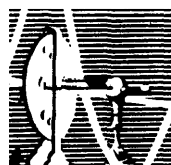


ALEX GOMES DE FREITAS

EFEITOS DA HIPÓXIA NA INFECÇÃO DE
MACRÓFAGOS PELO *Trypanosoma cruzi*

DISSERTAÇÃO SUBMETIDA À UNIVERSIDADE FEDERAL DO
RIO DE JANEIRO VISANDO A OBTENÇÃO DO GRAU DE
MESTRE EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (BIOFÍSICA)



**Universidade Federal do Rio de Janeiro
Centro de Ciências da Saúde
Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho
2010**

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Alex Gomes de Freitas

EFEITOS DA HIPÓXIA NA INFECÇÃO DE
MACRÓFAGOS PELO *Trypanosoma cruzi*

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação do Instituto
de Biofísica Carlos Chagas Filho da
Universidade Federal do Rio de Janeiro
Como parte dos requisitos necessários à
obtenção do título de Mestre em Ciências
(Biofísica).

Orientador: George Alexandre dos Reis

Rio de Janeiro
2010

Freitas, Alex Gomes.

Efeitos da hipóxia na infecção de macrófagos pelo *Trypanosoma cruzi* / Alex Gomes de Freitas

Freitas – Rio de Janeiro: UFRJ/IBCCF, 2010

107 Págs.

Orientador: George Alexandre dos Reis

Dissertação (mestrado) – UFRJ/ Instituto de Biofísica Carlos Chagas

Filho/Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas – Biofísica, 2010.

Referência bibliográfica: f. - .

1. Hipóxia. 2. Macrófagos. 3. *Trypanosoma cruzi*. 4. Eferocitose. 5. Citocinas

I. DosReis, G. A. Universidade Federal do Rio de Janeiro

Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas. III. Título.

EFEITOS DA HIPÓXIA NA INFECÇÃO DE
MACRÓFAGOS PELO *Trypanosoma cruzi*

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO SUBMETIDA À UNIVERSIDADE
FEDERAL DO RIO DE JANEIRO VISANDO A OBTENÇÃO DO
TÍTULO DE MESTRE EM CIÊNCIAS

Aprovada por:

Dr. Alexandre dos Santos Pyrrho

Dr. Bruno Lourenço Diaz

Dr. Marcelo Einicker Lamas

Dra. Roberta Olmo Pinheiro (Suplente externo)

Dra. Marcela de Freitas Lopes (Suplente interno)

Dr. Norton Heise (Revisor)

Dr. George Alexandre dos Reis (Orientador)

Rio de Janeiro
30 de março de 2010

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Biologia Imunitária do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, UFRJ, sob a orientação do Dr. George Alexandre dos Reis.

**Aos meus pais, Robson e Neuzi, e ao meu “pai postiço”
Jesus Caamaño pelo imenso amor com o qual me criaram,
pelo incentivo e apoio incondicionais
as minhas decisões e por sempre acreditarem
em meu potencial. Aos meus irmãos pela amizade e cumplicidade.**

"Arte de ser ora audacioso, ora prudente é a arte de vencer."
Napoleão Bonaparte

Agradecimentos

À Deus, que me possibilitou saúde, capacidade e pessoas maravilhosas em minha vida, indispensáveis para a realização deste trabalho.

Ao professor George Alexandre DosReis, pela oportunidade de trabalhar em seu grupo, pela orientação e amizade.

À minha família, pelos ensinamentos, pelo caráter, e principalmente, apoio nos momentos mais difíceis.

À Ana Beatriz Freitas de Oliveira, pelo companheirismo e cumplicidade, e pela enorme paciência.

À Alessandra Filardy, por toda atenção e auxílio.

Ao professor Norton Heise e Carolina Koeller pelo auxílio e amizade.

Aos meus irmãos Anderson, André e Karina pela amizade e apoio.

À Jorgete Logullo pelo carinho, amizade e auxílio técnico.

Ao Lindomar Miranda, por toda a assistência, pelo bom humor e pela amizade.

Aos amigos do laboratório que me apoiaram para a realização deste trabalho.

A todos que de uma forma ou de outra contribuíram para a realização deste trabalho.

Sumário

LISTA DE FIGURAS	xii
LISTA DE TABELAS	xiv
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	xv
RESUMO	xvii
ABSTRACT	xviii
1- INTRODUÇÃO	1
1.1- Doença de Chagas: Aspectos gerais	1
1.2- Resposta imune à infecção pelo <i>Trypanosoma cruzi</i>	3
1.3- Apoptose e Doença de Chagas	8
1.4- Hipóxia: Aspectos gerais	10
1.5- O fator de transcrição: HIF-1	11
1.6- Efeitos da hipóxia em macrófagos	14
1.7- Hipóxia e infecções parasitárias	17
2- OBJETIVOS	19
2.1- Objetivos gerais	19
2.2- Objetivos específicos	19
3- MATERIAL E MÉTODOS	20
3.1- Animais	20
3.2- Meio de cultura	20
3.3- Parasitas	20
3.4- Obtenção do ambiente hipóxico	21
3.5- Obtenção de macrófagos e avaliação da carga parasitária	22
3.6- Obtenção de timócitos apoptóticos e necróticos	23

3.7- Ensaio de viabilidade celular	24
3.8- Determinação da produção de nitritos	24
3.9- Dosagem de espécies reativas de oxigênio	25
3.10- Análise da expressão de HIF-1 α por ELISA	26
3.11- Dosagem de citocinas	26
3.12- Análise estatística	28
4- RESULTADOS	29
4.1- Análise do ambiente hipóxico	29
4.2- Análise da viabilidade celular de macrófagos em ambiente hipóxico	31
4.3- Análise da expressão de HIF-1 α em ambiente hipóxico	33
4.4- Análise da influência do ambiente hipóxico no pH das monocamadas em cultura	34
4.5- Produção de nitritos em ambiente hipóxico	36
4.6- Efeito da hipóxia na produção de espécies reativas de oxigênio	37
4.7- Análise da infecção pelo <i>T. cruzi</i> em ambiente hipóxico	38
4.8- Produção de nitritos em ambiente hipóxico durante a infecção pelo <i>T. cruzi</i>	43
4.9- Análise da influência da hipóxia na infectividade do <i>T. cruzi</i>	45
4.10- Efeito do L-NIL na produção de NO e na carga parasitária	47
4.11- Análise dos efeitos da hipóxia na eferocitose	51
4.12- Efeito da eferocitose na replicação do <i>T. cruzi</i> em condições de hipóxia	53
4.13- Análise do efeito dose-resposta à adição de poliamina em ambiente hipóxico	55
4.14- Efeito da eferocitose na produção de NO em hipóxia	57
4.15- Perfil da produção de citocinas em ambiente hipóxico	59
4.16- Análise da neutralização de citocinas na infecção pelo <i>T. cruzi</i> em	63

ambiente hipóxico

5- DISCUSSÃO	65
6- CONCLUSÕES	75
8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	76

Lista de Figuras

FIGURA 1 – ANÁLISE DO AMBIENTE HIPÓXICO	30
FIGURA 2 – VIABILIDADE DE MACRÓFAGOS EM AMBIENTE DE NORMÓXIA OU HIPÓXIA	32
FIGURA 3 – ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE HIF-1 α EM MACRÓFAGOS MANTIDOS EM NORMÓXIA OU HIPÓXIA	33
FIGURA 4 – ANÁLISE DE INFLUÊNCIA DA HIPÓXIA NO pH DO MEIO DE CULTURA DE MACRÓFAGOS	35
FIGURA 5 – EFEITO DA HIPÓXIA NA PRODUÇÃO DE NO POR MACRÓFAGOS ESTIMULADOS POR LPS OU LPS/IFN- γ	36
FIGURA 6 - EFEITO DA HIPÓXIA NA PRODUÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO POR MACRÓFAGOS ESTIMULADOS POR LPS/IFN- γ	37
FIGURA 7 – CINÉTICA DA INFECÇÃO DE MACRÓFAGOS PELO <i>T. cruzi</i> EM AMBIENTE DE NORMÓXIA OU HIPÓXIA	39
FIGURA 8 – EFEITO DA HIPÓXIA NA INFECÇÃO PELO <i>T. cruzi</i>	42
FIGURA 9 – EFEITO DA HIPÓXIA NA PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO DURANTE A INFECÇÃO PELO <i>T. cruzi</i>	44
FIGURA 10 – EFEITOS DA HIPÓXIA NA INFECTIVIDADE DO <i>T. cruzi</i>	46
FIGURA 11A – BLOQUEIO DA PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO POR L-NIL DURANTE A INFECÇÃO PELO <i>T. cruzi</i>	48
FIGURA 11B – EFEITO DA INIBIÇÃO DA SÍNTESE DE NO POR L-NIL NA INFECÇÃO PELO <i>T. cruzi</i> EM AMBIENTE DE NORMÓXIA E HIPÓXIA.	50
FIGURA 12 – EFEITOS DA HIPÓXIA NA EFEROCITOSE.	52
FIGURA 13 – EFEITOS DA ADIÇÃO DE CÉLULAS APOPTÓTICAS E NECRÓTICAS NA INFECÇÃO PELO <i>T. cruzi</i> EM MACRÓFAGOS MANTIDOS EM NORMÓXIA OU HIPÓXIA.	54
FIGURA 14 – DOSE –RESPOSTA DA ADIÇÃO DE PUTRESCINA NA LIBERAÇÃO DE FORMAS TRIPOMASTIGOTAS NO SOBRENADANTE DE CULTURAS DE MACRÓFAGOS INFECTADOS	

SUBMETIDOS À NORMÓXIA OU AMBIENTE DE HIPÓXIA.	56
FIGURA 15 – EFEITO DIFERENCIAL DE CÉLULAS APOPTÓTICAS E NECRÓTICAS NA PRODUÇÃO DE NO.	58
FIGURA 16 – PERFIL DE PRODUÇÃO DE CITOCINAS PRÓ- INFLAMATÓRIAS CULTURAS DE MACRÓFAGOS MANTIDOS EM AMBIENTE DE NORMÓXIA OU HIPÓXIA XIA.	60
FIGURA 17 – PERFIL DE PRODUÇÃO DE TGF- β EM CULTURAS DE MACRÓFAGOS MANTIDOS EM AMBIENTE DE NORMÓXIA OU HIPÓXIA.	62
FIGURA 18 – EFEITO DA NEUTRALIZAÇÃO DO TNF- α EM AMBIENTE HIPÓXICO NA INFECÇÃO PELO <i>T. cruzi</i>	64
FIGURA 19 – MODELO COMPARATIVO DOS EFEITOS DA EFEROCITOSE NA REPLICAÇÃO DO <i>T. cruzi</i> EM MACRÓFAGOS MANTIDOS EM NORMÓXIA OU HIPÓXIA	74

Lista de Tabelas

Tabela 1. ATIVIDADE CELULAR DE MACRÓFAGOS MODIFICADA PELA HIPÓXIA.....	15
Tabela 2. INFLUÊNCIA DA HIPÓXIA NA EXPRESSÃO DE CITOCINAS E FATORES DE CRESCIMENTO PELOS MACRÓFAGOS.....	16

Lista de Abreviaturas e Siglas

AICD	morte celular induzida por ativação (do inglês: activation induced cell death)
B7-1	molécula co-estimulatória B7-1
bHLH	básico dupla hélice
CBP/p300	molécula co-ativadora CBP/p300
DCFH-DA	2',7' diclorofluoresceína diacetato
DC	célula dendrítica
EPO	eritropoetina
FAD	flavina adenina dinucleotídeo
FIH-1	fator inibidor de HIF-1
HIF-1	fator de transcrição induzível por hipóxia – 1
HIF-1 α	fator de transcrição induzível por hipóxia – 1 sub-unidade α
HIF-1 β	fator de transcrição induzível por hipóxia – 1 sub-unidade β
IFN- γ	interferon gama
Ig	imunoglobulina
IL	interleucina
iNOS	óxido nítrico sintase induzível
L-NIL	L- Dihidrocloreto -N6- (1- iminoetil) lisina
mmHg	milímetros de mercúrio
MTT	Brometo de (3-(4,5-dimetiltiazol-2il)-2,5-difeniltetrazólio)
NF- κ B	fator nuclear κ B
NK	células “natural killer”
ODC	ornitina decarboxilase
ODD	domínio dependente de oxigênio
PAS	domínio Per-Arnt-Sim
PGE ₂	prostaglandina E ₂
PHD	prolil hidroxilase
pO ₂	pressão parcial de Oxigênio
pVHL	proteína supressora de tumor Von Hippel Lindau
RTK	receptores tirosina kinase
SEM	erro padrão

SFB	soro fetal bovino
TAD	domínio de transativação
T CD4 ⁺	células T CD4 ⁺
T CD8 ⁺	células T CD8 ⁺
TGF- β	fator transformador de crescimento do tipo beta
Th1	linfócito T helper do tipo 1
Th2	linfócito T helper do tipo 2
TNF- α	fator de necrose tumoral do tipo alfa
VEGF	fator de crescimento vascular endotelial

Resumo

FREITAS, Alex Gomes. EFEITOS DA HIPÓXIA NA INFECÇÃO DE MACRÓFAGOS PELO *Trypanosoma cruzi*. Rio de Janeiro, 2010. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas – Biofísica) – IBCCF, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2010

Células do sistema imune são submetidas a diversas condições fisiológicas e patofisiológicas, incluindo hipóxia tecidual. A adaptação de células do sistema imune a condições de hipóxia e as correspondentes mudanças nas suas funções efetoras podem proteger tecidos saudáveis dos efeitos nocivos causados por células do sistema imune reativas em microambientes teciduais inflamados. A doença de Chagas é causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*. Há evidências clínicas e experimentais que agregados plaquetários na microcirculação cardíaca e áreas hipóxicas estão associadas com a injúria do miocárdio. Entretanto, o papel da hipóxia na infecção de macrófagos pelo *T. cruzi* ainda não foi investigada. Neste estudo, comparamos o efeito de 2% da pressão parcial de oxigênio (hipóxia) com a pressão parcial de oxigênio de 21% (normóxia) na infecção de macrófagos pelo protozoário parasita *T. cruzi*. Nossos resultados demonstram que macrófagos peritoneais mantidos com condições de hipóxia mostram uma significativa diminuição na produção de NO, ROS e na replicação do parasita. A hipóxia diminui a efetocitose de uma maneira tempo-dependente e leva à uma replicação deficiente do *T. cruzi* em resposta à adição de putrescina. Macrófagos peritoneais mantidos em condições de hipóxia e estimulados por células apoptóticas apresentam mudanças no perfil de produção de citocinas, com aumento na produção de TNF- α e IL-1 β , sem afetar a produção de TGF- β . Nós sugerimos que o TNF- α é um importante fator que contribui para a diminuição da replicação do *T. cruzi*. Nossos resultados indicam que a eferocitose modula a replicação do *T. cruzi* e a produção de citocinas mesmo em condições de hipóxia.

Abstract

FREITAS, Alex Gomes. EFFECT OF HYPOXIA ON MACROPHAGE INFECTION BY *Trypanosoma cruzi*. Rio de Janeiro, 2010. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas – Biofísica) – IBCCF, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2010

Cells of the immune system are subject to various physiological and pathophysiological conditions, including tissue hypoxia. The adaptation of immune cells to hypoxia and corresponding changes in their effector functions can protect healthy tissue against excessive collateral damage by overactive immune cells in inflamed tissue microenvironments. Chagas disease is caused by the protozoan *Trypanosoma cruzi*. There is both clinical and experimental evidence that platelet aggregates in the cardiac microcirculation and hypoxic changes are associated with injury of the myocardium. However, the role of hypoxia in infection of macrophages by *T. cruzi* has not been investigated. In the present study, we compared the effect of 2% oxygen tension (hypoxia) with a normal tension of 21% oxygen (normoxia) on macrophage infection by the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi*. Here we show that peritoneal macrophages maintained in a hypoxic condition showed a significant decrease on NO and ROS production and on parasite replication. Hypoxia diminishes the efferocytosis in a time-dependent manner and led to a deficient *T. cruzi* replication in response to putrescine addition. Peritoneal macrophages maintained in a hypoxic condition and stimulated by apoptotic cells showed changes on cytokine production profile, with increased production of TNF- α and IL-1 β , without affecting production of TGF- β . We suggest that TNF- α is an important factor that contributes to the decrease of *T. cruzi* replication. Taken together, our results indicate that efferocytosis modulates *T. cruzi* replication and production of cytokines, even under hypoxic conditions.

1. Introdução

1.1 – DOENÇA DE CHAGAS : ASPECTOS GERAIS

Cerca de 100 anos após a primeira descrição feita por Carlos Chagas, a doença de Chagas também conhecida como Tripanossomíase Americana (CHAGAS, 1909) continua sendo um sério problema de saúde pública na região das Américas que se estende desde o México até a Argentina, e é considerada a causa significativa de morbidade e mortalidade em muitos países da região das América do Sul e Central. (MONCAYO & SILVEIRA, 2009).

Embora a incidência da doença de Chagas tenha diminuído através da implantação de campanhas para a erradicação do vetor transmissor, melhor controle da qualidade de componentes sanguíneos e de transfusões de sangue (COURA & DIAS, 2009), estima-se que há cerca de 10 milhões de indivíduos infectados na América Latina e entre 100 e 120 milhões de indivíduos com potencial risco de contrair a infecção (PAHO, 2007).

A doença de Chagas é causada pelo protozoário flagelado *Trypanosoma cruzi* pertencente da Ordem Kinetoplastida e da família Trypanosomatidae. O *T. cruzi* é um parasita intracelular obrigatório que possui um ciclo de vida heteroxênico, alternando entre estágios morfo e fisiologicamente distintos tanto nos hospedeiros invertebrados, insetos triatomíneos, como nos hospedeiros vertebrados, o homem e diversos mamíferos (revisado em MARTIM & TARLETON, 2004).

A transmissão vetorial inicia-se quando o inseto triatomíneo hematófago, ao se alimentar, elimina através de suas fezes/ urina as formas infectivas tripomastigotas metacíclicas do *T. cruzi*, o indivíduo ao coçar o local da picada, inocula o parasita através de microfissuras presentes na pele (ENGMAN & LEON, 2002).

Ao ultrapassar a barreira epitelial, as formas infectivas tripomastigotas metacíclicas do *T. cruzi* podem invadir diferentes tipos celulares do hospedeiro mamífero, escapar do vacúolo parasitóforo e, em seguida, no ambiente citoplasmático celular, diferenciarem-se em formas amastigotas replicativas. Após efetuar sucessivas divisões, as formas amastigotas diferenciam-se em formas tripomastigotas que, ao romperem as células, são capazes de infectar células adjacentes e também, podem ser carreadas pela circulação sanguínea onde adquirem a capacidade de infectar outros tecidos distantes do local inicial de infecção. O ciclo se completa quando os insetos triatomíneos hematófagos, durante o repasto sanguíneo, alimentam-se do sangue contendo as formas tripomastigotas sanguíneas do *T. cruzi* (revisado em MARTIM & TARLETON, 2004).

A transmissão congênita, a transmissão por transfusão sanguínea e por via oral também podem ser consideradas como mecanismos relevantes de infecção pelo *T. cruzi* (WENDEL, 1998; YOSHIDA, 2009).

Após o período inicial da infecção pelo *T. cruzi*, indivíduos entram em uma fase aguda que perdura por cerca de 2 a 4 meses e é caracterizada pelo alto grau de parasitemia. Com exceção do edema que aparece no sítio inicial da infecção, os sinais e sintomas associados com a fase aguda da doença de Chagas são em sua maioria não-específicos, resultando na dificuldade de detecção da doença em estágios iniciais (SOSA-ESTANI & SEGURA, 2006; BERN *et al.*, 2007). Se no estágio inicial a infecção não é tratada e controlada, indivíduos entram na fase crônica, sendo esta transição da fase aguda para fase crônica acompanhada por uma marcante diminuição na parasitemia. Isto se deve a uma resposta imune efetiva, que mantém a frequência da parasitemia abaixo de níveis detectáveis no hospedeiro durante todo o período da fase crônica da doença de Chagas. Apesar dos níveis baixos de parasitemia, é durante a fase crônica que indivíduos podem desenvolver as formas patológicas mais severas da doença de Chagas (ROCHA *et al.*, 2007).

As características clínicas e a evolução da fase aguda e crônica são determinadas pela combinação de fatores inerentes ao parasita como tropismo, mecanismo de evasão, modo de inoculação, bem como de fatores inerentes ao hospedeiro, como uma resposta imune exarcebada (COURA, 2007).

1.2 - RESPOSTA IMUNE À INFECÇÃO PELO *TRYPANOSOMA CRUZI*

Em modelos experimentais, o *T. cruzi* é capaz de estabelecer uma infecção crônica sem que ocorra uma cura espontânea. Estes achados sugerem um potente mecanismo que foi desenvolvido por esse patógeno a fim de evadir a detecção e a sua destruição pelo sistema imune. Entre esses mecanismos, está a capacidade do *T. cruzi* de invadir e se replicar em muitos tipos celulares diferentes (LEIRIAO *et al.*, 2004; DENKERS & BUTCHER, 2005).

A infecção pelo *T. cruzi* desencadeia simultaneamente diversas respostas do sistema imune inato e adaptativo, efetuadas por macrófagos, linfócitos B, linfócitos T e citocinas que controlam a parasitemia na fase aguda (TEIXEIRA *et al.*, 2002).

O mecanismo clássico proposto para um modelo de resposta imune na fase aguda da infecção pelo *T. cruzi* envolve a síntese da citocina interleucina-12 (IL-12) por macrófagos. Esta citocina ativa as células Natural Killer (NK), que por sua vez respondem sintetizando interferon-gama (IFN- γ). As células NK são uma importante fonte de IFN- γ antes do desenvolvimento de uma resposta imune mediada por células T e um importante elemento inato da resistência imune do hospedeiro à infecção pelo *T. cruzi* (GAZZINELLI *et al.*, 1993).

Estudos mostram que a infecção de macrófagos pelo *T. cruzi* é capaz de induzir a produção do fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) (TARLETON, 1988a; RIVERA *et al.*, 1995; CHANDRASEKAR *et al.*, 1996). SOUZA *et al.*, (2004) demonstraram que a exposição

in vitro à formas tripomastigotas do *T. cruzi* induz a expressão de TNF- α em monócitos de pacientes cardíacos.

O TNF- α , citocina pró-inflamatória produzida por macrófagos participa de forma sinérgica tanto com a IL-12 como com o IFN- γ na resistência do hospedeiro durante a infecção pelo *T. cruzi* (OSWALD *et al.*, 1992). Entretanto, o papel do TNF- α na resposta imune inata do hospedeiro pode gerar tanto efeitos deletérios como protetores (RUSSO *et al.*, 1989).

O papel protetor do TNF- α foi demonstrado através de estudos envolvendo camundongos deficientes geneticamente para esta citocina. Neste modelo, os camundongos deficientes para TNF- α apresentaram alta parasitemia e mortalidade quando infectados pelo *T. cruzi* (LIMA *et al.*, 1997). O efeito observado pode ser atribuído, em parte, à uma deficiência da expressão de moléculas de adesão pelo endotélio vascular que como resultante gera uma incapacidade dos macrófagos e linfócitos de serem direcionados para o tecido infectado (DOSREIS, 2000).

Em associação com o TNF- α , o IFN- γ produzido por células NK ativa a expressão em macrófagos da enzima óxido nítrico sintase induzida (iNOS) resultando em um aumento da produção de NO (GAZZINELLI *et al.*, 1992; OSWALD *et al.*, 1992).

O NO é um gás de baixo peso molecular que está envolvida nos mais variados processos biológicos. Sua produção ocorre pela catálise enzimática do aminoácido essencial L-arginina e é decorrente da ação de uma família de isoenzimas expressas em uma grande variedade de células de mamíferos (SPRINGALL, 1995). Em condições homeostáticas o NO é produzido em baixas concentrações por enzimas constitutivas e participa de mecanismos que estão envolvidos com a sinalização celular e citoproteção (CHEN & DEEN, 2001).

Por outro lado, o aumento da produção de NO mediante a ação de enzimas induzíveis por estímulos inflamatórios gera uma importante função desta molécula na resposta imune, a

atividade microbicida (DE GROOTE & FANG, 1995; FANG, 1997, NATHAN & SHILOH, 2000).

Durante a infecção pelo *T. cruzi*, o NO pode diretamente ou indiretamente modular as funções efetoras leucocitárias através de diversos mecanismos. Este processo envolve efeitos microbicidas derivados de radicais livres tóxicos como o ânion peroxinitrito (ONOO⁻) e o ânion superóxido (O₂⁻) que são gerados após a produção de NO. Estes radicais livres tóxicos estão envolvidos no controle da parasitemia induzida pelo *T. cruzi* e diretamente podem matar o parasita *in vitro* (PELUFFO *et al.*, 2004).

O NO causa modificações químicas de proteínas contendo resíduos de cisteína e tirosina e, é também capaz de se ligar a metaloproteínas que participam de processos metabólicos essenciais para o *T. cruzi* (VENTURINI *et al.*, 2000). A toxicidade do NO é dependente da sensibilidade do parasita, que difere entre as cepas de acordo com o microambiente. O NO é descrito como uma das principais moléculas efetoras envolvidas na destruição das formas amastigotas do *T. cruzi* pelos macrófagos (NATHAN & SHILOH, 2000, COLASANTI *et al.*, 2002, SILVA *et al.*, 2003), e na redução da produção de fatores de crescimento essenciais para o metabolismo do parasita (CICCARELLI *et al.*, 2007).

Contraditoriamente, evidências sugerem que cepas de camundongos susceptíveis a infecção pelo *T. cruzi* apresentam um aumento na ativação de macrófagos após o contato com o parasita, sugerindo que nestes animais, a infecção com o *T. cruzi* induz um excesso na produção NO e superóxido (RUSSO *et al.*, 1989, CARDONI *et al.*, 1990, ARANTES *et al.*, 2004).

Estes estudos possuem particular relevância dentro do contexto da infecção pelo *T. cruzi*, desde que foi descrito que o parasita é capaz de gerar um bloqueio energético da célula do hospedeiro, sem alterar a ultra estrutura organelar da mitocôndria (UYEMURA *et al.*, 1995). Em suma, mostra uma possibilidade em que o *T. cruzi* possa controlar a maquinaria

central responsável pelo metabolismo energético das células do hospedeiro, a fim de acessar metabólitos que são cruciais para a proliferação do parasita (SCHWARCZ DE TARLOVSKY *et al.*, 1995; BAEZ *et al.*, 2008).

SILVA *et al.*, (1991) mostram que durante a fase aguda da infecção pelo *T. cruzi*, células esplênicas de camundongos infectados produzem elevados níveis de fator de transformação e crescimento-beta (TGF- β) ativo *in vitro*. REED *et al.*, (1994) demonstraram que células esplênicas de camundongos suscetíveis à infecção pelo *T. cruzi* produzem maior quantidade de interleucina-10 (IL-10) quando comparados com camundongos resistentes à infecção pelo parasita.

