu, O., Catrina, A.I., Grünler, J., Lindberg, S., Pereira, T., Väli-Herttua, S., Poellinger, L., Brismar, K., Catrina, S.B., 2008. Stabilization of HIF-1 $\alpha$  is critical to improve wound healing in diabetic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 105, 19426–19431.
- Burke, M.L., Jones, M.K., Gobert, G.N., Li, Y.S., Ellis, M.K., McManus, D.P., 2009. Immunopathogenesis of human schistosomiasis. *Parasite Immunol.* 31, 163–176.
- Carmeliet, P., 2005. Angiogenesis in life, disease and medicine. *Nature* 438, 932–936.
- Catrina, S.B., Okamoto, K., Pereira, T., Brismar, K., Poellinger, L., 2004. Hyperglycemia regulates hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  protein stability and function. *Diabetes* 53, 3226–3232.
- Cheever, A.W., Lenzi, J.A., Lenzi, H.L., Andrade, Z.A., 2002. Experimental models of *Schistosoma mansoni* infection. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 97, 917–940.
- Couto, J.L.A., Vieira, R.C.S., Barbosa, J.M., Machado, S.S., Ferreira, H.S., 2008. Alterações da função hepática de camundongos desnutridos e infectados pelo *Schistosoma mansoni*. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 41, 390–393.
- Degrossoli, A., Bosetto, M.C., Lima, C.B.C., Giorgio, S., 2007. Expression of hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  in mononuclear phagocytes infected with *Leishmania amazonensis*. *Immunol. Lett.* 114, 119–125.
- Edungbola, L.C., Shiller, L.E., 1979. Histopathology of hepatic and pulmonary granulomata experimentally induced with eggs of *Schistosoma mansoni*. *J. Parasitol.* 65, 253–261.
- Feldman, G.M., Dannenberg Jr., A.M., Seed, J.L., 1990. Physiologic oxygen tensions limit oxidant-mediated killing of schistosome eggs by inflammatory cells and isolated granulomas. *J. Leukoc. Biol.* 47, 344–354.
- Freedman, D.O., Ottesen, E.A., 1988. Eggs of *Schistosoma mansoni* stimulate endothelial cell proliferation *in vitro*. *J. Infect. Dis.* 158, 556–562.
- Gobert, G.M., Chai, M., McManus, D.P., 2007. Biology of the schistosome lung-stage schistosomulum. *Parasitology* 134, 453–460.
- Haeberle, H.A., Durrstein, C., Rosenberger, P., Hosakote, Y.M., Kuhlicke, J., Kempf, V.A., Garofalo, R.P., Eltzschig, H.K., 2008. Oxygen-independent stabilization of hypoxia inducible factor (HIF)-1 during RSV infection. *PLoS ONE* 3, e3352.
- Höckel, M., Vaupel, P., 2001. Tumor hypoxia: definitions and current clinical, biologic, and molecular aspects. *J. Natl. Cancer Inst.* 93, 266–276.
- Janssen, H.L., Hausermans, K.M., Sprong, D., Blommestein, G., Hofland, L., Hoebbers, F.J., Blijweert, E., Raleigh, J.A., Semenza, G.M., Varia, M.A., Balm, A.J., van Velthuisen, M.L., Delaere, P., Sciort, R., Begg, C., 2002. HIF-1 $\alpha$ , pimonidazole, and iododoxyuridine to estimate hypoxia and perfusion in human head-and-neck tumors. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 54, 1537–1549.
- Jiang, B.H., Semenza, G.L., Bauer, C., Marti, H.H., 1996. Hypoxia-inducible factor 1 levels vary exponentially over a physiologically relevant range of O<sub>2</sub> tension. *Am. J. Physiol.* 271, C1172–C1180.

- Kanse, S.M., Liang, O., Schubert, U., Haas, H., Preissner, K.T., Doenhoff, M.J., Dennis, R.D., 2005. Characterization and partial purification of *Schistosoma mansoni* egg-derived pro-angiogenic factor. *Mol. Biochem. Parasitol.* 144, 76–85.
- Kempf, V.A.J., Lebedziejewski, M., Alitalo, K., Wälzlein, J., Ehehalt, U., Fiebig, J., Huber, S., Schütt, B., Sander, C.A., Müller, S., Grassl, G., Yazdi, A.S., Brehm, B., Autenrieth, I.B., 2005. Activation of hypoxia-inducible factor-1 in bacillary angiomatosis. Evidence for a role of hypoxia-inducible factor-1 in bacterial infections. *Circulation* 111, 1054–1062.
- Kietzmann, T., Görlach, A., 2005. Reactive oxygen species in the control of hypoxia-inducible-factor-mediated gene expression. *Semin. Cell Dev. Biol.* 16, 474–486.
- Klinkenberg, L.G., Sutherland, L.A., Bishai, W.R., Karakousis, P.C., 2008. Metronidazole lacks activity against *Mycobacterium tuberculosis* in an In Vivo hypoxic granuloma model of latency. *J. Infect. Dis.* 198, 275–283.
- Lenzi, H.L., Romanha, W.S., Santos, R.M., Rosas, A., Mota, E.M., Manso, P.P., Caputo, L.F., Pelajo-Machado, M., 2006. Four whole-istic aspects of schistosome granuloma biology: fractal arrangement, internal regulation, autopoietic component and closure. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 101, 219–231.
- Loeffler, D.A., Lundy, S.K., Singh, K.P., Gerard, H.C., Hudson, A.P., Boros, D.L., 2002. Soluble egg antigens from *Schistosoma mansoni* induce angiogenesis-related processes by up-regulating vascular endothelial growth factor in human endothelial cells. *J. Infect. Dis.* 185, 1650–1656.
