



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

JULIANA ELISA LIMA

**AVALIAÇÃO DA FRAÇÃO DE ALTA MASSA MOLECULAR  
DE *Paracoccidioides brasiliensis* E DO COMPOSTO  
[Ru(Na<sub>2</sub>)Fe(CN<sub>5</sub>)(NO)] NA PARACOCCIDIOIDOMICOSE  
EXPERIMENTAL EM CAMUNDONGOS**

JULIANA ELISA LIMA

**AVALIAÇÃO DA FRAÇÃO DE ALTA MASSA MOLECULAR  
DE *Paracoccidioides brasiliensis* E DO COMPOSTO  
[Ru(Na<sub>2</sub>)Fe(CN<sub>5</sub>)(NO)] NA PARACOCCIDIOIDOMICOSE  
EXPERIMENTAL EM CAMUNDONGOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito à obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Eiko Nakagawa Itano.

Co-orientador: Prof. Dr. Wander Rogério Pavanelli

Londrina  
2011

**Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca  
Central da Universidade Estadual de Londrina**

**Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação**

L732a Lima, Juliana Elisa

Avaliação da fração de alta massa molecular de Paracoccidioides brasiliensis e do composto  $[\text{Ru}(\text{Na}_2)\text{Fe}(\text{CN}_5)(\text{NO})]$  na Paracoccidioidomicose experimental em camundongos / Juliana Elisa Lima. – Londrina, 2011.

67 f. : il.

Orientador: Eiko Nakagawa Itano.

Co-orientador: Wander Rogério Pavanelli.

Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental, 2011.

Inclui bibliografia.

1. Patologia experimental – Teses. 2. Paracoccidioides brasiliensis – Teses. 3. Paracoccidioidomicose – Teses. 4. Antígenos de fungos – Teses. 5. Camundongo como animal de laboratório – Teses. I. Itano, Eiko Nakagawa. II. Pavanelli, Wander Rogério. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental. IV. Título.

CDU 616-092

JULIANA ELISA LIMA

**AVALIAÇÃO DA FRAÇÃO DE ALTA MASSA MOLECULAR DE  
*Paracoccidioides brasiliensis* E DO COMPOSTO  
[Ru(Na<sub>2</sub>)Fe(CN<sub>5</sub>)(NO)] NA PARACOCCIDIOIDOMICOSE  
EXPERIMENTAL EM CAMUNDONGOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito à obtenção do título de Mestre.

**COMISSÃO EXAMINADORA**

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Elisa Yoko Hirooka  
UEL – Londrina – PR

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Eiko Nakagawa Itano  
UEL – Londrina – PR

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Angelica Ehara Watanabe  
UEL – Londrina – PR

Londrina, 05 de abril de 2011.

*Dedico esta dissertação aos meus queridos pais, Elizete e Moracy, que são exemplos de dedicação e de perseverança e cujo incentivo, apoio e amor contribuíram, em muito, para a realização deste trabalho.*

## **AGRADECIMENTOS**

À minha orientadora, Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Eiko Nakagawa Itano e ao co-orientador Prof Dr Wander Rogério Pavanelli, pela compreensão, apoio, dedicação e orientação durante a realização deste trabalho.

À Mari Sumigawa Kaminami e ao Nilson de Jesus Carlos pelo auxílio técnico, incentivo e amizade em todas as horas difíceis.

Ao Dr Jean Jerley Nogueira da Silva por ter cedido o composto doador de óxido nítrico para a realização deste trabalho.

À Carolina Panis pela disponibilidade e pela grande ajuda durante o curso deste trabalho.

Aos professores Prof Dr Mario Augusto Ono e Prof Dr Emerson José Venancio por participarem da banca de qualificação e por contribuírem com suas sugestões.

A todos os professores e funcionários do Centro de Ciências Biológicas que, de alguma forma, ajudaram na minha formação.

A todos do Laboratório de Imunologia Aplicada: Bruno Alexandre Sekiguchi, Carina Harumi Takahama, Carlos Eduardo de Oliveira Lima, Claudia Yuri Akagi, Débora Alves Pinto, Fabiana Felipin Rigobello, Franciele Ayumi Semêncio Chiyoda, Francisco José de Abreu Oliveira, Kátia Sabino Takayama, Lilian Cristina Raia de Dio, Luciene Airy Nagashima, Maria Cláudia Noronha Dutra de Menezes, Paula Leonello Álvares e Silva, Tânia Maris Pedrini Soares da Costa e Wilson Candido Junior.

À Coordenação de Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental pelo suporte e ajuda.

À Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão de bolsa e por tratar a pesquisa de forma séria e profissional.

Enfim, a todos que direta e indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

*“-Os homens do seu planeta – disse o pequeno Príncipe – cultivam cinco mil rosas num jardim... e não encontram o que procuram...*

*- É verdade – responde*

*- E, no entanto, o que eles procuram poderia ser encontrado numa só rosa, ou num pouco de água...*

*- É verdade.*

*E o príncipezinho acrescentou: Mas os olhos são cegos.*

*É preciso ver com o coração.”*

*“O Pequeno Príncipe” de Antoine de Saint-Exupéry*

LIMA, Juliana Elisa. **Avaliação da fração de alta massa molecular de *Paracoccidioides brasiliensis* e do composto [Ru(Na<sub>2</sub>)Fe(CN<sub>5</sub>)(NO)] na Paracoccidioidomicose experimental em camundongos.** 2011. 67f. Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2011.

## RESUMO

A Paracoccidioidomicose (PCM) é uma doença granulomatosa causada pelo fungo dimórfico *Paracoccidioides brasiliensis*. Vários antígenos são detectados em preparado livre de células (CFA) de *P. brasiliensis* e dentre esses, uma fração de alta massa molecular (hMM) demonstrou efeito protetor parcial na PCM experimental. Recentes estudos vêm demonstrando a utilização de compostos doadores de óxido nítrico acoplados a metais de transição como transportadores de óxido nítrico (NO), sendo úteis no controle de algumas infecções. Assim, o presente estudo investigou a atividade protetora da fração de hMM em associação ou não com um composto doador de NO ([Ru(Na<sub>2</sub>)Fe(CN<sub>5</sub>)(NO)]) e deste composto na PCM experimental. A fração de hMM foi obtida pelo fracionamento do CFA de *P. brasiliensis* em coluna de sephadex G-200 e utilizada na imunização dos camundongos. Os camundongos Balb/c foram divididos em 7 grupos: a) controle; b) Pb (infectado com 1x10<sup>6</sup> leveduras de Pb18); c) hMM (imunizado com 100µg da fração de hMM); d) hMM + Pb (imunizado e infectado); e) [Ru(Na<sub>2</sub>)Fe(CN<sub>5</sub>)(NO)] (tratado com 100µM de [Ru(Na<sub>2</sub>)Fe(CN<sub>5</sub>)(NO)]); f) Pb + [Ru(Na<sub>2</sub>)Fe(CN<sub>5</sub>)(NO)] (infectado e tratado); g) hMM + Pb + [Ru(Na<sub>2</sub>)Fe(CN<sub>5</sub>)(NO)] (imunizado, infectado e tratado). O grau de proteção foi avaliada pela determinação de unidades formadoras de colônias (CFU), pela análise histopatológica do pulmão/figado, pela resposta imune celular, pelos níveis de IgG anti-fração de hMM e pela dosagem de NO, após 28 dias de infecção. Os resultados obtidos demonstraram ausência de CFU e uma diminuição deste nos grupos imunizados (hMM, hMM + Pb e hMM + Pb + [Ru(Na<sub>2</sub>)Fe(CN<sub>5</sub>)(NO)]) e no grupo Pb + [Ru(Na<sub>2</sub>)Fe(CN<sub>5</sub>)(NO)], respectivamente, em relação ao grupo Pb (p<0.05). Nos cortes histológicos também foi observado ausência no grupo imunizado (fig 2B e 3B e tabela1) e uma diminuição do número de células fúngicas no grupo Pb + [Ru(Na<sub>2</sub>)Fe(CN<sub>5</sub>)(NO)]. Coerente com o CFU e o histológico, houve um aumento da resposta celular observado no grupo hMM + Pb em relação ao grupo Pb (p<0.05). Por outro lado, uma resposta celular reduzida foi observada no grupo hMM + Pb + [Ru(Na<sub>2</sub>)Fe(CN<sub>5</sub>)(NO)] (p<0.05). Além disso, os níveis de IgG anti-fração de hMM foram elevados nos grupos hMM + Pb e hMM + Pb + [Ru(Na<sub>2</sub>)Fe(CN<sub>5</sub>)(NO)] em relação aos demais (p<0.05). Os níveis de NO foram significativamente maior no grupo Pb + [Ru(Na<sub>2</sub>)Fe(CN<sub>5</sub>)(NO)] em comparação aqueles somente [Ru(Na<sub>2</sub>)Fe(CN<sub>5</sub>)(NO)] (p<0.05) e deste primeiro em relação ao grupo hMM + Pb + [Ru(Na<sub>2</sub>)Fe(CN<sub>5</sub>)(NO)] (p<0.05). Adicionalmente, foi analisado o efeito da fração de hMM associada ou não com o tratamento [Ru(Na<sub>2</sub>)Fe(CN<sub>5</sub>)(NO)] sobre macrófagos peritoniais murinos. O aumento dos níveis de NO tanto no grupo hMM como no grupo tratado com [Ru(Na<sub>2</sub>)Fe(CN<sub>5</sub>)(NO)] em relação ao grupo controle (somente macrófagos) ou a diminuição dos níveis de NO nos grupos associados com hMM e [Ru(Na<sub>2</sub>)Fe(CN<sub>5</sub>)(NO)], em relação ao simples tratamento (p<0.05) foi detectado. Concluímos pelos resultados obtidos que a fração hMM induz

proteção com eliminação total de fungos nos principais órgãos e, o tratamento com o  $[\text{Ru}(\text{Na}_2)\text{Fe}(\text{CN}_5)(\text{NO})]$  também induz proteção, porém parcial, nas condições do estudo. Tanto a fração hMM como o composto  $[\text{Ru}(\text{Na}_2)\text{Fe}(\text{CN}_5)(\text{NO})]$  induz aumento de nível sérico de NO na PCM experimental em camundongos e também induz aumento de produção/liberação de NO pelos macrófagos peritoneais murinos, mas diminuição dos níveis por essa associação. A associação da fração de hMM junto com o composto  $[\text{Ru}(\text{Na}_2)\text{Fe}(\text{CN}_5)(\text{NO})]$  também suprime, parcialmente, a proteção induzida pela hMM, possivelmente induzido pela modulação da resposta imune celular, o qual requer estudos posteriores.

**Palavras-chave:** Hipersensibilidade tardia. Antígeno solúvel. Anticorpos anti-hMM e células fúngicas.

LIMA, Juliana Elisa. **Evaluation of high-molecular-mass fraction of *Paracoccidioides brasiliensis* and compound [Ru(Na<sub>2</sub>)Fe(CN<sub>5</sub>)(NO)] in experimental Paracoccidioidomycosis in mice.** 2011. 67f. Dissertation (Master's Degree in Experimental Pathology) – State University of Londrina, Londrina, 2011.

## ABSTRACT

Paracoccidioidomycosis (PCM) is a granulomatous disease caused by the dimorphic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. Several antigens are detected in cell-free preparation (CFA) of *P. brasiliensis*, among these a fraction of high-molecular-mass (hMM) showed partial protective effect in experimental PCM. Recent studies have demonstrated the use of nitric oxide donor compounds bound to transition metals as carriers of nitric oxide (NO) are useful in controlling some infections. Thus, this study investigated the protective activity of the hMM fraction in combination or not with NO donor compound ([Ru(Na<sub>2</sub>)Fe(CN<sub>5</sub>)(NO)]) and this compound in experimental PCM. The fraction of hMM was obtained by *P. brasiliensis* CFA fractionation in sephadex G-200 column and used for mice immunization. The Balb/c mice were divided into seven groups: a) control; b) Pb (1x10<sup>6</sup> infected with Pb18 yeast); c) hMM (immunized with 100µg the fraction of hMM); d) hMM + Pb (immunized and infected); e) [Ru(Na<sub>2</sub>)Fe(CN<sub>5</sub>)(NO)] (treated with 100µM [Ru(Na<sub>2</sub>)Fe(CN<sub>5</sub>)(NO)]); f) Pb + [Ru(Na<sub>2</sub>)Fe(CN<sub>5</sub>)(NO)] (infected and treated); g) hMM + Pb + [Ru(Na<sub>2</sub>)Fe(CN<sub>5</sub>)(NO)] (immunized, infected and treated). The degree of protection was assessed by determination of colony forming units (CFU), histopathology of lung/liver, the cellular immune response, the levels of IgG fraction of hMM and by measuring levels of NO after 28 days of infection. The results showed absence of CFU and a decrease in the group immunized (hMM, hMM + Pb and hMM + Pb + [Ru(Na<sub>2</sub>)Fe(CN<sub>5</sub>)(NO)]) and in Pb + [Ru(Na<sub>2</sub>)Fe(CN<sub>5</sub>)(NO)], respectively, compared to Pb group (p<0.05). In histological sections it was also observed absence in immunized groups (fig 2B and 3B and table 1) and a decreased fungal cells number in the group Pb + [Ru(Na<sub>2</sub>)Fe(CN<sub>5</sub>)(NO)]. Consistent with the CFU and the histology, there was an increase in the cellular response observed in hMM + Pb group relative to Pb group (p<0.05). But by other side, reduced cellular response was observed in group hMM + Pb + [Ru(Na<sub>2</sub>)Fe(CN<sub>5</sub>)(NO)] (p<0.05). Moreover, IgG anti-hMM fraction levels were higher in groups hMM + Pb + [Ru(Na<sub>2</sub>)Fe(CN<sub>5</sub>)(NO)] and hMM + Pb compared to the others (p<0.05). NO levels were higher in Pb + [Ru(Na<sub>2</sub>)Fe(CN<sub>5</sub>)(NO)] compared to [Ru(Na<sub>2</sub>)Fe(CN<sub>5</sub>)(NO)] group (p<0.05) and this first group compared to hMM + Pb + [Ru(Na<sub>2</sub>)Fe(CN<sub>5</sub>)(NO)] (p<0.05). Additionally, we analyzed the effect of the hMM fraction associated or not with NPS-Ru treatment on murine peritoneal macrophages. Increased NO levels in the hMM as the [Ru(Na<sub>2</sub>)Fe(CN<sub>5</sub>)(NO)] treated groups in relation to control group (only macrophages) or decreased NO level in hMM and [Ru(Na<sub>2</sub>)Fe(CN<sub>5</sub>)(NO)] associated groups, in relation to single treatment (p<0.05) were detected. We conclude by the results that the fraction of hMM induces protection with complete elimination of fungi in the main organs and the treatment with [Ru(Na<sub>2</sub>)Fe(CN<sub>5</sub>)(NO)] also induces protection, but partial, in the conditions of the study. Both the fraction of hMM as compound [Ru(Na<sub>2</sub>)Fe(CN<sub>5</sub>)(NO)] induces increased serum levels of NO in experimental PCM in mice and also induces increased production/release of NO by murine peritoneal macrophages, but

decreased level by its association. The association of hMM fraction together with the  $[\text{Ru}(\text{Na}_2)\text{Fe}(\text{CN}_5)(\text{NO})]$  compound also partially suppressed the protection induced by hMM, possibly induced by modulation of cellular immune response, that require further study.