Diversas citocinas podem exercer efeitos antagônicos dentro de um processo imunológico. Evidências sugerem que a resposta imune inata contra o *T. cruzi* pode se autorregular, reduzindo a ativação dos macrófagos e a produção local de NO. Estudos *in vitro*, demonstram que a IL-10 e o TGF- β são capazes de inibir a produção de NO e a atividade tripanocida de macrófagos infectados pelo *T. cruzi* e ativados por IFN- γ (GAZZINELLI *et al.*, 1992). A IL-10 é capaz de proteger o hospedeiro, neutralizando a toxicidade da resposta imune causada por citocinas do tipo Th1 durante a infecção pelo *T. cruzi* (HUNTER *et al.*, 1997).

Durante a fase aguda da infecção pelo *Trypanosoma cruzi*, ocorre ativação policlonal de linfócitos, afetando todas as populações celulares linfóides periféricas (MINOPRIO *et al.*, 1989).

Estudos mostram que as células T $\gamma\delta$ podem estar envolvidas na modulação da intensidade da parasitemia, mortalidade e na resposta inflamatória tecidual e, que este mecanismo de modulação se correlaciona com a idade do hospedeiro (CARDILLO *et al.*, 1993).

Embora as células NK exerçam um papel protetor, células T CD4⁺ e T CD8⁺ funcionais são necessárias para o controle da parasitemia e sobrevivência do hospedeiro na fase aguda da infecção pelo *T. cruzi* (TARLETON, 1995). A atividade imunoprotetora dos linfócitos T contra o parasita pode levar à formação de infiltrados inflamatórios e lesões teciduais no hospedeiro. (ROTTENBERG *et al.*, 1993; TARLETON *et al.*, 1996).

A polarização da respostas celular T CD4⁺ em padrões de produção de citocinas Th1 ou Th2 durante a infecção pelo *T. cruzi* não está inteiramente esclarecido. A infecção por *T. cruzi* não resulta em uma resposta polarizada de citocinas do tipo 1 ou 2, tanto IFN- γ como IL-10 podem ser secretados simultaneamente por diferentes tipos celulares (REED, 1988; MINOPRIO *et al.*, 1989; ZHANG & TARLETON, 1996).

A evolução da doença para a fase crônica caracteriza-se pela perda do padrão da resposta do tipo Th1 e substituição pelo padrão da resposta do tipo Th2. Durante a infecção natural, a redução da resposta Th1 pode ser um fenômeno crítico no estabelecimento de uma infecção crônica (DOSREIS, 2000). O predomínio da atividade Th2 na fase crônica da infecção pelo *T. cruzi* deve estar associado à persistência do parasito e à indução de um estágio relativamente protetor mantido pela produção de anticorpos líticos (BRENER, 1986).

A infecção aguda pelo *T. cruzi* pode ocasionar perturbações da resposta imune e de seus processos de regulação (MINOPRIO *et al.*, 1989; BRENER, 1992). Células T isoladas do estágio agudo da infecção pelo *T. cruzi* apresentam uma forte redução de sua reatividade a antígenos do parasita e a ativadores policlonais *in vitro* (ABRAHAMSOHN & COFFMAN, 1995). Diversos mecanismos de supressão de células T têm sido caracterizados, *in vitro*, na fase aguda da infecção (DOSREIS, 1997). Um desses mecanismos envolve a produção de mediadores supressivos por macrófagos ativados. Outro possível mecanismo envolve a resposta intrínseca de células T, onde a ativação via TCR-CD3 leva a morte celular programada (DOSREIS, 1997).

Mecanismos supressores de linfócitos T CD4 podem estar relacionados com a atividade secretora de macrófagos ativadas, já que a depleção de macrófagos ou o bloqueio da síntese de um de seus produtos restauram em parte a proliferação de células T na presença de mitógenos (HAREL-BELLAN *et al.*, 1985; TARLETON, 1988b). A citocina IL-10 diminui a expressão de moléculas co-estimulatórias como B7-1 e a secreção de IL-12, afetando a capacidade de ativação dos linfócitos pelos macrófagos (SILVA *et al.*, 1991; REED *et al.*, 1994; KAYE, 1995).

No estágio agudo da infecção, ocorre produção de IFN- γ , que por sua vez através do TNF- α , ativa macrófagos a liberarem metabólitos tóxicos derivados do NO que suprimem a proliferação de células T (ABRAHAMSOHN & COFFMAN 1995).

Foi descrito um defeito intrínseco do processo de ativação de células T CD4, associado à morte por apoptose (AICD) (LOPES *et al.*, 1995). Estes estudos sugerem que uma atividade imunorregulatória está presente na infecção pelo *T. cruzi*, encontrando-se exacerbada, provavelmente, pela excessiva geração de linfócitos ativados (DOSREIS, 2000). Os mecanismos reguladores, por um lado limitam o potencial patogênico contra a integridade dos tecidos do hospedeiro pelos linfócitos ativados, mas acabam permitindo a persistência do parasita levando à cronificação da infecção pelo *T. cruzi* (DOSREIS, 2000).

1.3 – APOPTOSE E DOENÇA DE CHAGAS

Do Latin *effere* significa túmulo, sepultura. Eferocitose refere-se ao processo pelo qual células apoptóticas têm seus corpúsculos apoptóticos removidos e degradados através da formação de eferossomas. O processo de eferocitose possui grande importância na manutenção da homeostasia tecidual (HENSON *et al.*, 2001). Células apoptóticas são removidas antes que percam a integridade da membrana e seu conteúdo seja liberado no

espaço extracelular. Isto previne a exposição do tecido a moléculas intracelulares que podem potencialmente causar dano. Incluindo moléculas que podem estimular respostas inflamatórias e/ou autoimunes (FINK & COOKSON, 2005).

A morte celular programada por apoptose é uma resposta biológica relevante para o desenvolvimento, renovação tecidual e homeostasia do sistema imune. Defeitos neste processo podem ocasionar mecanismos de doença (RUDIN & THOMPSON, 1997).

A apoptose pode ser induzida por parasitas unicelulares, dentre eles, inclui-se o *T. cruzi*. Neste contexto, a apoptose de leucócitos do hospedeiro exerce um importante papel imunorregulatório (DOSREIS *et al.*, 2007).

O *T. cruzi* é capaz de induzir a apoptose de linfócitos B e T (LOPES *et al.*, 1995a; MARTINS *et al.*, 1998; ZUÑIGA *et al.*, 2002; de MEIS *et al.*, 2006) causando um importante impacto na resposta imune contra o parasita. Além disso, a infecção pelo *T. cruzi* gera uma ativação policlonal de linfócitos (MINOPRIO *et al.*, 1989), que pó si só, é capaz de promover apoptose dessas células (WELSH & MCNALLY, 1999). Além disso, antígenos liberados pelo *T. cruzi* induzem a apoptose de linfócitos (LEGUIZAMÓN *et al.*, 1999; MARAÑÓN *et al.*, 2000).

A apoptose leva à uma rápida e silenciosa remoção de células mortas por células adjacentes e fagócitos profissionais (RAVICHANDRAN & LORENZ, 2007). A eferocitose de células apoptóticas gera efeitos imunossupressivos, que bloqueiam a secreção de IL-12 (VOLL *et al.*, 1997) e induz a secreção de TGF- β pelos macrófagos (FADOK *et al.*, 1998).

Macrófagos infectados com *T. cruzi* apresentam um aumento na replicação de parasitas quando expostos à linfócitos apoptóticos (NUNES *et al.*, 1998; FREIRE-DE-LIMA *et al.*, 2000). O *T. cruzi* não é capaz de sintetizar putrescina, uma poliamina essencial para o crescimento do parasita. Por isso, depende da putrescina produzida pelas células do hospedeiro para o seu crescimento intracelular (ARIYANAYAGAM *et al.*, 2003).

Linfócitos apoptóticos são capazes de se ligar à receptores de vitronectina expressos em macrófagos, levando à produção de prostaglandina E2 (PGE2) e TGF- β pelo macrófago. Estes fatores induzem as atividades, Arginase (JOHANN *et al.*, 2007) e Ornitina Decarboxilase (ODC) que resulta, em última análise, na síntese de putrescina, que funciona como fator de crescimento essencial para o *T. cruzi* (FREIRE-DE-LIMA *et al.*, 2000). Este efeito deletério das células apoptóticas é abolido por inibidores da síntese de prostaglandinas e pela utilização de anticorpos neutralizantes contra TGF- β (FREIRE-DE-LIMA *et al.*, 2000).

1.4 - HIPÓXIA : ASPECTOS GERAIS

O oxigênio molecular possui uma grande importância dentro de diversos processos celulares, dentre os quais o mais notável é a produção de ATP pelo processo de fosforilação oxidativa mitocondrial das células de mamíferos. A homeostasia de O₂ requer um estreito limite, a fim de evitar possíveis danos causados pela hiperóxia ou o bloqueio de processos metabólicos das células pela hipóxia. A hipóxia é definida com uma condição de reduzida pressão parcial de oxigênio (pO₂) relativa à presente na atmosfera. A hipóxia é relevante não somente em quadros patológicos, mas também no âmbito fisiológico (SEMENZA, 2001b; SITKOVSKY & LUKASHEV, 2005).

No aspecto fisiológico, os compartimentos teciduais diferem em sua extensão e grau de vascularização resultando em variações no nível de oxigenação. A hipóxia fisiológica reflete o microambiente normal do tecido, sua vascularização e geometria. A pO₂ tecidual é proporcional à distância do capilar sanguíneo mais próximo. Estudos envolvendo diferentes metodologias demonstram que a pO₂ em diferentes tecidos é normalmente baixa e pode ser considerada hipóxica (VANDERKOOI *et al.*, 1991). A pO₂ nos compartimentos teciduais é menor do que a pO₂ presente no ar atmosférico inspirado ao nível do mar que corresponde à

21Kpa, 159 mmHg ou a concentração de 21% de O₂ (VANDERKOOI *et al.*, 1991; CALDWELL *et al.*, 2001).

Em condições patológicas, a hipóxia gera uma adaptação no tecido alterado e é resultante da disfunção da rede vascular que como consequência, diminui o aporte sanguíneo tecidual (Revisado por SEMENZA, 2001c). A hipóxia no contexto patológico é encontrada em diversas situações como tumores malignos, reações inflamatórias, tecidos isquêmicos e doenças obstrutivas pulmonares (BJÖRNHEDEN *et al.*, 1999; HARRIS, 2002; VAUPEL & HÖCKEL, 2003; LE *et al.*, 2004; DISTLER *et al.*, 2004). A hipóxia cria microambientes únicos, condicionando o fenótipo e função de diferentes tipos celulares que resultam em importantes sinais que são capazes de promover a angiogênese para o restabelecimento do aporte de oxigênio, a ativação de fontes alternativas para obtenção de energia e recrutamento de leucócitos efetores para o quadro patológico (SEМЕНZA, 2001c; PUGH & RATCLIFFE, 2003; NIZET & JOHNSON, 2009).

1.5 – O FATOR DE TRANSCRIÇÃO HIF-1

A resposta a hipóxia requer um alto nível de coordenação e seu mecanismo inclui um amplo espectro de ações que vão desde variações na expressão enzimática (que adaptam a produção de energia em situações com pouca disponibilidade de oxigênio), até a regulação de genes que estão envolvidos com a sobrevivência celular em circunstâncias adversas. Nos mamíferos, a resposta hipóxica inclui, entre outras, adaptações da função respiratória, hemodinâmica, do metabolismo intermediário e da função renal que são influenciados pela ação de hormônios, de fatores de transcrição e da atividade enzimática (CARAMELO *et al.*, 2006).

Os estímulos gerados pela hipóxia são transmitidos e mediados por fatores de transcrição. HIF-1 do inglês (Hypoxia inducible factor - 1) (SEMENZA, 1999) é considerado o principal mediador da adaptação celular a variações na pO_2 tanto em células normais como em células tumorais (WANG & SEMENZA, 1993a; CARMELIET *et al.*, 1998; KUNG *et al.*, 2000; KOJIMA *et al.*, 2002; CRAMER *et al.*, 2003; WALMSLEY *et al.*, 2005).

A descoberta de HIF-1 como regulador da homeostasia do oxigênio surgiu como consequência de estudos envolvendo mecanismos moleculares que modulam a transcrição do gene para eritropoietina (EPO) em resposta a hipóxia (SEMENZA *et al.*, 1991a; SEMENZA *et al.*, 1991b; JIANG *et al.*, 1997). Estudos posteriores demonstraram que HIF-1 é um fator de transcrição que regula a expressão de mais 100 genes envolvidos em diversos mecanismos nas células dos mamíferos e participa no controle do metabolismo, da angiogênese, do tônus vascular, da diferenciação celular e apoptose (LEWIS *et al.*, 1999; BURKE *et al.*, 2002; MURDOCH *et al.*, 2005).

HIF-1 é um fator de transcrição heterodimérico que é composto por duas subunidades HIF-1 α e HIF-1 β (WANG *et al.*, 1995). A proteína HIF-1 β é expressa constitutivamente e não é controlada pela variação na pO_2 . Por outro lado, a subunidade HIF-1 α é a responsável pela regulação molecular de HIF-1 em função da pO_2 (JIANG *et al.*, 1997; PUGH *et al.*, 1997).

A proteína HIF-1 α possui quatro domínios distintos. A extremidade N- terminal contém um domínio bHLH (basic helix-loop-helix) e um domínio PAS (Per-Arnt-Sim) que são mediadores da dimerização com a sub-unidade HIF-1 β e posterior ligação ao DNA na sequência consenso (5'-CGTGC-3') no sítio de iniciação do promotor de uma variedade de genes. (WANG *et al.*, 1995).

A extremidade COOH-terminal da subunidade HIF-1 α contém um domínio dependente de oxigênio (ODD), no segmento dos resíduos 401-603 e participa no controle da estabilidade protéica em função da variação da pO_2 . Outros dois domínios, conhecidos como

domínios de transativação (TADs) estão relacionados com o mecanismo de transativação da sub-unidade HIF-1 α (JIANG *et al.*, 1997).

A translocação da subunidade HIF-1 α para o núcleo, e sua posterior heterodimerização com a sub-unidade HIF-1 β é essencial para a ligação de HIF-1 a co-ativadores que são necessários para a ativação da transcrição de genes alvo (LANDO *et al.*, 2002).

Em condições de normóxia, HIF-1 α sofre modificações pós-tradução por ação de enzimas hidroxilases (PHD1-3, FIH-1), as quais são responsáveis por hidroxilar resíduos de Prolina nas posições 402/564 e de Asparagina na posição 803 que se localizam nos domínios ODD e TADs (IVAN *et al.*, 2001; JAAKKOLA *et al.*, 2001; MASSON *et al.*, 2001; YU *et al.*, 2001; LANDO *et al.*, 2002).

Estas modificações permitem a união da proteína supressora de tumor von Hippel Lindau (pVHL) aos sítios hidroxilados de HIF-1 α formando parte do complexo E3 ubiquitina-ligase que resulta na ubiquitinação e degradação via proteassoma (HUANG *et al.*, 2002; OHH *et al.*, 2000). A hidroxilação do resíduo Asparagina na posição 803 foi descrita recentemente e constitui um impedimento estérico para a união do co-ativador CBP/p300 com a subunidade HIF-1 α (LANDO *et al.*, 2002).

Em condições de normóxia, diversas citocinas e fatores de crescimento ativadores de receptores do tipo tirosina cinases (RTKs) são também capazes de induzir a expressão da subunidade HIF-1 α , repercutindo no aumento dos níveis deste fator transcricional. De uma maneira geral, o mecanismo pelo qual as citocinas e os fatores de crescimento são capazes de induzir a expressão da subunidade HIF-1 α em condições de normóxia inclui um aumento na síntese protéica. Por outro lado, na hipóxia, o aumento da expressão é devido a uma diminuição da taxa de degradação de HIF-1 α . (ZELZER *et al.*, 1998; FELDSER *et al.*, 1999; HELLWIG-BURGEL *et al.*, 1999; ZHONG *et al.*, 2000; GORLACH *et al.*, 2001; SPINELLA *et al.*, 2002).

1.6 – EFEITOS DA HIPÓXIA EM MACRÓFAGOS

As células do sistema imune inato e adaptativo exercem suas funções efetoras nas mais variadas condições fisiológicas e patofisiológicas, incluindo em tecidos profundamente hipóxicos. O sucesso na resolução de quadros patológicos dependem da sobrevivência das células do sistema imune frente a variações na pO_2 ao longo de diferentes microambientes teciduais (SITOKOVSKY & LUKASHEV, 2005).

Células de origem mielóide apresentam meia vida curta e são rapidamente mobilizadas para responder a mudanças na integridade tecidual ou entrada de microorganismos patogênicos. Macrófagos são células cruciais do sistema imune inato e servem como localizadores e agentes ativos na erradicação de patógenos, impedindo o estabelecimento de uma infecção sistêmica (NIZET & JOHNSON, 2009; WALMSLEY *et al.*, 2009).

Diversos estudos sugerem que os macrófagos podem ser estimulados por fatores derivados do microambiente tecidual presente em diversas situações patológicas. Estes fatores são capazes de modificar o fenótipo dessas células, direcionando para atividades específicas de tecido (MURDOCH *et al.*, 2008).

Um desses fatores é a hipóxia resultante de uma perfusão vascular insuficiente de um determinado tecido. A hipóxia é capaz de alterar diversos parâmetros relacionados com a atividade dos macrófagos, dentre os quais a morfologia, expressão de marcadores de superfície, viabilidade celular e fagocitose (LEWIS *et al.*, 1999). (TABELA 1).

Tabela 1. ATIVIDADE CELULAR DE MACRÓFAGOS MODIFICADA PELA HIPÓXIA

Função relacionada à atividade de macrófagos	Referência
Morfologia	CAZIN <i>et al.</i> , 1990; ANGERMULLER <i>et al.</i> , 1995.
Marcadores de superfície celular	SCANNELL <i>et al.</i> , 1993; GYETKO <i>et al.</i> , 1994; SCANNELL <i>et al.</i> , 1995; SCANNELL <i>et al.</i> , 1996 NEGUS <i>et al.</i> , 1998
Viabilidade celular	RYMSA <i>et al.</i> , 1990; RYMSA <i>et al.</i> , 1991; TSUKAMOTO <i>et al.</i> , 1996; GRAEBER <i>et al.</i> , 1996 ; YUN <i>et al.</i> , 1997; GUIDA <i>et al.</i> , 1998.
Fagocitose	DU <i>et al.</i> , 1998, LEEPER-WOODFORD <i>et al.</i> , 1992

O extravasamento de monócitos é um processo que ocorre no início da resposta inflamatória, a migração pelo endotélio é regulada por um conjunto de fatores de adesão e quimiotáticos que são expressos pelo endotélio e pelas células adjacentes (IMHOF & AURRAND-LIONS, 2004; BAGGIOLINI & LOESTSCHER, 2000). De acordo com o sítio inflamatório, os monócitos encontram variações decrescentes na pO₂ tecidual. Estes monócitos se acumulam em áreas avasculares e hipóxicas de tecidos nos mais variados

quadros patológicos, tais como tumores sólidos, sítios isquêmicos, inflamação crônica e sítios de infecção bacteriana (BAGGIOLINI & LOESTSCHER, 2000, MANTOVANI *et al.*, 2004).

Estudos recentes demonstraram o sinergismo entre a resposta hipóxica e a resposta imune inata. Estes estudos surgiram a partir da observação que células fagocíticas de origem mielóide em condições de hipóxia adquiriam melhor capacidade em eliminar bactérias do que em condições de normóxia (PEYSSONNAUX *et al.*, 2005; ANAND *et al.*, 2007). Uma explicação para um possível mecanismo envolvido nesses efeitos observados é a relação sinérgica entre HIF e o NF- κ B, um fator de transcrição que regula a imunidade inata (FREDE *et al.*, 2006; BELAIBA *et al.*, 2007).

O estímulo hipóxico é capaz de induzir mudanças marcantes na expressão de citocinas e atividade secretória dos macrófagos, demonstrado através de estudos de liberação de citocinas pró-angiogênicas e citocinas inflamatórias pelos macrófagos (LEWIS *et al.*, 1999).

(TABELA 2)

Tabela 2. INFLUÊNCIA DA HIPÓXIA NA EXPRESSÃO DE CITOCINAS E FATORES DE CRESCIMENTO PELOS MACRÓFAGOS.

Fator	Função	Referência
VEGF	pró-angiogênica	HARMEY <i>et al.</i> , 1998; XIONG <i>et al.</i> , 1998; LEWIS <i>et al.</i> , 2000;
TNF- α	pró-angiogênica	SCANNELL <i>et al.</i> , 1993
	pró-inflamatória	HEMPEL <i>et al.</i> , 1996;
	citotóxica	XIONG <i>et al.</i> , 1998; CRAMER <i>et al.</i> , 2003;

IL-1	pró- inflamatória	WEST <i>et al.</i> ,1994; HEMPEL <i>et al.</i> ,1996;
PGE ₂	imunossupressiva	ERTEL <i>et al.</i> , 1993; WEST <i>et al.</i> ,1994;
IL-10	imunossupressiva	MURATA <i>et al.</i> , 2002;
IL-6	pró- inflamatória	ALBINA <i>et al.</i> ,1995; WEST <i>et al.</i> , 1994.

1.7 –HIPÓXIA E INFECÇÕES PARASITÁRIAS

Poucos estudos foram realizados envolvendo este tema, mas evidências sugerem que a regulação celular via HIF-1 ocorre no contexto de infecção parasitária por protozoários. Lesões cutâneas podem ser geradas em camundongos Balb/c pela infecção com *Leishmania amazonensis* e em estágios tardios da infecção, a indução de HIF-1 α no citoplasma e no vacúolo parasitóforo de macrófagos recrutados ao microambiente da lesão pode ser claramente demonstrado (ARRAIS-SILVA *et al.*, 2005).

BOSSETO *et al.*, (2010) mostram que o microambiente hipóxico é capaz de promover uma pressão seletiva no fenótipo de células dendríticas (DCs), contribuindo para o efeito leishmanicida da resposta imune inata.

Um importante estudo de comparação foi realizado envolvendo a análise da transcrição gênica em fibroblastos humanos infectados pelo *Toxoplasma gondii*, um parasita intracelular obrigatório. Neste modelo, a indução de HIF-1 parece ter um importante papel no ciclo biológico do parasita, sendo capaz de induzir a transcrição de genes relacionados com

enzimas glicolíticas, transportadores de glicose, receptores de transferrina e VEGF (BLADER *et al.*, 2001; GAIL *et al.*, 2001).

Investigações posteriores demonstram que *Toxoplasma gondii* induz rapidamente o aumento dos níveis de HIF-1 α em fibroblastos infectados (SPEAR *et al.*, 2006). Em condições de hipóxia presentes nos tecidos cerebral, muscular e na retina, onde o parasita se aloja, a divisão celular do parasita e a manutenção da estrutura organelar é severamente bloqueada nas células do hospedeiro onde a função de HIF-1 α foi deletada. O parasita pode estar envolvido na indução de HIF-1 α , e os genes regulados por HIF-1 poderiam ser essenciais para sua replicação (SPEAR *et al.*, 2006).

No contexto da infecção pelo *T. cruzi*, praticamente não há estudos sobre o tema. No entanto, ROSSI *et al.*, (1984), demonstraram que a microcirculação está envolvida na cardiopatia chagásica, que é potencializada com a formação de agregados plaquetários. Posteriormente, ROSSI *et al.*, (1985) evidenciaram a formação de áreas hipóxicas com transitória formação isquêmica dentro do mesmo modelo experimental e sugerem a hipóxia poderia estar associada à injúria na cardiomiopatia chagásica.

2. *Objetivos*

2.1 –OBJETIVOS GERAIS

1 – Investigar os efeitos da hipóxia na replicação do *Trypanosoma cruzi* em macrófagos

2.2 –OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1 – Estudar os efeitos da hipóxia em macrófagos

2 – Estudar os efeitos da hipóxia na eferocitose

3 – Estudar os efeitos da eferocitose sobre a replicação do *T. cruzi* em condições de hipóxia

4 – Estudar os efeitos da eferocitose sobre a produção de citocinas pelos macrófagos em condições de hipóxia

3. Material e Métodos

3.1 – ANIMAIS

Os experimentos foram realizados utilizando-se camundongos isogênicos da linhagem BALB/c, machos, com 4-8 semanas de idade, fornecidos pelo Centro de Criação de Animais de Laboratório (CECAL) da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ- Rio de Janeiro) e mantidos em nosso biotério, sob condições sanitárias convencionais. A utilização dos animais foi adequada às normas estabelecidas pela Comissão de Avaliação do Uso de Animais em Pesquisa (CAUAP) do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho.

3.2 – MEIO DE CULTURA

O meio de cultura utilizado na cultura de macrófagos foi RPMI 1640 (Gibco BRL) contendo (2 mM de L-glutamina, 50 μ M de β -mercaptoetanol, 1mM de piruvato, 10 μ g/mL de gentamicina, aminoácidos não essenciais, suplementado com 10% de SFB (Gibco BRL) para os experimentos ou 1% de nutridoma (Roche ®) para a dosagem de citocinas.

3.3 – PARASITAS

As formas epimastigotas do clone Dm28c de *T. cruzi* (CONTRERAS *et al.*, 1988) são mantidas a 27 °C em estufa BOD, em meio BHI suplementado com 10 % de soro fetal bovino (SFB – GIBCO BRL), 25 μ g/mL de hemina (Sigma), 20 μ g/mL de ácido fólico (Sigma) e 10 μ g/mL de gentamicina (GIBCO BRL). Para obtenção das formas tripomastigotas

metacíclicas, formas epimastigotas obtidas no final da fase exponencial de crescimento são centrifugadas (1000 g, 10 min) e ressuspensas em meio TAU-P (Triatomine Artificial Urine, NaCl 190 mM, tampão fosfato de sódio 8mM pH 6,0, KCl 17mM, CaCl₂ 2mM, MgCl₂ 2mM, NaHCO₃ a 0,035%, L-Prolina 10mM), em garrafas de cultura (25 cm²) contendo 10 mL de meio TAU-P. As garrafas foram mantidas em posição horizontal durante 72 horas a 27°C, sem agitação. As formas tripomastigotas metacíclicas foram quantificadas com auxílio da câmara de Neubauer.

3.4 – OBTENÇÃO DO AMBIENTE HIPÓXICO

O ambiente hipóxico foi estabelecido pela injeção de uma mistura gasosa padrão primário (White Martins, praxair INC – Osasco) contendo em sua composição 2% mol/ mol de O₂, 7% mol/mol de CO₂ e 91% de mol/mol de N₂ em uma câmara incubadora do tipo dessecador saturado de H₂O (Figura suplementar 1). A injeção da mistura gasosa P.A. foi efetuada até atingir a saturação. Em seguida, a câmara incubadora foi selada com vaselina e mantida em estufa convencional a 37°C. As condições de normóxia foram estabelecidas em estufa convencional contendo em sua composição 21% mol/ mol de O₂, 7% mol/mol de CO₂ e 75% mol/mol de N₂. Para aferir o grau de hipóxia presente no meio de cultura foi utilizado um sensor catódico (Oxygraph 2k, OROBOS, Áustria) capaz de mensurar a concentração de O₂ dissolvido no meio de cultura. A verificação da concentração de oxigênio molecular dissolvido foi realizada após 30 minutos da injeção da mistura gasosa P.A. Como controle, foi utilizado o meio de cultura mantido em condições de 7% CO₂, 21% de O₂ (concentração atmosférica ao nível do mar) e concentração de saturação de N₂ a 37°C.