- Lopes, L.C., Santos, V.C.R., Souza, V.L.R.B., Rodrigues, J.R.C., 2006. Histopathological study of *Schistosoma mansoni* infection in the murine model using the PC (Pará) and LILA (Maranhão) strains. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 10, 273–277.
- Nizet, V., Johnson, R.S., 2009. Interdependence of hypoxic and innate immune responses. *Nat. Rev. Immunol.* 9, 609–617.
- Pagé, E.L., Chan, D.A., Giaccia, A.J., Levine, M., Richard, D.E., 2008. Hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  stabilization in nonhypoxic conditions: role of oxidation and intracellular ascorbate depletion. *Mol. Biol. Cell* 19, 86–94.
- Park, J.E., Keller, G.A., Ferreira, N., 1993. The vascular endothelial growth factor (VEGF) isoforms: differential deposition into the subepithelial extracellular matrix and bioactivity of extracellular matrix-bound VEGF. *Mol. Biol. Cell* 4, 1317–1326.
- Pearce, E.J., MacDonald, A.S., 2002. The immunobiology of schistosomiasis. *Nat. Rev. Immunol.* 2, 499–511.
- Pugh, C.W., Ratcliffe, P.J., 2003. Regulation of angiogenesis by hypoxia: role of the HIF system. *Nat. Med.* 9, 677–684.
- Raleigh, J.A., Chou, S.C., Arteel, G.E., Horsman, M.R., 1999. Comparisons among pimonidazole binding, oxygen electrode measurements, and radiation response in C3H mouse tumors. *Radiat. Res.* 151, 580–589.
- Ramos, M.A., Kuzuya, M., Esaki, T., Miura, S., Satake, S., Asai, T., Kanda, S., Hayashi, T., Iguchi, A., 1998. Induction of macrophage VEGF in response to oxidized LDL and VEGF accumulation in human atherosclerotic lesions. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 18, 1188–1196.
- Rasey, J.S., Hofstrand, P.D., Chin, L.K., Tewson, T.J., 1999. Characterization of [18F] fluorodeoxyglucose, a new radiopharmaceutical for detecting tumor hypoxia. *J. Nucl. Med.* 40, 1072–1079.
- Semenza, G.L., Agani, F., Feldser, D., Iyer, N., Kotch, L., Laughner, E., Yu, A., 2000. Hypoxia, HIF-1, and the pathophysiology of common human disease. *Adv. Exp. Med. Biol.* 475, 123–130.
- Shi, S.R., Key, M.E., Kalra, K.L., 1991. Antigen retrieval in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues: an enhancement method for immunohistochemical staining based on microwave oven heating of tissue sections. *J. Histochem. Cytochem.* 39, 741–748.
- Sobhanifar, S., Aquino-Parsons, C., Stanbridge, E.J., Olive, P., 2005. Reduced expression of hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  in perinecrotic regions of solid tumors. *Cancer Res.* 65, 7259–7266.
- Spear, W., Chan, D., Coppens, I., Johnson, R.S., Giaccia, A., Blader, I.J., 2006. The host cell transcription factor hypoxia-inducible factor 1 is required for *Toxoplasma gondii* growth and survival at physiological oxygen levels. *Cell. Microbiol.* 8, 339–352.
- Stadecker, M.J., 1999. The development of granulomas in schistosomiasis: genetic backgrounds, regulatory pathways, and specific egg antigen responses that influence the magnitude of disease. *Microbes Infect.* 1, 505–510.
- Stavitsky, A.B., 2004. Regulation of granulomatous inflammation in experimental models of schistosomiasis. *Infect. Immun.* 72, 1–12.
- Uchida, T., Rossignol, F., Matthay, M.A., Mounier, R., Couette, S., Clottes, E., Clerici, C., 2004. Prolonged hypoxia differentially regulates hypoxia-inducible factor (HIF)-1 $\alpha$  and HIF-2 $\alpha$  expression in lung epithelial cells: implication of natural antisense HIF-1 $\alpha$ . *J. Biol. Chem.* 279, 14871–14878.
- Vaupel, P., Harrison, L., 2004. Tumor hypoxia: causative factors, compensatory mechanisms, and cellular response. *Oncologist* 9, 4–9.
- Via, L.E., Lin, P.L., Ray, S.M., Carrillo, J., Allen, S.S., Eum, S.I., Taylor, K., Klein, E., Manjunatha, U., Gonzales, J., Lee, E.G., Park, S.K., Raleigh, J.A., Cho, S.N., McMurray, D.N., Flynn, J.L., Barry, C.E., 2008. Tuberculous granulomas are hypoxic in guinea pigs, rabbits, and nonhuman primates. *Infect. Immun.* 76, 2333–2340.
- von Lichtenberg, F., Sher, A., McIntyre, S., 1977. A lung model of schistosome immunity in mice. *Am. J. Pathol.* 87, 105–123.
- Vordemark, D., Kraß, P., Katzer, A., Bölling, T., Willner, J., Flentje, M., 2005. Glucose requirement for hypoxic accumulation of hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ). *Cancer Lett.* 30, 122–133.
- Wilson, M.S., Mentink-Kane, M.M., Pesce, J.T., Ramalingam, T.R., Thompson, R., Wynn, T.A., 2007. Immunopathology of schistosomiasis. *Immunol. Cell Biol.* 85, 148–154.
- Yoshioka, I., Zanotti-Magalhães, E.M., Magalhães, L.A., Linares, A.X., 2002. *Schistosoma mansoni*: a study of pathogenesis of Santa Rosa strain (Campinas, SP, Brasil) in mice. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 35, 203–207.
- Zinkernagel, A.S., Johnson, R.S., Nizet, V., 2007. Hypoxia inducible factor (HIF) function in innate immunity and infection. *J. Mol. Med.* 85, 1339–1346.