**Keywords:** Delayed hypersensitivity. Soluble antigen. Antibodies anti-hMM and fungal cells.

## LISTA DE FIGURAS E TABELAS

<b>Figura 1</b> – Perfil espectrofotométrico a 280nm da fração cromatográfica de CFA em sephadex G-200 e <i>western blotting</i> .....	45
<b>Figura 2</b> – Análise quantitativa de CFU de <i>P. brasiliensis</i> em pulmão e fígado .....	46
<b>Figura 3</b> – Análise histopatológica do pulmão em camundongos Balb/c infectados com <i>P. brasiliensis</i> .....	48
<b>Figura 4</b> – Análise histopatológica do fígado em camundongos Balb/c infectados com <i>P. brasiliensis</i> .....	49
<b>Figura 5</b> – Teste de hipersensibilidade tardia (DTH) em camundongos Balb/c infectados com <i>P. brasiliensis</i> .....	51
<b>Figura 6</b> – Análise dos níveis séricos de IgG anti-hMM de <i>P. brasiliensis</i> em camundongos Balb/c.....	52
<b>Figura 7</b> – Níveis séricos de NO em camundongos Balb/c infectados com <i>P. brasiliensis</i> .....	54
<b>Figura 8</b> – Níveis de NO em sobrenadante de macrófagos peritoneais murinos sensibilizados com a fração de hMM.....	55
<b>Figura 9</b> – Níveis de NO em sobrenadante de macrófagos peritoneais murinos tratados com [Ru(Na <sub>2</sub> )Fe(CN <sub>5</sub> )(NO)] .....	56
<b>Figura 10</b> – Porcentagem de inibição dos níveis de NO em sobrenadante de macrófagos murinos sensibilizados com hMM e tratados com [Ru(Na <sub>2</sub> )Fe(CN <sub>5</sub> )(NO)] na presença de <i>P. brasiliensis</i> .....	57
<b>Tabela 1</b> – Número de granulomas e de células fúngicas presentes nos cortes histológicos de pulmão e fígado de camundongos tratados ou não com hMM e/ou [Ru(Na <sub>2</sub> )Fe(CN <sub>5</sub> )(NO)] e infectados com <i>P. brasiliensis</i> .....	50

## LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS

<b>BHI</b>	Ágar infusão cérebro-coração
<b>Bpy</b>	2,2' bipyridina
<b>CFA</b>	<i>Cell-free Antigens</i>
<b>CFU</b>	<i>Colony-forming unit</i>
<b>Ctz</b>	Clotrimazol
<b>DCs</b>	Células dendríticas
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucléico
<b>ELISA</b>	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
<b>eNOS</b>	Óxido nítrico sintase endotelial
<b>Fe</b>	Ferro
<b>H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></b>	Ácido sulfúrico
<b>Hedta</b>	<i>Hydroxyethylethylenediaminetriacetic Acid</i>
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	interferon gama
<b>IL-1<math>\beta</math></b>	interleucina 1 beta
<b>iNOS</b>	Óxido nítrico sintase induzível
<b>kDa</b>	Quilodalton
<b>ktz</b>	Cetoconazol
<b>mg</b>	Miligrama
<b>mL</b>	Mililitro
<b>Mm</b>	Milimolar
<b>M</b>	Molar
<b>N<sub>2</sub></b>	Gás nitrogênio
<b>NADPH</b>	<i>Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate</i>
<b>NK</b>	Células Natural killer
<b>Nm</b>	Nanômetro
<b>nNOS</b>	Óxido nítrico sintase neuronal
<b>NO</b>	Óxido nítrico
<b>NPS-Ru</b>	Nitroprussiato de sódio complexado com rutênio
<b>OPD</b>	<i>o-phenylenediamine Dihydrochloride</i>
<b>O<sub>2</sub></b>	Gás oxigênio
<b>PF6</b>	Hexafluorofosfato

<b>PMSF</b>	<i>Phenylmethanesulphonyl Fluoride</i>
<b>RIN</b>	Intermediários reativos de nitrogênio
<b>RPMI</b>	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
<b>TCA</b>	Ácido tricloroacético
<b>Terpy</b>	2,2':6',2"- terpiridina
<b>Th1</b>	Linfócito T auxiliar ou <i>helper</i> 1
<b>Th2</b>	Linfócito T auxiliar ou <i>helper</i> 2
<b>TMB</b>	3,3,5,5 tetrametilbenzidina
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Fator de Necrose Tumoral alfa
<b>Mg</b>	Micrograma
<b><math>\mu</math>L</b>	Microlitro
<b><math>\mu</math>M</b>	Micromolar
<b><math>^{\circ}</math>C</b>	Grau Celsius

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	15
1.1	<i>PARACOCCIDIOIDES BRASILIENSIS</i> E A PARACOCCIDIOIDOMICOSE .....	15
1.2	RELAÇÃO FUNGO-MACRÓFAGO E ÓXIDO NÍTRICO .....	18
1.3	COMPLEXOS DE RUTÊNIO .....	21
<b>2</b>	<b>OBJETIVO</b> .....	24
2.1	OBJETIVO GERAL .....	24
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	24
<b>3</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	25
	<b>ARTIGO</b> .....	33
<b>4</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	35
<b>5</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	38
5.1	MANUTENÇÃO DO PATÓGENO .....	38
5.2	COMPOSTO DOADOR DE ÓXIDO NÍTRICO .....	38
5.3	ANIMAIS .....	38
5.4	OBTENÇÃO DE ANTÍGENOS DE <i>P. BRASILIENSIS</i> .....	38
5.5	CROMATOGRAFIA EM COLUNA DE SEPHADEX G-200 .....	39
5.6	<i>WESTERN BLOTTING</i> .....	39
5.7	PROTOCOLO EXPERIMENTAL .....	40
5.7.1	Imunização dos Animais .....	40
5.7.2	Infecção dos Animais .....	40
5.7.3	Tratamento dos Animais .....	41
5.8	UNIDADES FORMADORAS DE COLÔNIAS (CFU) .....	41
5.9	ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA DOS ÓRGÃOS .....	42
5.10	REAÇÃO DE HIPERSENSIBILIDADE TARDIA (DTH) .....	42
5.11	ELISA PARA DETECÇÃO DE IGG ANTI-HMM .....	42
5.12	EFEITO DA FRAÇÃO DE HMM E DO [RU(NA <sub>2</sub> )FE(CN <sub>5</sub> )(NO)] NA PRODUÇÃO DE NO PELOS MACRÓFAGOS PERITONIAIS MURINOS .....	43

5.13	DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE ÓXIDO NÍTRICO.....	44
5.14	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	44
<b>6</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>45</b>
6.1	PERFIL ESPECTROFOTOMÉTRICO DA FRAÇÃO DE CFA E <i>WESTERN</i> <i>BLOTTING</i> .....	45
6.2	UNIDADE FORMADORA DE COLÔNIAS (CFU).....	45
6.3	ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA DO PULMÃO E FÍGADO .....	46
6.4	REAÇÃO DE HIPERSENSIBILIDADE TARDIA (DTH) .....	50
6.5	ELISA PARA DETERMINAÇÃO DO NÍVEL DE IGG ANTI-FRAÇÃO DE HMM .....	51
6.6	NÍVEIS DE ÓXIDO NÍTRICO <i>IN VITRO E IN VIVO</i> .....	53
6.6.1	Níveis Séricos de Óxido Nítrico em Camundongos Balb/c .....	53
6.6.2	Níveis de Óxido Nítrico em Sobrenadante de Macrófagos Peritoneais Murinos Sensibilizados com Hmm.....	54
6.6.3	Níveis de Óxido Nítrico em Sobrenadante de Macrófagos Peritoneais Murinos Tratados com [Ru(Na <sub>2</sub> )Fe(CN <sub>5</sub> )(NO)] .....	55
6.6.4	Inibição dos Níveis de Óxido Nítrico em Sobrenadante de Macrófagos Murinos Sensibilizados com hMM e Tratados com [Ru(Na <sub>2</sub> )Fe(CN <sub>5</sub> )(NO)] na Presença de <i>P. brasiliensis</i> .....	56
<b>7</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	<b>58</b>
<b>8</b>	<b>CONCLUSÕES</b> .....	<b>63</b>
<b>9</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>64</b>

## 1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 1.1 *PARACOCCIDIOIDES BRASILIENSIS* E A PARACOCCIDIOIDOMICOSE

A Paracoccidioidomicose (PCM) é uma doença granulomatosa, sistêmica e de evolução crônica causada pelo fungo dimórfico *Paracoccidioides brasiliensis* descrito inicialmente por Adolfo Lutz, em 1908. É uma doença endêmica na América Latina onde cerca de 10 milhões de pessoas estão infectadas e 2% delas, podendo vir a desenvolver a doença (MCEWEN et al., 1995; ALMEIDA et al., 2003). No entanto, nas áreas de maior endemicidade, como o Brasil, a incidência anual chega a 3 casos para cada 100.000 habitantes, com letalidade variando de 2% a 23% (FELIPE et al., 2005). O Brasil, Venezuela, Colômbia, Equador e Argentina são os de maior incidência (SILVESTRE et al., 1997; MARQUES, 1998).

O habitat e o ciclo biológico do *P. brasiliensis* ainda não estão totalmente esclarecidos, contudo, diversos estudos ecoepidemiológicos sugerem que esse fungo sobreviva na sua fase miceliana como saprobiota em regiões com solos úmidos, ricos em matéria orgânica e com pequenas alterações de temperatura (RESTREPO, 1985; RESTREPO et al., 2001). Em condições adversas, como limitação de umidade e nutrientes, o fungo pode produzir propágulos denominados de conídios, os quais podem infectar, por via aérea, o hospedeiro (RESTREPO et al., 2001).

Utilizando técnicas moleculares, *P. brasiliensis* foi classificado como pertencente ao filo Ascomycota, ordem Onygenales, e da família Onygenaceae (ALMEIDA et al., 2003). *P. brasiliensis* é um fungo que apresenta forma de micélio à temperatura ambiente (26°C) e forma de levedura à 37°C (SAN-BLAS et al., 1993). A transição de micélio para levedura pode ser induzida, *in vitro*, apenas mudando a temperatura de incubação de 26°C para 37°C (BROWN et al., 1999) e essa transição dimórfica ocorre através de alterações na composição da parede e membranas celulares, ocasionando mudanças estruturais nos polímeros de carboidratos da parede e reorganização dos lipídeos de membrana (LEVERY et al., 1998; TOLEDO et al., 1999). Acredita-se que a morfogênese esteja ligada à virulência do fungo, pois os isolados que não possuem a capacidade de se diferenciar em leveduras não são virulentos (BORBA et al., 2002).

Em temperaturas próximas a 26°C, as culturas de *P. brasiliensis* apresentam aspecto algodinoso e estruturas celulares que se apresentam sob a forma miceliana, com formação de hifas septadas, multinucleadas, com filamentos finos e artroconídios intercalares (BRUMMER et al., 1993; SAN-BLAS et al., 2000). À temperatura de 37°C o fungo promove uma transição da estrutura filamentosa para uma estrutura globular, assumindo a forma de levedura (SAN-BLAS et al., 2000). Esta seria sua forma parasitária, que assume características peculiares como brotamentos múltiplos, resultado de exoesporulação, uma membrana birrefringente, além de cromatina evidente. A morfologia única desta levedura é determinante no diagnóstico laboratorial da PCM, e em uma avaliação comparativa, se assemelha a uma “roda-de-leme” (FURTADO et al., 1967). Embora a composição da parede celular dos fungos varie entre as diferentes espécies, é composto basicamente por proteínas, glicoproteínas, lipídeos e, principalmente, por polissacarídeos do tipo quitina e glicanas, distribuídos diferentemente ao longo da superfície (DE GROOT et al., 2005). Esses dois últimos compostos variam em proporções de acordo com a fase morfológica e com o grau de virulência da linhagem fúngica (KANETSUNA et al., 1970).

Após inalação do fungo nos pulmões, ocorre a formação de lesões que podem: (i) regredir com a destruição do fungo, (ii) regredir com fungos latentes ou quiescentes podendo desenvolver PCM ativa posteriormente, ou (iii) progredir com o desenvolvimento dos sinais e sintomas da PCM (LACAZ, 1994). A doença é caracterizada por inflamação granulomatosa, supressão da imunidade celular e altos títulos de anticorpos (DIXON et al., 1998).

Estudos epidemiológicos utilizando-se teste intradérmico com paracoccidioidina para detecção de contato prévio com *P. brasiliensis* ou pelo uso de teste imunoenzimático (ELISA), detectando anticorpos específicos, revelam que a exposição ao fungo é alta em populações de indivíduos adultos e saudáveis, principalmente em áreas rurais (DIXON et al., 1998; BOTTEON et al., 2002). A infecção primária da PCM pode persistir em focos quiescentes por décadas, como observado em casos importados, sugerindo que, durante este período, estes pacientes foram capazes de controlar a disseminação fúngica. Alguns tipos de medicamentos utilizados contra a rejeição de órgãos ou quimioterápicos podem levar a reativação do *P. brasiliensis* latente por indução de imunossupressão do hospedeiro. O desenvolvimento da doença fica, então, dependente de fatores como

a virulência do patógeno, da susceptibilidade genética e do estado imunológico do hospedeiro (FRANCO et al., 1987; SAN-BLAS et al., 2002).

O principal componente antigênico de *P. brasiliensis* é uma glicoproteína de 43kDa, denominada gp43. É o principal antígeno secretado pelo fungo e é também o mais específico para o diagnóstico da infecção pelo *P. brasiliensis* (PUCCIA et al., 1986; ALMEIDA et al., 2003). Essa glicoproteína atua como um receptor de laminina e é responsável pela adesão da forma de levedura de *P. brasiliensis* à membrana basal das células do hospedeiro. Uma vez presente no hospedeiro, a gp43 tem a capacidade de inibir a fagocitose, a produção de óxido nítrico (NO) e peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) pelos macrófagos (ALMEIDA et al., 1998; POPI et al., 2002).

Outro componente que tem sido estudado na infecção causada pelo *P. brasiliensis*, é um antígeno solúvel de alta massa molecular (hMM) produzido pela forma de levedura do fungo. Márquez et al. (2005), observaram que o peso molecular desse componente é de, aproximadamente, 386kDa e segundo Pavanelli et al. (2007), o mesmo apresenta efeito protetor, o qual foi evidenciado pelo menor nível de antígenos solúveis em soros de camundongos Balb/c imunizados com a fração de hMM, e comprovado pelo menor número de fungos viáveis em pulmão e fígado, observados pela análise de CFU.

Além disso, em animais imunizados com a fração de hMM, foi observada a redução de células fúngicas nos granulomas, verificado através da análise histopatológica, sugerindo uma atividade protetora da fração de hMM. A análise de cortes histopatológicos, demonstraram que as lesões granulomatosas formadas foram poucas, menores, e mais compactas e organizadas nesse grupo de animais (PAVANELLI et al., 2007).

A morfologia das lesões granulomatosas está relacionada com a resposta imune celular do hospedeiro. A formação de granulomas compactos com poucas células fúngicas é observada em pacientes com doença crônica localizada, enquanto que nos pacientes com a forma aguda, as lesões são geralmente desorganizadas. O mesmo ocorre em animais imunossuprimidos com baixos níveis de IFN- $\gamma$ , produção de citocinas do padrão Th2 e de doença progressiva, com a presença de muitas lesões granulomatosas desorganizadas (DEFVREI et al., 1982; SOARES et al., 2002).

## 1.2 RELAÇÃO FUNGO-MACRÓFAGO E ÓXIDO NÍTRICO

O sistema mononuclear fagocitário constitui um importante mecanismo efetor da resposta imune natural e adaptativa contra diversos patógenos. Kashino et al. (1995), sugeriram que macrófagos desempenham um papel fundamental na resistência ao *P. brasiliensis*.

Estudos anteriores demonstraram que macrófagos peritoniais murinos ativados com IFN- $\gamma$ , exercem um efeito fungicida sobre as formas de levedura e de conídios do *P. brasiliensis* (CANO et al., 1992; BRUMMER, 1994; CANO et al., 1994). Esses achados também sugerem que citocinas, especialmente o IFN- $\gamma$ , desempenham um importante papel na resistência a PCM, como demonstrado por Cano et al. (1998) utilizando camundongos resistentes (A/Sn) e susceptíveis (B10.A) infectados intraperitonealmente com *P. brasiliensis*. A depleção de IFN- $\gamma$  causou uma exacerbação da infecção pulmonar e uma disseminação mais precoce para o fígado e baço tanto dos camundongos A/Sn quanto dos B10.A.

Após inalação, as primeiras células de defesa as quais os conídios de *P. brasiliensis* encontram são os macrófagos alveolares residentes e células dendríticas (DCs) presentes no parênquima pulmonar. Esses conídios, ou são fagocitados e convertem-se para a forma de levedura parasita, ou essa transição ocorre primeiro seguido pela fagocitose dessas leveduras (CANO et al., 1992; ARISTIZABAL et al., 1998; GONZALEZ et al., 2000). Os macrófagos residentes estão em maior número em relação às DCs (TWIGG, 2004), o que os tornam mais provável de interagir inicialmente com o fungo após uma infecção primária. Apesar dos macrófagos possuírem a maquinaria requerida para a apresentação antigênica, sua maior contribuição para a defesa antifúngica é a fagocitose seguida da destruição desses organismos (ROMANI, 2004).

Diversos são os mecanismos utilizados pelos macrófagos para destruição de patógenos. Os mecanismos oxidativos e nitrosativos envolvem principalmente a atividade enzimática do complexo nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) oxidase e a óxido nítrico sintase induzível (iNOS), respectivamente (NATHAN et al., 2000; MISSAL et al., 2004). A iNOS é expressa, principalmente, por macrófagos ativados por citocinas (IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ ) e/ou produtos microbianos (XIE et al., 1992; NATHAN, 1997). Modelos experimentais demonstraram que a principal atividade microbicida dos macrófagos relaciona-se

com a produção de NO e seus metabólicos, chamados coletivamente de intermediários reativos de nitrogênio (RIN), como o peroxinitrito, que subsequentemente decompõe-se em moléculas adicionais também altamente reativas (BOGDAN et al., 2000; MISSAL et al., 2004).