Figura suplementar 1- Modelo de reprodução do ambiente hipóxico

3.5 – OBTENÇÃO DE MACRÓFAGOS E AVALIAÇÃO DA CARGA PARASITÁRIA

Macrófagos inflamatórios foram obtidos a partir da lavagem da cavidade peritoneal de camundongos BALB/c, 4 dias após a injeção intraperitoneal de 1mL de tioglicolato de sódio 3% (Sigma). Os macrófagos provenientes do lavado peritoneal foram contados e plaqueados como triplicatas em placas de 24 poços (Corning Inc., NY) numa concentração de 3×10^5 células/ poço e cultivados em meio RPMI completo contendo 10% de SFB ou 1% de nutridoma® (Roche). A cultura foi mantida 18 horas a 37 °C para a aderência celular. Após o período de aderência, os macrófagos foram infectados com $1,5 \times 10^6$ de formas tripomastigotas de *T. cruzi* por poço durante 18 horas em ambiente de hipóxia ou normóxia. Posteriormente,

foram efetuadas lavagens para retirada de parasitas não internalizados e, em seguida, adicionados os estímulos com suas variações. 10 ng/mL ou 1µg/mL (para dosagem de citocinas) de LPS derivados de *Salmonella enterica* sorotipo Typhimurium(Sigma). 0,5ng/mL de IFN-γ recombinante (rm IFN-γ – R&D). Inibidor específico da iNOS: L- Dihidroclorato - N6- (1- iminoetil) lisina (L-NIL, 1mmol/L – Sigma). Dihidroclorato de putrescina (Sigma) em concentrações variáveis para análise dose-resposta da infecção em ambiente de hipóxia ou normóxia. Timócitos viáveis, apoptóticos e necróticos na concentração de 9×10^5 células/ poço, obtidos através da metodologia descrita abaixo. Após a adição dos estímulos foram acrescentados mais 72 horas de ambiente de hipóxia ou normóxia. Após este período, macrófagos mantidos em ambiente de hipóxia foram transferidos para ambiente de normóxia. Os sobrenadantes dessas culturas foram coletados após 48 horas da adição dos estímulos para a quantificação de citocinas e óxido nítrico.

A replicação do parasita foi quantificada após dez dias em cultura por contagem direta utilizando câmara de Neubauer. O pH de diferentes dias de cultura celular em ambiente de hipóxia ou normóxia foi avaliado utilizando-se pHmetro Digimed DM-22 e os valores expressos em média e erro padrão (SEM) das leituras de triplicatas.

3.6 – OBTENÇÃO DE TIMÓCITOS APOPTÓTICOS E NECRÓTICOS

Timos de animais BALB/c foram coletados e homogeneizados em meio RPMI incompleto, em de placas de Petri de vidro contendo malha de aço inoxidável estéril. O material obtido foi centrifugado a 800 g por 10 minutos a 4°C, o sobrenadante foi desprezado e o botão celular foi ressuspensão em meio RPMI completo sem soro. Para obtenção de células apoptóticas, timócitos foram expostos a radiação UV durante 20 minutos e posterior 2 horas adicionais em estufa 37°C e atmosfera contendo 7% de CO₂ (OJEDA *et al.*, 2004). Timócitos

necróticos foram obtidos pela adição de Paraformaldeído 4% durante 20 minutos e posteriores lavagens (FREIRE-DE-LIMA *et al.*, 2000). As células foram contadas em câmara de Neubauer utilizando a técnica de exclusão pelo corante Azul de Trypan e ajustadas para uma concentração de $1,5 \times 10^6$ células por poço. Para aferir a eferocitose em ambiente de normóxia ou hipóxia, macrófagos inflamatórios foram submetidos em ambiente de hipóxia ou normóxia com variações no tempo de exposição e em seguida submetidos a interação durante 1 hora com timócitos apoptóticos na proporção (5:1). O grau de eferocitose foi mensurado pela contagem do percentual de macrófagos fagocitando e pelo número de células apoptóticas por 100 macrófagos em lamínulas redondas de 13 mm de diâmetro (Glass Técnica).

3.7 – ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR

A viabilidade de macrófagos peritoneais inflamatórios foi determinada através do teste de redução do MTT: Brometo de (3-(4,5-dimetiltiazol-2il)-2,5-difeniltetrazólio)(Sigma). Macrófagos inflamatórios foram cultivados em placas de cultura de 96 poços (Corning Inc., NY) em meio RPMI 1640 completo e mantidos em condições de hipóxia ou normóxia. Após o tempo de cultura determinado, em cada poço foi adicionado 5 mg/mL de MTT. As placas foram mantidas durante 4 h em temperatura de 37°C. Após este período, o meio de cultura foi retirado e foram adicionados 100 µL de SDS à cultura celular e mantidas durante 18h em estufa 37°C. Após este período, a absorbância da amostra foi obtida através de leitura em espectrofotômetro de placa (VERSA_{Max} Microplate Reader – Molecular Devices - USA) com filtro de comprimento de onda de 570nm (MOSMANN, 1986). Para o ensaio de viabilidade celular, também foi utilizada a técnica de exclusão por coloração com azul de Trypan.

3.8 – DETERMINAÇÃO DA PRODUÇÃO DE NITRITOS

A produção de NO foi determinada indiretamente pela metodologia de quantificação da produção de nitritos (NO_2^-) conforme descrito (GREEN *et al.*, 1982). O sobrenadante coletado da cultura foi diluído na proporção de 1:1 com o Reativo de Griess, que apresenta em sua composição 0,1% de dihidrocloro naftiletlenodiamina, 1% sulfanamida e 2,5% de ácido fosfórico. A densidade óptica foi lida em espectrofotômetro de placa (VERSA_{MAX} Microplate Reader – Molecular Devices - USA) com filtro de comprimento de onda de 540nm. A determinação da concentração de nitritos foi calculada utilizando -se como base uma curva padrão de nitrito de sódio (NaNO_2) e os resultados obtidos foram expressos em μM .

3.9 – DOSAGEM DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO

Para avaliar a produção de Espécies Reativas de Oxigênio foi utilizada a técnica de detecção micro-fluorimétrica usando 2',7'diclorofluoresceína diacetato (DCFH-DA)- Fluka-BioChemika (WANG *et al.*, 2008). Esta técnica é baseada na oxidação de DCFH-DA não-fluorescente a um composto fluorescente DCF ambos intracelular e extracelular. Macrófagos inflamatórios foram cultivados na concentração de 10^5 células/ poço em placas de 96 poços (Corning Inc., NY) durante 72 horas em ambiente de hipóxia ou normóxia. Após este período foi adicionado durante 10 minutos $10\mu\text{M}$ de DCFH-DA em ambiente de hipóxia ou normóxia. Após a etapa de lavagem, os macrófagos inflamatórios foram submetidos a estímulos por 10 ng/mL de LPS derivados de *Salmonella enterica* sorotipo Typhimurium (Sigma) e/ou $0,5\text{ng/mL}$ de IFN- γ recombinante (rm IFN- γ – R&D) e incubados em ambiente de hipóxia ou normóxia por um período de 4 horas. Após o período de 4 horas com estímulos, a leitura foi realizada utilizando um fluorímetro FLX 800 Microplate Fluorescence Reader (BIO-TEK) com comprimentos de onda de excitação 485 nm e emissão 530 nm. Os

resultados foram expressos em média e erro padrão (SE) das leituras de absorbância das triplicatas de cultura.

3.10 – ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE HIF-1 α POR ELISA

A expressão de HIF-1 α de macrófagos foi avaliada pela técnica de ELISA celular (BORGES *et al.*, 2001). Macrófagos inflamatórios ($10^4/200 \mu\text{L}$) foram cultivados em microplacas de 96 poços, durante 24 horas em condições de normóxia ou hipóxia como descrito. Após o período de incubação, as monocamadas foram fixadas com PBS contendo 4% de paraformaldeído por 30 min e bloqueadas com PBS contendo 10% de SFB (GIBCO-BRL) por 2 horas a temperatura ambiente. Em seguida, as células foram lavadas com PBS-Tween, e incubadas com 5 $\mu\text{g/mL}$ de anticorpo policlonal anti-HIF-1 α (R&D) por 18 horas a 4°C. Após a lavagem com PBS-Tween, foi adicionado 5 $\mu\text{g/mL}$ de anticorpo IgG anti-coelho biotilado (Vector, CA) diluído em PBS contendo 10% de SFB para detectar HIF-1 α . A placa foi incubada por 3 horas a temperatura ambiente e lavada com PBS-T. A reação foi revelada com fosfatase alcalina conjugada à estreptoavidina (Southern Biotechnology Associates Inc. Birmingham, AL) diluída na proporção de 1:2000 em PBS + 10% SFB, seguida de incubação a 37°C por 1h. Após etapa de lavagem, foi adicionado o substrato paranitrofenol fosfato (pNPP) 1mg/mL (Sigma) diluído em tampão TRIS-MgCl₂ (pH 9,8). A densidade óptica foi obtida através de leitura em espectrofotômetro de placa (VERSA_{Max} Microplate Reader – Molecular Devices - USA) com filtro de comprimento de onda de 405nm. Os resultados foram expressos em média e erro padrão (SE) das leituras de absorbância das triplicatas de cultura.

3.11 – DOSAGEM DE CITOCINAS

Sobrenadantes obtidos em 48h de cultura celular foram centrifugados e armazenados a -20°C até a utilização. A quantificação das citocinas produzidas (TNF- α , IL-1 β e TGF- β) foi baseada na técnica de ELISA do tipo sanduíche, de acordo com a metodologia preconizada pelo fabricante (R&D; e-Bioscience, CA). Placas de 96 poços com fundo chato (Corning Inc., NY) foram sensibilizadas com anticorpos monoclonais de captura diluídos em PBS ou tampão de captura (fornecido pelo fabricante) e incubadas a 4°C por 18h. Em seguida, foram efetuadas etapas de lavagem com PBS contendo 0,05% Tween 20 (PBS-T) (Sigma) e posterior bloqueio com PBS contendo 10% SFB por 2h a temperatura ambiente seguido por mais uma etapa de lavagem com PBS-T. Os sobrenadantes e as citocinas recombinantes que foram utilizados para a curva-padrão foram adicionados e incubados a 4°C por 18h. Para a dosagem de TGF- β , os sobrenadantes obtidos da cultura celular foram acidificados com HCl 1N por 1h a temperatura ambiente e posterior neutralização com NaOH 1N. Após lavagem com PBS-T, foram adicionados os anticorpos secundários de detecção marcados com biotina, diluídos em PBS + 10%SFB ou tampão de ensaio (fornecido pelo fabricante). A placa foi incubada por 3 horas a temperatura ambiente e lavada com PBS-T. A reação foi revelada com fosfatase alcalina conjugada à estreptoavidina (Southern Biotechnology Associates Inc. Birmingham, AL) diluída na proporção de 1:2000 em PBS + 10% SFB, seguida de incubação a 37°C por 1h. Após etapa de lavagem, foi adicionado o substrato paranitrofenol fosfato (PNPP) (Sigma) diluído em tampão TRIS-MgCl₂ (ph 9,8). A densidade óptica foi obtida através de leitura em espectrofotômetro de placa (VERSA_{Max} Microplate Reader – Molecular Devices - USA) com filtro de comprimento de onda de 405nm. A concentração das citocinas foram calculadas baseando-se nos valores obtidos da curva-padrão de citocinas recombinante e os resultados expressos em pg/mL. Para ensaios de neutralização da citocina TNF- α foram

utilizados anticorpo anti- TNF- α MP6-XT3 (BD Biosciences) na concentração de 10 μ g/mL e anticorpo isotipo controle R3-34 (BD Biosciences) na concentração de 10 μ g/mL.

3.12 – ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram expressos com média \pm erro padrão (SEM). A análise estatística foi realizada no programa *SigmaPlot* para *Windows*, empregando o teste *t* de *Student* para amostras independentes. Diferenças com um valor de $p < 0,05$ ou $p < 0,01$ foram consideradas significantes. Todos os experimentos mostrados foram repetidos pelo menos 3 vezes, com resultados semelhantes.

4. Resultados

4.1 - ANÁLISE DO AMBIENTE HIPÓXICO

Para estudar os efeitos da hipóxia na infecção de macrófagos pelo *T. cruzi*, verificamos inicialmente se a variação na pressão parcial de O₂ (pO₂) empregada para o ambiente hipóxico estava sendo transmitida eficientemente para o meio de cultura.

Para tal, o meio de cultura utilizado nas experiências foi mantido em uma câmara do tipo dessecador saturado de H₂O onde efetuamos a injeção de uma mistura gasosa padrão primário até atingir a saturação. Após 30 minutos, o meio de cultura foi retirado e aferido com auxílio de um sensor catódico capaz de medir a concentração de O₂ dissolvido no meio. Na condição de normóxia, o meio de cultura foi mantido em estufa convencional pelo mesmo período que o empregado para o ambiente hipóxico. Como pode ser observado na Figura 1, a pO₂ em condições de normóxia foi de $18,5 \pm 0,6245$, enquanto que em hipóxia o valor obtido foi de $3,4 \pm 0,608$. Estes resultados demonstram que a metodologia empregada para o estabelecimento do ambiente hipóxico foi efetiva.

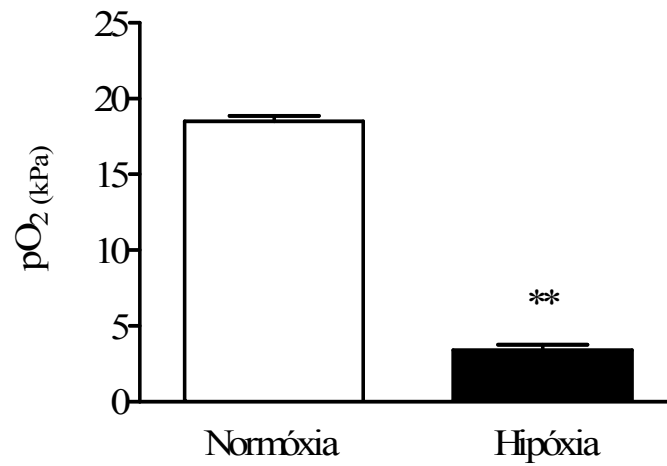


FIGURA 1 – ANÁLISE DO AMBIENTE HIPÓXICO. Meio de cultura de macrófagos foi mantido durante 30 minutos em ambiente de normóxia (barra branca) ou em ambiente de hipóxia (barra preta). A leitura da concentração de O₂ dissolvido foi realizada com auxílio de um sensor catódico e os valores expressos como média \pm SEM da pO₂ (kPa) de um experimento representativo de 3 experimentos, onde (**) indica valores com $p < 0,01$ para diferenças entre hipóxia e normóxia.

4.2 - ANÁLISE DA VIABILIDADE CELULAR DE MACRÓFAGOS EM AMBIENTE HIPÓXICO

Em modelos experimentais, diferentes tipos celulares demonstram sobrevivência a períodos crônicos de hipóxia e a situações que envolvem o processo de reoxigenação através de mecanismos adaptativos (LEWIS, 1999).

Para verificar o perfil de sobrevivência celular, realizamos ensaios de viabilidade celular de macrófagos variando o tempo de exposição ao ambiente de hipóxia ou normóxia e ao processo de reoxigenação. Em seguida, as culturas foram submetidas ao ensaio de viabilidade pelo método MTT.

A Figura 2 mostra que a hipóxia por um período de 3 dias não afetou a viabilidade dos macrófagos quando comparados com os macrófagos mantidos em normóxia. Além disso, a transferência destas culturas mantidas por 3 dias em hipóxia para condições de normóxia por mais 4 dias não causou alterações significativas na viabilidade celular dos macrófagos. No entanto, macrófagos mantidos por um período de 7 dias consecutivos em ambiente hipóxico apresentaram uma significativa redução na viabilidade celular quando comparados aos macrófagos mantidos em condições de normóxia. Resultados semelhantes foram obtidos através da utilização da técnica de exclusão com a coloração azul de Trypan (dados não mostrados). Estes resultados nos permitiram empregar nos experimentos seguintes, períodos de até 3 dias de exposição à hipóxia, sem que ocorra a interferência na sobrevivência celular.

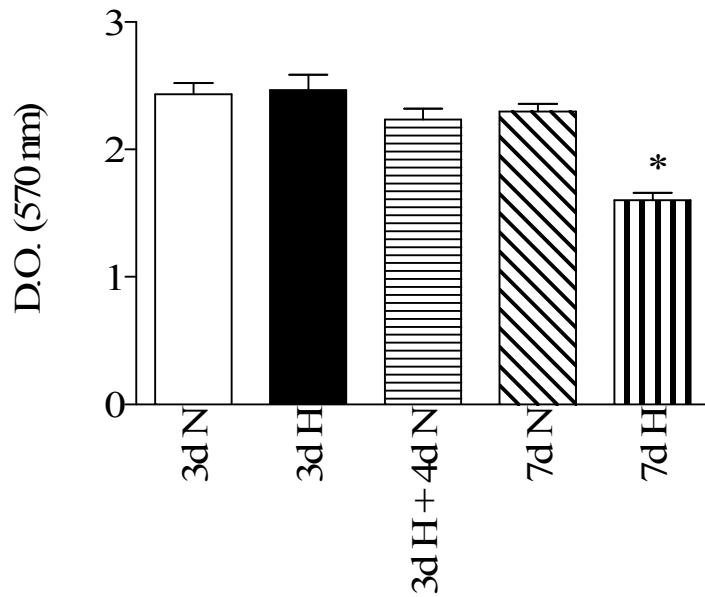


FIGURA 2 – VIABILIDADE DE MACRÓFAGOS MANTIDOS EM AMBIENTE DE NORMÓXIA OU HIPÓXIA. Culturas de macrófagos foram mantidos por 3 dias (3d) ou 7 dias (7d) em condições de normóxia (N) ou hipóxia (H), ou por 3 dias de hipóxia seguidos por 4 dias em normóxia (3dH + 4dN). Após estes períodos, a viabilidade celular dos macrófagos nas culturas foi avaliada pelo método do MTT. Os valores de D.O. (570nm) estão expressos em média \pm SEM de 3 experimentos em triplicatas onde (*) indica valores com $p < 0,05$ para diferenças entre ambientes de hipóxia e normóxia.

4.3 - ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE HIF-1 α EM AMBIENTE HIPÓXICO

Um dos principais mecanismos de adaptação celular ao ambiente hipóxico envolve a regulação da expressão de genes que estão envolvidos com a sobrevivência celular em condições adversas, e o fator de transcrição HIF-1 é considerado o principal mediador da adaptação celular a variações na pO₂ (SEMENZA, 2001c).

Culturas de macrófagos foram submetidas ao ambiente de normóxia ou hipóxia por um período de 24 horas e a expressão da sub-unidade HIF-1 α foi medida utilizando a técnica de ELISA celular. Conforme apresentado na Figura 3, a expressão HIF-1 α aumenta significativamente em macrófagos que foram submetidos ao ambiente de hipóxia.

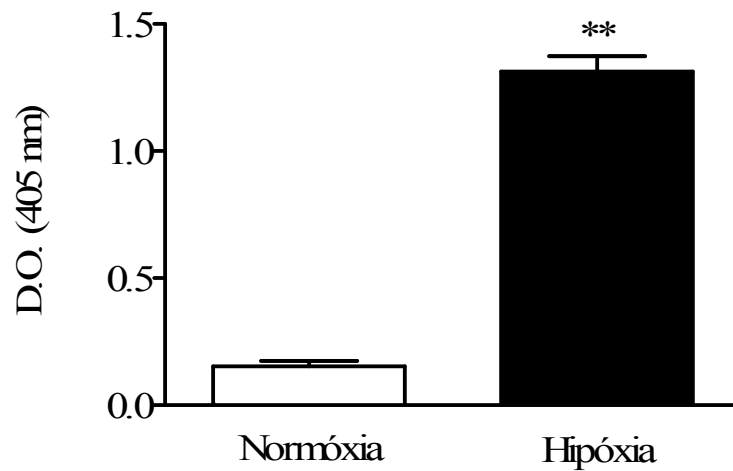


FIGURA 3 – ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE HIF-1 α EM MACRÓFAGOS MANTIDOS EM NORMÓXIA OU HIPÓXIA. Cultura de macrófagos foram submetidas a ambiente de normóxia ou hipóxia por um período de 24 horas. A expressão de HIF-1 α foi analisada utilizando-se a técnica de ELISA celular. Ambiente de normóxia (barra branca) e ambiente de hipóxia (barra preta). (**): p < 0,01 para diferenças entre níveis de oxigenação.

4.4 - ANÁLISE DA INFLUÊNCIA DO AMBIENTE HIPÓXICO NO pH DAS MONOCAMADAS EM CULTURA

Estudos experimentais sugerem que macrófagos são capazes de alterar sua atividade metabólica em ambiente hipóxico, adotando o metabolismo anaeróbico para a produção de ATP (BUTTERICK *et al.*, 1981). Para observar se este tipo de adaptação poderia estar ocorrendo em nosso modelo, avaliamos em seguida a influência do ambiente hipóxico no pH das monocamadas de macrófagos. Para isso, aferimos como dia 0, a medição do pH apenas do meio de cultura livre de células. Em seguida, culturas de macrófagos foram inoculadas no meio e submetidas ao ambiente de normóxia ou hipóxia durante períodos estabelecidos. Como mostrado na Figura 4, foi observada uma significativa acidificação do meio da cultura de macrófagos submetidos ao ambiente de hipóxia quando comparado ao meio de cultura de macrófagos mantidos em ambiente de normóxia.

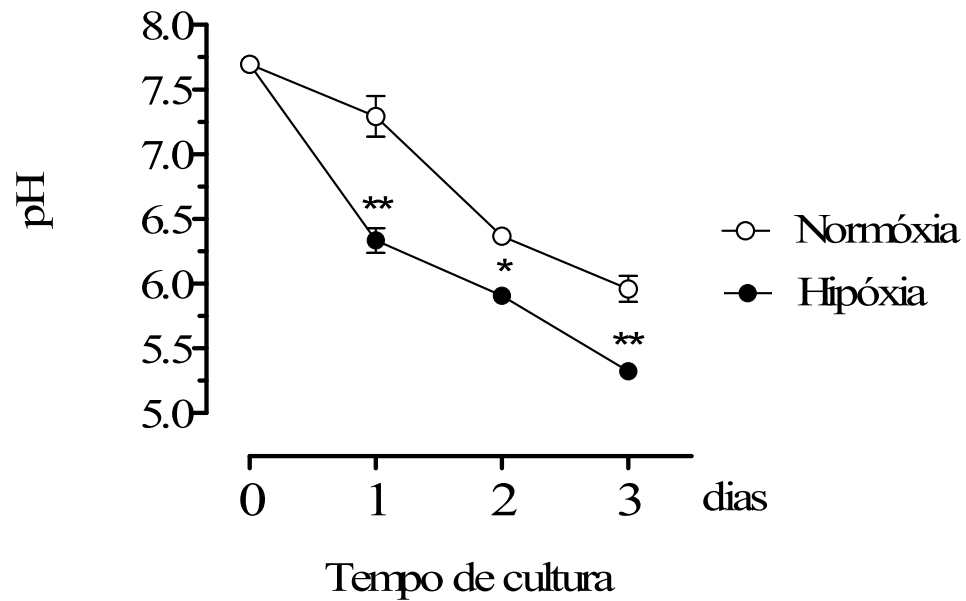


FIGURA 4 – ANÁLISE DE INFLUÊNCIA DA HIPÓXIA NO pH DO MEIO DE CULTURA DE MACRÓFAGOS. Culturas de macrófagos foram mantidas em condições de normóxia (○) ou hipóxia (●) durante 3 dias. A cada 24 horas, medidas do pH do sobrenadante dos meios de cultura foram avaliados sendo o valor do dia 0 correspondente ao pH do meio de cultura livre de células. As medidas \pm SEM estão representados, sendo os valores com $p < 0,05$ (*) e $p < 0,01$ (**) assinalados para diferenças significativas em relação à normóxia.

4.5 - PRODUÇÃO DE NITRITOS EM AMBIENTE HIPÓXICO

Estudos anteriores demonstraram uma correlação entre a pO_2 e a produção de óxido nítrico (MELILLO *et al.*, 1996; McCORMICK *et al.*, 2000). Para avaliar a influência do ambiente hipóxico na produção de óxido nítrico em nosso modelo experimental, macrófagos foram mantidos em ambiente de normóxia ou hipóxia e na ausência ou presença de LPS ou LPS/IFN- γ . Após 48 horas nestas condições, os sobrenadantes das culturas foram coletados e o teor de nitritos analisado pelo método de Griess. Como observado na Figura 5, o ambiente hipóxico causa uma diminuição na produção de nitritos por macrófagos estimulados por LPS ou LPS/IFN- γ quando comparado com as culturas mantidas em ambiente de normóxia. No entanto, não foi observada nenhuma diferença na produção de nitritos entre as culturas mantidas na ausência de estímulos.

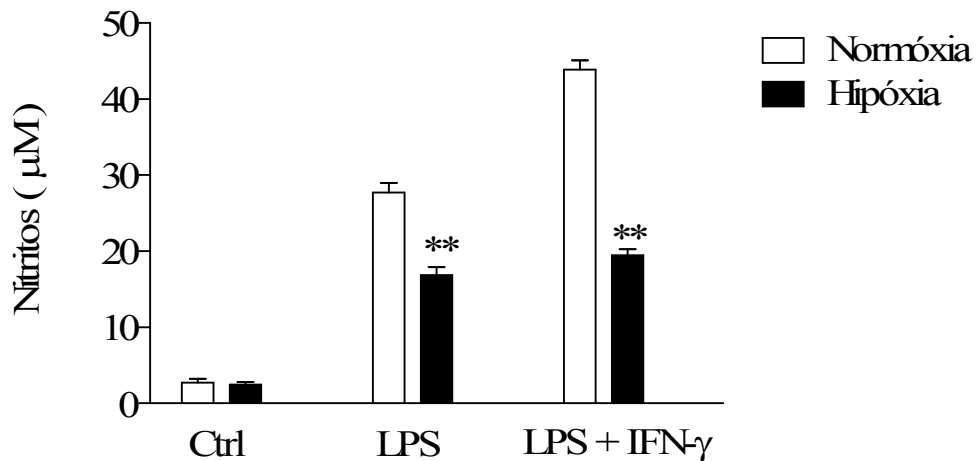


FIGURA 5 – EFEITO DA HIPÓXIA NA PRODUÇÃO DE NO POR MACRÓFAGOS ESTIMULADOS POR LPS OU LPS/IFN- γ . Culturas de macrófagos foram preparadas em meio RPMI (Ctrl) ou meio suplementado com 10 ng/mL de LPS (LPS) ou 10 ng/mL de LPS e 0,5 ng/mL de IFN- γ (LPS + IFN- γ) e mantidas em ambiente de normóxia (barras brancas) ou hipóxia (barras pretas). Após 48 h, os sobrenadantes foram testados para a presença de nitritos pelo método de Griess. Sendo média \pm SEM dos valores em μ M representados. Diferenças significativas ($p < 0,01$) em relação ao ambiente de normóxia estão assinalados (**).