O efeito deletério dos RINs reside no fato dessas moléculas causarem uma variedade de alterações no DNA, incluindo quebra de fitas e desaminação.

Além disso, nas proteínas causam modificações que envolvem nitrosilação de resíduos de cisteína e tirosina, além de inativação de enzimas com centro ferro-enxofre (FANG, 1997). Essas modificações podem afetar enzimas vitais como a do ciclo respiratório, causando efeitos microbiostático e microbicida *in vitro* e *in vivo* contra uma grande variedade de fungos incluindo *P. brasiliensis* (BOCCA et al., 1998; GONZALEZ et al., 2000; NASCIMENTO et al., 2002), *Cryptococcus neoformans* (LEE et al., 1994), *Histoplasma capsulatum* (LANE et al., 1994), a forma de hifa de *Candida albicans* (BLASI et al., 1995) entre outros.

Especificamente, uma ação deletéria do NO sobre o *P. brasiliensis* foi observada não só *in vitro* como *in vivo*. Gonzalez et al. (2000) utilizando cultura de macrófagos peritoniais murinos ativados por IFN- $\gamma$ , demonstraram que a função fungicida e a inibição da transformação da forma de conídio para levedura eram dependentes da via L-arginina-óxido nítrico. Em trabalho anterior, Bocca et al. (1998) demonstraram um efeito fungicida do NO para levedura de *P. brasiliensis in vitro*, sugerindo que sua produção pelo hospedeiro poderia estar envolvida no controle da infecção. De fato, animais infectados e tratados com um inibidor da atividade da iNOS apresentaram um número significativamente maior de fungos no pulmão em comparação aos animais infectados não tratados. Além disso, Nascimento et al. (2002) confirmaram o papel fungicida do NO na PCM experimental por meio da utilização de camundongos geneticamente deficientes para o gene da iNOS.

A descoberta que o NO, produzido enzimaticamente pelo endotélio, o qual era o responsável direto pelo controle da pressão arterial, desencadeou o renascimento da química do NO e suas implicações bioquímicas e biológicas (MONCANA et al., 1987; PALMER et al., 1988). O NO, sob condições normais de pressão e temperatura, é um gás incolor e termodinamicamente instável quando comparado aos gases N<sub>2</sub> e O<sub>2</sub> (LANCASTER, 2000). Sua elevada constante difusional somada a sua lipossolubilidade e hidrossolubilidade (MEULEMANS, 1994)

confere a esta molécula habilidade de difundir-se livremente no meio fisiológico, cruzar membranas sem canais ou receptores e, também, a facilidade em formar complexos com centros metálicos [Fe (II e III)] presentes em várias proteínas (PACHER et al., 2007).

O NO está relacionado com várias e importantes funções fisiológicas e patológicas, tais como controle da pressão sanguínea (IGNARRO, 1989), neurotransmissão (BREDT et al., 1990; GARTHWAITE, 1991; 1995), sinalizador do sistema imunológico (HIBBS et al., 1988), bem como nas atividades do cérebro, fígado, pâncreas, útero e pulmões (PACHER et al., 2007). Além disso, tem sido relatado que a produção enzimática de NO é, provavelmente, a principal forma de defesa do sistema imunológico do hospedeiro para controlar as infecções causadas por parasitas, tais como *Trypanosoma cruzi* (VESPA et al., 2004), *Toxoplasma gondii* (LUDER et al., 2003), *Plasmodium chabaudi* (GARNICA et al., 2003) e *Leishmania infantum* (SALVATI et al., 2001). O aumento da concentração de NO também é observado durante as infecções causadas por vírus e bactérias como é o caso de *Herpes Simplex Vírus* (FUJI et al., 1999) e da Tuberculose (COOPER et al., 2002).

O NO é sintetizado a partir da L-arginina e de um oxigênio molecular por um processo enzimático que utiliza elétrons doados pela NADPH. A enzima NO sintase (NOS) converte a L-arginina a NO e L-citrulina através de um produto intermediário, o N-hidroxi-L-arginina. Há três tipos de NOS. Duas delas são constitutivamente expressas (nNOS ou NOS I ou eNOS ou NOS III), enquanto a outra é expressa somente em células ativadas (iNOS ou NOS II) (TRIPATHI et al., 2007).

As enzimas NOS estão presentes em células endoteliais vasculares, células cardíacas, plaquetas, células musculares lisas, células neuronais, macrófagos, células NK, fibroblastos e neutrófilos (MONCADA et al., 1991; LINDE et al., 2006). A manifestação de efeitos biológicos é dependente da química do ambiente e é influenciada pela presença dos diferentes RIN gerados: anion nitroxil, óxido nitroso, cátion nitrosil, ácido nitroso, dióxido de nitrogênio, dinitrogênio tetraóxido, peroxinitrito e cátion nitril, sendo que os principais produtos estáveis do metabolismo do NO são as moléculas de nitrito e nitrato (DENICOLA et al., 1998).

A nível celular, o NO exerce vários efeitos na função celular dos leucócitos, incluindo a indução de apoptose de macrófagos, a estimulação da

motilidade citoplasmática de macrófagos, a modulação da adesão de neutrófilos e a regulação diferencial da síntese de citocinas pelos leucócitos (LIEW, 1995; MADAN et al., 1996).

Além de ter efeitos protetores no hospedeiro, o NO está envolvido na imunossupressão, mediada por macrófagos. Em estudos anteriores, a produção de NO mostrou-se importante em macrófagos murinos, em relação à supressão da proliferação de células T estimuladas por antígenos e também em relação à supressão imunológica em algumas linhagens de camundongos infectados com *Trypanosoma brucei* (STENBERG et al., 1992; SCHLEIFER et al., 1993), *Plasmodium vinckei* (ROCKETT et al., 1994), e *Salmonella typhimurium* (AL-RAMADI et al., 1992). Além disso, há evidências que o NO reduz a habilidade de células dendríticas pulmonares em apresentar antígenos (HOLT et al., 1992), inibindo, também, a expressão de produtos de genes do complexo principal de histocompatibilidade de classe II (moléculas Ia) em macrófagos estimulados por IFN- $\gamma$  (SICHER et al., 1994), responsável por apresentar os antígenos a outras células linfóides e favorecer o curso da infecção.

### 1.3 COMPLEXOS DE RUTÊNIO

Complexos metálicos são eficientes transportadores de NO. Da interação do ligante NO com íon Fe(III) presente em proteínas tais como ferrohemo proteínas, hemoglobina e mioglobina ou ferroproteínas como citocromo c, citocromo oxidase e guanilato ciclase, decorrem muitos processos fisiológicos que estão diretamente associados a essa molécula (ROSE et al., 1983; SALERMO, 1996; COOPER, 1999). Além do íon Fe, o NO reage com uma variedade de metais de transição, como níquel, molibdênio, crômio, irídio, ósmio e rutênio, gerando complexos nitrosilos (FONTECAVE et al., 1994). Dentre esses, os íons de rutênio formam diversos compostos contendo o nitrosilo e em quantia superior a de qualquer outro metal de transição (BOTTOMLEY, 1978; MCCLEVERTY, 1979).

Muitos trabalhos têm apresentado estratégias para a liberação controlada de NO de uma ampla variedade de complexos nitrosilo envolvendo alguns metais, principalmente o rutênio. Nitrosilos de rutênio têm se mostrando termicamente estáveis, porém fotolábeis, liberando NO quando expostos a radiação ultravioleta e, em alguns casos, radiação visível (CARLOS et al., 2004). Mesmo

assim, doadores de NO complexados com rutênio como o *trans*-[Ru<sup>II</sup>(NO<sup>+</sup>)(NH<sub>3</sub>)<sub>4</sub>L]<sup>3+</sup> e [Ru<sup>II</sup>(NO<sup>+</sup>)(Hedta)], são bons modelos para avaliar a atividade tripanocida *in vitro* e *in vivo* devido a baixa toxicidade, solubilidade em água e a estabilidade em meio aquoso na presença de oxigênio, apresentado por eles (TOLEDO *et al.*, 2004). Além disso, complexos Ru-NO como *cis*-(Cl,Cl)-[Ru<sup>II</sup>Cl<sub>2</sub>(NO<sup>+</sup>)(terpy)]Cl, tem sido investigado como potencial agente antitumoral, uma vez que se a liberação do NO puder ser introduzida dentro das células tumorais, a morte celular pode ocorrer (KARIDI *et al.*, 2005).

De fato, alguns estudos demonstram que os complexos de rutênio, Ru(Ctz)<sub>2</sub>(H<sub>2</sub>O)<sub>2</sub>(PF<sub>6</sub>)<sub>2</sub> e [Ru(Ktz)<sub>2</sub>(H<sub>2</sub>O)Cl<sub>3</sub>], agindo em sinergismo com drogas antifúngicas têm se mostrado mais ativos que os correspondentes ligantes livres (SANCHEZ-DELGADO *et al.*, 1998; NAVARRO *et al.*, 2000). Ainda assim, estudo anterior, demonstrou que complexos de rutênio são capazes de inibir 70% da proliferação das formas epimastigotas de *T. cruzi* (SANCHEZ-DELGADO *et al.*, 2004). Seguindo esta linha, o [Ru(NH<sub>3</sub>)<sub>4</sub>L]<sup>n+</sup> foi testado com sucesso como transportador de NO *in vitro* e *in vivo* (TFOUNI *et al.*, 2003; SILVA *et al.*, 2007), e a produção de NO tem sido atribuída como responsável pelo efeito tripanocida dos macrófagos ativados (TFOUNI *et al.*, 2003). Além disso, Pavanelli *et al.* (2011), demonstraram que camundongos infectados com *P. brasiliensis* foram mais resistentes a infecção e apresentaram uma maior sobrevivência destes quando tratados com *cis*-[Ru(bpy)<sub>2</sub>(NO)SO<sub>3</sub>](PF<sub>6</sub>). Assim, as características apresentadas por esses tipos de compostos são bastante promissoras para desenvolvimento de metalofármacos, especialmente para o tratamento de doenças infecciosas, onde a concentração de NO tem que ser alta o suficiente para impedir o desenvolvimento de parasitas, mas não tão elevados que cause imunossupressão, inibição dos complexos respiratórios, modificações no DNA ou apoptose das células do hospedeiro (BOGDAN, 2001).

Complexos metálicos, cujo centro metálico é o rutênio, possuem boa aplicação clínica, principalmente pela baixa toxicidade do metal (ALLARDYCE *et al.*, 2001). Isto se deve, em parte, à semelhança das propriedades físico-químicas deste íon metálico com o do íon Fe. O organismo consegue proteger-se dos efeitos causados por um excesso de Fe através do aumento da produção de proteínas captadoras de Fe, como a transferrina. Alguns autores acreditam que o mecanismo

de proteção contra a toxicidade do rutênio seria o mesmo (ALLARDYCE et al., 2001).

Lembrando que a toxicidade do metal também está relacionada com seu estado de oxidação, pode-se afirmar que um outro fator da baixa toxicidade do rutênio é sua habilidade de atingir vários estados de oxidação (II, III e IV) em meio fisiológico (ALLARDYCE et al., 2001).

Portanto, não é surpresa que a procura por complexos metalonitrosilo para serem usados como agentes potencialmente capazes de liberar NO *in vivo* se tornou uma área de pesquisa muito ativa recentemente. Deste modo, complexos nitrosilos de rutênio parecem ser candidatos muito bons, devido estes, exibirem alta estabilidade em solução aquosa, podendo ser um agente doador de NO quando sujeito à redução eletroquímica ou radiação por luz. O possível uso deste tipo de sistema em terapia clínica dirigiu os estudos para uma melhor compreensão de suas propriedades químicas e biológicas (LUNARDI et al., 2006).

Até o momento, um grande número de complexos de rutênio foram sintetizados e testados como potenciais terapêuticos. Foram feitos estudos de seus modos de ação e, relações de estrutura-atividade foram sugeridas. Porém, muitos detalhes ainda são desconhecidos, e sua caracterização permanece como uma tarefa desafiadora para a pesquisa interdisciplinar.

Baseados nos fatos até aqui mencionados, consideramos oportuno e relevante o estudo dos efeitos da fração de hMM juntamente com o do NO, para avaliação da patogenicidade do *P. brasiliensis* em modelo de infecção experimental murino, bem como, o efeito desse tratamento sobre a resposta imune do hospedeiro.

## 2 OBJETIVO

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos do componente de hMM e do composto doador de NO ( $[\text{Ru}(\text{Na}_2)\text{Fe}(\text{CN}_5)(\text{NO})]$ ), e de suas associações, em camundongos experimentalmente infectados com *P. brasiliensis*.

## 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obter a fração de hMM do CFA de *P. brasiliensis*.
- Determinar a carga fúngica (CFU) em pulmão e fígado de camundongos infectados, imunizados ou não com a fração de hMM e tratados ou não com  $[\text{Ru}(\text{Na}_2)\text{Fe}(\text{CN}_5)(\text{NO})]$ .
- Determinar número de granulomas e de fungos nestes granulomas nos cortes histológicos de pulmão e fígado, em camundongos infectados, imunizados ou não com a fração de hMM e tratados ou não com  $[\text{Ru}(\text{Na}_2)\text{Fe}(\text{CN}_5)(\text{NO})]$ .
- Avaliar a resposta imune celular por meio do teste de Hipersensibilidade tardia (DTH) em camundongos infectados, imunizados ou não com a fração de hMM e tratados ou não com  $[\text{Ru}(\text{Na}_2)\text{Fe}(\text{CN}_5)(\text{NO})]$ .
- Determinar os níveis séricos de IgG anti-hMM no soro dos camundongos infectados, imunizados ou não com a fração de hMM e tratados ou não, com  $[\text{Ru}(\text{Na}_2)\text{Fe}(\text{CN}_5)(\text{NO})]$ .
- Avaliar os níveis de NO produzido por macrófagos peritoneais murinos incubados com as leveduras de *P. brasiliensis* ou com a fração hMM ou com  $[\text{Ru}(\text{Na}_2)\text{Fe}(\text{CN}_5)(\text{NO})]$  e com as associações dos mesmos.

### 3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALLARDYCE, C. S.; DYSON, P. J. Ruthenium in medicine: current clinical uses and future prospects. *Plat. Met. Rev.*, v. 45, p. 62-69, 2001.
- ALMEIDA, O. P.; JACKS, J. JR.; SCULLY, C. Paracoccidioidomycosis of the mouth: an emerging deep mycosis. *Crit. Rev. Oral. Biol. Med.*, 14(5):377-83, 2003.
- ALMEIDA, S. R.; UNTERKIRCHER, C. S.; CAMARGO, Z. P. Involvement of the major glycoprotein (gp43) of *Paracoccidioides brasiliensis* in attachment to macrophages. *Med. Mycol.*, 36:405-411, 1998.
- AL-RAMADI, B. K.; MEISSLER, J. J.; HUANG, D.; EISERSTERN, T. K. Immunosuppression induced by nitric oxide and its inhibition by interleukin-4. *Eur. J. Immunol.*, 22:2249, 1992.
- ARISTIZABAL, B. H.; KARL, V. C.; DAVID, A. S.; RESTREPO, A. Morphological transition of *Paracoccidioides brasiliensis* conidia to yeast cells: *in vivo* inhibition in females. *Infec. Immun.*, 66:5587-5591, 1998.
- BLASI, E.; PITZURRA, M.; PULITI, M.; CHIMIANTI, A. R.; MAZZOLLA R.; BARLUZZI, R.; BISTONI, F. Differential susceptibility of yeast and hyphal forms of *Candida albicans* to macrophages-derived nitrogen-containing compounds. *Infect. Immunol.*, 63:1806-1809, 1995.
- BOCCA, A. L.; HAYASHI, E. E.; PINHEIRO, A. G.; FURLANETTO, A. B.; CAMPANELLI, A. P.; CUNHA, F. Q.; FIGUEIREDO, F. Tratament of *Paracoccidioides brasiliensis*-infected mice with a nitric oxide inhibitor prevent the failure of cell-mediated immune response. *J. immunol.*, 161:3056-3063, 1998.
- BOGDAN, C. M. R.; DIEFENBACH, A. Reactive oxygen and reactive nitrogen intermediates in innate and specific immunity. *Curr. Opin. Immunol.*, 12:64-76, 2000.
- BOGDAN, C. M. R. Nitric oxide and the immune response. *Nat. Immun.*, 10: 907-916, 2001.
- BORBA, C. M.; SCHÄFFER, G. V. *Paracoccidioides brasiliensis*:k Virulence and attempt to induce the dimorphic process with fetal calf serum. *Mycoses*, 45: 174-179, 2002.
- BOTTEON, F. A.; CAMARGO, Z.P.; BENARD, G.; COELHO, R.F.; CHAMONE, D.A.; ITANO, E.N. *Paracoccidioides brasiliensis*-reactive antibodies in Brazilian blood donors. *Med Mycol.*, v. 40, n. 4, p. 387-91, 2002.
- BOTTOMLEY, F. Nitrosyl complexes of ruthenium. *Coord. Chem. Rev.*, v. 26, p. 7-32, 1978.
- BREDT, D. S.; HWANG, P. M.; SNYDER, S. H. Localization of nitric oxide synthase indicating a neural role for nitric oxide. *Nature*, v. 347, p. 768-770, 1990.