4.6 - EFEITO DA HIPÓXIA NA PRODUÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO

Nosso próximo passo foi analisar a influência da hipóxia na produção de espécies reativas de oxigênio. Para adaptação, macrófagos foram cultivados por um período de 72 horas em normóxia ou hipóxia. Após este período foi adicionado DCFH-DA, mais os estímulos LPS/ IFN- γ , e as culturas foram incubadas em ambiente de normóxia ou hipóxia por um período adicional de 4 horas. A produção de radicais de oxigênio foi então avaliada por meio da emissão de fluorescência.

Como observado na Figura 6, a hipóxia causou uma diminuição na produção de espécies reativas de oxigênio por macrófagos estimulados, quando comparado com a cultura mantida em ambiente de normóxia. Entretanto, não foi observada nenhuma diferença na produção de radicais de oxigênio entre as culturas mantidas na ausência de estímulos.

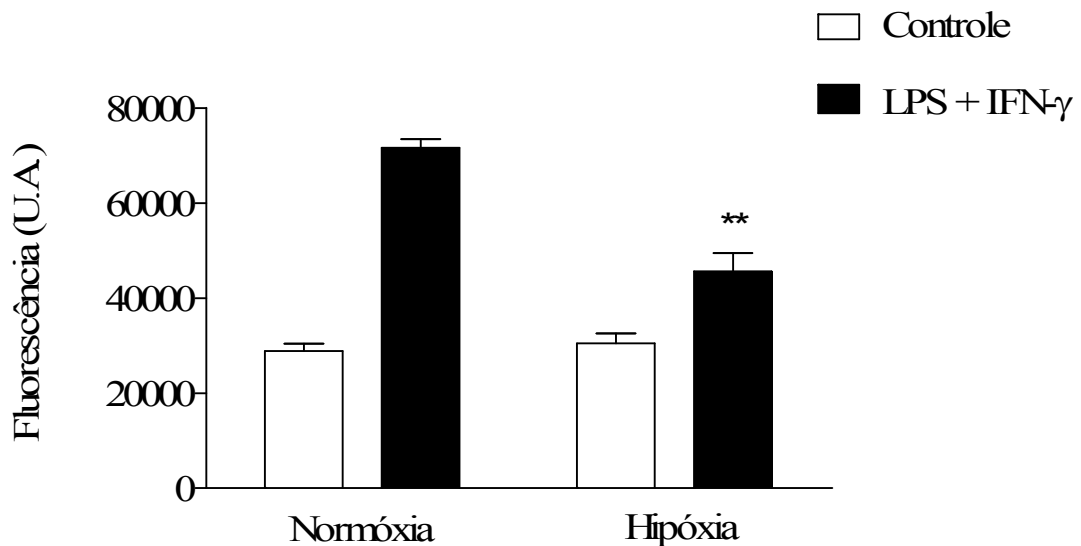
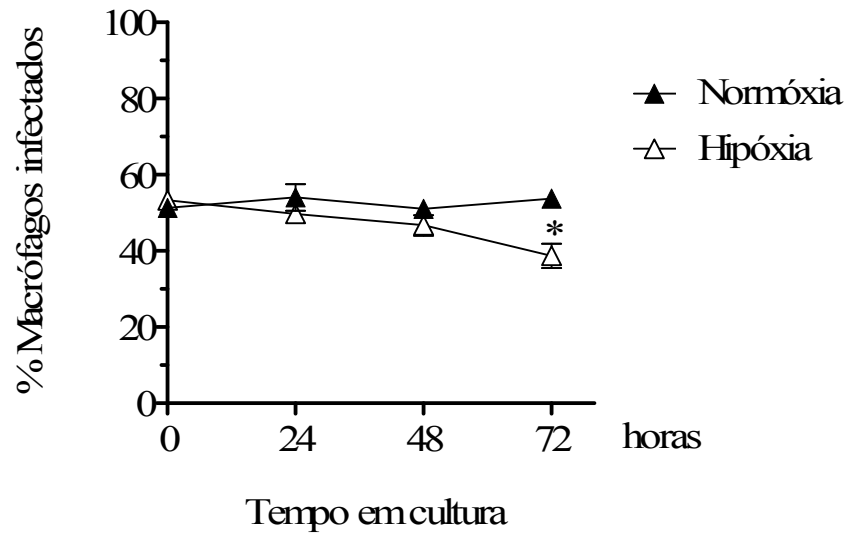
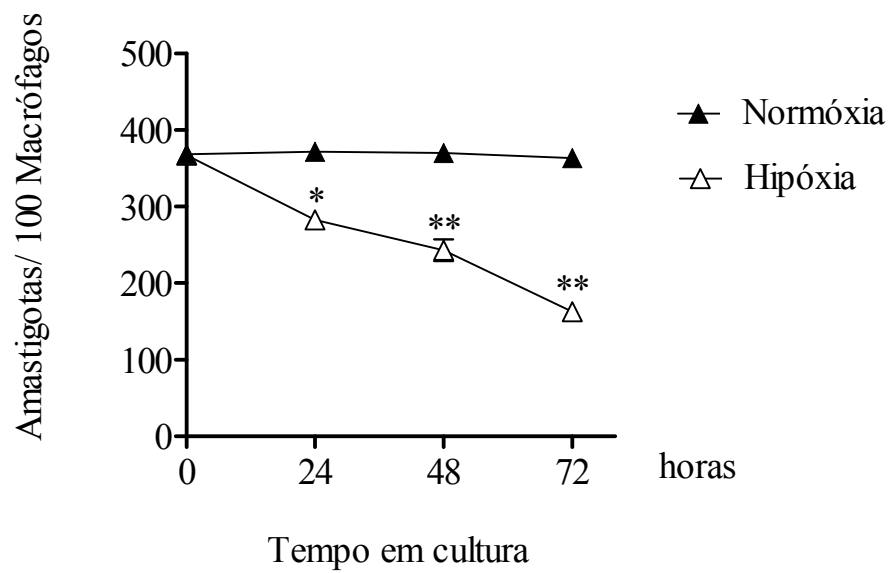
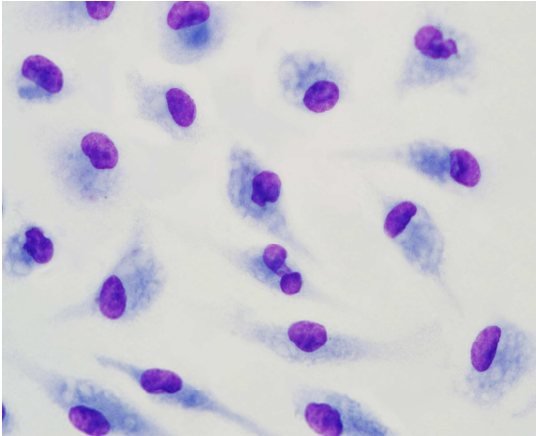


FIGURA 6 – EFEITO DA HIPÓXIA NA PRODUÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO POR MACRÓFAGOS ESTIMULADOS POR LPS/IFN- γ . Macrófagos foram cultivados com meio de cultura durante 72 horas em ambiente de normóxia ou hipóxia. Após este período foi adicionado DCFH-DA, e em seguida, foram mantidos com meio de cultura (barra branca) ou estimulados com LPS e IFN- γ (barra preta). Após 4 h, a quantificação de radicais de oxigênio foi realizada com auxílio de um fluorímetro. Média \pm SEM estão representados. (**): $p < 0,01$ para diferenças em relação ao ambiente de normóxia.

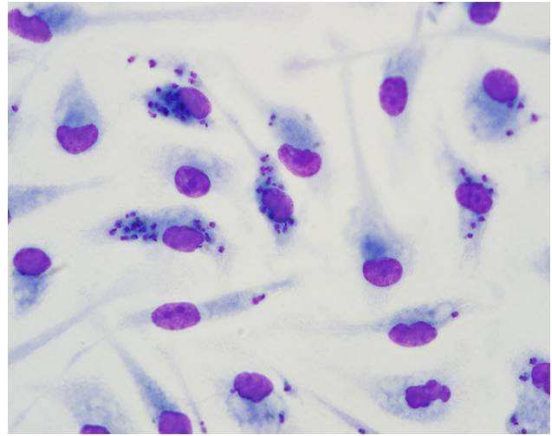
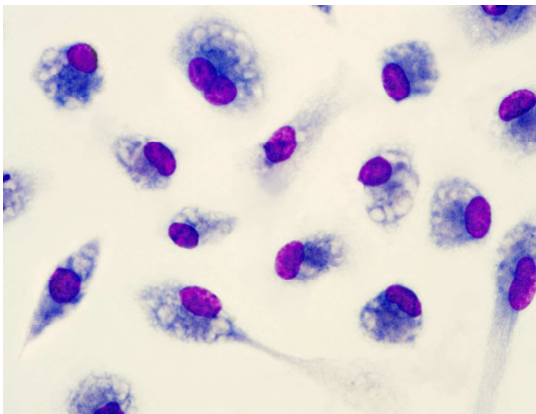
4.7- ANÁLISE DA INFECÇÃO PELO *T. CRUZI* EM AMBIENTE HIPÓXICO

Macrófagos foram cultivados em lamínulas, infectados com *T.cruzi* e mantidos em condições de normóxia ou hipóxia. A cinética da infecção foi então acompanhada em períodos estabelecidos e avaliada com auxílio de microscopia óptica. Como mostrado na Figura 7A, somente após 3 dias pode se observar uma redução significativa no número de macrófagos infectados mantidos em ambiente de hipóxia quando comparado com aqueles mantidos em normóxia. Além disso, as culturas infectadas mantidas em hipóxia apresentaram uma gradativa diminuição no número de amastigotas por 100 macrófagos detectados já a partir de 24 horas após a infecção (Figura 7B). Imagens representativas dos macrófagos não infectados ou infectados e mantidos por 3 dias em condições de normóxia ou hipóxia estão representados na Figura 7C-F. Pode-se observar uma intensa vacuolização dos macrófagos mantidos em hipóxia, independente de estarem infectados (Figura 7F) ou não (Figura 7E).

A**B**

C

Normóxia (72 horas)

D**E**

Hipóxia (72 horas)

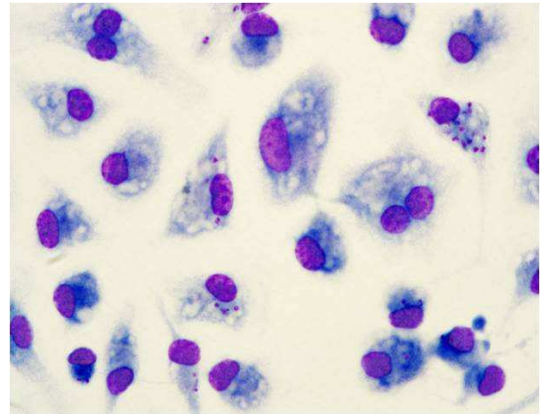
F

FIGURA 7 – CINÉTICA DA INFECÇÃO DE MACRÓFAGOS PELO *T. cruzi* EM AMBIENTE DE NORMÓXIA OU HIPÓXIA. Macrófagos foram cultivados em lamínula, infectados em condições de normóxia ou hipóxia e mantidos nestas condições por períodos estabelecidos. A cinética da infecção foi avaliada através da determinação da porcentagem de macrófagos infectados (A) e número de amastigotas/ 100 macrófagos (B) mantidos em normóxia (▲) ou hipóxia (Δ) a cada 24h após infecção por até 72h. As médias \pm SEM estão representados e valores com $p < 0,05$ (*) e $p < 0,01$ (**) assinalados para diferenças significativas em relação a culturas de macrófagos mantidos em normóxia. Todas as imagens (C-F) em aumento de 400X.

Com base nestes resultados iniciais, nosso próximo experimento foi observar o efeito da hipóxia e do LPS na liberação de formas tripomastigotas nos sobrenadantes das culturas. Macrófagos foram cultivados e infectados com formas tripomastigotas de *T. cruzi* e mantidos em condições de normóxia ou hipóxia durante o período da infecção como descrito em material e métodos. Após o período de infecção, culturas foram mantidas na ausência ou presença de LPS. A cultura onde ocorreu a infecção em ambiente de normóxia permaneceu no mesmo ambiente de normóxia. Já a cultura onde ocorreu a infecção em ambiente hipóxico foi mantida em hipóxia por um período adicional de 3 dias e, então, esta foi transferida para o ambiente de normóxia por 7 dias adicionais. Nestas condições a viabilidade dos macrófagos não apresentou alterações significativas quando comparada com as culturas mantidas durante 10 dias consecutivos em normóxia, conforme análises feitas pela técnica de exclusão por coloração com azul de Trypan (dados não mostrados). A contagem das formas tripomastigotas foi realizada após 10 dias em cultura com auxílio da câmara de Neubauer. A Figura 8 mostra que o ambiente hipóxico reduziu a infecção pelo *T. cruzi* e que o estímulo por LPS contribuiu para uma maior redução da infecção pelo *T. cruzi* em ambiente hipóxico.

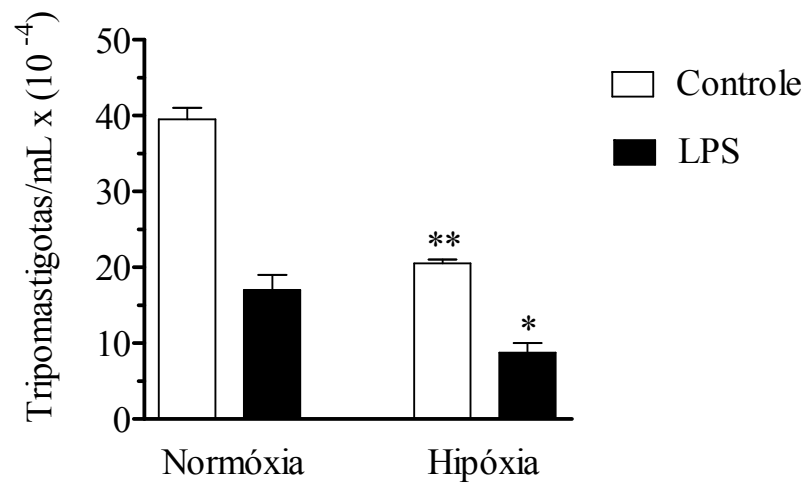


FIGURA 8 – EFEITO DA HIPÓXIA NA INFECÇÃO PELO *T. cruzi*. Macrófagos infectados foram cultivados com meio de cultura somente (Controle – barra branca) ou meio de cultura suplementado com 10 ng/mL de LPS (LPS – barra preta) e mantidos em condições de normóxia ou hipóxia por 72h. Após este período, macrófagos cultivados em ambiente de normóxia foram mantidos neste ambiente por mais 7 dias consecutivos. Macrófagos mantidos em ambiente de hipóxia foram transferidos para o ambiente de normóxia por mais 7 dias. A contagem dos parasitas foi realizada de maneira direta com auxílio da câmara de Neubauer 10 dias após a infecção. Média \pm SEM estão representados. (*): $p < 0,05$ e (**): $p < 0,01$ para diferenças em relação à cultura de macrófagos mantida em ambiente de normóxia.

4.8 - PRODUÇÃO DE NITRITOS EM AMBIENTE HIPÓXICO DURANTE A INFECÇÃO PELO *T. CRUZI*

Um fator importante na resistência contra a infecção pelo *T. cruzi* é a produção de NO (PELUFFO *et al.*, 2004), e por isso, estudamos a influência da hipóxia na produção de NO em macrófagos infectados. Cultura de macrófagos controle não infectados e infectados pelo *T. cruzi* em condições de normóxia ou hipóxia foram mantidos nestas condições, sendo as culturas de macrófagos infectados mantidos na ausência ou presença de LPS. Após 48h, os sobrenadantes das culturas foram coletados e analisados para quantidade de nitritos pelo método de Griess e os resultados apresentados na Figura 9. Pode-se observar que o ambiente hipóxico causa uma diminuição na produção de nitritos por macrófagos infectados na presença de LPS, quando comparados com o ambiente de normóxia. Não foi observada qualquer alteração na produção de nitritos pelos macrófagos não infectados ou infectados e cultivados somente com meio de cultura e mantidos em normóxia ou hipóxia.

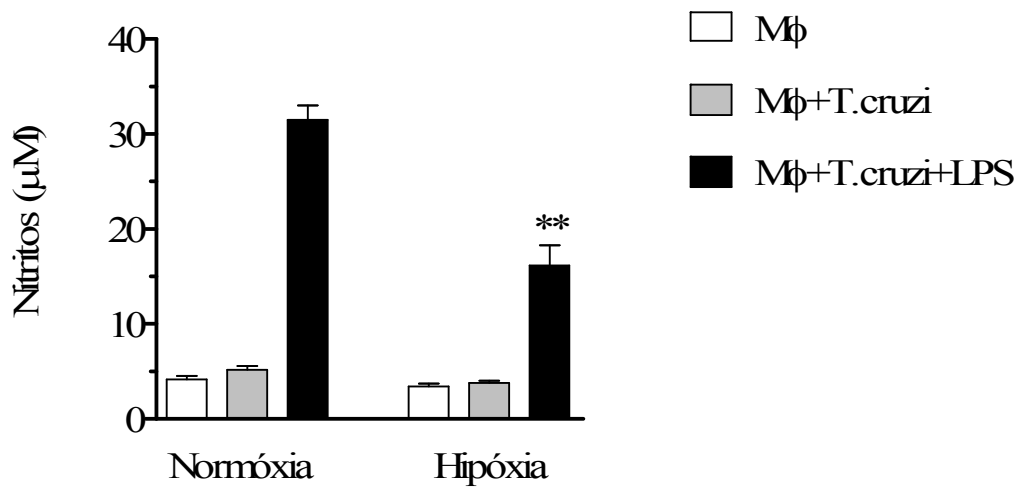


FIGURA 9. EFEITO DA NORMÓXIA E HIPÓXIA NA PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO DURANTE A INFECCÃO PELO *T. cruzi*. Culturas de macrófagos não infectados (Mφ – barra branca) e infectados (Mφ + *T. cruzi* – barra cinza) foram preparadas em meio RPMI e cultura de macrófagos infectados foram cultivados com meio suplementado com 10 ng/mL de LPS (Mφ + *T. cruzi* + LPS – barra preta). As culturas foram mantidas em ambiente de normóxia ou hipóxia. Após 48 h, os sobrenadantes foram testados para a presença de nitritos pelo método de Griess. Sendo média \pm SEM dos valores em μ M representados. Diferenças significativas ($p < 0,01$) em relação ao ambiente de normóxia estão assinalados (**).

4.9 - ANÁLISE DA INFLUÊNCIA DA HIPÓXIA NA INFECTIVIDADE DO *T. CRUZI*

Com o intuito de avaliar a possibilidade de que a redução da carga parasitária das culturas na condição de hipóxia estivesse ocorrendo por interferência na infectividade do parasita, formas tripomastigotas foram mantidas em ambiente de normóxia ou hipóxia por um período de 12 horas e posteriormente colocadas em contato com macrófagos durante 18 horas em normóxia. Após este período, o percentual de macrófagos infectados e o número de amastigotas por 100 macrófagos foram determinados em contagem de lamínulas e os resultados apresentados na Figura 10. Nestas condições, o tratamento dos parasitas com hipóxia não alterou a porcentagem de macrófagos infectados (Figura 10A), e não interferiu no número de amastigotas por 100 macrófagos (Figura 10B), quando comparados aos parasitas submetidos a condições de normóxia. Estes resultados sugerem que o efeito da hipóxia na carga parasitária ocorre numa etapa posterior à penetração das formas tripomastigotas nos macrófagos.

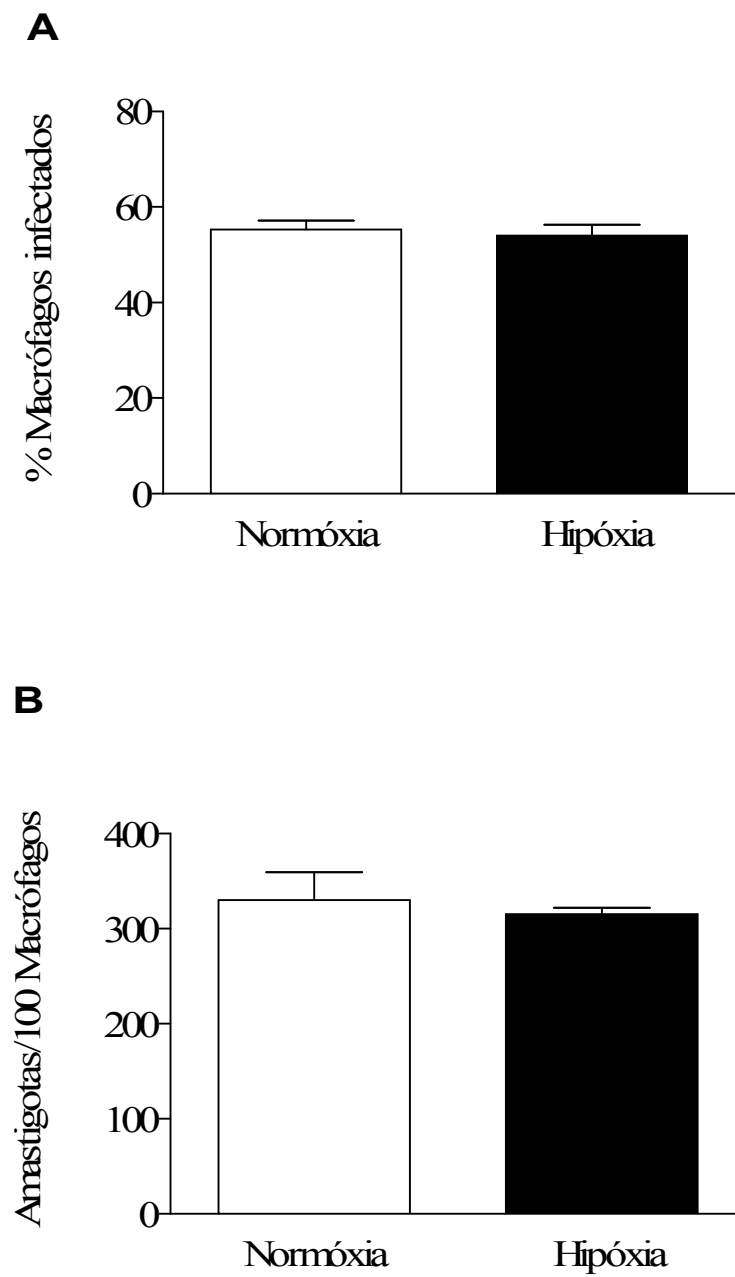


FIGURA 10 – EFEITOS DA HIPÓXIA NA INFECTIVIDADE DO *T. cruzi*. Formas tripomastigotas do *T. cruzi* foram mantidas em condições de normóxia ou hipóxia por 12 horas. Após este período os parasitas foram adicionados por 18 horas à cultura de macrófagos que foram cultivados em condições de normóxia. Após 48h a porcentagem de macrófagos infectados (A) e o número de amastigotas por 100 macrófagos (B) foram avaliados como na Figura 7. Média \pm SEM estão representados.

4.10 - EFEITO DO L-NIL NA PRODUÇÃO DE NO E NA CARGA PARASITÁRIA

Para melhor avaliarmos o efeito da hipóxia na produção de óxido nítrico e a influência deste efeito no nosso modelo experimental de infecção pelo *T. cruzi*, utilizamos L-NIL, um bloqueador da produção de óxido nítrico através da inibição da iNOS (RIBEIRO-GOMES *et al.*, 2005). Macrófagos cultivados foram ou não infectados com *T.cruzi* em normóxia ou hipóxia e mantidos em meio de cultura somente ou contendo LPS, LPS e L-NIL ou L-NIL. As culturas foram mantidas em normóxia ou hipóxia. Após 48 horas, os sobrenadantes das culturas foram coletados e analisados para detecção de nitritos pelo método de Griess. Pode-se observar que o inibidor L-NIL foi capaz de bloquear intensamente a síntese de nitritos tanto em condições de normóxia como de hipóxia, tanto na ausência como na presença do estímulo LPS (Figura 11A).

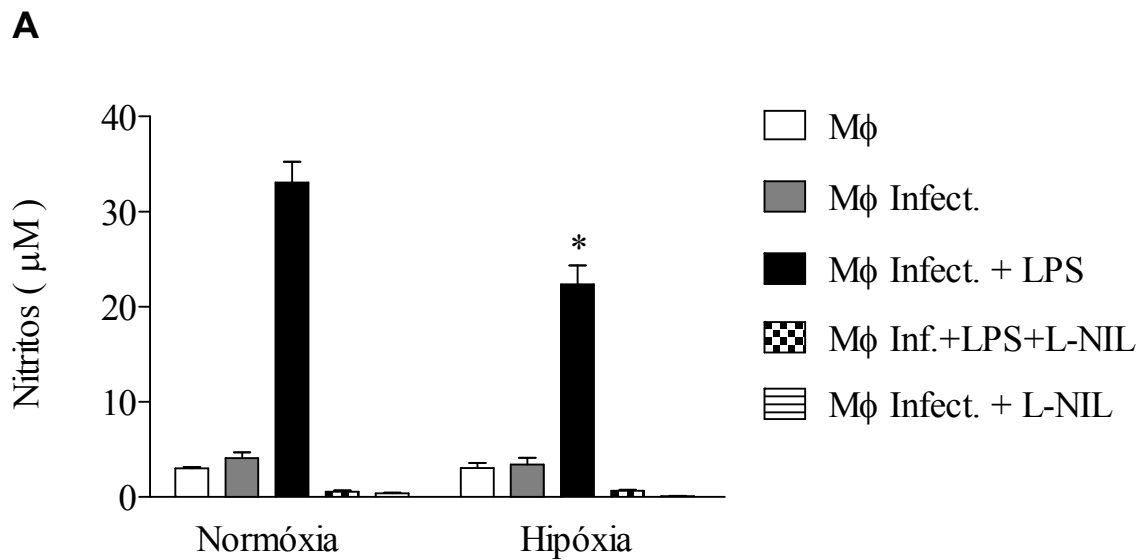


FIGURA 11A – BLOQUEIO DA PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO POR L-NIL DURANTE A INFECCÃO PELO *T. cruzi*. Macrófagos infectados (Mφ Infect) ou não foram (Mφ) mantidos em normóxia ou hipóxia. Após o período de infecção foram adicionados somente meio de cultura (Mφ Infect), LPS (Mφ Infect + LPS), LPS e L-NIL (Mφ Inf + LPS + L-NIL) ou L-NIL (Mφ Infect + L-NIL) e mantidos em condições de normóxia ou hipóxia como indicado na base da figura. Após 48 h, os sobrenadantes foram testados para a presença de nitrito pelo método de Griess. [LPS] - 10ng/mL e [L-NIL] - 1mmol/L. Média ± SEM estão representados. (*): $p < 0,05$ para diferenças em relação ao ambiente de normóxia.