BROWN, A. J. P.; GOW, N. A. R. Regulatory networks controlling *Candida albicans* morphogenesis. *Trends Microbiol.*, 7, 333-338, 1999.

BRUMMER, E.; CASTANEDA, E.; RESTREPO, A. Paracoccidioidomycosis: an update. *Clin. Microbiol. Rev.*, 6, 89-117, 1993.

BRUMMER, E. Interaction of *Paracoccidioides brasiliensis* with host defense cells, p. 213–223. In: FRANCO, M.; SILVA LACAZ, C.; RESTREPO MORENO, A.; DEL NEGRO, G. (Ed.). *Paracoccidioidomycosis-1994*. CRC Press, Boca Raton, 1994.

CANO, L. E.; BRUMMER, E.; STEVENS, D.; RESTREPO, A. Fate of conidia from *Paracoccidioides brasiliensis* after ingestion by resident macrophages or cytokine-treated macrophages. *Infect. Immun.*, 60:2096–2100, 1992.

CANO, L. E.; GOMEZ, B.; BRUMMER, E.; RESTREPO, A.; STEVENS, D. A. Inhibitory effect of deferoxamine or macrophage activation on transformation of *Paracoccidioides brasiliensis* conidia ingested by macrophages: reversal by holotransferrin. *Infect. Immun.*, 62:1494–1496, 1994.

CANO, L. E.; KASHINO, S. S.; ARRUDA, C.; ANDRÉ, D.; XIDIEH, C. F.; SINGER-VERMES, L. M.; VAZ, C. A. C.; BURGER, E.; CALICH, V. L. G. Protective role of gamma interferon in experimental pulmonary paracoccidioidomycosis. *Infect. Immun.*, 66:800–806, 1998.

CARLOS, R. M.; FERRO, A. A.; SILVA, H. A. S.; GOMES, M. G.; BORGES, S. S. S.; FORD, P. C.; TFOUNI, E.; FRANCO, D. W. Photochemical reactions of trans-[Ru(NH<sub>3</sub>)<sub>4</sub>L(NO)]<sup>3+</sup> complexes. *Inorg. Chimica Acta*, 347 (5):1381, 2004.

COOPER, C. E. Nitric oxide and iron proteins. *Bioch. et Bioph. Acta*, v. 1411, p. 290-309, 1999.

COOPER, A. M.; ADAMS, L. B.; DALTON, D. K.; APPELBERG, R.; EHLERS, S. IFN-gama and NO in microbacterial disease: new jobs for old hands. *Trends in Microbiol.*, v. 10, p. 221-226, 2002.

DE GROOT, P. W.; RAM, A. F.; KLIS, F. M. Features and fuctions of covalently linked proteins in fungal cell walls. *Fungal Genet. Biol.*, 42:657-675, 2005.

DEFAVREI, J.; REZ, J.; REZKALLAH-IWASSO, M. T.; FRANCO, M. F. Experimental pulmonary paracoccidioidomycosis in mice: Morphology and correlation of lesions with humoral and cellular immune response. *Mycopathology*, 77(1):3–11, 1982.

DENICOLA, A.; SOUZA, J. M.; RADU, R. Diffusion of peroxynitrite across erythrocyte membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95: 3566-3571, 1998.

DIXON, D. M.; CASADEVALL, A.; KLEIN, B.; MENDOZA, L.; TRAVASSOS, L.; DEEPE, G. S. JR. Deselopmente of vaccines and their use in the prevention of fungal infections. *Med. Mycol.*, 1: 57-67, 1998.

FANG, F. C. Perspective series: host/pathogen interaction. Mechanisms of nitric oxide-related antimicrobial activity. *J. Clin. Invest.*, 99:2818-2825, 1997.

FELIPE, M. S.; TORRES, F. A.; MARANHÃO, A. Q.; SILVA-PEREIRA, I.; POÇAS-FONSECA, M. J.; CAMPOS, E. G.; MORAES, L. M.; ARRAES, F. B.; CARVALHO, M. J.; ANDRADE, R. V.; NICOLA, A. M.; TEIXEIRA, M. M.; JESUÍNO, R. S.; PEREIRA, M.; SOARES, C. M.; BRÍGIDO, M. M. Functional genome of the human pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, 45(3):369–81, 2005.

FONTECAVE, M.; PIERRE, J. L. The basic chemistry of nitric oxide and its possible biological reactions. *Bulletin de lá Société Chimique de France*, v. 131, p. 620-631, 1994.

FRANCO, M.; MENDEZ, R. P.; DILLON, N. L.; MOTA, N. G. S. Paracoccidioidomycosis, a recently proposed classification of this clinical forms. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v. 20, p. 129-132, 1987.

FUJI, S.; AKAIKE, T.; MAEDA, H. Role of nitric oxide in pathogenesis of Herpes simplex vírus encephalitis in rats. *Virology*, v. 526, p. 203-212, 1999.

FURTADO, J. S.; BRITO, T.; FREYMÜLLER, E. The structure and reproduction of *Paracoccidioides brasiliensis* in tissue. *Saboraudia*, 5:226-237, 1967.

GARNICA, M. R.; SILVA, J. S.; JUNIOR, A. Stromal cell-derived factor-1 production by spleen cells is affected by nitric oxide in protective immunity against blood-stage *Plasmodium chabaudi* CR in C57BL/6j mice. *Immun. Letter*, v. 89, p. 133-142, 2003.

GARTHWAITE, J. Glutamate, nitric oxide and cell-cell signaling in the nervous systems. *Trends in Neuroscien*, v. 14, p. 60-67, 1991.

GARTHWAITE, J. Neuronal nitric-oxide signaling. *Trends in Neuroscien*, v. 18, p. 51-52, 1995.

GONZALEZ, A.; GREGORI, W.; VELEZ, D.; RESTREPO, A.; CANO, L. E. Nitric Oxide Participation in the Fungicidal Mechanism of Gamma Interferon-Activated Murine Macrophages against *Paracoccidioides brasiliensis* Conidia. *Infect. Immun.*, 68:2546-2552, 2000.

HIBBS JR, J. B.; TAINTOR, R. R.; VAVRIN, Z.; RACHLIN, E. M. Nitric oxide: A cytotoxic activated macrophages effector molecule. *Biochem. and Biophys. Res. Commun*, v. 157, p. 87-94, 1988.

IGNARRO, L. J. Endothelium-derived nitric oxide - actions and properties. *The FASEB journal: Official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, v. 3, p. 31-36, 1989.

KANETSUNA, F.; CARBONELL, L. M. Cell wall glucans of the yeast and mycelial forms of *Paracoccidioides brasiliensis*. *J. Bacteriol.* 101:675-680, 1970.

KARIDI, K.; GAROUFIS, A.; TSIPIS, A.; HADJILIADIS, N.; DEN DULK, H.; REEDIJK, J. Synthesis, characterization, *in vitro* antitumor activity, DNA-binding properties and electronic structure (DFT) of the new complex cis-(Cl,Cl)[Ru<sup>II</sup>Cl<sub>2</sub>(NO<sup>+</sup>)(terpy)]Cl. *Dalton Transactions*, 7:1176, 2005.

- KASHINO, S. S.; FAZIOLI, R. A.; MOSCARDI-BACCHI, M.; FRANCO, M.; SINGER-VERMES, L. M.; BURGER, E.; CALICH, V. L. G. Effect of macrophage blockade on the resistance of inbred mice to *Paracoccidioides brasiliensis* infection. *Mycopathology.*, 130:131-140, 1995.
- LACAZ, C. L. *Paracoccidioides brasiliensis* morphology, Evolutionary cycle, maintenance during saprophytic life, biology, virulence, taxonomy. In: FRANCO, M.; LACAZ, C. S.; RESTREPO-MORENO, A.; DEL NEGRO, G. (Ed.). *Paracoccidioidomycosis*. Flórida: CRC Press Boca Raton, 1994. p. 109-120.
- LANCASTER JR, J. R. The physiological properties of nitric oxide. Determinants of the dynamics of NO in tissue. In: IGNARRO, L. (Ed.). *Nitric oxide*. New York: Academic Press, 2000. P. 209-223.
- LANE, T. E.; WU-HSIEH, B. A.; HOWARD, D. H. Antihistoplasma effect of activated mouse splenic macrophages involves production of reactive nitrogen intermediates. *Infect. Immunol.*, 62:1940-1945, 1994.
- LEE, S. C.; DICKSON, D. W.; BROSNAN, C. F.; CASADEVALL, A. Human astrocytes inhibit *Cryptococcus neoformans* growth by a nitric oxide-mediated mechanism. *J. Exp. Med.*, 180:365-369, 1994.
- LEVERY, S. B.; TOLEDO, M. S.; STRAUS, A. H.; TAKAHASHI, H. K. Structure elucidation of sphingolipids from the mycopathogen *Paracoccidioides brasiliensis*: an immunodominant beta - galactofuranose residue is carried by a novel glycosylinositol phosphorylceramide antigen. *Biochemistry*, 37: 8764-8775, 1998.
- LIEW, F. Y. Interactions between cytokines and nitric oxide. *Adv Neuroimmunol.*, 5: 201-209, 1995.
- LINDE, A.; MOSIERB, D.; BLECHAA, F.; TONATIUH, M. Innate immunity and inflammation – New frontiers in comparative cardiovascular pathology. *Cardiov. Res.*, 73 (1): 26-36, 2006.
- LUDER, C. G. K.; ALGNER, M.; LANG, C.; BLEICHER, N.; GROB, U. Reduced expression of the inducible nitric oxide synthase after infection with *Toxoplasma gondii* facilitates parasite replication in activated murine macrophages. *Inter. J. Parasit.*, v. 33, p. 833-844, 2003.
- LUNARDI, C. N.; CACCIARI, A. L.; SILVA, R. S.; BENDHACK, L. M. Cytosolic calcium concentration is reduced by photolysis of a nitrosyl ruthenium complex in vascular smooth muscle cells. *Nitric Oxide*, 15(3): 252, 2006.
- MADAN, G.; RAO, M. Physiological and clinical importance of nitric oxide. *Indian. J. Med. Sci.*, 50: 318-324, 1996.
- MARQUES, S. A. Paracoccidioidomicose. *An. Bras. Dermatol.*, 73(5):455-69, 1998 [in Portuguese].
- MÁRQUEZ, A. S.; VICENTINI, P.; ONO, M. A.; WATANABE, M. A. E.; CAMARGO, Z. P.; ITANO, E. N. Reactivity of antibodies from patients with acute and chronic

paracoccidioidomycosis to a high-mass molecular antigen from *Paracoccidioides brasiliensis*. *J. Clin. Labor. Anal.*, 19: 199–204, 2005.

MCCLEVERTY, J. A. Reaction of nitric oxide coordinated to transition metals. *Chem. Rev.*, v. 79, p. 53-76, 1979.

MCEWEN, J. G.; GARCIA, A. M.; ORTIZ, B. L.; BOTERO, S.; RESTREPO, A. In search of the natural habitat of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Arch. Med. Res.*, 26(3):305–6, 1995.

MEULEMANS, A. Diffusion coefficients and half-lives of nitric oxide and N-nitroso-L-arginine in rat cortex. *Neurosc. Letters*, v. 171, p. 89-93, 1994.

MISSAL, T. A.; LODGE, J. K.; MCEWEN, J. E. Mechanisms of resistance to oxidative and nitroative stress: implication for fungal survival in mammalian hosts. *Eukaryot. Cell.*, 3:835-846, 2004.

MONCADA, S.; HERMAN, A. G.; VANHOUTTE, P. Endothelium-derived relaxing factor is identified as nitric oxide. *Trends in Pharmac. Scien.*, v. 8, p. 365-368, 1987.

MONCADA, S.; HIGGS, E. A. Endogenous nitric oxide: physiology, pathology and clinical relevance. *Eur. J. Clin. Invest.*, 21:361–374, 1991.

NASCIMENTO, F. R.; CALICH, V. L.; RODRIGUES, D.; RUSSO, M. Dual role for nitric oxide in paracoccidioidomycosis: essential for resistance, but overproduction associated with susceptibility. *J. Immunol.*, 168:4593-4600, 2002.

NATHAN, C. Inducible nitric oxide synthase: what difference does it make? *J. Clin. Invest.*, 100:2417-2423, 1997.

NATHAN, C.; SHILOH, M. U. Reactive oxygen and nitrogen intermediates in the relationship between mammalian hosts and microbial pathogens. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 97:8841-8848, 2000.

NAVARRO, M. T.; LAHMANN, E. J.; CISNEROS-FAJARDO, A.; FUENTES, R. A.; SÁNCHEZ-DELGADO, P.; SILVA, J. A. Toward a Novel Metal-Based Chemotherapy Against Tropical Diseases. Part 5. Synthesis and Characterization of New Ru(II) and Ru(III) Clotrimazole and Ketoconazole Complexes and Evaluation of Their Activity Against *Trypanosoma cruzi* Polyhedron. *J. Med. Chem.*, 19: 2319-2325, 2000.

PACHER, P.; BECKMAN, J. S.; LIAUDET, L. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiol. Rev.*, v. 87, p. 315-424, 2007.

PALMER, R. M. J.; ASHTON, D. S.; MONCANA, S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide. *Nature*, v. 333, p. 664-666, 1988.

PAVANELLI, W. R.; KAMINAMI, M. S.; GERES, J. R.; SANO, A.; ONO, M. O.; CAMARGO, I. C. C.; ITANO, E. N. Protection induced in BALB/c mice by the high-molecular-mass (hMM) fraction of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Mycopathology.*, 163:117–128, 2007.

PAVANELLI, W. R.; SILVA, J. J. N.; PANIS, C.; COSTA, I. C.; MENEZES, M. C. N. D.; OLIVEIRA, F. J. A.; CUNHA, T. M.; CUNHA, F. Q.; CECHINI, R.; WATANABE, M. A. E.; ITANO, E. N. experimental chemotherapy in paracoccidioidomycosis using ruthenium no-donor. *Mycopathology*, 2011.

POPI, A. F.; LOPES, J. D.; MARIANO, M. GP43 from *Paracoccidioides brasiliensis* inhibits macrophage functions. An evasion mechanism of the fungus, *Cell Immunol.*, 218:87-94, 2002.

PUCCIA, R.; SCHENKMAN, S.; GORIN, P. A.; TRAVASSOS, L. R. Exocellular components of *Paracoccidioides brasiliensis*: identification of a specific antigen. *Infect. Immun.* 53(1):199-206, 1986.

RESTREPO, A. The ecology of *P. brasiliensis* a puzzle still unsolved. *Saboraudia*, v. 23, n. 5, p. 323-334, 1985.

RESTREPO, A.; MCEWEN, J. G.; CASTANEDA, E. The habitat of *P. brasiliensis*: how far from solving the riddle? *Med. Mycol.*, v. 39, n. 3, p. 233-241, 2001.

ROCKETT, K. A.; AUBURU, M. M.; ROCKETT, E. J.; CORIDE, W. B.; CLARK, I. Possible role of nitric oxide in malarial immunosuppression. *Parasite Immunol.*, 16:243, 1994.

ROMANI, L. Immunity to fungal infections. *Nat. Rev. Immunol.*, 4:1-23, 2004.

ROSE, E. J.; HOFFMAN, M. Nitric oxide ferrohemes: kinetics of formation and photodissociation quantum yields. *The J. Amer. Chem. Soc.*, v. 105, p. 2866-2873, 1983.

SALERMO, J. C. Nitric oxide of mettaloproteins: an introductory overview. In: LANCASTER JR, J. R. (Ed.). *Nitric oxide: principles and actions*. Boca Raton: Academic Press, 1996, p. 86-110.

SALVATI, L.; MATTU, M.; COLASANTI, M.; SCALONE, A.; VENTURINI, G.; GRADONI, L.; ASCENZI, P. NO donors inhibit *Leishmania infantum* cysteine proteinase activity. *Bioch. et Bioph. Acta*, v. 1545, p. 357-366, 2001.

SAN-BLAS, G.; SAN-BLAS, F. Biochemistry of *P. brasiliensis* dimorphism. In: FRANCO, M. et al. (Ed.). *Paracoccidioidomycosis*, CRC Press, 1993. p. 49-66.