Macrófagos cultivados foram infectados com *T.cruzi* em normóxia ou hipóxia e mantidos em meio de cultura somente ou contendo LPS, LPS e L-NIL ou L-NIL. As culturas foram mantidas em normóxia ou hipóxia por um período de 72 horas. Após este período, culturas mantidas em hipóxia foram transferidas para o ambiente de normóxia por mais 7 dias adicionais e culturas mantidas em ambiente de normóxia foram mantidas em normóxia por um período de 7 dias consecutivos. A Figura 11B mostra que a presença do inibidor da síntese de óxido nítrico não foi capaz de reverter a diminuição da infecção em ambiente de hipóxia quando comparado ao mesmo procedimento efetuado em condições de normóxia. No entanto, L-NIL reverteu completamente o efeito do LPS, tanto em normóxia como em hipóxia.

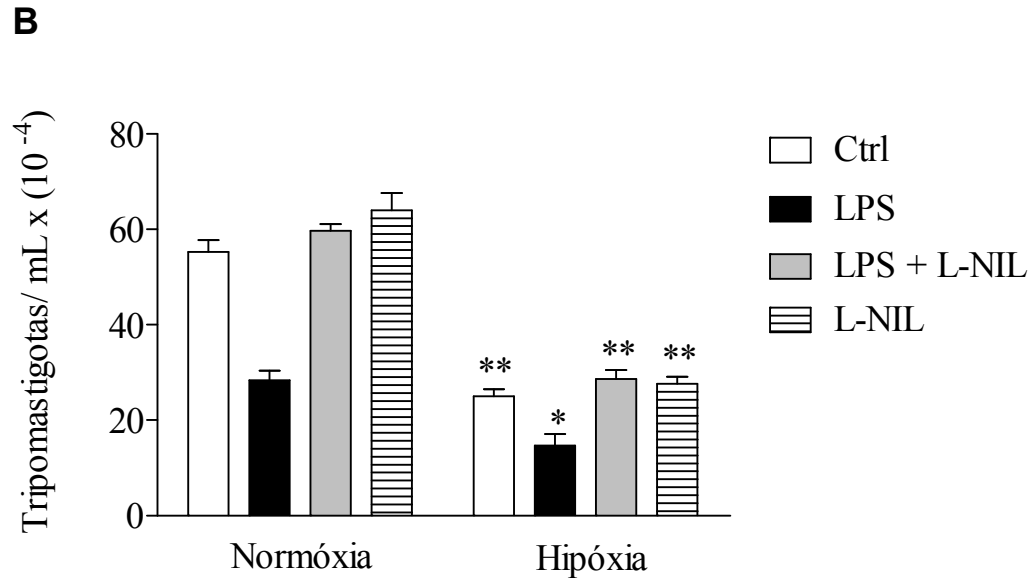


FIGURA 11B – EFEITO DA INIBIÇÃO DA SÍNTESE DE NO POR L-NIL NA REPLICAÇÃO DO *T. cruzi* EM AMBIENTE DE NORMÓXIA E HIPÓXIA. Macrófagos infectados (Mφ Infect) foram mantidos em normóxia ou hipóxia. Após o período de infecção foram adicionados somente meio de cultura (Mφ Infect), LPS (Mφ Infect + LPS), LPS e L-NIL (Mφ Inf + LPS + L-NIL) ou L-NIL (Mφ Infect + L-NIL) e mantidos em condições de normóxia ou hipóxia por um período de 72 horas adicionais como indicado na base da figura. Após este período, macrófagos infectados em ambiente de hipóxia foram transferidos para o ambiente de normóxia por um período de 7 dias e macrófagos infectados em ambiente de normóxia foram mantidos em condições de normóxia por 7 dias consecutivos. A contagem de parasitas foi realizada por contagem direta 10 dias após a infecção com auxílio da câmara de Neubauer. [LPS] - 10ng/mL e [L-NIL] - 1mmol/L. Média ± SEM estão representados. (*): $p < 0,05$ e (**): $p < 0,01$ para diferenças em relação à cultura de macrófagos mantida em ambiente de normóxia.

4.11 - ANÁLISE DOS EFEITOS DA HIPÓXIA NA EFEROCITOSE

A seguir, avaliamos a influência da hipóxia na eferocitose. Macrófagos foram cultivados em lamínulas e mantidos em condições de normóxia ou hipóxia durante os períodos indicados. Em seguida, timócitos viáveis ou apoptóticos foram adicionados às culturas. Após 1 hora, eferocitose foi medida com auxílio de microscopia óptica. A Figura 12A mostra que no decorrer do período de exposição ao ambiente de hipóxia, há uma redução na porcentagem de células fagocitando timócitos apoptóticos. Da mesma forma, a Figura 12B mostra que há uma diminuição significativa no número de células apoptóticas fagocitadas por 100 macrófagos e que este efeito aumenta no decorrer do tempo de exposição ao ambiente de hipóxia.

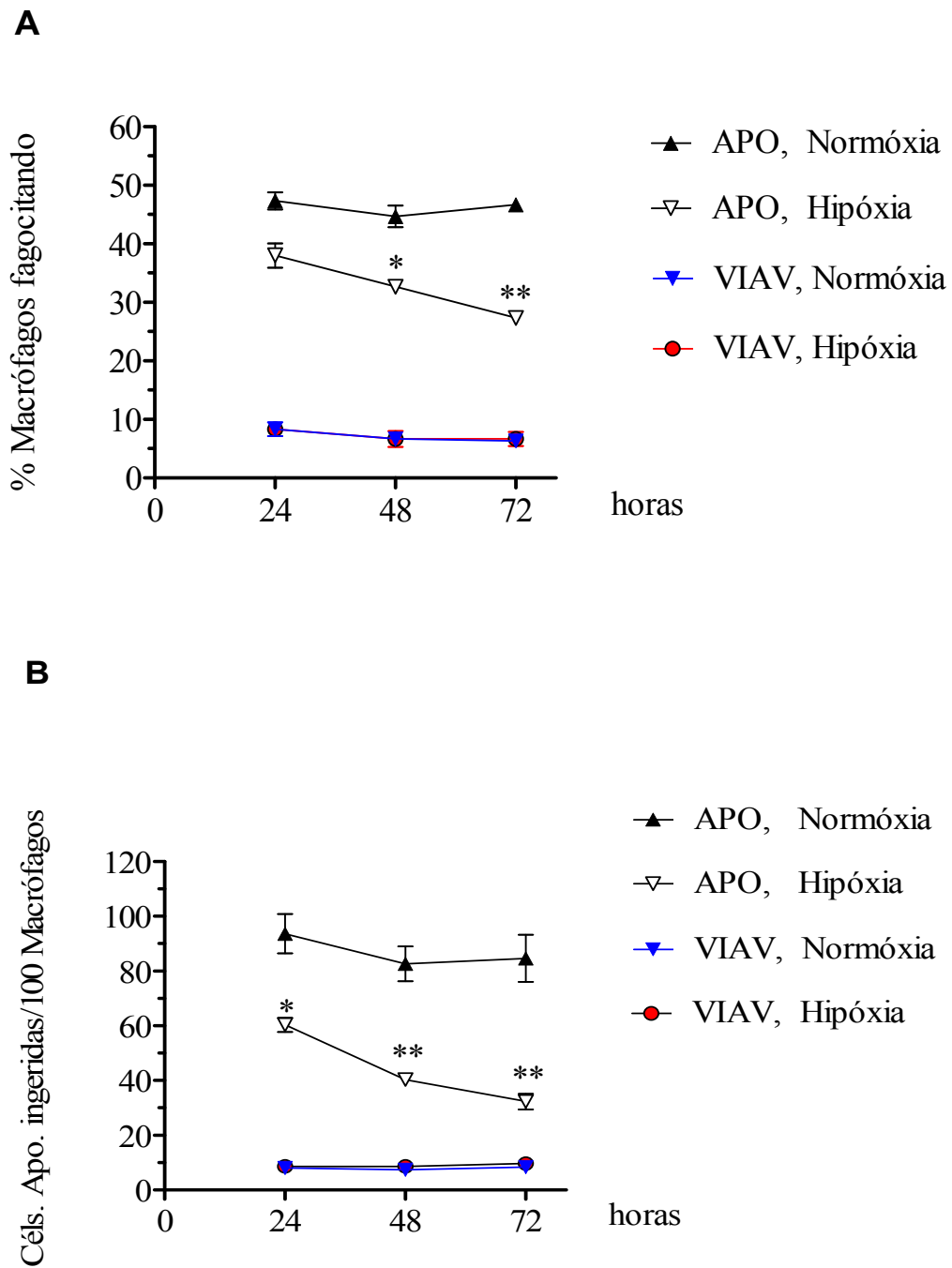


FIGURA 12 – EFEITOS DA HIPÓXIA NA EFEROCITOSE. Macrófagos cultivados em lamínula e submetidos a condições de normóxia ou hipóxia por períodos de 24h, 48h e 72h. Após cada um destes períodos foram adicionados timócitos viáveis ou timócitos apoptóticos e incubados por 1 hora com os macrófagos em condições de normóxia ou hipóxia. (A) Porcentagem de macrófagos fagocitando. (B) Número de células apoptóticas por 100 macrófagos. ▲ Macrófagos em normóxia com timócitos apoptóticos. ▽ Macrófagos em hipóxia com timócitos apoptóticos. ▼ Macrófagos em normóxia com timócitos viáveis. ● Macrófagos em hipóxia com timócitos viáveis. Média ± SEM estão representados. (*): $p < 0,05$ e (**): $p < 0,01$ para diferenças em relação à cultura de macrófagos mantida em ambiente de normóxia.

4.12 - EFEITO DA EFEROCTOSE NA REPLICAÇÃO DO *T. CRUZI* EM CONDIÇÕES DE HIPÓXIA

Em seguida, analisamos o efeito da fagocitose de timócitos apoptóticos ou necróticos na replicação do *T.cruzi* em condições de hipóxia. Macrófagos foram cultivados e infectados com *T.cruzi* e mantidos em condições de normóxia ou hipóxia como descrito em material e métodos. Após o período de infecção, foi adicionado somente meio de cultura, timócitos apoptóticos, timócitos necróticos ou LPS. A cultura mantida em ambiente de hipóxia permaneceu em ambiente de hipóxia por 72 horas, e foi posteriormente transferida para o ambiente de normóxia como descrito anteriormente. Como mostrado na Figura 13, em normóxia, a presença de células apoptóticas provocou um aumento na replicação do *T. cruzi* em macrófagos. Em hipóxia, ocorreu redução da replicação do *T. cruzi*, tanto nos controles, quanto em condições de eferocitose. No entanto, a adição de células apoptóticas ainda foi capaz de aumentar em 40 % a replicação do *T.cruzi*.

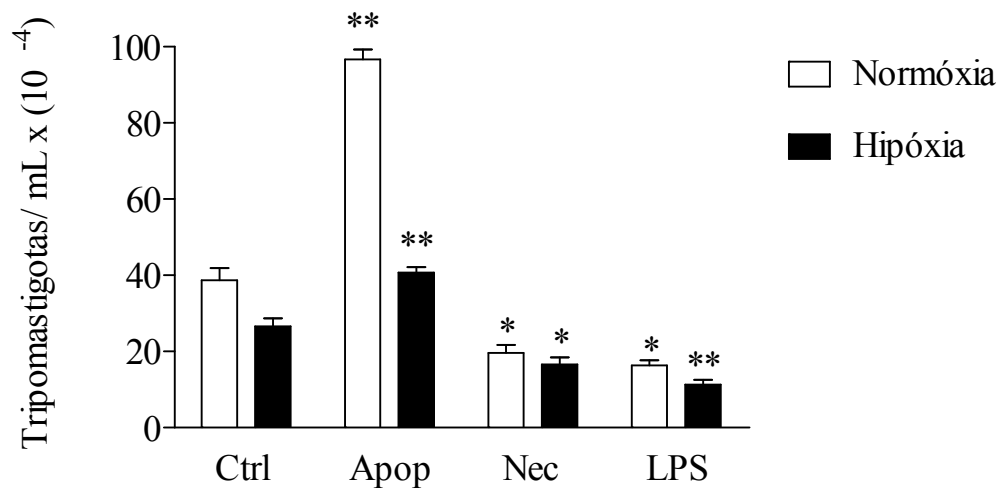


FIGURA 13 – EFEITOS DA ADIÇÃO DE CÉLULAS APOPTÓTICAS E NECRÓTICAS NA INFECCÃO PELO *T. cruzi* EM MACRÓFAGOS MANTIDOS EM NORMÓXIA OU HIPÓXIA. Macrófagos foram infectados e mantidos em condições de normóxia ou hipóxia. Após o período de infecção foi adicionado somente meio de cultura ou os estímulos tímócitos apoptóticos, tímócitos necróticos ou LPS. Macrófagos infectados em ambiente de hipóxia foram mantidos em hipóxia por 72 horas adicionais e transferidos para o ambiente de normóxia por um período de 7 dias consecutivos e macrófagos infectados em ambiente de normóxia foram mantidos por 10 dias consecutivos em normóxia. A contagem de parasitas foi realizada pelo método direto 10 dias após infecção com auxílio da câmara de Neubauer. Média \pm SEM estão representados. (*): $p < 0,05$ e (**): $p < 0,01$ para diferenças em relação à cultura de macrófagos não estimulados.

4.13 - ANÁLISE DO EFEITO DOSE-RESPOSTA À ADIÇÃO DE POLIAMINA EM AMBIENTE HIPÓXICO

Estudos anteriores demonstraram que putrescina, uma poliamina, é essencial para o crescimento do *T. cruzi* (FREIRE-DE-LIMA *et al.*, 2000). Nesta direção, os efeitos da adição de putrescina a culturas de macrófagos infectados foram comparados quando estas eram mantidos em normóxia ou hipóxia. Culturas contendo ou não diferentes concentrações de putrescina foram mantidas por 72h após infecção em normóxia ou hipóxia e estas últimas foram colocadas em normóxia juntamente com os demais e cultivados por 7 dias adicionais. Ao final dos 10 dias de cultivo, o número de formas tripomastigotas liberadas nos sobrenadantes foram quantificadas por método direto de contagem com auxílio da câmara de Neubauer. Na Figura 14 pode-se observar que a putrescina foi capaz de aumentar o crescimento do parasita tanto no ambiente de normóxia quanto no ambiente de hipóxia. Entretanto, na hipóxia o aumento na taxa de replicação foi menos intenso em resposta às concentrações crescentes de putrescina. Estes dados poderiam explicar a redução do efeito da eferocitose em hipóxia.

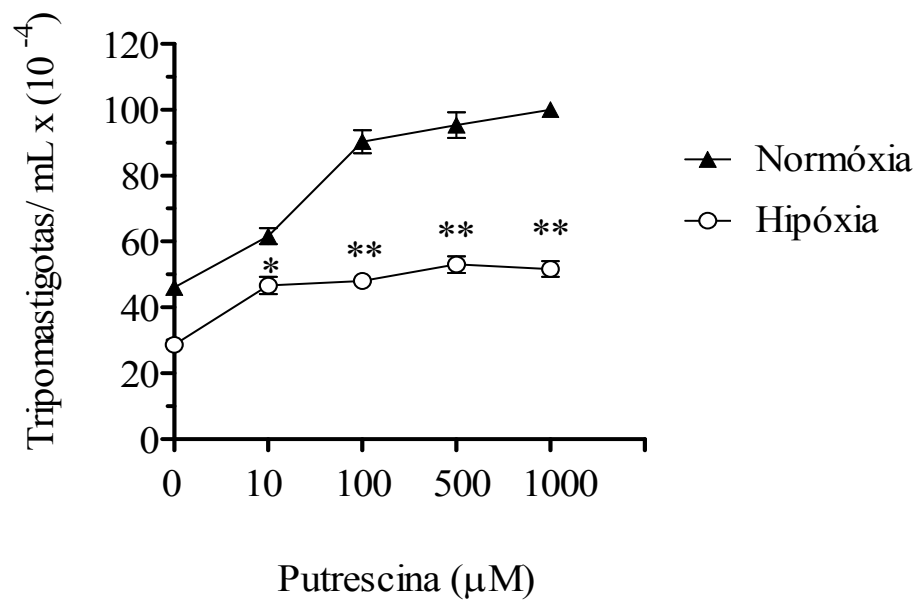


FIGURA 14 – DOSE –RESPOSTA DA ADIÇÃO DE PUTRESCINA NA LIBERAÇÃO DE FORMAS TRIPOMASTIGOTAS NO SOBRENADANTE DE CULTURAS DE MACRÓFAGOS INFECTADOS SUBMETIDOS À NORMÓXIA OU AMBIENTE DE HIPÓXIA. Após infecção dos macrófagos em ambiente de normóxia (▲) ou hipóxia (○) as culturas foram cultivadas na ausência ou presença de quantidades crescentes de putrescina (10-100µM) em normóxia ou hipóxia por 72h. Após este período, todas as culturas foram mantidas em normóxia por mais 7 dias, quando o número de tripomastigotas nos sobrenadantes foi determinado por contagem direta em câmara de Neubauer. Média ± SEM estão representados. (*): $p < 0,05$ e (**): $p < 0,01$ para diferenças em relação à cultura de macrófagos mantida em ambiente de normóxia.

4.14 - EFEITO DA EFEROCITOSE NA PRODUÇÃO DE NO EM HIPÓXIA

Avaliamos o efeito da eferocitose na produção de óxido nítrico em hipóxia . Macrófagos foram cultivados e infectados ou não com *T.cruzi* em normóxia ou hipóxia como descrito. Após o período de infecção foram adicionados somente meio de cultura, timócitos apoptóticos, timócitos necróticos ou LPS. As culturas foram mantidas em normóxia ou hipóxia. Após 48 horas, os sobrenadantes da cultura foram coletados e analisados pelo método de Griess. A Figura 15 mostra que a adição de células apoptóticas não induziu produção importante de NO, seja em normóxia ou hipóxia. Importante, adição de células necróticas reduziu a produção de NO, tanto quanto a adição de LPS. Como esperado, ocorreu uma redução na produção de NO em hipóxia. Não observamos diferença na produção de nitritos na ausência de estímulos tanto em ambiente de normóxia quanto de hipóxia.

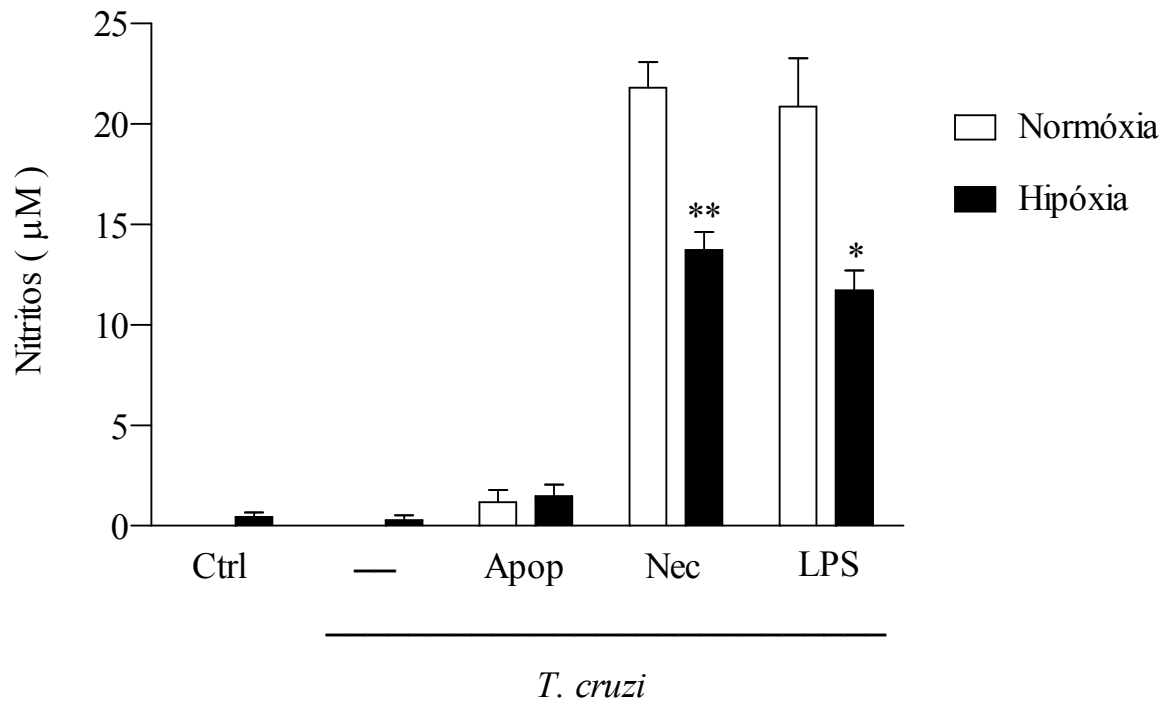
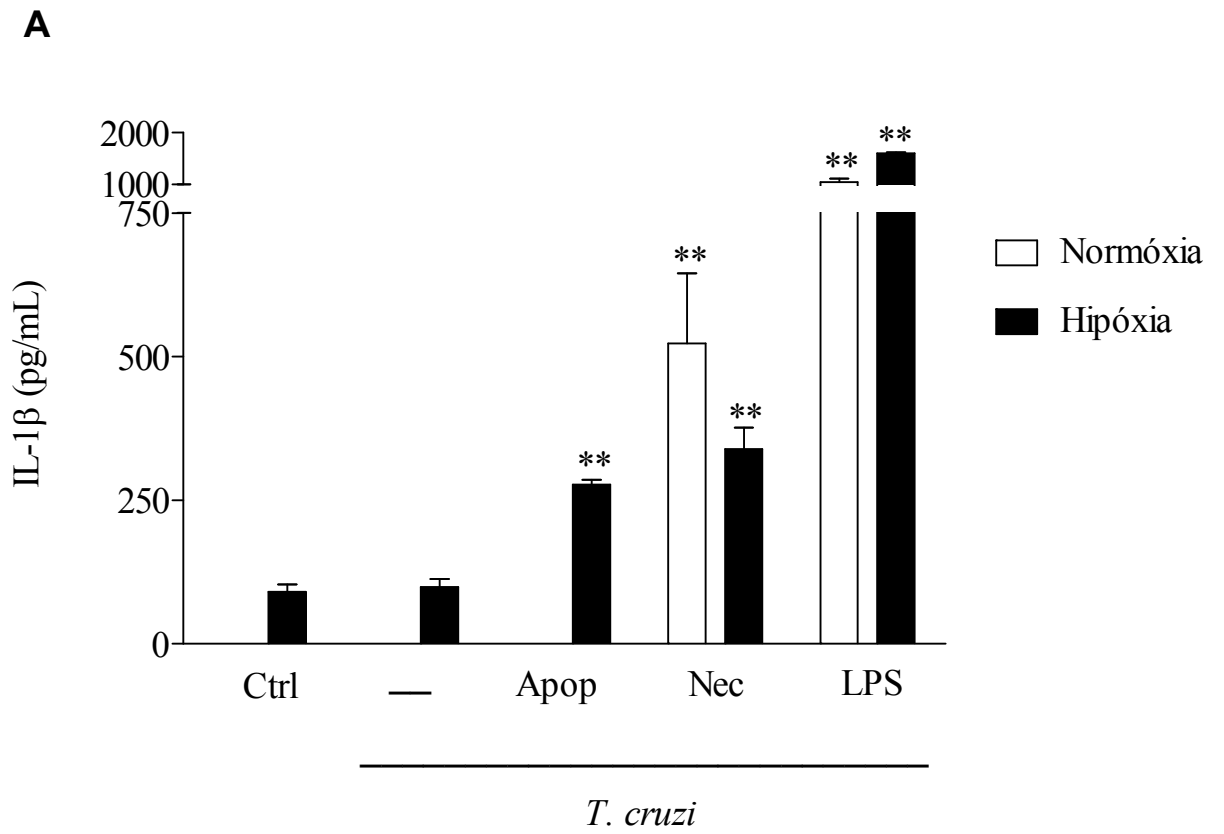


FIGURA 15 – EFEITO DIFERENCIAL DE CÉLULAS APOPTÓTICAS E NECRÓTICAS NA PRODUÇÃO DE NO. Macrófagos infectados ou não e mantidos em normóxia ou hipóxia. Após o período de infecção foi adicionado somente meio de cultura (Ctrl) ou os estímulos timócitos apoptóticos (Apop), timócitos necróticos (Nec) ou LPS. Após 48 h, os sobrenadantes foram testados para a presença de nitrito pelo método de Griess. Barra branca representa ambiente de normóxia e barra preta ambiente de hipóxia. Média \pm SEM estão representados. (*): $p < 0,05$ para diferenças em relação ao ambiente de normóxia.

4.15 - PERFIL DA PRODUÇÃO DE CITOCINAS EM AMBIENTE HIPÓXICO

Modelos experimentais mostram que a hipóxia é capaz de influenciar a produção de diversas citocinas (LEWIS, 1999). Com o objetivo de avaliar esta influência em nosso modelo, macrófagos inflamatórios infectados ou não com *T.cruzi* foram mantidos em condições de normóxia ou hipóxia. Após o período de infecção foram adicionados somente meio de cultura, timócitos apoptóticos, timócitos necróticos ou LPS, e as culturas foram mantidas em normóxia ou hipóxia. Após 48 horas, os sobrenadantes das culturas foram coletados e testados inicialmente para a produção das citocinas pró-inflamatórias IL-1 β e TNF- α pelo método de ELISA. A Figura 16A mostra que a hipóxia foi capaz de induzir um aumento na produção de IL-1 β mesmo na ausência de estímulos. Este aumento foi também observado em macrófagos infectados, e foi ainda maior quando estes macrófagos foram incubados com células apoptóticas e necróticas e na presença de LPS (Figura 16A). Além disso, a presença de células necróticas em culturas de macrófagos infectados mantidos em normóxia também provocou aumento na produção de IL-1 β . Na Figura 16B, surpreendentemente, pode-se observar que a hipóxia foi capaz de elevar ao nível máximo a produção de TNF- α nas culturas mesmo na ausência de estímulos, e a presença de células apoptóticas diminuiu a produção de TNF- α em hipóxia.