SAN-BLAS, G.; TRAVASSOS, L. R.; FRIES, B. C.; GOLDMAN, D. L.; CASADEVALL, A.; CARMONA, A. K.; BARROS, T. F.; PUCCIA, R.; HOSTETTER, M. K.; SHANKS, S. G.; COPPING, V. M.; KNOX, Y.; GOW, N. A. Fungal morphogenesis and virulence. *Med. Mycol.*, 38 (Supl. 1): 79-86, 2000.

SAN-BLAS, G.; NIÑO-VEJA, G.; ITURRIAGA, T. *Paracoccidioides brasiliensis* and Paracoccidioidomycosis: Molecular approaches to morphogenesis, diagnosis, epidemiology, taxonomy and genetics. *Med Mycol.*, Jun; 40(3): 225-42, 2002.

SANCHEZ-DELGADO, R. A.; NAVARRO, M.; LAZARDI, K.; ATENCIO, R.; CAPPARELLI, M.; VARGAS, F.; URBINA, J. A.; BOUILLEZ, A.; NOELS, A. F.; MAIS, D. Toward a Novel Metal-Based Chemotherapy Against Tropical Diseases. Part 4.

Synthesis and Characterization of New Metal–Clotrimazole Complexes and Evaluation of Their Activity Against *Trypanosoma cruzi*. *Inorg. Chim. Acta*, 528-540, 1998.

SANCHEZ-DELGADO, R. A.; ANZELLOTTI, A. Metal Complexes as Chemotherapeutic Agents Against Tropical Diseases: Trypanosomiasis, Malaria and Leishmaniasis. *Mini. Rev. Med. Chem.*, 4: 23-30, 2004.

SCHLEIFER, K. W.; MANSFIELD, J. M. Suppressor macrophages in African trypanosomiasis inhibit T cell proliferative responses by nitric oxide and prostaglandins. *J. Immunol.*, 151:5492, 1993.

SICHER, S. C.; VAZQUEZ, M. A.; LU, C. Y. Inhibition of macrophage Ia expression by nitric oxide. *J. Immunol.*, 153:1293, 1994.

SILVA, J. J. N.; OSAKABE, A. L.; PAVANELLI, W. R.; SILVA, J. S.; FRANCO, D. W. *In Vitro* and *in Vivo* Antiproliferative and Trypanocidal Activities of Ruthenium NO Donors. *Br. J. Pharmacol.*, 152: 112-121, 2007.

SILVESTRE, M. T.; FERREIRA, M. S.; BORGES, A. S.; ROCHA, A.; SOUZA, G. M.; NISHIOKA, S. A. Monoartrite de joelho como manifestação isolada de paracoccidiodomicose. *Rev. Soc Bras Med Trop.*, 30(5):393–5, 1997 [in Portuguese].

SOARES, A. M. V. C.; PERAÇOLI, M. T. S.; SANTOS, R. R. Correlation among immune response, morphogenesis of granulomatous reaction and spleen lymphoid structure in murine experimental paracoccidiodomycosis. *Med. Mycol.*, 38: 317–377, 2002.

STENBERG, J.; MCGUIGAN, F. Nitric oxide mediates suppression of T cell response in murine *Trypanosoma brucei* infection. *Eur. J. Immunol.* 22:2741, 1992.

TFOUNI, E.; KRIEGER, M.; MCGARVEY, B.; FRANCO, D. W. Structure, Chemical and Photochemical Reactivity and Biological Activity of Some Ruthenium Nitrosyl Complexes. *Coord. Chem. Rev.*, 236: 57-69, 2003.

TOLEDO, M. S.; LEVERY, S. B.; STRAUS, A. H.; SUZUKI, E.; MOMANY, M.; GLUSHKA, J.; MOULTON, J. M.; TAKAHASHI, H. K. Characterization of sphingolipids from mycopathogens: factors correlating with expression of 2-hydroxy fatty acyl (E)- $\Delta^3$ -unsaturation in cerebroside of *Paracoccidioides brasiliensis* and *Aspergillus fumigatus*. *Biochemistry*, 38: 7294-7306, 1999.

TOLEDO, J. C.; SILVA, H. A. S.; SCARPELLINI, M.; MORI, V.; CAMARGO, A. J.; BERTOTI, M. et al. Ruthenium tetraamine as a model of nitric oxide donor compounds. *Eur. J. Inorg., Chem.*, 9: 1879–1885, 2004.

TRIPATHI, P.; TRIPATHI, P.; KASHYAP, L.; VINOD, S. The role of nitric oxide in inflammatory reactions. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, 51:443-452, 2007.

TWIGG, H. L. Macrophages in innate and acquired immunity. *Semin. Respir. Crit. Care Med.*, 25:21-31, 2004.

VESPA, G. N. R.; CUNHA, F. Q.; SILVA, J. S. Nitric oxide is involved in control of *Trypanosoma cruzi*-induced parasitemia and directly kills the parasite *in vitro*. *Infect. and Immun.*, v. 62, p. 5177-5182, 1994.

XIE, Q.; CHO, H. J.; CALAYCAY, J.; MUMFORD, R. A.; SWIDEREK, K. M.; LEE, T. D.; DING, A. T.; TROSO, C. N. Cloning and characterization of inducible nitric oxide synthase from mouse macrophages. *Scien.*, 526:225-228, 1992.

**ARTIGO: Avaliação da Fração de Alta Massa Molecular de *Paracoccidioides Brasiliensis* e do Composto [Ru(Na<sub>2</sub>)Fe(CN<sub>5</sub>)(NO)] na Paracoccidioidomicose Experimental**

**Resumo:** A Paracoccidioidomicose (PCM) é uma doença granulomatosa causada pelo fungo dimórfico *Paracoccidioides brasiliensis*. Vários antígenos são detectados em preparado livre de células (CFA) de *P. brasiliensis* e dentre esses, uma fração de alta massa molecular (hMM) demonstrou efeito protetor parcial na PCM experimental. Recentes estudos vêm demonstrando a utilização de compostos doadores de óxido nítrico acoplados a metais de transição como transportadores de óxido nítrico (NO), sendo úteis no controle de algumas infecções. Assim, o presente estudo investigou a atividade protetora da fração de hMM em associação ou não com um composto doador de NO ([Ru(Na<sub>2</sub>)Fe(CN<sub>5</sub>)(NO)]) e deste composto na PCM experimental. A fração de hMM foi obtida pelo fracionamento do CFA de *P. brasiliensis* em coluna de sephadex G-200 e utilizada na imunização dos camundongos. Os camundongos Balb/c foram divididos em 7 grupos: a) controle; b) Pb (infectado com 1x10<sup>6</sup> leveduras de Pb18); c) hMM (imunizado com 100µg da fração de hMM); d) hMM + Pb (imunizado e infectado); e) [Ru(Na<sub>2</sub>)Fe(CN<sub>5</sub>)(NO)] (tratado com 100µM de [Ru(Na<sub>2</sub>)Fe(CN<sub>5</sub>)(NO)]); f) Pb + [Ru(Na<sub>2</sub>)Fe(CN<sub>5</sub>)(NO)] (infectado e tratado); g) hMM + Pb + [Ru(Na<sub>2</sub>)Fe(CN<sub>5</sub>)(NO)] (imunizado, infectado e tratado). O grau de proteção foi avaliada pela determinação de unidades formadoras de colônias (CFU), pela análise histopatológica do pulmão/fígado, pela resposta imune celular, pelos níveis de IgG anti-fração de hMM e pela dosagem de NO, após 28 dias de infecção. Os resultados obtidos demonstraram ausência de CFU e uma diminuição deste nos grupos imunizados (hMM, hMM + Pb e hMM + Pb + [Ru(Na<sub>2</sub>)Fe(CN<sub>5</sub>)(NO)]) e no grupo Pb + [Ru(Na<sub>2</sub>)Fe(CN<sub>5</sub>)(NO)], respectivamente, em relação ao grupo Pb (p<0.05). Nos cortes histológicos também foi observado ausência no grupo imunizado e uma diminuição do número de células fúngicas no grupo Pb + [Ru(Na<sub>2</sub>)Fe(CN<sub>5</sub>)(NO)]. Coerente com o CFU e o histológico, houve um aumento da resposta celular observado no grupo hMM + Pb em relação ao grupo Pb (p<0.05). Por outro lado, foi reduzida no grupo hMM + Pb + [Ru(Na<sub>2</sub>)Fe(CN<sub>5</sub>)(NO)] (p<0.05). Além disso, os níveis de IgG anti-fração de hMM foram elevados nos grupos hMM + Pb e hMM + Pb + [Ru(Na<sub>2</sub>)Fe(CN<sub>5</sub>)(NO)] em relação aos demais (p<0.05). Os níveis de NO foram significativamente maior no grupo Pb + [Ru(Na<sub>2</sub>)Fe(CN<sub>5</sub>)(NO)] em comparação aqueles somente [Ru(Na<sub>2</sub>)Fe(CN<sub>5</sub>)(NO)] (p<0.05) e deste primeiro em relação ao grupo hMM + Pb + [Ru(Na<sub>2</sub>)Fe(CN<sub>5</sub>)(NO)] (p<0.05). Adicionalmente, foi analisado o efeito da fração de hMM associada ou não com o tratamento [Ru(Na<sub>2</sub>)Fe(CN<sub>5</sub>)(NO)] sobre macrófagos peritoneais murinos. O aumento dos níveis de NO tanto no grupo hMM como no grupo tratado com [Ru(Na<sub>2</sub>)Fe(CN<sub>5</sub>)(NO)] em relação ao grupo controle (somente macrófagos) ou a diminuição dos níveis de NO nos grupos associados com hMM e [Ru(Na<sub>2</sub>)Fe(CN<sub>5</sub>)(NO)], em relação ao simples tratamento (p<0.05) foi detectado. Concluímos que a fração hMM induz proteção com eliminação total de fungos nos principais órgãos e, o tratamento com o [Ru(Na<sub>2</sub>)Fe(CN<sub>5</sub>)(NO)] também induz proteção, porém parcial, nas condições do estudo. Tanto a fração hMM como o composto [Ru(Na<sub>2</sub>)Fe(CN<sub>5</sub>)(NO)] induz aumento de nível sérico de NO na PCM experimental em camundongos e também induz aumento de produção/liberação de NO pelos macrófagos peritoneais murinos, mas diminuição dos níveis por essa

associação. A associação da fração de hMM junto com o composto  $[\text{Ru}(\text{Na}_2)\text{Fe}(\text{CN}_5)(\text{NO})]$  também suprime, parcialmente, a proteção induzida pela hMM, possivelmente induzido pela modulação da resposta imune celular, o qual requer estudos posteriores.

**Palavras-chave:** Hipersensibilidade tardia. Antígeno solúvel. Anticorpos anti-hMM e células fúngicas.

**ARTICLE: Evaluation of High-Molecular-Mass Fraction of *Paracoccidioides Brasiliensis* and Compound  $[\text{Ru}(\text{Na}_2)\text{Fe}(\text{CN}_5)(\text{NO})]$  in Experimental Paracoccidioidomycosis**

**Abstract:** Paracoccidioidomycosis (PCM) is a granulomatous disease caused by the dimorphic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. Several antigens are detected in cell-free preparation (CFA) of *P. brasiliensis*, among these a fraction of high-molecular-mass (hMM) showed partial protective effect in experimental PCM. Recent studies have demonstrated the use of nitric oxide donor compounds bound to transition metals as carriers of nitric oxide (NO) are useful in controlling some infections. Thus, this study investigated the protective activity of the hMM fraction in combination or not with NO donor compound ( $[\text{Ru}(\text{Na}_2)\text{Fe}(\text{CN}_5)(\text{NO})]$ ) and this compound in experimental PCM. The fraction of hMM was obtained by *P. brasiliensis* CFA fractionation in sephadex G-200 column and used for mice immunization. The Balb/c mice were divided into seven groups: a) control; b) Pb ( $1 \times 10^6$  infected with Pb18 yeast); c) hMM (immunized with 100 $\mu\text{g}$  the fraction of hMM); d) hMM + Pb (immunized and infected); e)  $[\text{Ru}(\text{Na}_2)\text{Fe}(\text{CN}_5)(\text{NO})]$  (treated with 100 $\mu\text{M}$   $[\text{Ru}(\text{Na}_2)\text{Fe}(\text{CN}_5)(\text{NO})]$ ); f) Pb +  $[\text{Ru}(\text{Na}_2)\text{Fe}(\text{CN}_5)(\text{NO})]$  (infected and treated); g) hMM + Pb +  $[\text{Ru}(\text{Na}_2)\text{Fe}(\text{CN}_5)(\text{NO})]$  (immunized, infected and treated). The degree of protection was assessed by determination of colony forming units (CFU), histopathology of lung/liver, the cellular immune response, the levels of IgG fraction of hMM and by measuring levels of NO after 28 days of infection. The results showed absence of CFU and a decrease in the group immunized (hMM, hMM + Pb and hMM + Pb +  $[\text{Ru}(\text{Na}_2)\text{Fe}(\text{CN}_5)(\text{NO})]$ ) and in Pb +  $[\text{Ru}(\text{Na}_2)\text{Fe}(\text{CN}_5)(\text{NO})]$ , respectively, compared to Pb group ( $p < 0.05$ ). In histological sections it was also observed absence in immunized groups and a decreased fungal cells number in the group Pb +  $[\text{Ru}(\text{Na}_2)\text{Fe}(\text{CN}_5)(\text{NO})]$ . Consistent with the CFU and the histology, there was an increased in the cellular response observed in hMM + Pb group relative to Pb group ( $p < 0.05$ ). But by other side, was reduced in group hMM + Pb +  $[\text{Ru}(\text{Na}_2)\text{Fe}(\text{CN}_5)(\text{NO})]$  ( $p < 0.05$ ). Moreover, IgG anti-hMM fraction levels were higher in groups hMM + Pb +  $[\text{Ru}(\text{Na}_2)\text{Fe}(\text{CN}_5)(\text{NO})]$  and hMM + Pb compared to the others ( $p < 0.05$ ). NO levels were higher in Pb +  $[\text{Ru}(\text{Na}_2)\text{Fe}(\text{CN}_5)(\text{NO})]$  compared to  $[\text{Ru}(\text{Na}_2)\text{Fe}(\text{CN}_5)(\text{NO})]$  group ( $p < 0.05$ ) and this first group compared to hMM + Pb +  $[\text{Ru}(\text{Na}_2)\text{Fe}(\text{CN}_5)(\text{NO})]$  ( $p < 0.05$ ). Additionally, we analyzed the effect of the hMM fraction associated or not with NPS-Ru treatment on murine peritoneal macrophages. Increased NO levels in the hMM as the  $[\text{Ru}(\text{Na}_2)\text{Fe}(\text{CN}_5)(\text{NO})]$  treated groups in relation to control group (only macrophages) or decreased NO level in hMM and  $[\text{Ru}(\text{Na}_2)\text{Fe}(\text{CN}_5)(\text{NO})]$  associated groups, in relation to single treatment ( $p < 0.05$ ) were detected. We conclude that the fraction of hMM induces protection with complete elimination of fungi in the main organs and the treatment with

[Ru(Na<sub>2</sub>)Fe(CN<sub>5</sub>)(NO)] also induces protection, but partial, in the conditions of the study. Both the fraction of hMM as compound [Ru(Na<sub>2</sub>)Fe(CN<sub>5</sub>)(NO)] induces increased serum levels of NO in experimental PCM in mice and also induces increased production/release of NO by murine peritoneal macrophages, but decreased level by its association. The association of hMM fraction together with the [Ru(Na<sub>2</sub>)Fe(CN<sub>5</sub>)(NO)] compound also partially suppressed the protection induced by hMM, possibly induced by modulation of cellular immune response, that require further study.

**Keywords:** Delayed hypersensitivity. Soluble antigen. Antibodies anti-hMM and fungal cells.

#### 4 INTRODUÇÃO

A Paracoccidioidomicose (PCM) é uma doença granulomatosa, sistêmica e de evolução crônica causada pelo fungo dimórfico *Paracoccidioides brasiliensis* descrito inicialmente por Adolfo Lutz, em 1908. É uma doença endêmica na América Latina onde cerca de 10 milhões de pessoas estão infectadas e 2% delas, podendo vir a desenvolver a doença (MCEWEN et al., 1995; ALMEIDA et al., 2003).