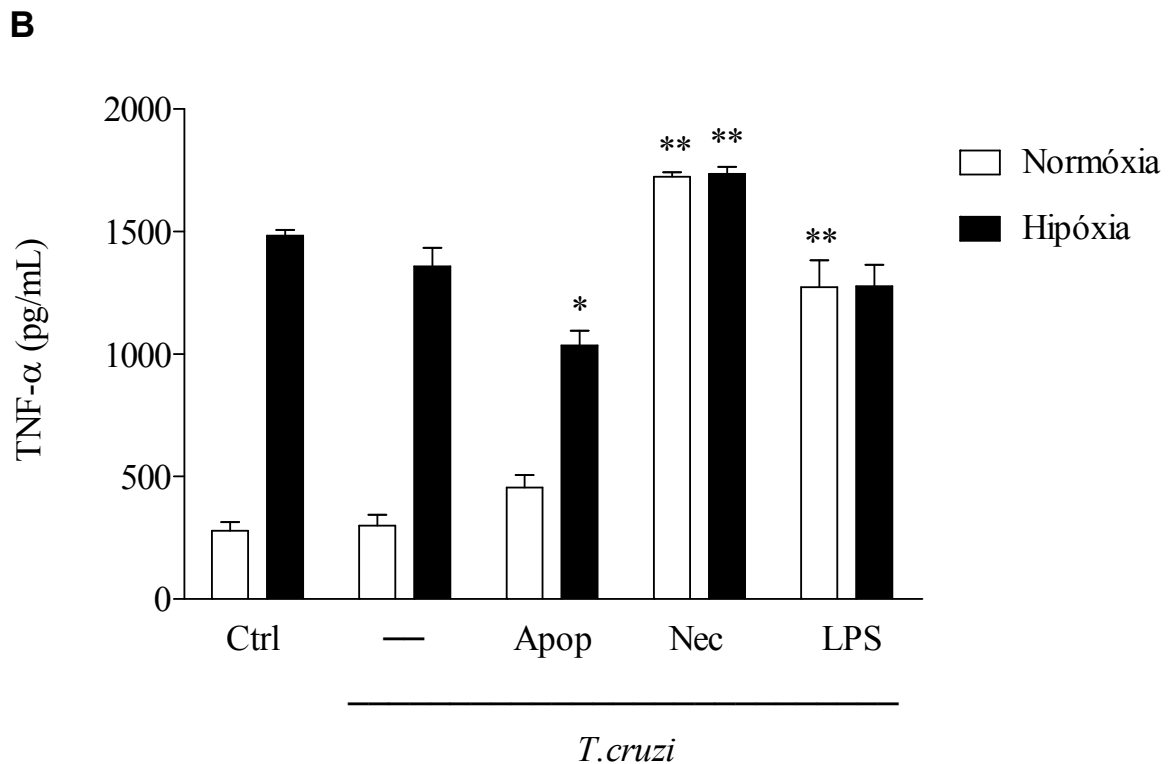


FIGURA 16 – PERFIL DE PRODUÇÃO DE CITOCINAS PRÓ-INFLAMATÓRIAS CULTURAS DE MACRÓFAGOS MANTIDOS EM AMBIENTE DE NORMÓXIA OU HIPÓXIA. Macrófagos infectados (-) ou não (Ctrl) foram mantidos em normóxia ou hipóxia. Após o período de infecção foi adicionado somente meio de cultura ou os estímulos timócitos apoptóticos (Apop), timócitos necróticos (Nec) ou LPS. Após 48 horas, os sobrenadantes foram recolhidos e a produção de citocinas foi avaliada pelo método de ELISA. IL-1 β (A), TNF- α (B). Média \pm SEM estão representados. Cultura de células realizadas em triplicatas. (*): $p < 0,05$ e (**): $p < 0,01$ para diferenças em relação à cultura de macrófagos infectados e ausentes de estímulo.

Em seguida, avaliamos o perfil da produção da citocina anti-inflamatória TGF- β nestas mesmas condições, comparando as respostas das culturas mantidas em normóxia ou hipóxia. Como apresentado na Figura 17, pode-se observar que timócitos apoptóticos aumentam a produção de TGF- β tanto em condições de normóxia quanto em hipóxia. Entretanto, tanto em hipóxia quanto em normóxia, não houve alteração na produção de citocina nas culturas de macrófagos não infectados ou infectados e não estimulados ou incubados na presença de células necróticas ou LPS.

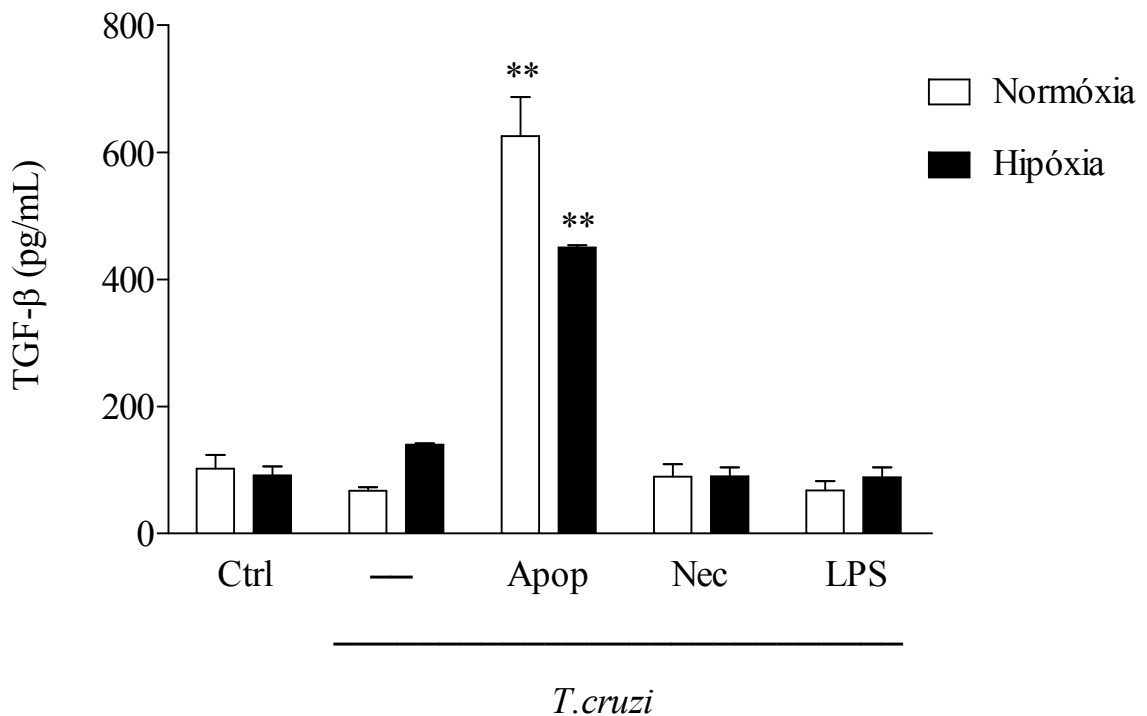


FIGURA 17 – PERFIL DE PRODUÇÃO DE TGF- β EM CULTURAS DE MACRÓFAGOS MANTIDOS EM AMBIENTE DE NORMÓXIA OU HIPÓXIA. Macrófagos infectados (-) ou não (Ctrl) foram mantidos em normóxia ou hipóxia. Após o período de infecção foi adicionado somente meio de cultura ou os estímulos timócitos apoptóticos (Apop), timócitos necróticos (Nec) ou LPS. Após 48 horas, os sobrenadantes foram recolhidos e a produção de citocinas foi avaliada pelo método de ELISA. Média \pm SEM estão representados. Cultura de células realizadas em triplicatas. (*): $p < 0,05$ e (**): $p < 0,01$ para diferenças em relação à cultura de macrófagos infectados e ausentes de estímulo.

4.16 - ANÁLISE DA NEUTRALIZAÇÃO DE CITOCINAS NA INFECÇÃO PELO *T. CRUZI* EM AMBIENTE HIPÓXICO

Para entendermos o papel do TNF- α na redução da infecção pelo *T. cruzi* em ambiente hipóxico, utilizamos anticorpo neutralizante desta citocina. Macrófagos foram cultivados e infectados com *T. cruzi* e mantidos em condições de normóxia ou hipóxia como descrito. Após o período de infecção, foram adicionados somente meio de cultura ou timócitos apoptóticos na presença ou ausência do anticorpo neutralizante da citocina TNF- α ou seu isotipo controle. A cultura onde a infecção ocorreu em ambiente de hipóxia permaneceu em ambiente de hipóxia por 72 horas adicionais e, em seguida, transferida para o ambiente de normóxia por um período de 7 dias adicionais. A cultura onde a infecção ocorreu em ambiente de normóxia foi mantida durante durante 10 dias consecutivos em normóxia. Na Figura 18, observamos que a neutralização do TNF- α aumenta a replicação do *T. cruzi* em ambiente hipóxico e estimulados com timócitos apoptóticos. Entretanto, não reverte completamente o efeito observado na hipóxia.

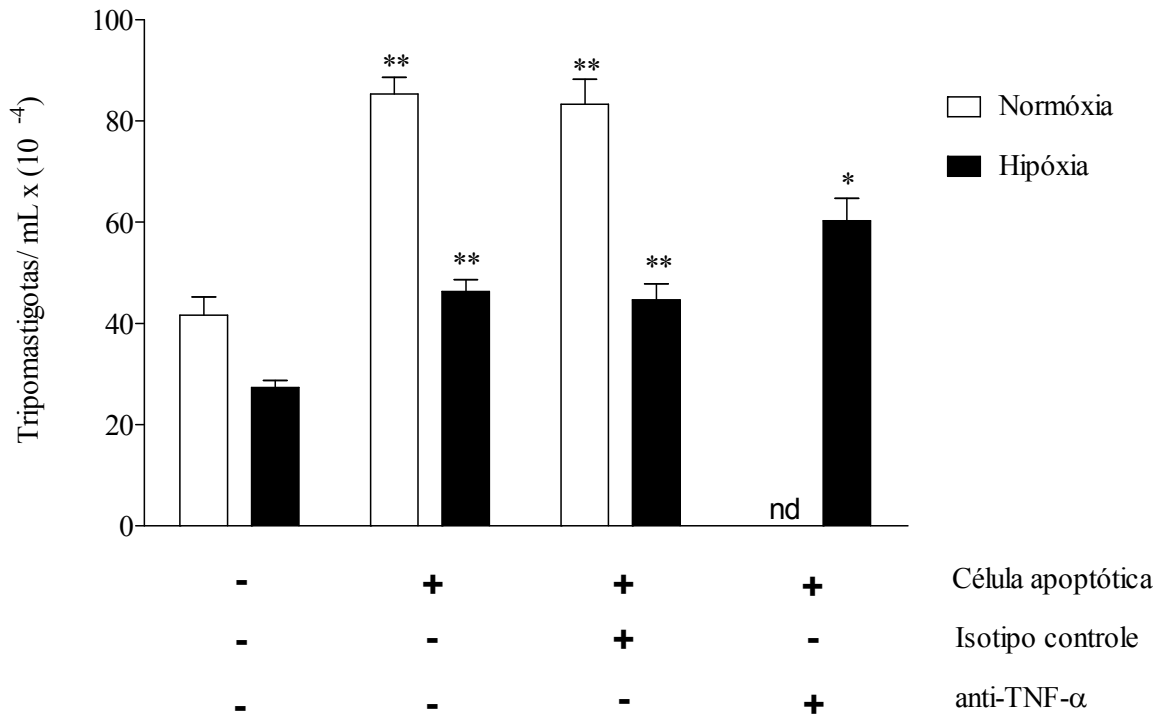


FIGURA 18 – EFEITO DA NEUTRALIZAÇÃO DO TNF- α EM AMBIENTE HIPÓXICO NA INFECÇÃO PELO *T. cruzi*. Macrófagos infectados foram mantidos em normóxia ou hipóxia. Após o período de infecção foi adicionado somente meio de cultura ou timócitos apoptóticos na presença ou ausência de anti-TNF- α ou isotipo controle. Macrófagos em ambiente de hipóxia foram mantidos em hipóxia por 72 horas adicionais e transferidos para o ambiente de normóxia. A contagem de parasitas foi realizada 10dpi com auxílio da câmara de Neubauer. Média \pm SEM estão representados. (*): $p < 0,05$ e (**): $p < 0,01$ para diferenças em relação à cultura de macrófagos infectados e ausentes de estímulo. (nd) não determinado.

5. *Discussão*

Em condições patológicas, a interrupção do fluxo sanguíneo resultante da disfunção da rede vascular no tecido alterado freqüentemente causa a formação de áreas de baixa tensão de oxigênio (LEWIS *et al.*, 1999). No contexto de infecção pelo *Trypanosoma cruzi*, a formação de agregados plaquetários intravasculares e trombos oclusivos afetam a microcirculação local (ROSSI *et al.*, 1984). Posteriormente, ROSSI *et al.*, (1985), utilizando o mesmo modelo experimental, evidenciaram a formação de áreas hipóxicas e sugerem que a hipóxia poderia estar associada à injúria na cardiomiopatia chagásica. Durante a fase aguda da infecção, nos órgãos linfóides como baço, a hiperplasticidade resultante da ativação policlonal comparada a animais controle pode também gerar a formação de hipóxia.

Neste trabalho, investigamos os efeitos da hipóxia na infecção de macrófagos pelo *T. cruzi*. Na etapa inicial do nosso estudo, foi utilizado um sensor catódico com objetivo de validar o procedimento experimental para o estabelecimento do ambiente hipóxico. Na Figura 1, observamos que o modelo experimental para o emprego da condição de hipóxia foi efetuado com êxito.

Diversos estudos demonstram que diferentes tipos celulares são capazes de resistir a períodos crônicos de hipóxia e a situações que envolvem o processo de reoxigenação através de mecanismos adaptativos (YUN *et al.*, 1997; TSUKAMOTO *et al.*, 1996; GRAEBER *et al.*, 1996; RYMSA *et al.*, 1990). Em nosso modelo, sob condições determinadas, verificamos que macrófagos inflamatórios mantiveram sua viabilidade celular durante o período de 3 dias em hipóxia. O posterior processo de reoxigenação durante 7-10 dias empregado, não interferiu significativamente na viabilidade dos macrófagos. No entanto, observamos que macrófagos mantidos por um período de 7 dias consecutivos em ambiente hipóxico apresentaram uma significativa redução na viabilidade celular (Figura 2). Estes resultados

permitiram o emprego do procedimento experimental sem que ocorresse qualquer comprometimento na sobrevivência celular.

O fator de transcrição HIF-1 α acumula em condições de hipóxia, e é considerado como um dos principais mediadores da adaptação celular a variações na pO₂, participando na regulação de mais de 100 genes que estão envolvidos com os mais variados processos nas células de mamíferos (LEWIS *et al.*, 1999; BURKE *et al.*, 2003). Observamos que no período de 24 horas de exposição à hipóxia, a expressão de HIF-1 α aumenta significativamente em macrófagos inflamatórios (Figura 3), sugerindo que o efeito deste fator está presente em nosso modelo experimental.

Células do sistema imune inato são usualmente as primeiras a chegar ao sítio inflamatório ou tecido danificado e se adaptam à baixa tensão de oxigênio encontrada nesses locais. Estudos anteriores sugerem que macrófagos são capazes de alterar sua atividade metabólica de diversas maneiras quando expostos à hipóxia. Um mecanismo relevante para o processo de adaptação é a adoção do metabolismo anaeróbico para a produção de ATP, semelhante ao observado em células tumorais sobre as mesmas condições de hipóxia (BUTTERICK *et al.*, 1981). Na Figura 4, observamos uma maior acidificação do pH das culturas mantidas em ambiente hipóxico, quando comparado com as culturas mantidas em normóxia. Estes dados sugerem maior acúmulo e/ou secreção de produtos ácidos possivelmente oriundos do metabolismo preferencialmente fermentativo adotado pelos macrófagos como uma adaptação metabólica ao ambiente de hipóxia.

O NO é um importante componente no efeito tripanocida exercido por macrófagos murinos quando ativados por linfocinas (NATHAN & SHILOH, 2000; COLASANTI *et al.*, 2002; SILVA *et al.*, 2003; CICCARELLI *et al.*, 2007). Avaliamos a produção de nitritos por macrófagos não infectados e mantidos em condições de hipóxia. Nossos resultados indicam que a hipóxia limita a síntese de nitritos por macrófagos na presença de estímulos como LPS e

IFN- γ (Figura 5). Esses resultados são similares aos encontrados por McCORMICK *et al.*, (2000) que demonstra uma redução de 50-60% na produção de nitritos em macrófagos peritoneais sem infecção e ativados com LPS e IFN- γ em ambiente de hipóxia. MELILLO *et al.*, (1996) observaram que a hipóxia reduziu em 70% a síntese de nitritos em macrófagos não infectados e ativados por LPS e IFN- γ .

Diversos mecanismos podem potencialmente ser responsáveis pela diminuição na produção de NO pelos macrófagos quando a tensão de oxigênio na cultura é reduzida. Estes mecanismos podem ser divididos em duas categorias: 1) redução na quantidade total de iNOS ou na capacidade de determinada quantidade da enzima produzir NO quando a tensão de oxigênio é reduzida; 2) redução na disponibilidade de substratos para a produção de NO em baixas tensões de oxigênio.

Estudos anteriores mostram resultados conflitantes na descrição dos efeitos da pO₂ na enzima iNOS. ALBINA *et al.*, (1995) mostraram um aumento na proteína iNOS em macrófagos inflamatórios, mas não em macrófagos residentes quando a cultura foi submetida a baixas tensões de oxigênio. MELILO *et al.*, (1996) demonstraram um aumento paralelo na atividade iNOS citossólica e na proteína iNOS de macrófagos estimulados por IFN- γ onde as culturas foram mantidas em baixas tensões de oxigênio. Entretanto, KACIMI *et al.*, (1997) demonstraram que baixas tensões de oxigênio inibem a proteína iNOS em cardiomiócitos estimulados por IL-1 β .

Por outro lado, a diminuição da produção de NO quando a tensão de oxigênio é reduzida, pode também ser mediada por efeitos na disponibilidade de substratos para a produção de NO (OTTO & BAUMGARDNER, 2001). O oxigênio molecular é considerado um substrato essencial para a produção de NO (LEONE *et al.*, 1991), e tem sua disponibilidade limitada em condições de hipóxia. Apesar de que níveis citoplasmáticos de outros co-fatores conhecidos, e que participam da produção de NO, como tetrahidrobiopterina

(BH4), NADPH, FAD e heme, possam estar envolvidos na diminuição da produção de NO em condições de hipóxia (RENGASAMY & JOHNS, 1996; STUEHR, 1999).

Observamos também que a hipóxia foi capaz de reduzir a produção de ROS por macrófagos estimulados e não notamos alteração na emissão basal de fluorescência de macrófagos não estimulados e mantidos em condição de hipóxia (Figura 6).

Estudos mostram resultados conflitantes entre a produção de ROS e hipóxia. FAN *et al.*, (2007) mostraram que a hipóxia reduz a produção de ROS por células-tronco progenitoras CD34+, e que esta redução, está associada à uma diminuição na atividade NADPH oxidase. Entretanto, PADDENBERG *et al.*, (2003) demonstraram que células vasculares do pulmão de camundongos apresentaram um aumento na produção de ROS quando submetidas à hipóxia, e que este efeito estaria correlacionado com mecanismos mitocondriais compensatórios.

No contexto da infecção pelo *T. cruzi*, inicialmente, avaliamos a cinética da infecção em ambiente de hipóxia. Nossos resultados mostram que ocorre uma redução da carga parasitária no decorrer do tempo de exposição ao ambiente hipóxico (Figura 7). No período de 72 horas de exposição ao ambiente de hipóxia a porcentagem de macrófagos infectados reduziu significativamente (Figura 7A). Com base na análise do parâmetro do número de amastigotas por 100 macrófagos, observamos uma redução significativa no período de exposição de 24 horas a hipóxia, sendo essa redução ainda mais acentuada no decorrer do tempo de exposição ao ambiente hipóxico (Figura 7B). Os dados obtidos da Figura 8 corroboram para o efeito de redução da infecção pelo *T. cruzi* observado na hipóxia. Entretanto, no contexto de infecção pelo *T. cruzi*, a produção de nitritos por macrófagos infectados na presença de LPS também é limitada pelo ambiente hipóxico (Figura 9). No entanto, a produção de NO na condição de hipóxia poderia já ser suficiente para exercer a atividade tripanocida. Avaliamos a possibilidade de que a redução da carga parasitária das culturas estivesse ocorrendo por interferência com a infectividade do parasita. No entanto,

nossos resultados sugeriram que o efeito da hipóxia na carga parasitária ocorre em uma etapa posterior à penetração das formas tripomastigotas de *T. cruzi* (Figura 10).

Para melhor avaliarmos o efeito da hipóxia na produção de óxido nítrico e a influência deste efeito no nosso modelo experimental de infecção pelo *T. cruzi*, utilizamos L-NIL, um bloqueador da produção de óxido nítrico. Nossos resultados mostram que o inibidor L-NIL foi capaz de bloquear intensamente a síntese de nitritos tanto em condições de normóxia como de hipóxia, na ausência e na presença do estímulo LPS (Figura 11A). Apesar de reverter o efeito do LPS, a presença do inibidor da síntese de óxido nítrico não foi capaz de reverter a diminuição da infecção em ambiente de hipóxia quando comparado ao mesmo procedimento efetuado em condições de normóxia. Nossos dados sugerem não haver uma correlação entre a produção de nitritos e a redução da carga parasitária em macrófagos mantidos em condição de hipóxia, uma vez o efeito de redução da carga parasitária ainda ocorre com o bloqueio da síntese de nitritos (Figura 11B). Outro fator que podemos descartar é o efeito do processo de reoxigenação na diminuição da infecção. Isto porque, observamos que a redução na carga parasitária ocorre antes do processo de reoxigenação (Figura 7).

Nosso próximo passo foi avaliar a influência da hipóxia na eferocitose. Observamos que no decorrer do período de exposição ao ambiente de hipóxia, há uma redução na porcentagem de células fagocitando timócitos apoptóticos (Figura 12A). Da mesma forma (Figura 12B), há uma diminuição significativa no número de células apoptóticas fagocitadas por 100 macrófagos, efeito este, acentuado com o aumento do período de exposição ao ambiente de hipóxia.

Um caminho pelo qual macrófagos se adaptam a baixa tensão de oxigênio é através da limitação de funções energia-dependentes. Além disso, o oxigênio é essencial para o processo respiratório e a obtenção de energia está associada com uma eficiente atividade microbicida e digestiva através da produção de ROS e, indiretamente, para a regulação intravacuolar dos

níveis do pH relacionado com a atividade de enzimas lisossomais (SEGAL *et al.*, 1981; BABIOR, 1984; DU *et al.*, 1998; TAN *et al.*, 1998). Assim, análises histológicas de células de Kuppfer expostas à hipóxia, demonstraram uma redução na fagocitose de partículas coloidais de carbono (TE KOPPELE *et al.*, 1991). LEEPER-WOODFORD & MILLS (1992) mostraram que a hipóxia aguda alterou a função fagocítica em macrófagos alveolares de coelhos. Macrófagos pulmonares de camundongos incubados em baixas concentrações de oxigênio (2% pO₂), apresentaram redução da atividade fagocítica (SIMON *et al.*, 1981). REICHNER *et al.*, (2001) demonstraram uma redução na fagocitose de partículas de zimosan e de microesferas de látex por macrófagos de ratos mantidos em hipóxia.

Entretanto, TURNER *et al.*, (1999) não observaram influência da hipóxia na fagocitose de hemácias por células de linhagem monocítica humana. MATSUMOTO *et al.*, (2000) também não observaram diferenças na endocitose de lipoproteínas de baixa densidade (LDL) em macrófagos humanos mantidos em hipóxia. As diferenças nos estudos relatados podem ser em parte explicadas pelas diferenças nas metodologias empregadas, nos diferentes tipos de células testadas como fagócitos, na porcentagem e na duração no tempo de exposição à hipóxia aplicada e na natureza das partículas usadas para serem fagocitadas. Além disso, estes estudos sugerem que, em condições patológicas, a atividade fagocítica de macrófagos pode estar comprometida em áreas hipóxicas.

Diversos estudos demonstram que a putrescina, um poliamina, é essencial para o crescimento do *T. cruzi*. Avaliamos o efeito dose-resposta à adição de putrescina em hipóxia e observamos que a poliamina foi capaz de aumentar o crescimento do parasita tanto no ambiente de normóxia quanto no ambiente de hipóxia. Entretanto, no ambiente de hipóxia ocorreu uma replicação deficiente em resposta à putrescina (Figura 14)

De acordo com resultados anteriores (NUNES *et al.*, 1998; FREIRE-DE-LIMA *et al.*, 2000), observamos em nosso modelo experimental que em normóxia a presença de células

apoptóticas aumenta a replicação do *T. cruzi* em macrófagos. Em hipóxia, ocorreu redução generalizada da replicação do *T. cruzi*. No entanto, a adição de células apoptóticas ainda foi capaz de aumentar a replicação do *T. cruzi* (Figura 13).

Conforme discutida, a replicação do *T. cruzi* frente à adição de putrescina está diminuída em condições de hipóxia. Como o efeito da eferocitose depende da produção aumentada de putrescina (FREIRE-DE-LIMA *et al.*, 2000), estes dados poderiam explicar a redução do efeito da eferocitose observado em hipóxia. Na Figura 15 observamos que a adição de células apoptóticas não induziu um aumento na produção de NO, seja em normóxia ou hipóxia e ocorreu redução da produção de NO estimulada por LPS. Por outro lado, a adição de células necróticas induziu a produção de NO, tanto quanto a adição de LPS. Estes dados reforçam a noção de que a eferocitose é anti-inflamatória, enquanto que células necróticas induzem uma resposta pró-inflamatória (RAVICHANDRAN & LORENZ, 2007).

Os efeitos deletérios da eferocitose na replicação do *T. cruzi* dependem da produção de TGF- β (FREIRE-DE-LIMA *et al.*, 2000). Modelos experimentais demonstram que a hipóxia é capaz de influenciar a produção de diversas citocinas. Analisamos a produção da citocina TGF- β em condições de hipóxia. Na Figura 17 podemos observar que células apoptóticas aumentam a produção de TGF- β pelos macrófagos tanto em ambiente de normóxia quanto em hipóxia e não notamos aumento da produção de TGF- β pelos macrófagos mantidos em condição de hipóxia e não estimulados.

Uma série de estudos sugere que a hipóxia estimula a produção de citocinas pró-inflamatórias em macrófagos, como IL-1 β e TNF- α (LEWIS *et al.*, 1999; HADDAD & HARB, 2005). Na Figura 16A observamos que ocorreu um aumento na produção de IL-1 β pelos macrófagos não infectados, ausentes de estímulo e mantidos em hipóxia. A adição de células necróticas, tanto em hipóxia quanto em normóxia aumentou a produção de IL-1 β , e observamos um aumento da produção de IL-1 β pelos macrófagos na presença de células

apoptóticas em hipóxia. Estudos anteriores mostram que a hipóxia e IL-1 β atuam como estímulo para a produção de VEGF em células renais humanas, este efeito é atribuído ao aumento da ligação de HIF-1 ao DNA na região do gene promotor de VEGF, direcionando e contribuindo para alterações microvasculares e o extravasamento de monócitos (EL AWAD *et al.*, 2000). Além disso, a IL-1 β em condições de normóxia tem a habilidade de induzir a expressão e estabilidade de HIF-1, envolvendo a participação da via PI3-kinase (STIEHL *et al.*, 2002). HADDAD, (2002) mostra que a estabilização, a translocação nuclear e a ativação de HIF-1 α regulada pela IL-1 β recombinante humana requer um mecanismo sensível ao equilíbrio de antioxidantes e ROS, sugerindo uma importante via de estabilização não hipóxica de HIF-1.

O efeito da hipóxia no aumento da produção de TNF- α na ausência de estímulos foi demonstrado originalmente por SCANNEL *et al.*, (1993). Na Figura 16B observamos que a hipóxia induz uma alta produção de TNF- α pelos macrófagos mesmo na ausência de estímulos, e que a adição de células apoptóticas reduz este efeito. Na literatura, dados evidenciam que o TNF- α exerce um efeito estimulatório na ligação de HIF-1 ao DNA de maneira similar a IL-1 β (HELLWIG-BURGEL *et al.*, 1999). Além disso, estudos mostram o efeito da hipóxia na indução de moléculas de adesão através da liberação de TNF- α e IL-1 β (OHGA & MATSUSE, 2000).

Para melhor compreendermos o efeito da eferocitose na produção de TNF- α em condições de hipóxia, utilizamos anticorpo neutralizante desta citocina. Nossos dados mostram que a neutralização do TNF- α aumentou a replicação do *T. cruzi* induzida por eferocitose em condições de hipóxia (Figura 18). Os resultados sugeriram que a alta produção de TNF- α contribui para reduzir a replicação do *T. cruzi* em hipóxia. Além disso, a capacidade de a eferocitose aumentar a replicação do *T. cruzi* em hipóxia parece estar dependente da sua capacidade de reduzir parcialmente a produção de TNF- α .

A indução de hipóxia estimula em macrófagos a produção de citocinas pró-inflamatórias, como o TNF- α (LEWIS *et al.*, 1999), e é provável que condições hipóxicas estejam presentes na infecção pelo *T. cruzi in vivo*.

Resumidamente, conforme o modelo apresentado na Figura 19, observamos que a eferocitose por macrófagos infectados em ambiente de normóxia resulta em aumento da replicação do parasita. Já em condições de hipóxia, observamos um aumento da produção de TNF- α e aumento da expressão de HIF-1 α , mesmo nestas condições, sugerindo que neste modelo a eferocitose resulta na produção de fatores que atuam de maneira deletéria para o hospedeiro e que este efeito parece estar relacionado com a manutenção da produção de TGF- β , e associado à uma redução na alta produção basal de TNF- α em condições de hipóxia.

Portanto, nossos resultados obtidos mimetizando um ambiente de hipóxia, corroboram com a idéia de que a eferocitose possui papel deletério para o hospedeiro durante a infecção pelo *Trypanosoma cruzi* (DOSREIS & LOPES, 2009).

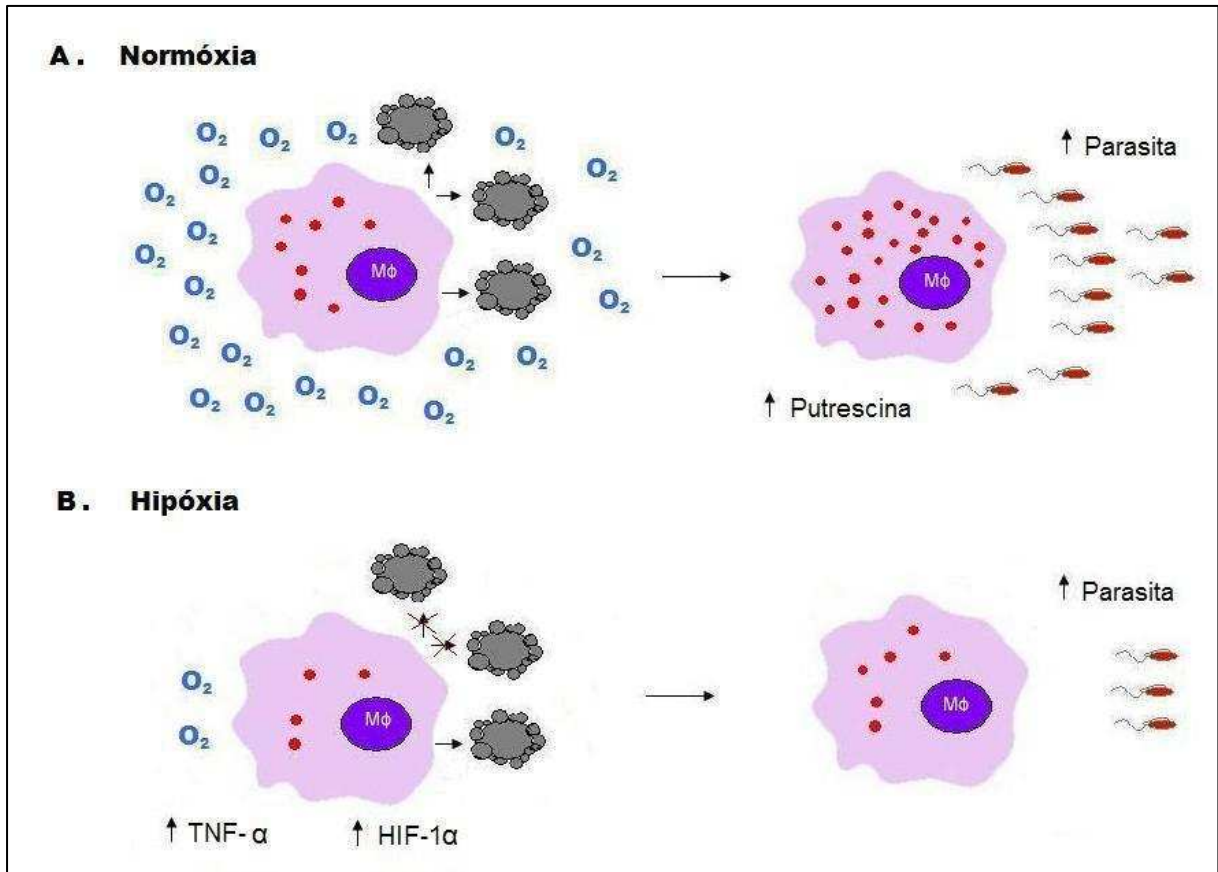


FIGURA 19 – MODELO COMPARATIVO DOS EFEITOS DA EFEROCITOSE NA REPLICAÇÃO DO *T. cruzi* EM MACRÓFAGOS MANTIDOS EM NORMÓXIA OU HIPÓXIA. (A) Em condições de normóxia, a fagocitose de células apoptóticas (representada na cor cinza) por macrófagos infectados pelo *T. cruzi* resulta em aumento da produção de putrescina, a qual favorece a replicação do parasita. (B) Em condições de hipóxia, ocorre um aumento na produção de TNF- α e aumento na expressão de HIF-1 α que participam para a diminuição generalizada da replicação do parasita. Mesmo nestas condições, a fagocitose de células apoptóticas (representada na cor cinza) por macrófagos infectados pelo *T. cruzi* é deletéria para o hospedeiro.

6. Conclusões

1. A hipóxia em macrófagos inflamatórios:
 - A) aumenta a expressão de HIF-1 α em macrófagos;
 - B) não interfere na infectividade das formas tripomastigotas;
 - C) promove uma diminuição generalizada da replicação do *T. cruzi*, que não está relacionada com NO, e que leva à uma resposta replicativa deficiente à oferta de putrescina;
 - D) diminui a eferocitose.
 - E) em macrófagos inflamatórios induz aumento na produção de TNF- α e IL-1 β mesmo na ausência de estímulos;
2. A eferocitose aumenta a replicação do *T. cruzi* em macrófagos submetidos à hipóxia, apesar do efeito ser menos acentuado do que em normóxia;
3. A neutralização do TNF- α produzido por macrófagos submetidos à hipóxia provocou um aumento na replicação do *T. cruzi*, sugerindo que este é um fator importante que contribui para os efeitos observados na hipóxia;

7. Referências Bibliográficas

ABRAHAMSOHN, I. A. E R. L. COFFMAN. Cytokine and nitric oxide regulation of the immunosuppression in *Trypanosoma cruzi* infection. **J Immunol**, v.155, n.8, Oct 15, p.3955-63. 1995.

ALBINA, J. E., W. L. HENRY, JR., B. MASTROFRANCESCO, B. A. MARTIN E J. S. REICHNER. Macrophage activation by culture in an anoxic environment. **J Immunol**, v.155, n.9, Nov 1, p.4391-6. 1995.

ANAND, R. J., S. C. GRIBAR, J. LI, J. W. KOHLER, M. F. BRANCA, T. DUBOWSKI, C. P. SODHI E D. J. HACKAM. Hypoxia causes an increase in phagocytosis by macrophages in a HIF-1alpha-dependent manner. **J Leukoc Biol**, v.82, n.5, Nov, p.1257-65. 2007.

ANGERMULLER, S., M. SCHUNK E K. KUSTERER. Alteration of xanthine oxidase activity in sinusoidal endothelial cells and morphological changes of Kupffer cells in hypoxic and reoxygenated rat liver. **Hepatology**, v.21, n.6, Jun, p.1594-601. 1995.

ARANTES, R. M., H. H. MARCHE, M. T. BAHIA, F. Q. CUNHA, M. A. ROSSI E J. S. SILVA. Interferon-gamma-induced nitric oxide causes intrinsic intestinal denervation in *Trypanosoma cruzi*-infected mice. **Am J Pathol**, v.164, n.4, Apr, p.1361-8. 2004.

ARIYANAYAGAM, M. R., S. L. OZA, A. MEHLERT E A. H. FAIRLAMB. Bis(glutathionyl)spermine and other novel trypanothione analogues in *Trypanosoma cruzi*. **J Biol Chem**, v.278, n.30, Jul 25, p.27612-9. 2003.

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

BAEZ, A. L., M. S. LO PRESTI, H. W. RIVAROLA, P. PONS, R. FRETES E P. PAGLINI-OLIVA. *Trypanosoma cruzi*: Cardiac mitochondrial alterations produced by different strains in the acute phase of the infection. **Exp Parasitol**, v.120, n.4, Dec, p.397-402. 2008.

BAGGIOLINI, M. E P. LOETSCHER. Chemokines in inflammation and immunity. **Immunol Today**, v.21, n.9, Sep, p.418-20. 2000.

BELAIBA, R. S., S. BONELLO, C. ZHRINGER, S. SCHMIDT, J. HESS, T. KIETZMANN E A. GORLACH. Hypoxia up-regulates hypoxia-inducible factor-1alpha transcription by involving phosphatidylinositol 3-kinase and nuclear factor kappaB in pulmonary artery smooth muscle cells. **Mol Biol Cell**, v.18, n.12, Dec, p.4691-7. 2007.

BERN, C., S. P. MONTGOMERY, B. L. HERWALDT, A. RASSI, JR., J. A. MARINETO, R. O. DANTAS, J. H. MAGUIRE, H. ACQUATELLA, C. MORILLO, L. V. KIRCHHOFF, R. H. GILMAN, P. A. REYES, R. SALVATELLA E A. C. MOORE. Evaluation and treatment of chagas disease in the United States: a systematic review. **Jama**, v.298, n.18, Nov 14, p.2171-81. 2007.

BJORNHEDEN, T., M. LEVIN, M. EVALDSSON E O. WIKLUND. Evidence of hypoxic areas within the arterial wall in vivo. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v.19, n.4, Apr, p.870-6. 1999.

BLADER, I. J., I. D. MANGER E J. C. BOOTHROYD. Microarray analysis reveals previously unknown changes in *Toxoplasma gondii*-infected human cells. **J Biol Chem**, v.276, n.26, Jun 29, p.24223-31. 2001.

BORGES, V. M., H. FALCAO, J. H. LEITE-JUNIOR, L. ALVIM, G. P. TEIXEIRA, M. RUSSO, A. F. NOBREGA, M. F. LOPES, P. M. ROCCO, W. F. DAVIDSON, R. LINDEN, H. YAGITA, W. A. ZIN E G. A. DOSREIS. Fas ligand triggers pulmonary silicosis. **J Exp Med**, v.194, n.2, Jul 16, p.155-64. 2001.

BOSSETO, M. C., P. V. PALMA, D. T. COVAS E S. GIORGIO. Hypoxia modulates phenotype, inflammatory response, and leishmanial infection of human dendritic cells. **Apmis**, v.118, n.2, Feb, p.108-14.

BRENER, Z. Why vaccines do not work in Chagas disease. **Parasitol Today**, v.2, n.7, Jul, p.196-7. 1986.

BRENER, Z. (1992). Immune Response and Immunopathology in *T. cruzi* Infection. In: B: Z. WENDEL S, CAMARGO ME, RASSI A (Ed). **Chagas Disease (American Trypanosomiasis): Its Impact N Transfusion and Clinical Medicine**. São Paulo.: ISBT Brazil, 1992,p.31-47.

BURKE, B., N. TANG, K. P. CORKE, D. TAZZYMAN, K. AMERI, M. WELLS E C. E. LEWIS. Expression of HIF-1alpha by human macrophages: implications for the use of macrophages in hypoxia-regulated cancer gene therapy. **J Pathol**, v.196, n.2, Feb, p.204-12. 2002.

BURLEIGH, B. A. E N. W. ANDREWS. A 120-kDa alkaline peptidase from *Trypanosoma cruzi* is involved in the generation of a novel Ca(2+)-signaling factor for mammalian cells. **J Biol Chem**, v.270, n.10, Mar 10, p.5172-80. 1995.

CALDWELL, C. C., H. KOJIMA, D. LUKASHEV, J. ARMSTRONG, M. FARBER, S. G. APASOV E M. V. SITKOVSKY. Differential effects of physiologically relevant hypoxic conditions on T lymphocyte development and effector functions. **J Immunol**, v.167, n.11, Dec 1, p.6140-9. 2001.

CAMARGO, M. M., I. C. ALMEIDA, M. E. PEREIRA, M. A. FERGUSON, L. R. TRAVASSOS E R. T. GAZZINELLI. Glycosylphosphatidylinositol-anchored mucin-like glycoproteins isolated from *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes initiate the synthesis of proinflammatory cytokines by macrophages. **J Immunol**, v.158, n.12, Jun 15, p.5890-901. 1997.

CARAMELO, C., J. J. PENA DEUDERO, A. CASTILLA, S. JUSTO, A. J. DE SOLIS, F. NERIA, S. PENATE E F. R. GONZALEZ-PACHECO. [Response to hypoxia. A systemic mechanism based on the control of gene expression]. **Medicina (B Aires)**, v.66, n.2, p.155-64. 2006.

CARDILLO, F., R. P. FALCAO, M. A. ROSSI E J. MENGEL. An age-related gamma delta T cell suppressor activity correlates with the outcome of autoimmunity in experimental *Trypanosoma cruzi* infection. **Eur J Immunol**, v.23, n.10, Oct, p.2597-605. 1993.

CARDONI, R. L., M. E. ROTTENBERG E E. L. SEGURA. Increased production of reactive oxygen species by cells from mice acutely infected with *Trypanosoma cruzi*. **Cell Immunol**, v.128, n.1, Jun, p.11-21. 1990.

CARMELIET, P., Y. DOR, J. M. HERBERT, D. FUKUMURA, K. BRUSSELMANS, M. DEWERCHIN, M. NEEMAN, F. BONO, R. ABRAMOVITCH, P. MAXWELL, C. J. KOCH, P. RATCLIFFE, L. MOONS, R. K. JAIN, D. COLLEN E E. KESHERT. Role of HIF-1alpha in hypoxia-mediated apoptosis, cell proliferation and tumour angiogenesis. **Nature**, v.394, n.6692, Jul 30, p.485-90. 1998.

CARNEIRO-SAMPAIO, M. E A. COUTINHO. Immunity to microbes: lessons from primary immunodeficiencies. **Infect Immun**, v.75, n.4, Apr, p.1545-55. 2007.

CAZIN, M., D. PALUSZEZAK, A. BIANCHI, J. C. CAZIN, C. AERTS E C. VOISIN. Effects of anaerobiosis upon morphology and energy metabolism of alveolar macrophages cultured in gas phase. **Eur Respir J**, v.3, n.9, Oct, p.1015-22. 1990.

CHAGAS, C. Nova tripanozomíase americana. Estudos sobre a morfología e o ciclo evolutivo de *Schizotrypanum cruzi* n.gen., n.sp., agente etiológico de nova entidade mórbida do homem. **Mem Ins Oswaldo Cruz**, v.1, p. 159-218. 1909.

CHANDRASEKAR, B., P. C. MELBY, D. A. TROYER E G. L. FREEMAN. Induction of proinflammatory cytokine expression in experimental acute Chagasic cardiomyopathy. **Biochem Biophys Res Commun**, v.223, n.2, Jun 14, p.365-71. 1996.

CHEN, B. E W. M. DEEN. Analysis of the effects of cell spacing and liquid depth on nitric oxide and its oxidation products in cell cultures. **Chem Res Toxicol**, v.14, n.1, Jan, p.135-47. 2001.

CICCARELLI, A., L. ARAUJO, A. BATLLE E E. LOMBARDO. Effect of haemin on growth, protein content and the antioxidant defence system in *Trypanosoma cruzi*. **Parasitology**, v.134, n.Pt 7, Jul, p.959-65. 2007.

COLASANTI, M., L. GRADONI, M. MATTU, T. PERSICHINI, L. SALVATI, G. VENTURINI E P. ASCENZI. Molecular bases for the anti-parasitic effect of NO (Review). **Int J Mol Med**, v.9, n.2, Feb, p.131-4. 2002.

CONTRERAS, V. T., T. C. ARAUJO-JORGE, M. C. BONALDO, N. THOMAZ, H. S. BARBOSA, N. MEIRELLES MDE E S. GOLDENBERG. Biological aspects of the Dm 28c clone of *Trypanosoma cruzi* after metacyclogenesis in chemically defined media. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v.83, n.1, Jan-Mar, p.123-33. 1988.

COURA, J. R. Chagas disease: what is known and what is needed--a background article. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v.102 Suppl 1, Oct 30, p.113-22. 2007.

COURA, J. R. E J. C. DIAS. Epidemiology, control and surveillance of Chagas disease: 100 years after its discovery. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v.104 Suppl 1, Jul, p.31-40. 2009.

CRAMER, T., Y. YAMANISHI, B. E. CLAUSEN, I. FORSTER, R. PAWLINSKI, N. MACKMAN, V. H. HAASE, R. JAENISCH, M. CORR, V. NIZET, G. S. FIRESTEIN, H. P. GERBER, N. FERRARA E R. S. JOHNSON. HIF-1alpha is essential for myeloid cell-mediated inflammation. **Cell**, v.112, n.5, Mar 7, p.645-57. 2003.

DE GROOTE, M. A. E F. C. FANG. NO inhibitions: antimicrobial properties of nitric oxide. **Clin Infect Dis**, v.21 Suppl 2, Oct, p.S162-5. 1995.

DE MEIS, J., D. A. MENDES-DA-CRUZ, D. A. FARIAS-DE-OLIVEIRA, E. CORREA-DE-SANTANA, F. PINTO-MARIZ, V. COTTA-DE-ALMEIDA, A. BONOMO E W. SAVINO. Atrophy of mesenteric lymph nodes in experimental Chagas' disease: differential role of Fas/Fas-L and TNFRI/TNF pathways. **Microbes Infect**, v.8, n.1, Jan, p.221-31. 2006.

DENKERS, E. Y. E B. A. BUTCHER. Sabotage and exploitation in macrophages parasitized by intracellular protozoans. **Trends Parasitol**, v.21, n.1, Jan, p.35-41. 2005.

DISTLER, J. H., R. H. WENGER, M. GASSMANN, M. KUROWSKA, A. HIRTH, S. GAY E O. DISTLER. Physiologic responses to hypoxia and implications for hypoxia-inducible factors in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. **Arthritis Rheum**, v.50, n.1, Jan, p.10-23. 2004.

DOSREIS, G. A. Cell-mediated immunity in experimental *Trypanosoma cruzi* infection. **Parasitol Today**, v.13, n.9, Sep, p.335-42. 1997.

DOSREIS, G. A. Susceptible hosts: a resort for parasites right in the eye of the immune response. **An Acad Bras Cienc**, v.72, n.1, p.79-82. 2000.

DOSREIS, G. A., F. L. RIBEIRO-GOMES, L. V. GUILLERMO E M. F. LOPES. Cross-talk between apoptosis and cytokines in the regulation of parasitic infection. **Cytokine Growth Factor Rev**, v.18, n.1-2, Feb-Apr, p.97-105. 2007.

DU, G., A. MOUITHYS-MICKALAD E F. E. SLUSE. Generation of superoxide anion by mitochondria and impairment of their functions during anoxia and reoxygenation in vitro. **Free Radic Biol Med**, v.25, n.9, Dec, p.1066-74. 1998.

ENGMAN, D. M. E J. S. LEON. Pathogenesis of Chagas heart disease: role of autoimmunity. **Acta Trop**, v.81, n.2, Feb, p.123-32. 2002.

ERTEL, W., G. SINGH, M. H. MORRISON, A. AYALA E I. H. CHAUDRY. Chemically induced hypotension increases PGE2 release and depresses macrophage antigen presentation. **Am J Physiol**, v.264, n.4 Pt 2, Apr, p.R655-60. 1993.

FADOK, V. A., D. L. BRATTON, A. KONOWAL, P. W. FREED, J. Y. WESTCOTT E P. M. HENSON. Macrophages that have ingested apoptotic cells in vitro inhibit proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF-beta, PGE2, and PAF. **J Clin Invest**, v.101, n.4, Feb 15, p.890-8. 1998.

FANG, F. C. Perspectives series: host/pathogen interactions. Mechanisms of nitric oxide-related antimicrobial activity. **J Clin Invest**, v.99, n.12, Jun 15, p.2818-25. 1997.

FELDSER, D., F. AGANI, N. V. IYER, B. PAK, G. FERREIRA E G. L. SEMENZA. Reciprocal positive regulation of hypoxia-inducible factor 1alpha and insulin-like growth factor 2. **Cancer Res**, v.59, n.16, Aug 15, p.3915-8. 1999.

FINK, S. L. E B. T. COOKSON. Apoptosis, pyroptosis, and necrosis: mechanistic description of dead and dying eukaryotic cells. **Infect Immun**, v.73, n.4, Apr, p.1907-16. 2005.

FREDE, S., C. STOCKMANN, P. FREITAG E J. FANDREY. Bacterial lipopolysaccharide induces HIF-1 activation in human monocytes via p44/42 MAPK and NF-kappaB. **Biochem J**, v.396, n.3, Jun 15, p.517-27. 2006.

FREIRE-DE-LIMA, C. G., D. O. NASCIMENTO, M. B. SOARES, P. T. BOZZA, H. C. CASTRO-FARIA-NETO, F. G. DE MELLO, G. A. DOSREIS E M. F. LOPES. Uptake of apoptotic cells drives the growth of a pathogenic trypanosome in macrophages. **Nature**, v.403, n.6766, Jan 13, p.199-203. 2000.

GAIL, M., U. GROSS E W. BOHNE. Transcriptional profile of *Toxoplasma gondii*-infected human fibroblasts as revealed by gene-array hybridization. **Mol Genet Genomics**, v.265, n.5, Jul, p.905-12. 2001.

GAZZINELLI, R. T., S. HIENY, T. A. WYNN, S. WOLF E A. SHER. Interleukin 12 is required for the T-lymphocyte-independent induction of interferon gamma by an intracellular parasite and induces resistance in T-cell-deficient hosts. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.90, n.13, Jul 1, p.6115-9. 1993.

GAZZINELLI, R. T., I. P. OSWALD, S. HIENY, S. L. JAMES E A. SHER. The microbicidal activity of interferon-gamma-treated macrophages against *Trypanosoma cruzi* involves an L-arginine-dependent, nitrogen oxide-mediated mechanism inhibitable by interleukin-10 and transforming growth factor-beta. **Eur J Immunol**, v.22, n.10, Oct, p.2501-6. 1992.

GORLACH, A., I. DIEBOLD, V. B. SCHINI-KERTH, U. BERCHNER-PFANNSCHMIDT, U. ROTH, R. P. BRANDES, T. KIETZMANN E R. BUSSE. Thrombin activates the hypoxia-inducible factor-1 signaling pathway in vascular smooth muscle cells: Role of the p22(phox)-containing NADPH oxidase. **Circ Res**, v.89, n.1, Jul 6, p.47-54. 2001.

GRAEBER, T. G., C. OSMANIAN, T. JACKS, D. E. HOUSMAN, C. J. KOCH, S. W. LOWE E A. J. GIACCIA. Hypoxia-mediated selection of cells with diminished apoptotic potential in solid tumours. **Nature**, v.379, n.6560, Jan 4, p.88-91. 1996.

GREEN, L. C., D. A. WAGNER, J. GLOGOWSKI, P. L. SKIPPER, J. S. WISHNOK E S. R. TANNENBAUM. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids. **Anal Biochem**, v.126, n.1, Oct, p.131-8. 1982.

GUIDA, E. E A. STEWART. Influence of hypoxia and glucose deprivation on tumour necrosis factor-alpha and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor expression in human cultured monocytes. **Cell Physiol Biochem**, v.8, n.1-2, p.75-88. 1998.

GYETKO, M. R., R. F. TODD, 3RD, C. C. WILKINSON E R. G. SITRIN. The urokinase receptor is required for human monocyte chemotaxis in vitro. **J Clin Invest**, v.93, n.4, Apr, p.1380-7. 1994.

HAREL-BELLAN, A., M. JOSKOWICZ, D. FRADELIZI E H. EISEN. T lymphocyte function during experimental Chagas' disease: production of and response to interleukin 2. **Eur J Immunol**, v.15, n.5, May, p.438-42. 1985.

HARMEY, J. H., E. DIMITRIADIS, E. KAY, H. P. REDMOND E D. BOUCHIER-HAYES. Regulation of macrophage production of vascular endothelial growth factor (VEGF) by hypoxia and transforming growth factor beta-1. **Ann Surg Oncol**, v.5, n.3, Apr-May, p.271-8. 1998.

HARRIS, A. L. Hypoxia--a key regulatory factor in tumour growth. **Nat Rev Cancer**, v.2, n.1, Jan, p.38-47. 2002.

HELLWIG-BURGEL, T., K. RUTKOWSKI, E. METZEN, J. FANDREY E W. JELKMANN. Interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha stimulate DNA binding of hypoxia-inducible factor-1. **Blood**, v.94, n.5, Sep 1, p.1561-7. 1999.

HEMPEL, S. L., M. M. MONICK E G. W. HUNNINGHAKE. Effect of hypoxia on release of IL-1 and TNF by human alveolar macrophages. **Am J Respir Cell Mol Biol**, v.14, n.2, Feb, p.170-6. 1996.

HENSON, P. M., D. L. BRATTON E V. A. FADOK. Apoptotic cell removal. **Curr Biol**, v.11, n.19, Oct 2, p.R795-805. 2001.

HUANG, J., Q. ZHAO, S. M. MOONEY E F. S. LEE. Sequence determinants in hypoxia-inducible factor-1alpha for hydroxylation by the prolyl hydroxylases PHD1, PHD2, and PHD3. **J Biol Chem**, v.277, n.42, Oct 18, p.39792-800. 2002.

HUNTER, C. A., L. A. ELLIS-NEYES, T. SLIFER, S. KANALY, G. GRUNIG, M. FORT, D. RENNICK E F. G. ARAUJO. IL-10 is required to prevent immune hyperactivity during infection with *Trypanosoma cruzi*. **J Immunol**, v.158, n.7, Apr 1, p.3311-6. 1997.

IMHOF, B. A. E M. AURRAND-LIONS. Adhesion mechanisms regulating the migration of monocytes. **Nat Rev Immunol**, v.4, n.6, Jun, p.432-44. 2004.

IVAN, M., K. KONDO, H. YANG, W. KIM, J. VALIANDO, M. OHH, A. SALIC, J. M. ASARA, W. S. LANE E W. G. KAELIN, JR. HIFalpha targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: implications for O2 sensing. **Science**, v.292, n.5516, Apr 20, p.464-8. 2001.