A infecção por *P. brasiliensis* provavelmente ocorre pela inalação de propágulos infectantes e para o desenvolvimento da doença, é imprescindível que os conídios alojados nos alvéolos pulmonares passem para a forma de levedura. A mudança da fase infectante para a fase patogênica depende do aumento de temperatura. Após inalação do fungo nos pulmões, ocorre a formação de lesões que podem: (i) regredir com a destruição do fungo, (ii) regredir com fungos latentes ou quiescentes podendo desenvolver PCM ativa posteriormente, ou (iii) progredir com o desenvolvimento dos sinais e sintomas da PCM (LACAZ, 1994). A doença é caracterizada por inflamação granulomatosa, supressão da imunidade celular e altos títulos de anticorpos (DIXON et al., 1998).

Um componente que tem sido estudado na infecção causada por *P. brasiliensis* é um antígeno de alta massa molecular (hMM) produzido pela forma de levedura do fungo. Márquez et al. (2005), observaram que o peso molecular desse componente é de, aproximadamente, 386kDa e segundo Pavanelli et al. (2007), o mesmo apresenta efeito protetor, o qual foi evidenciado pelo menor nível de antígenos solúveis em soros de camundongos Balb/c imunizados com a fração de hMM, e comprovado pelo menor número de fungos viáveis em pulmão e fígado, observados pela análise de CFU.

Estudos anteriores demonstraram que macrófagos peritoneais murinos ativados com IFN- $\gamma$ , exercem um efeito fungicida contra as formas de levedura e de conídios do *P. brasiliensis* (CANO et al., 1992; BRUMMER, 1994; CANO et al., 1994). Além disso, foi evidenciado que a principal atividade microbicida dos macrófagos relaciona-se com a produção de óxido nítrico (NO) e seus metabólicos, chamados coletivamente de intermediários reativos de nitrogênio (RIN), como o peroxinitrito, que subsequente, decompõe-se em moléculas adicionais também altamente reativas (BOGDAN et al., 2000; MISSAL et al., 2004).

Alguns autores têm relatado que a produção enzimática de NO é, provavelmente, a principal forma de defesa do sistema imunológico do hospedeiro para controlar as infecções causadas por parasitas, tais como *Trypanosoma cruzi* (VESPA et al., 2004), *Toxoplasma gondii* (LUDER et al., 2003), *Plasmodium chabaudi* (GARNICA et al., 2003) e *Leishmania infantum* (SALVATI et al., 2001). O aumento da concentração de NO também é observado durante as infecções causadas por vírus e bactérias como é o caso de *Herpes Simplex Vírus* (FUJI et al., 1999) e da Tuberculose (COOPER et al., 2002).

Recentes pesquisas sobre a fisiopatologia do NO estimularam interesse em sua química e bioquímica, embora estudos estivessem limitados devido, principalmente, a seu curto tempo de meia-vida. Uma dificuldade em entender alguns aspectos da biologia do NO está relacionada à ausência de agentes doadores de NO que possam produzi-lo por estimulação externa, que poderia ser superada desenvolvendo novos agentes doadores de NO, como os complexos nitrosilos metálicos (LUNARDI et al., 2006).

Muitos trabalhos têm apresentado estratégias para a liberação controlada de NO de uma ampla variedade de complexos nitrosilo envolvendo alguns metais, principalmente o rutênio. Doadores de NO complexados com rutênio como o *trans*-[Ru<sup>II</sup>(NO<sup>+</sup>)(NH<sub>3</sub>)<sub>4</sub>L]<sup>3+</sup> e [Ru<sup>II</sup>(NO<sup>+</sup>)(Hedta)], são bons modelos para avaliar a atividade tripanocida *in vitro* e *in vivo* devido a baixa toxicidade, solubilidade em água e a estabilidade em meio aquoso na presença de oxigênio, apresentado por eles (TOLEDO et al., 2004). Além disso, complexos Ru-NO como *cis*-(Cl,Cl)-[Ru<sup>II</sup>Cl<sub>2</sub>(NO<sup>+</sup>)(terpy)]Cl, tem sido investigado como potencial agente antitumoral, uma vez que se a liberação do NO puder ser introduzida dentro das células tumorais, a morte celular pode ocorrer (KARIDI et al., 2005).

De fato, alguns estudos demonstram que os complexos de rutênio,  $\text{Ru}(\text{Ctz})_2(\text{H}_2\text{O})_2(\text{PF}_6)_2$  e  $[\text{Ru}(\text{Ktz})_2(\text{H}_2\text{O})\text{Cl}_3]$ , agindo em sinergismo com drogas antifúngicas têm se mostrado mais ativos que os correspondentes ligantes livres (SANCHEZ-DELGADO et al., 1998; NAVARRO et al., 2000). Ainda assim, estudo anterior, demonstrou que complexos de rutênio são capazes de inibir 70% da proliferação das formas epimastigotas de *T. cruzi* (SANCHEZ-DELGADO et al., 2004). Seguindo esta linha, o  $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_4\text{L}]^{n+}$  foi testado com sucesso como transportador de NO *in vitro* e *in vivo* (TFOUNI et al., 2003; SILVA et al., 2007), e a produção de NO tem sido atribuída como responsável pelo efeito tripanocida de macrófagos ativados (TFOUNI et al., 2003). Além disso, Pavanelli et al. (2011), demonstraram que camundongos infectados com *P. brasiliensis* foram mais resistentes a infecção e apresentaram uma maior sobrevivência destes quando tratados com *cis*- $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{NO})\text{SO}_3](\text{PF}_6)$ .

Assim, as características apresentadas por esses tipos de compostos são bastante promissoras para desenvolvimento de metalofármacos, especialmente para combater doenças infecciosas, onde a concentração de NO tem que ser alta o suficiente para impedir o desenvolvimento de parasitas, mas não tão elevados que cause imunossupressão, inibição dos complexos respiratórios, modificações no DNA ou apoptose das células do hospedeiro (BOGDAN, 2001).

Baseados nos fatos mencionados, consideramos oportuno e relevante o estudo dos efeitos da fração de hMM juntamente com o do NO, para avaliação da patogenicidade do *P. brasiliensis* em modelo de infecção experimental murina, bem como, o efeito desse tratamento sobre a resposta imune do hospedeiro.

## 5 MATERIAL E MÉTODOS

### 5.1 MANUTENÇÃO DO PATÓGENO

O fungo *P. brasiliensis* cepa 18 (Pb18) foi cultivado em meio Saboraund juntamente com BHI (infusão cérebro-coração) à 35°C. O material foi repicado a cada cinco dias.

### 5.2 COMPOSTO DOADOR DE ÓXIDO NÍTRICO

Foi utilizado um composto doador de NO, nitroprussiato de sódio complexado a molécula de rutênio – [Ru(Na<sub>2</sub>)Fe(CN<sub>5</sub>)(NO)], que foi sintetizado e caracterizado por pesquisadores do Departamento de Química e Física Molecular da Universidade de São Paulo-USP/São Carlos e cedido pelo pesquisador responsável Dr. Jean Jerley Nogueira da Silva.

### 5.3 ANIMAIS

Os camundongos fêmeas adultas Balb/c de 6 – 8 semanas (20 a 25g) foram mantidos no Biotério do laboratório de Imunologia do Departamento de Ciências Patológicas, CCB – UEL. Os animais foram mantidos separadamente em gaiolas de tamanho aproximado de 40cm<sup>2</sup> (máximo 6 animais por gaiolas), em salas isoladas, ambiente climatizado com alimentação *ad Libitum*, ração peletizada e esterilizada e iluminação controlada. Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética de Pesquisa Animal da Universidade Estadual de Londrina (CEEA N° 114/09, processo n° 35356/2009).

### 5.4 OBTENÇÃO DE ANTÍGENOS DE *P. BRASILIENSIS*

O antígeno *cell-free* (CFA) de Pb18 foi obtido de acordo com Camargo et al. (1991), modificado pela adição de fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF). Após cultivo, Pb18 foi colocado PBS (tampão fosfato salina) 0,15M e pH 7.4 com o inibidor de protease, PMSF a 1mM (Sigma), e solução de thimerosol a 0,02%.

Homogeinizou-se em vórtex durante 10 minutos e a seguir centrifugado a 10726x g a 4°C por 20 minutos. Uma amostra de sobrenadante foi coletada e a concentração protéica do CFA obtido foi realizada de acordo com Lowry *et al.*, 1951 com algumas modificações. Nas amostras de CFA foram adicionados o reativo cúprico (proteína 1: 10% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> + 0.5M NaOH, proteína 2: 2% Tartarato de sódio e potássio e proteína 3: 2 % CuSO<sub>4</sub> . 5H<sub>2</sub>O) e o reagente de Folin-Ciocalteu. Foram deixadas em banho maria a 50°C por 10 minutos e posteriormente lidas por espectrofotômetro (Spectrum SP-2000 UV) a 660nm. A seguir, o CFA foi aliquoteado e armazenado em freezer - 80°C até o momento do uso.

## 5.5 CROMATOGRAFIA EM COLUNA DE SEPHADEX G-200

Cerca de 4mL a 6mL das amostras de CFA foram aplicados em coluna de sephadex G-200 seguida de eluição em PBS 0,15M e pH 7.4. As frações obtidas pelo coletor automático de frações (Analítica, Nova Analítica, São Paulo, SP, Brasil) foram analisadas por espectrofotômetro (Spectrum SP-2000 UV) em comprimento de onda de 280nm. Nesse processo foi obtida a fração de alta massa molecular (hMM – de, aproximadamente, 380kDa) e a concentração protéica foi determinada de acordo com Lowry *et al.* (1951).

## 5.6 WESTERN BLOTTING

As frações obtidas pela cromatografia em coluna de Sephadex G-200 e o padrão de proteína de massa molecular (Bio-Rad 161-0375), foram submetidas à eletroforese em gel de poliácridamida 7,5%. Após eletroforese, foi realizada a transferência das proteínas do gel para a membrana de nitrocelulose, por eletroforese em tampão Tris-HCl-metanol a 23V *overnight* e 1 hora antes do término, a 60V. A membrana foi bloqueada por 1 hora em temperatura ambiente com tampão bloqueio (leite em pó 5%, *tween* 0,5% e PBS) e lavada com tampão lavagem (leite em pó 0,5%, *tween* 0,05% e PBS). Em seguida, fez-se a incubação por 2 horas à 37°C com *pool* de soro de pacientes PCM, previamente selecionados, diluídos 1:40 seguido de lavagens e incubação com conjugado peroxidase de coelho anti-IgG humano (Sigma A-8775 Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) diluído 1:2000 em tampão diluição (leite em pó 0,05% e PBS) e incubadas por 2 horas à 37°C. Após

lavagem, a membrana foi revelada com TMB (Zimed cat. N<sup>o</sup>00-2019 Zimed, S. San Francisco, CA, USA) e o resultado foi analisado com o software LabImage 1D 2006 (Loccus Biotecnologia, São Paulo, SP, Brasil)

## 5.7 PROTOCOLO EXPERIMENTAL

Camundongos fêmeas Balb/c foram divididos em 7 grupos (n=6): a) controle, b) infectados com  $1 \times 10^6$  de leveduras viáveis de Pb18, c) imunizados com 100µg da fração de hMM, d) imunizados e infectados com  $1 \times 10^6$  de leveduras viáveis de Pb18, e) tratados com 100µM de  $[\text{Ru}(\text{Na}_2)\text{Fe}(\text{CN}_5)(\text{NO})]$ , f) infectados e tratados com  $[\text{Ru}(\text{Na}_2)\text{Fe}(\text{CN}_5)(\text{NO})]$  e g) imunizados, infectados e tratados com  $[\text{Ru}(\text{Na}_2)\text{Fe}(\text{CN}_5)(\text{NO})]$ .

### 5.7.1 Imunização dos Animais

Primeiramente, três grupos de camundongos foram imunizados com 100µg da fração de hMM pela via subcutânea (s.c), os quais receberam três doses, sendo a primeira com adjuvante completo de Freund e mais duas doses, com intervalos de 15 dias, com adjuvante incompleto de Freund. Os animais não imunizados receberam apenas PBS estéril.

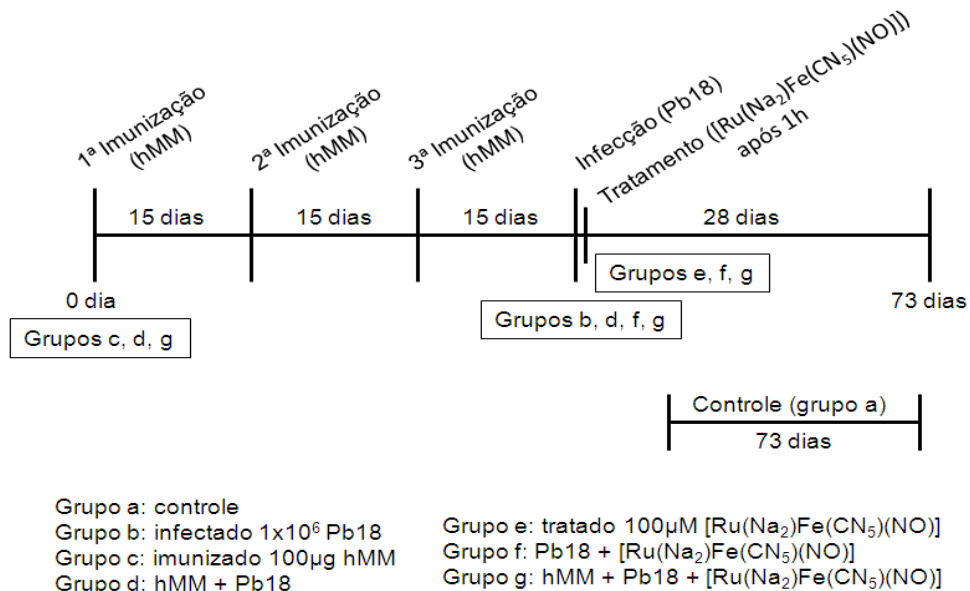
### 5.7.2 Infecção dos Animais

Após 45 dias da imunização, quatro grupos de camundongos foram infectados com 100µL contendo  $1 \times 10^6$  de leveduras viáveis de Pb18 por via endovenosa (e.v). Os animais não infectados receberam apenas PBS estéril.

### 5.7.3 Tratamento dos Animais

Após 1 hora da infecção, três grupos de camundongos foram tratados com 100µL  $[\text{Ru}(\text{Na}_2)\text{Fe}(\text{CN}_5)(\text{NO})]$ , na concentração de 100µM, pela via intraperitoneal (i.p), diariamente, por 28 dias. Foram utilizados camundongos tratados com PBS como controle.

Após 28 dias de infecção e tratamento, os camundongos foram eutanasiados, o soro e os órgãos (pulmão e fígado) foram devidamente coletados e armazenados para as análises dos níveis de anticorpos solúveis no soro, dosagem de NO, das CFU, além da análise histopatológica.



## 5.8 UNIDADES FORMADORAS DE COLÔNIAS (CFU)

Após terem sido eutanasiados, o pulmão direito e parte do fígado de cada camundongo foram retirados, macerados e homogeneizados em PBS estéril (0,2g de órgão/mL). Em seguida,  $50 \mu\text{L}$  do homogenato foram submetidos à determinação do CFU, sendo que cada amostra foi distribuída em placas de Petri com meio de isolamento para *P. brasiliensis* (Ágar BHI enriquecido com 4% de soro bovino fetal, gamicina e 5% de filtrado de cultura de Pb18). As placas foram incubadas em estufa de  $37^\circ\text{C}$  por 15 dias. Ao término do período de incubação, o número de CFU de *P. brasiliensis* foi contado visualmente.

## 5.9 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA DOS ÓRGÃOS

Para avaliação histopatológica, o pulmão esquerdo e parte do fígado, foram removidos dos animais dos diferentes grupos e fixados em solução de formalina tamponada ( $0,05\text{M}$   $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ,  $0,05\text{M}$   $\text{Na}_2\text{PO}_4$ , água destilada e 10% de

formol 37%, pH 7.0). Após fixação por 24 horas, foram submetidos a procedimentos rotineiros para inclusão em parafina e cortes de 5µm de espessura (semi-seriados), os quais foram corados pela Hematoxilina-Eosina (HE) para as análises estruturais e da resposta inflamatória e analisadas, posteriormente, em microscópio óptico. Foram observadas as lâminas, de todos os camundongos utilizados no experimento, em sua área total.

#### 5.10 REAÇÃO DE HIPERSENSIBILIDADE TARDIA (DTH)

Para determinar a DTH, 24 horas antes de serem sacrificados, os camundongos receberam uma inoculação subcutânea com 50µL na concentração de 7,5µg da fração de hMM no coxim da pata traseira esquerda. Como controle, foi inoculado PBS estéril na pata traseira direita. A extensão do infiltrado inflamatório foi avaliado através da medida da pata utilizando paquímetro (Mitotoyo, draper 0-25mm Micrometer, Tokyo, Japan) e a área relativa do aumento da pata foi calculada pela fórmula  $A = \pi \cdot d^2 / 4$  (onde A= área de um círculo plano;  $\pi = 3,14$ ; d= medida obtida no paquímetro) e avaliada comparando-se com o controle.