JAAKKOLA, P., D. R. MOLE, Y. M. TIAN, M. I. WILSON, J. GIELBERT, S. J. GASKELL, A. KRIEGSHEIM, H. F. HEBESTREIT, M. MUKHERJI, C. J. SCHOFIELD, P. H. MAXWELL, C. W. PUGH E P. J. RATCLIFFE. Targeting of HIF-alpha to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O2-regulated prolyl hydroxylation. **Science**, v.292, n.5516, Apr 20, p.468-72. 2001.

- JIANG, B. H., J. Z. ZHENG, S. W. LEUNG, R. ROE E G. L. SEMENZA. Transactivation and inhibitory domains of hypoxia-inducible factor 1alpha. Modulation of transcriptional activity by oxygen tension. **J Biol Chem**, v.272, n.31, Aug 1, p.19253-60. 1997.
- JOHANN, A. M., V. BARRA, A. M. KUHN, A. WEIGERT, A. VON KNETHEN E B. BRUNE. Apoptotic cells induce arginase II in macrophages, thereby attenuating NO production. **Faseb J**, v.21, n.11, Sep, p.2704-12. 2007.
- KAYE, P. M. Costimulation and the regulation of antimicrobial immunity. **Immunol Today**, v.16, n.9, Sep, p.423-7. 1995.
- KOJIMA, H., H. GU, S. NOMURA, C. C. CALDWELL, T. KOBATA, P. CARMELIET, G. L. SEMENZA E M. V. SITKOVSKY. Abnormal B lymphocyte development and autoimmunity in hypoxia-inducible factor 1alpha -deficient chimeric mice. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.99, n.4, Feb 19, p.2170-4. 2002.
- KUNG, A. L., S. WANG, J. M. KLCO, W. G. KAELIN E D. M. LIVINGSTON. Suppression of tumor growth through disruption of hypoxia-inducible transcription. **Nat Med**, v.6, n.12, Dec, p.1335-40. 2000.
- LANDO, D., D. J. PEET, J. J. GORMAN, D. A. WHELAN, M. L. WHITELAW E R. K. BRUICK. FIH-1 is an asparaginyl hydroxylase enzyme that regulates the transcriptional activity of hypoxia-inducible factor. **Genes Dev**, v.16, n.12, Jun 15, p.1466-71. 2002.
- LE, A. D., Q. ZHANG, Y. WU, D. V. MESSADI, A. AKHONDZADEH, A. L. NGUYEN, T. L. AGHALOO, A. P. KELLY E C. N. BERTOLAMI. Elevated vascular endothelial growth factor in keloids: relevance to tissue fibrosis. **Cells Tissues Organs**, v.176, n.1-3, p.87-94. 2004.
- LEEPER-WOODFORD, S. K. E J. W. MILLS. Phagocytosis and ATP levels in alveolar macrophages during acute hypoxia. **Am J Respir Cell Mol Biol**, v.6, n.3, Mar, p.326-34. 1992.
- LEGUIZAMON, M. S., E. MOCETTI, H. GARCIA RIVELLO, P. ARGIBAY E O. CAMPETELLA. Trans-sialidase from *Trypanosoma cruzi* induces apoptosis in cells from the immune system in vivo. **J Infect Dis**, v.180, n.4, Oct, p.1398-402. 1999.
- LEIRIAO, P., C. D. RODRIGUES, S. S. ALBUQUERQUE E M. M. MOTA. Survival of protozoan intracellular parasites in host cells. **EMBO Rep**, v.5, n.12, Dec, p.1142-7. 2004.
- LEWIS, J. S., R. J. LANDERS, J. C. UNDERWOOD, A. L. HARRIS E C. E. LEWIS. Expression of vascular endothelial growth factor by macrophages is up-regulated in poorly vascularized areas of breast carcinomas. **J Pathol**, v.192, n.2, Oct, p.150-8. 2000.
- LEWIS, J. S., J. A. LEE, J. C. UNDERWOOD, A. L. HARRIS E C. E. LEWIS. Macrophage responses to hypoxia: relevance to disease mechanisms. **J Leukoc Biol**, v.66, n.6, Dec, p.889-900. 1999.

- LIMA, E. C., I. GARCIA, M. H. VICENTELLI, P. VASSALLI E P. MINOPRIO. Evidence for a protective role of tumor necrosis factor in the acute phase of *Trypanosoma cruzi* infection in mice. **Infect Immun**, v.65, n.2, Feb, p.457-65. 1997.
- LOPES, M. F., V. F. DA VEIGA, A. R. SANTOS, M. E. FONSECA E G. A. DOSREIS. Activation-induced CD4+ T cell death by apoptosis in experimental Chagas' disease. **J Immunol**, v.154, n.2, Jan 15, p.744-52. 1995a.
- LOPES, M. F., J. M. CUNHA, F. L. BEZERRA, M. S. GONZALEZ, J. E. GOMES, J. R. LAPA E SILVA, E. S. GARCIA E G. A. DOS REIS. *Trypanosoma cruzi*: both chemically induced and triatomine-derived metacyclic trypomastigotes cause the same immunological disturbances in the infected mammalian host. **Exp Parasitol**, v.80, n.2, Mar, p.194-204. 1995b.
- MANTOVANI, A., A. SICA, S. SOZZANI, P. ALLAVENA, A. VECCHI E M. LOCATI. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. **Trends Immunol**, v.25, n.12, Dec, p.677-86. 2004.
- MARANON, C., L. PLANELLES, C. ALONSO E M. C. LOPEZ. HSP70 from *Trypanosoma cruzi* is endowed with specific cell proliferation potential leading to apoptosis. **Int Immunol**, v.12, n.12, Dec, p.1685-93. 2000.
- MARTIN, D. E R. TARLETON. Generation, specificity, and function of CD8+ T cells in *Trypanosoma cruzi* infection. **Immunol Rev**, v.201, Oct, p.304-17. 2004.
- MARTINS, G. A., M. A. CARDOSO, J. C. ALIBERTI E J. S. SILVA. Nitric oxide-induced apoptotic cell death in the acute phase of *Trypanosoma cruzi* infection in mice. **Immunol Lett**, v.63, n.2, Sep, p.113-20. 1998.
- MASSON, N., C. WILLAM, P. H. MAXWELL, C. W. PUGH E P. J. RATCLIFFE. Independent function of two destruction domains in hypoxia-inducible factor-alpha chains activated by prolyl hydroxylation. **Embo J**, v.20, n.18, Sep 17, p.5197-206. 2001.
- MINOPRIO, P., S. ITOHARA, C. HEUSSER, S. TONEGAWA E A. COUTINHO. Immunobiology of murine *T. cruzi* infection: the predominance of parasite-nonspecific responses and the activation of TCRI T cells. **Immunol Rev**, v.112, Dec, p.183-207. 1989.
- MONCAYO, A. E A. C. SILVEIRA. Current epidemiological trends for Chagas disease in Latin America and future challenges in epidemiology, surveillance and health policy. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v.104 Suppl 1, Jul, p.17-30. 2009.
- MOSMANN, T. R., H. CHERWINSKI, M. W. BOND, M. A. GIEDLIN E R. L. COFFMAN. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. **J Immunol**, v.136, n.7, Apr 1, p.2348-57. 1986.
- MURATA, Y., T. OHTEKI, S. KOYASU E J. HAMURO. IFN-gamma and pro-inflammatory cytokine production by antigen-presenting cells is dictated by intracellular thiol redox status regulated by oxygen tension. **Eur J Immunol**, v.32, n.10, Oct, p.2866-73. 2002.

MURDOCH, C., M. MUTHANA, S. B. COFFELT E C. E. LEWIS. The role of myeloid cells in the promotion of tumour angiogenesis. **Nat Rev Cancer**, v.8, n.8, Aug, p.618-31. 2008.

MURDOCH, C., M. MUTHANA E C. E. LEWIS. Hypoxia regulates macrophage functions in inflammation. **J Immunol**, v.175, n.10, Nov 15, p.6257-63. 2005.

NATHAN, C. E M. U. SHILOH. Reactive oxygen and nitrogen intermediates in the relationship between mammalian hosts and microbial pathogens. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.97, n.16, Aug 1, p.8841-8. 2000.

NEGUS, R. P., L. TURNER, F. BURKE E F. R. BALKWILL. Hypoxia down-regulates MCP-1 expression: implications for macrophage distribution in tumors. **J Leukoc Biol**, v.63, n.6, Jun, p.758-65. 1998.

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

NUNES, M. P., R. M. ANDRADE, M. F. LOPES E G. A. DOSREIS. Activation-induced T cell death exacerbates *Trypanosoma cruzi* replication in macrophages cocultured with CD4+ T lymphocytes from infected hosts. **J Immunol**, v.160, n.3, Feb 1, p.1313-9. 1998.

OHH, M., C. W. PARK, M. IVAN, M. A. HOFFMAN, T. Y. KIM, L. E. HUANG, N. PAVLETICH, V. CHAU E W. G. KAELIN. Ubiquitination of hypoxia-inducible factor requires direct binding to the beta-domain of the von Hippel-Lindau protein. **Nat Cell Biol**, v.2, n.7, Jul, p.423-7. 2000.

OJEDA, F., M. I. GUARDA, C. LOVENGREEN, M. A. HIDALGO, H. FOLCH, S. HARTEL E C. MALDONADO. Ultraviolet exposure of thymocytes: selective inhibition of apoptosis. **Int J Radiat Biol**, v.80, n.6, Jun, p.445-50. 2004.

OSWALD, I. P., T. A. WYNN, A. SHER E S. L. JAMES. Interleukin 10 inhibits macrophage microbicidal activity by blocking the endogenous production of tumor necrosis factor alpha required as a costimulatory factor for interferon gamma-induced activation. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.89, n.18, Sep 15, p.8676-80. 1992.

PAHO. PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION 2007. XVI Reunión de la Comisión Intergubernamental de la Iniciativa del Cono Sur. Brasília. Junio de 2007. Available from: **www.paho.org**

PELUFFO, G., L. PIACENZA, F. IRIGOIN, M. N. ALVAREZ E R. RADI. L-arginine metabolism during interaction of *Trypanosoma cruzi* with host cells. **Trends Parasitol**, v.20, n.8, Aug, p.363-9. 2004.

PEYSSONNAUX, C., V. DATTA, T. CRAMER, A. DOEDENS, E. A. THEODORAKIS, R. L. GALLO, N. HURTADO-ZIOLA, V. NIZET E R. S. JOHNSON. HIF-1alpha expression regulates the bactericidal capacity of phagocytes. **J Clin Invest**, v.115, n.7, Jul, p.1806-15. 2005.

PUGH, C. W., J. F. O'ROURKE, M. NAGAO, J. M. GLEADLE E P. J. RATCLIFFE. Activation of hypoxia-inducible factor-1; definition of regulatory domains within the alpha subunit. **J Biol Chem**, v.272, n.17, Apr 25, p.11205-14. 1997.

PUGH, C. W. E P. J. RATCLIFFE. Regulation of angiogenesis by hypoxia: role of the HIF system. **Nat Med**, v.9, n.6, Jun, p.677-84. 2003.

RAVICHANDRAN, K. S. E U. LORENZ. Engulfment of apoptotic cells: signals for a good meal. **Nat Rev Immunol**, v.7, n.12, Dec, p.964-74. 2007.

REED, S. G. In vivo administration of recombinant IFN-gamma induces macrophage activation, and prevents acute disease, immune suppression, and death in experimental *Trypanosoma cruzi* infections. **J Immunol**, v.140, n.12, Jun 15, p.4342-7. 1988.

REED, S. G., C. E. BROWNELL, D. M. RUSSO, J. S. SILVA, K. H. GRABSTEIN E P. J. MORRISSEY. IL-10 mediates susceptibility to *Trypanosoma cruzi* infection. **J Immunol**, v.153, n.7, Oct 1, p.3135-40. 1994.

RIBEIRO-GOMES, F. L., M. C. MONIZ-DE-SOUZA, V. M. BORGES, M. P. NUNES, M. MANTUANO-BARRADAS, H. D'AVILA, P. T. BOZZA, V. L. CALICH E G. A. DOSREIS. Turnover of neutrophils mediated by Fas ligand drives *Leishmania major* infection. **J Infect Dis**, v.192, n.6, Sep 15, p.1127-34. 2005.

RIVERA, M. T., S. MARQUES DE ARAUJO, R. LUCAS, J. DEMAN, C. TRUYENS, M. P. DEFRESNE, P. DE BAETSELIER E Y. CARLIER. High tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha) production in *Trypanosoma cruzi*-infected pregnant mice and increased TNF-alpha gene transcription in their offspring. **Infect Immun**, v.63, n.2, Feb, p.591-5. 1995.

ROCHA, M. O., M. M. TEIXEIRA E A. L. RIBEIRO. An update on the management of Chagas cardiomyopathy. **Expert Rev Anti Infect Ther**, v.5, n.4, Aug, p.727-43. 2007.

ROSSI, M. A. E S. G. CAROBREZ. Experimental *Trypanosoma cruzi* cardiomyopathy in BALB/c mice: histochemical evidence of hypoxic changes in the myocardium. **Br J Exp Pathol**, v.66, n.2, Apr, p.155-60. 1985.

ROSSI, M. A., S. GONCALVES E R. RIBEIRO-DOS-SANTOS. Experimental *Trypanosoma cruzi* cardiomyopathy in BALB/c mice. The potential role of intravascular platelet aggregation in its genesis. **Am J Pathol**, v.114, n.2, Feb, p.209-16. 1984.

ROTTENBERG, M. E., M. BAKHIET, T. OLSSON, K. KRISTENSSON, T. MAK, H. WIGZELL E A. ORN. Differential susceptibilities of mice genomically deleted of CD4 and CD8 to infections with *Trypanosoma cruzi* or *Trypanosoma brucei*. **Infect Immun**, v.61, n.12, Dec, p.5129-33. 1993.

RUDIN, C. M. E C. B. THOMPSON. Apoptosis and disease: regulation and clinical relevance of programmed cell death. **Annu Rev Med**, v.48, p.267-81. 1997.

RUSSO, M., N. STAROBINAS, R. RIBEIRO-DOS-SANTOS, P. MINOPRIO, H. EISEN E M. HONTEBEYRIE-JOSKOWICZ. Susceptible mice present higher macrophage activation

than resistant mice during infections with myotropic strains of *Trypanosoma cruzi*. **Parasite Immunol**, v.11, n.4, Jul, p.385-95. 1989.

RYMSA, B., H. D. BECKER, W. LAUCHART E H. DE GROOT. Hypoxia/reoxygenation injury in liver: Kupffer cells are much more vulnerable to reoxygenation than to hypoxia. **Res Commun Chem Pathol Pharmacol**, v.68, n.2, May, p.263-6. 1990.

RYMSA, B., J. F. WANG E H. DE GROOT. O₂- release by activated Kupffer cells upon hypoxia-reoxygenation. **Am J Physiol**, v.261, n.4 Pt 1, Oct, p.G602-7. 1991.

SAVILL, J., N. HOGG, Y. REN E C. HASLETT. Thrombospondin cooperates with CD36 and the vitronectin receptor in macrophage recognition of neutrophils undergoing apoptosis. **J Clin Invest**, v.90, n.4, Oct, p.1513-22. 1992.

SCANNELL, G. Leukocyte responses to hypoxic/ischemic conditions. **New Horiz**, v.4, n.2, May, p.179-83. 1996.

SCANNELL, G., K. WAXMAN, G. J. KAML, G. IOLI, T. GATANAGA, R. YAMAMOTO E G. A. GRANGER. Hypoxia induces a human macrophage cell line to release tumor necrosis factor-alpha and its soluble receptors in vitro. **J Surg Res**, v.54, n.4, Apr, p.281-5. 1993.

SCANNELL, G., K. WAXMAN, N. D. VAZIRI, J. ZHANG, C. J. KAUPKE, M. JALALI E C. HECT. Effects of trauma on leukocyte intercellular adhesion molecule-1, CD11b, and CD18 expressions. **J Trauma**, v.39, n.4, Oct, p.641-4. 1995.

SCHWARCZ DE TARLOVSKY, M. N., M. C. RILO, S. M. HERNANDEZ, A. M. BEDOYA, E. M. LAMMEL E E. L. ISOLA. Spermine action on mitochondrial H(+)-ATPase activity and proliferation rate of *Trypanosoma cruzi*. **Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)**, v.41, n.6, Sep, p.861-6. 1995.

SEMENZA, G. L. Regulation of mammalian O₂ homeostasis by hypoxia-inducible factor 1. **Annu Rev Cell Dev Biol**, v.15, p.551-78. 1999.

SEMENZA, G. L. HIF-1 and mechanisms of hypoxia sensing. **Curr Opin Cell Biol**, v.13, n.2, Apr, p.167-71. 2001a.

SEMENZA, G. L. Hypoxia-inducible factor 1: control of oxygen homeostasis in health and disease. **Pediatr Res**, v.49, n.5, May, p.614-7. 2001b.

SEMENZA, G. L. Hypoxia-inducible factor 1: oxygen homeostasis and disease pathophysiology. **Trends Mol Med**, v.7, n.8, Aug, p.345-50. 2001c.

SEMENZA, G. L. HIF-1, O₂, and the 3 PHDs: how animal cells signal hypoxia to the nucleus. **Cell**, v.107, n.1, Oct 5, p.1-3. 2001d.

SEMENZA, G. L., S. T. KOURY, M. K. NEJFELT, J. D. GEARHART E S. E. ANTONARAKIS. Cell-type-specific and hypoxia-inducible expression of the human erythropoietin gene in transgenic mice. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.88, n.19, Oct 1, p.8725-9. 1991b.

SEMENZA, G. L., M. K. NEJFELT, S. M. CHI E S. E. ANTONARAKIS. Hypoxia-inducible nuclear factors bind to an enhancer element located 3' to the human erythropoietin gene. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.88, n.13, Jul 1, p.5680-4. 1991a.

SILVA, J. S., F. S. MACHADO E G. A. MARTINS. The role of nitric oxide in the pathogenesis of Chagas disease. **Front Biosci**, v.8, May 1, p.s314-25. 2003.

SILVA, J. S., D. R. TWARDZIK E S. G. REED. Regulation of *Trypanosoma cruzi* infections in vitro and in vivo by transforming growth factor beta (TGF-beta). **J Exp Med**, v.174, n.3, Sep 1, p.539-45. 1991.

SITKOVSKY, M. E D. LUKASHEV. Regulation of immune cells by local-tissue oxygen tension: HIF1 alpha and adenosine receptors. **Nat Rev Immunol**, v.5, n.9, Sep, p.712-21. 2005.

SOSA-ESTANI, S. E E. L. SEGURA. Etiological treatment in patients infected by *Trypanosoma cruzi*: experiences in Argentina. **Curr Opin Infect Dis**, v.19, n.6, Dec, p.583-7. 2006.

SOUZA, P. E., M. O. ROCHA, E. ROCHA-VIEIRA, C. A. MENEZES, A. C. CHAVES, K. J. GOLLOB E W. O. DUTRA. Monocytes from patients with indeterminate and cardiac forms of Chagas' disease display distinct phenotypic and functional characteristics associated with morbidity. **Infect Immun**, v.72, n.9, Sep, p.5283-91. 2004.

SPEAR, W., D. CHAN, I. COPPENS, R. S. JOHNSON, A. GIACCIA E I. J. BLADER. The host cell transcription factor hypoxia-inducible factor 1 is required for *Toxoplasma gondii* growth and survival at physiological oxygen levels. **Cell Microbiol**, v.8, n.2, Feb, p.339-52. 2006.

SPINELLA, F., L. ROSANO, V. DI CASTRO, P. G. NATALI E A. BAGNATO. Endothelin-1 induces vascular endothelial growth factor by increasing hypoxia-inducible factor-1alpha in ovarian carcinoma cells. **J Biol Chem**, v.277, n.31, Aug 2, p.27850-5. 2002.

SPRINGALL, D. R. Nitric oxide--friend and foe. **J Pathol**, v.175, n.2, Feb, p.165-6. 1995.

TARLETON, R. L. Tumour necrosis factor (cachectin) production during experimental Chagas' disease. **Clin Exp Immunol**, v.73, n.2, Aug, p.186-90. 1988a.

TARLETON, R. L. Regulation of lymphokine production in experimental and human Chagas' disease. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v.83 Suppl 1, Nov, p.268-71. 1988b.

TARLETON, R. L. The role of T cells in *Trypanosoma cruzi* infections. **Parasitol Today**, v.11, n.1, Jan, p.7-9. 1995.

TARLETON, R. L., M. J. GRUSBY, M. POSTAN E L. H. GLIMCHER. *Trypanosoma cruzi* infection in MHC-deficient mice: further evidence for the role of both class I- and class II-restricted T cells in immune resistance and disease. **Int Immunol**, v.8, n.1, Jan, p.13-22. 1996.

TEIXEIRA, M. M., R. T. GAZZINELLI E J. S. SILVA. Chemokines, inflammation and *Trypanosoma cruzi* infection. **Trends Parasitol**, v.18, n.6, Jun, p.262-5. 2002.

TSUKAMOTO, Y., K. KUWABARA, S. HIROTA, J. IKEDA, D. STERN, H. YANAGI, M. MATSUMOTO, S. OGAWA E Y. KITAMURA. 150-kD oxygen-regulated protein is expressed in human atherosclerotic plaques and allows mononuclear phagocytes to withstand cellular stress on exposure to hypoxia and modified low density lipoprotein. **J Clin Invest**, v.98, n.8, Oct 15, p.1930-41. 1996.

UYEMURA, S. A., S. ALBUQUERQUE E C. CURTI. Energetics of heart mitochondria during acute phase of *Trypanosoma cruzi* infection in rats. **Int J Biochem Cell Biol**, v.27, n.11, Nov, p.1183-9. 1995.

VANDERKOOI, J. M., M. ERECINSKA E I. A. SILVER. Oxygen in mammalian tissue: methods of measurement and affinities of various reactions. **Am J Physiol**, v.260, n.6 Pt 1, Jun, p.C1131-50. 1991.

VAUPEL, P. E M. HOCKEL. Tumor oxygenation and its relevance to tumor physiology and treatment. **Adv Exp Med Biol**, v.510, p.45-9. 2003.

VENTURINI, G., L. SALVATI, M. MUOLO, M. COLASANTI, L. GRADONI E P. ASCENZI. Nitric oxide inhibits cruzipain, the major papain-like cysteine proteinase from *Trypanosoma cruzi*. **Biochem Biophys Res Commun**, v.270, n.2, Apr 13, p.437-41. 2000.

VOLL, R. E., M. HERRMANN, E. A. ROTH, C. STACH, J. R. KALDEN E I. GIRKONTAITE. Immunosuppressive effects of apoptotic cells. **Nature**, v.390, n.6658, Nov 27, p.350-1. 1997.

WALMSLEY, S. R., K. A. CADWALLADER E E. R. CHILVERS. The role of HIF-1alpha in myeloid cell inflammation. **Trends Immunol**, v.26, n.8, Aug, p.434-9. 2005.

WALMSLEY, S. R., E. R. CHILVERS E M. K. WHYTE. Hypoxia. Hypoxia, hypoxia inducible factor and myeloid cell function. **Arthritis Res Ther**, v.11, n.2, p.219. 2009.

WAN, C. P., E. MYUNG E B. H. LAU. An automated micro-fluorometric assay for monitoring oxidative burst activity of phagocytes. **J Immunol Methods**, v.159, n.1-2, Feb 26, p.131-8. 1993.

WANG, G., Y. GONG, F. J. BURCZYNSKI E B. B. HASINOFF. Cell lysis with dimethyl sulphoxide produces stable homogeneous solutions in the dichlorofluorescein oxidative stress assay. **Free Radic Res**, v.42, n.5, May, p.435-41. 2008.

WANG, G. L., B. H. JIANG, E. A. RUE E G. L. SEMENZA. Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.92, n.12, Jun 6, p.5510-4. 1995.

WANG, G. L. E G. L. SEMENZA. Characterization of hypoxia-inducible factor 1 and regulation of DNA binding activity by hypoxia. **J Biol Chem**, v.268, n.29, Oct 15, p.21513-8. 1993b.

- WANG, G. L. E G. L. SEMENZA. General involvement of hypoxia-inducible factor 1 in transcriptional response to hypoxia. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.90, n.9, May 1, p.4304-8. 1993a.
- WELSH, R. M. E J. M. MCNALLY. Immune deficiency, immune silencing, and clonal exhaustion of T cell responses during viral infections. **Curr Opin Microbiol**, v.2, n.4, Aug, p.382-7. 1999.
- WENDEL, S. Transfusion-transmitted Chagas' disease. **Curr Opin Hematol**, v.5, n.6, Nov, p.406-11. 1998.
- WEST, M. A., M. H. LI, S. C. SEATTER E M. P. BUBRICK. Pre-exposure to hypoxia or septic stimuli differentially regulates endotoxin release of tumor necrosis factor, interleukin-6, interleukin-1, prostaglandin E2, nitric oxide, and superoxide by macrophages. **J Trauma**, v.37, n.1, Jul, p.82-9; discussion 89-90. 1994.
- XIONG, M., G. ELSON, D. LEGARDA E S. J. LEIBOVICH. Production of vascular endothelial growth factor by murine macrophages: regulation by hypoxia, lactate, and the inducible nitric oxide synthase pathway. **Am J Pathol**, v.153, n.2, Aug, p.587-98. 1998.
- YOSHIDA, N. Molecular mechanisms of *Trypanosoma cruzi* infection by oral route. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v.104 Suppl 1, Jul, p.101-7. 2009.
- YU, F., S. B. WHITE, Q. ZHAO E F. S. LEE. HIF-1alpha binding to VHL is regulated by stimulus-sensitive proline hydroxylation. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.98, n.17, Aug 14, p.9630-5. 2001.
- YUN, J. K., T. S. MCCORMICK, R. JUDWARE E E. G. LAPETINA. Cellular adaptive responses to low oxygen tension: apoptosis and resistance. **Neurochem Res**, v.22, n.4, Apr, p.517-21. 1997.
- ZELZER, E., Y. LEVY, C. KAHANA, B. Z. SHILO, M. RUBINSTEIN E B. COHEN. Insulin induces transcription of target genes through the hypoxia-inducible factor HIF-1alpha/ARNT. **Embo J**, v.17, n.17, Sep 1, p.5085-94. 1998.
- ZHANG, L. E R. L. TARLETON. Characterization of cytokine production in murine *Trypanosoma cruzi* infection by in situ immunocytochemistry: lack of association between susceptibility and type 2 cytokine production. **Eur J Immunol**, v.26, n.1, Jan, p.102-9. 1996.
- ZHONG, H., K. CHILES, D. FELDSER, E. LAUGHNER, C. HANRAHAN, M. M. GEORGESCU, J. W. SIMONS E G. L. SEMENZA. Modulation of hypoxia-inducible factor 1alpha expression by the epidermal growth factor/phosphatidylinositol 3-kinase/PTEN/AKT/FRAP pathway in human prostate cancer cells: implications for tumor angiogenesis and therapeutics. **Cancer Res**, v.60, n.6, Mar 15, p.1541-5. 2000.
- ZUNIGA, E., C. C. MOTRAN, C. L. MONTES, H. YAGITA E A. GRUPPI. *Trypanosoma cruzi* infection selectively renders parasite-specific IgG+ B lymphocytes susceptible to Fas/Fas ligand-mediated fratricide. **J Immunol**, v.168, n.8, Apr 15, p.3965-73. 2002.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)