#### 5.11 ELISA PARA DETECÇÃO DE IGG ANTI-HMM

Placas de 96 orifícios foram sensibilizadas com 25µg/mL da fração de hMM (100µL/orifícios), diluídas em tampão carbonato-bicarbonato e incubadas por 1 hora à 37°C e depois *overhight* a 4°C. Após esse período, as placas foram lavadas 4 vezes em tampão de lavagem (leite em pó 0,5%, *tween* 0,05% e PBS), bloqueadas por 1 hora em tampão bloqueio (leite em pó 5%, *tween* 0,5% e PBS) à temperatura ambiente. Após 4 novas lavagens, as amostras de soro foram distribuídas em duplicatas (100µL/mL), diluídas 1:10 em tampão de diluição (leite em pó 0,05% e PBS) e incubadas por 2 horas à 37°C.

Após 4 novas lavagens, foram adicionado 100µL/orifício de conjugado peroxidase anti-IgG de camundongo (Sigma A-8924 Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA), diluído em tampão de diluição a 1:4000 e, em seguida, novamente incubadas por 1 hora e 30 minutos à 37°C. As placas foram lavadas novamente com tampão de lavagem e adicionado 100µL de solução reveladora

(tampão citrato, OPD e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). A reação foi interrompida cerca de 15 minutos com 50µL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 4N seguida de leitura em Multiskan EX (Uniscience – Labsystems, Helsinki, Filand) a 492nm.

#### 5.12 EFEITO DA FRAÇÃO DE HMM E DO [Ru(Na<sub>2</sub>)Fe(CN<sub>5</sub>)(NO)] NA PRODUÇÃO DE NO PELOS MACRÓFAGOS PERITONIAIS MURINOS

Seis camundongos Balb/c foram anestesiados com éter etílico e administrado na cavidade peritoneal, 3mL de meio de cultura de células RPMI-1640 incompleto (Sigma). Após massagem leve local, durante 10 minutos, os camundongos foram sacrificados via analgesia inalatória seguida por deslocamento cervical. As células obtidas da cavidade peritoneal foram depositadas em placas de Petri e incubadas por 1 hora a 37°C, seguidas de três lavagens consecutivas com RPMI-1640 pré-aquecido a 37°C. As células aderentes foram tratadas com solução de EDTA 0,05%, coletadas, lavadas via centrifugação a 3000 rpm por 5 minutos, ressuspendidas em meio RPMI-1640 completo (suplementado com 10% de soro bovino fetal) gelado, e contadas em câmara de Neubauer.

As células obtidas no procedimento anterior, foram depositadas sobre lamínulas estéreis presente nos orifícios das microplacas (24 wells) (1x10<sup>6</sup> células) e, em seguida, incubadas à 37°C em atmosfera de ar umidificada contendo 5% de CO<sub>2</sub> na presença de 5µg, 15µg e 45µg da fração de hMM e diferentes concentrações de [Ru(Na<sub>2</sub>)Fe(CN<sub>5</sub>)(NO)] (5µM, 15µM e 45µM), separadamente, por 24 horas. Após este período, foi adicionado o fungo (1x10<sup>6</sup> leveduras viáveis de Pb 18) e as diferentes concentrações da droga em associação com as diferentes concentrações de hMM e incubadas, novamente, por 24 horas. Todas as amostras foram feitas em triplicata e os níveis de NO do sobrenadante foram detectadas conforme item 5.15.

#### 5.13 DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE ÓXIDO NÍTRICO

A produção de NO foi quantificada pelo acúmulo de nitrito presentes nos sobrenadantes das amostras, de acordo com Panis et al. (2010) com algumas modificações. Previamente, os sobrenadantes e os soros dos experimentos *in vitro* e *in vivo*, respectivamente, foram desproteinizadas pela adição de 50µL de ZnSO<sub>4</sub> a

75mM e 70µL de NaOH, agitadas e centrifugadas a 8939x g à 25°C por 5 minutos. Foram coletados os sobrenadantes das amostras e diluídas em tampão glicina (45g/L pH 9.7) durante 5 minutos. Os grânulos de cádmio foram lavados em água destilada estéril e adicionado a uma solução de CuSO<sub>4</sub> a 5mM em tampão glicina-NaOH (15g/L pH 9.7) durante 5 minutos. Os grânulos acoplados com cobre ativados foram adicionados ao sobrenadante diluído em tampão glicina e agitado por 10 minutos. Alíquotas de 200µL foram colocadas em tubos apropriados para determinação de nitrito e, adicionados a ele, o mesmo volume de reagente de Griess. Após 10 minutos de incubação em temperatura ambiente, os tubos foram centrifugados a 8939x g à 25°C por 2 minutos e colocados em microplacas de 96 poços, em triplicata. A concentração de nitrito foi determinada em referência à curva padrão de 7,8µM a 250µM de NaNO<sub>2</sub> e a absorbância foi determinada pela leitura da microplaca em 550nm.

A porcentagem de inibição da produção de NO foi determinada pela fórmula:  $100 - ([\text{média da produção de NO}/\text{controle positivo}] \times 100)$ .

#### 5.14 ANÁLISE ESTATÍSTICA

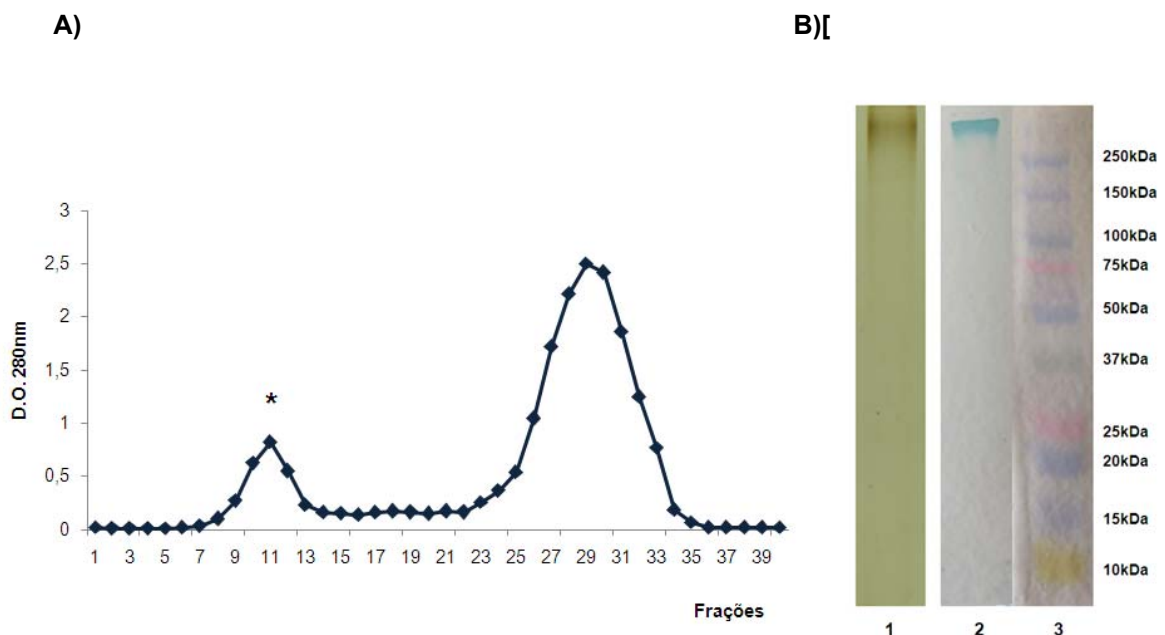
Foi realizada análise de variância (ANOVA) pelo teste de Tukey-Kramer utilizando o programa Graphpad Prism 4.0. Os valores foram descritos pela média ± desvio padrão, e os resultados, considerados significativos, quando  $p < 0.05$

## 6 RESULTADOS

### 6.1 PERFIL ESPECTROFOTOMÉTRICO DA FRAÇÃO DE CFA E *WESTERN BLOTTING*

As frações de CFA que foram obtidas pelo coletor automático de frações foram analisadas em leitura em espectrofotômetro a 280nm e a fração F11 (\*) foi considerada como a fração de hMM (fig. A). Logo após, foi realizada a eletroforese seguida da transferência em membrana de nitrocelulose para caracterização da fração de hMM (fig. B).

**Figura 1** – Perfil espectrofotométrico a 280nm da fração cromatográfica de CFA em sephadex G-200 e *western blotting*. **A)** As frações obtidas pelo coletor automático de frações foram lidas a 280nm e a fração F11 (\*) foi considerada como a fração de hMM. **B)** A fração F11 foi analisada por *western blotting* utilizando um padrão de peso molecular (MM) (Bio-Rad 161-0375) e revelada com TMB. Sendo 1: F11-SDS-PAGE; 2: F11-WB e 3: MM.



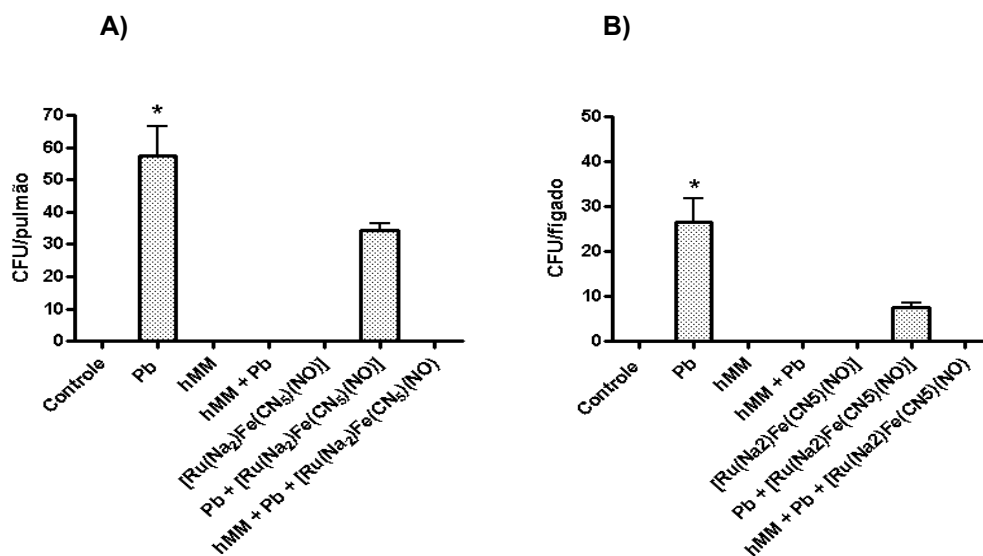
### 6.2 UNIDADE FORMADORA DE COLÔNIAS (CFU)

Os resultados de CFU de pulmão dos camundongos que foram previamente imunizados com a fração de hMM, infectado com Pb18 (hMM + Pb) e

quando tratados com o composto (hMM + Pb + [Ru(Na<sub>2</sub>)Fe(CN<sub>5</sub>)(NO)]), não apresentaram crescimento de fungos (Fig. A) durante os 28 dias de infecção. O mesmo foi observado no CFU de fígado (fig. B).

Quando comparamos o grupo Pb com o grupo Pb + [Ru(Na<sub>2</sub>)Fe(CN<sub>5</sub>)(NO)], podemos observar uma diminuição das colônias formadas, indicando que o composto doador exerceu um efeito benéfico na infecção por *P. brasiliensis* tanto no pulmão como no fígado ( $p < 0.05$ ) (fig. A e B).

**Figura 2** – Determinação quantitativa de CFU de *P. brasiliensis* em pulmão e fígado. Grupos de camundongos Balb/c (n=6): Pb: infectado com  $1 \times 10^6$  leveduras de Pb18; hMM: imunizado com 100 $\mu$ g da fração de hMM; hMM + Pb: Imunizado e infectado com Pb18; [Ru(Na<sub>2</sub>)Fe(CN<sub>5</sub>)(NO)]: tratado com 100 $\mu$ M de [Ru(Na<sub>2</sub>)Fe(CN<sub>5</sub>)(NO)]; Pb + [Ru(Na<sub>2</sub>)Fe(CN<sub>5</sub>)(NO)]: infectado e tratado; hMM + Pb + [Ru(Na<sub>2</sub>)Fe(CN<sub>5</sub>)(NO)]: imunizado, infectado e tratado. **A)** Pulmão: diferença significativa entre o grupo Pb x grupo Pb + [Ru(Na<sub>2</sub>)Fe(CN<sub>5</sub>)(NO)] (\* $p < 0.05$ ). **B)** Fígado: diferença significativa entre o grupo Pb x grupo Pb + [Ru(Na<sub>2</sub>)Fe(CN<sub>5</sub>)(NO)] (\* $p < 0.05$ ).

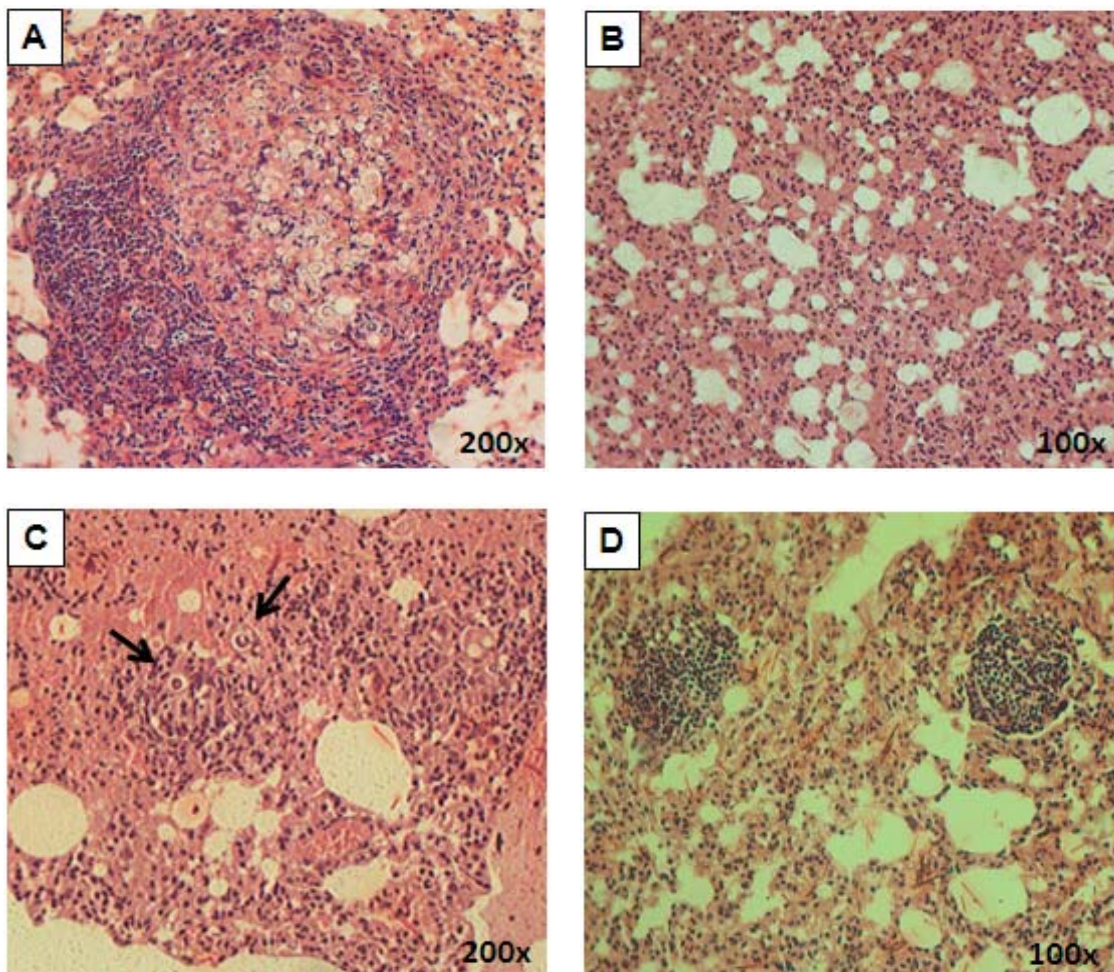


### 6.3 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA DO PULMÃO E FÍGADO

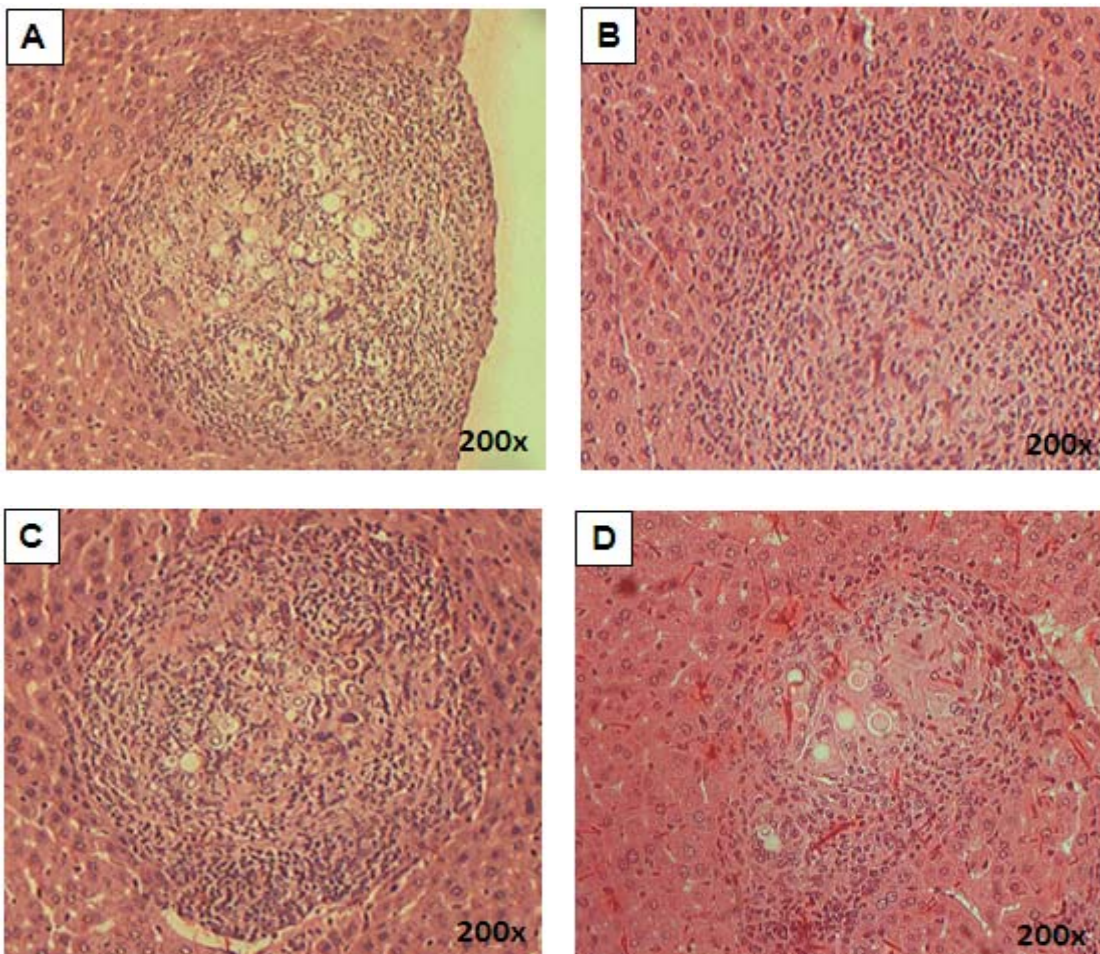
Os camundongos do grupo Pb apresentaram, tanto no pulmão como no fígado, dano focal com granulomas circunscritos e bem definidos, com presença de fungos viáveis em seu interior (fig. 3A e 4A). Já no grupo hMM + Pb, não houve formação de granulomas e sim um grande infiltrado celular em ambos os órgãos (fig. 3B e 4B). No grupo Pb + [Ru(Na<sub>2</sub>)Fe(CN<sub>5</sub>)(NO)], foi observado, no pulmão, um grande

infiltrado celular com a presença de fungos dispersos (setas) (fig. 3C), e no fígado, houve a formação de um número reduzido de granulomas e de fungos em seu interior (fig. 4C). Além disso, no grupo hMM + Pb +  $[\text{Ru}(\text{Na}_2)\text{Fe}(\text{CN}_5)(\text{NO})]$ , foi demonstrado, no pulmão, infiltrado celular com formação de pequenos granulomas sem observação de fungos no tecido (fig. 3D). Já no fígado, houve a formação de um número reduzido de granulomas e de fungos em seu interior (fig. 4D) (tabela1).

**Figura 3** – Avaliação histopatológica do pulmão em camundongos Balb/c infectados com *P. brasiliensis*. **A)** Grupo Pb (infectado com  $1 \times 10^6$  leveduras de Pb18) mostrando granuloma confluyente com muitas células de leveduras viáveis (200x); **B)** Grupo hMM + Pb (imunizado com  $100 \mu\text{g}$  da fração de hMM e infectado com Pb18) mostrando um grande infiltrado celular (100x); **C)** Grupo Pb +  $[\text{Ru}(\text{Na}_2)\text{Fe}(\text{CN}_5)(\text{NO})]$  (infectado e tratado com  $100 \mu\text{M}$   $[\text{Ru}(\text{Na}_2)\text{Fe}(\text{CN}_5)(\text{NO})]$ ) mostrando um grande infiltrado celular com presença de fungos dispersos (setas) (200x) e **D)** Grupo hMM + Pb +  $[\text{Ru}(\text{Na}_2)\text{Fe}(\text{CN}_5)(\text{NO})]$  (imunizado, infectado e tratado) mostrando infiltrado celular com pequenos granulomas sem a presença de fungos (100x).



**Figura 4** – Avaliação histopatológica do fígado em camundongos Balb/c infectados com *P. brasiliensis*. **A)** Grupo Pb (infectado com  $1 \times 10^6$  leveduras de Pb18) mostrando granuloma confluyente com muitas células de leveduras viáveis (200x); **B)** Grupo hMM + Pb (imunizado com  $100 \mu\text{g}$  da fração de hMM e infectado com Pb18) mostrando um grande infiltrado celular (200x); **C)** Grupo Pb +  $[\text{Ru}(\text{Na}_2)\text{Fe}(\text{CN}_5)(\text{NO})]$  (infectado e tratado com  $100 \mu\text{M}$   $[\text{Ru}(\text{Na}_2)\text{Fe}(\text{CN}_5)(\text{NO})]$ ) mostrando a presença de granulomas com número reduzido de fungos em seu interior (200x) e **D)** Grupo hMM + Pb +  $[\text{Ru}(\text{Na}_2)\text{Fe}(\text{CN}_5)(\text{NO})]$  (imunizado, infectado e tratado) mostrando a presença de granulomas com número reduzido de fungos em seu interior (200x).



**Tabela 1** – Quantificação de granulomas e de células fúngicas presentes nos cortes histológicos de pulmão e fígado de camundongos tratados ou não com hMM e/ou [Ru(Na<sub>2</sub>)Fe(CN<sub>5</sub>)(NO)] e infectados com *P. brasiliensis*.

Média do número de granulomas em pulmão e fígado

Grupos	Nº de granulomas	
	Pulmão	Fígado
Pb	2,40 ± 0,245	22,00 ± 1,817
hMM + Pb	0	0
Pb + [Ru(Na <sub>2</sub> )Fe(CN <sub>5</sub> )(NO)]	0	15,8 ± 2,311*
hMM + Pb + [Ru(Na <sub>2</sub> )Fe(CN <sub>5</sub> )(NO)]	1,20 ± 0,490	2,21 ± 0,374*

Média do número de células fúngicas em granulomas de pulmão e fígado

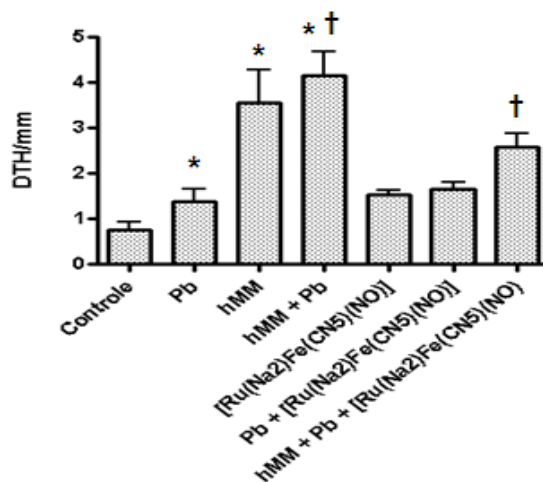
Grupos	Nº de células fúngicas	
	Pulmão	Fígado
Pb	54,6 ± 2,768	35,6 ± 3,234
hMM + Pb	0	0
Pb + [Ru(Na <sub>2</sub> )Fe(CN <sub>5</sub> )(NO)]	32,4 ± 4,214**	25,3 ± 1,985***
hMM + Pb + [Ru(Na <sub>2</sub> )Fe(CN <sub>5</sub> )(NO)]	0	13,4 ± 4,974**

**Representações da média do número de granulomas e de células fúngicas presentes nos granulomas de camundongos infectados com *P. brasiliensis*.** Grupos de camundongos (n=6): Pb: infectado com 1x10<sup>6</sup> leveduras de Pb18; hMM + Pb: Imunizado com 100µg da fração de hMM e infectado com Pb18; Pb + [Ru(Na<sub>2</sub>)Fe(CN<sub>5</sub>)(NO)]: infectado e tratado com 100µM [Ru(Na<sub>2</sub>)Fe(CN<sub>5</sub>)(NO)]; hMM + Pb + [Ru(Na<sub>2</sub>)Fe(CN<sub>5</sub>)(NO)]: imunizado, infectado e tratado. Os valores foram calculados comparando a média de granulomas nos grupo Pb x hMM + Pb + [Ru(Na<sub>2</sub>)Fe(CN<sub>5</sub>)(NO)] (\*p<0.001) e Pb + [Ru(Na<sub>2</sub>)Fe(CN<sub>5</sub>)(NO)] x hMM + Pb + [Ru(Na<sub>2</sub>)Fe(CN<sub>5</sub>)(NO)] (\*p<0.001) presentes no fígado e quanto a média de células fúngicas, no pulmão, nos grupos Pb x Pb + [Ru(Na<sub>2</sub>)Fe(CN<sub>5</sub>)(NO)] (\*\*p<0.01) e nos grupos Pb x Pb + [Ru(Na<sub>2</sub>)Fe(CN<sub>5</sub>)(NO)] (\*\*p<0.05) e Pb x hMM + Pb + [Ru(Na<sub>2</sub>)Fe(CN<sub>5</sub>)(NO)] presentes no fígado (\*\*p<0.05). Não houve diferença na média dos granulomas entre os grupos Pb x hMM + Pb + [Ru(Na<sub>2</sub>)Fe(CN<sub>5</sub>)(NO)] (p>0.05) presentes no pulmão e entre Pb x Pb + [Ru(Na<sub>2</sub>)Fe(CN<sub>5</sub>)(NO)] presentes no fígado (p>0.05). Na média de células fúngicas Pb + [Ru(Na<sub>2</sub>)Fe(CN<sub>5</sub>)(NO)] x hMM + Pb + [Ru(Na<sub>2</sub>)Fe(CN<sub>5</sub>)(NO)] (p>0.05) presentes no fígado.

#### 6.4 REAÇÃO DE HIPERSENSIBILIDADE TARDIA (DTH)

Os resultados da reação de hipersensibilidade tardia, demonstraram aumento da resposta inflamatória em mm sendo significativo ( $p < 0.05$ ) nos grupos hMM, hMM + Pb,  $[\text{Ru}(\text{Na}_2)\text{Fe}(\text{CN}_5)(\text{NO})]$ , Pb +  $[\text{Ru}(\text{Na}_2)\text{Fe}(\text{CN}_5)(\text{NO})]$  e hMM + Pb +  $[\text{Ru}(\text{Na}_2)\text{Fe}(\text{CN}_5)(\text{NO})]$  em relação ao grupo controle. Além disso, houve aumento na resposta entre os grupos hMM e hMM + Pb quando comparado com o grupo Pb ( $*p < 0.05$ ) e entre hMM + Pb em relação ao grupo hMM + Pb +  $[\text{Ru}(\text{Na}_2)\text{Fe}(\text{CN}_5)(\text{NO})]$  ( $^\dagger p < 0.05$ ). Não foi observada diferença nos grupos hMM x hMM + Pb;  $[\text{Ru}(\text{Na}_2)\text{Fe}(\text{CN}_5)(\text{NO})]$  x Pb +  $[\text{Ru}(\text{Na}_2)\text{Fe}(\text{CN}_5)(\text{NO})]$  e Pb +  $[\text{Ru}(\text{Na}_2)\text{Fe}(\text{CN}_5)(\text{NO})]$  x hMM + Pb +  $[\text{Ru}(\text{Na}_2)\text{Fe}(\text{CN}_5)(\text{NO})]$  ( $p > 0.05$ ) (fig. 5).

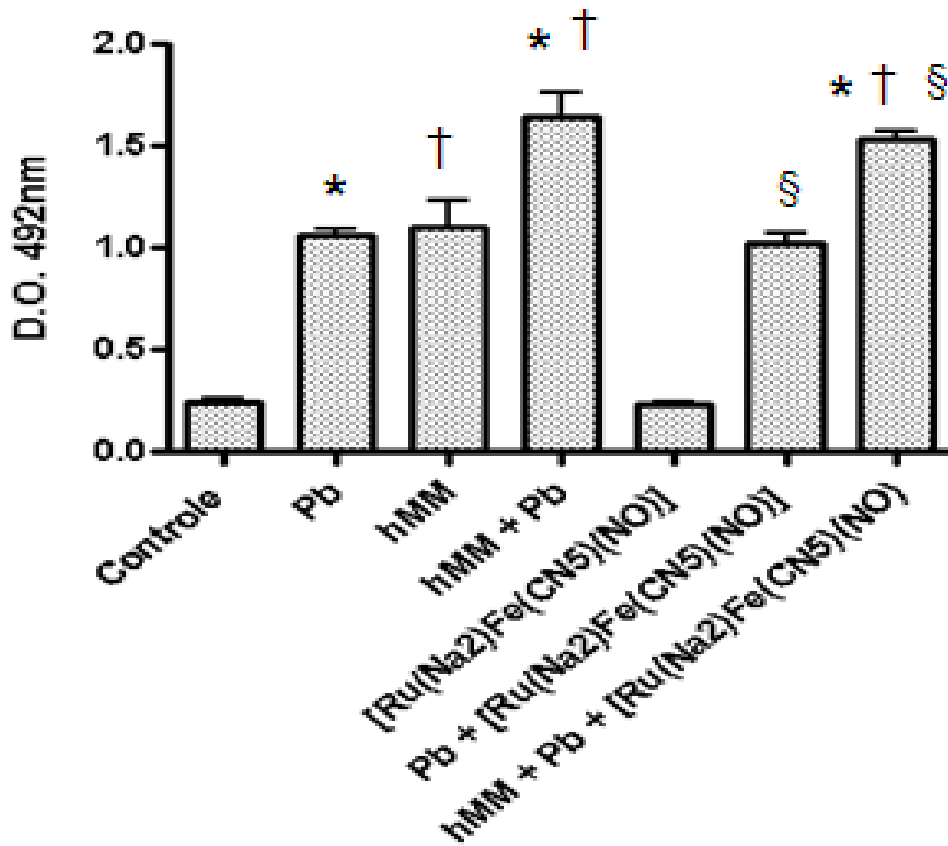
**Figura 5** – Avaliação da resposta imune celular em camundongos Balb/c infectados com *P. brasiliensis*. Resposta em mm, 24 após inoculação s.c. da fração de hMM (7,5 $\mu\text{g}$ ) em grupos de camundongos Balb/c (n=6): Pb: infectado com  $1 \times 10^6$  leveduras de Pb18; hMM: imunizado com 100 $\mu\text{g}$  da fração de hMM; hMM + Pb: Imunizado e infectado com Pb18;  $[\text{Ru}(\text{Na}_2)\text{Fe}(\text{CN}_5)(\text{NO})]$ : tratado com 100 $\mu\text{M}$   $[\text{Ru}(\text{Na}_2)\text{Fe}(\text{CN}_5)(\text{NO})]$ ; Pb +  $[\text{Ru}(\text{Na}_2)\text{Fe}(\text{CN}_5)(\text{NO})]$ : infectado e tratado; hMM + Pb +  $[\text{Ru}(\text{Na}_2)\text{Fe}(\text{CN}_5)(\text{NO})]$ : imunizado, infectado e tratado. Diferença significativa nos grupos hMM, hMM + Pb,  $[\text{Ru}(\text{Na}_2)\text{Fe}(\text{CN}_5)(\text{NO})]$ , Pb +  $[\text{Ru}(\text{Na}_2)\text{Fe}(\text{CN}_5)(\text{NO})]$  e hMM + Pb +  $[\text{Ru}(\text{Na}_2)\text{Fe}(\text{CN}_5)(\text{NO})]$  x controle ( $p < 0.05$ ); hMM e hMM + Pb x Pb ( $*p < 0.05$ ) e hMM + Pb x hMM + Pb +  $[\text{Ru}(\text{Na}_2)\text{Fe}(\text{CN}_5)(\text{NO})]$  ( $^\dagger p < 0.05$ ). Não houve diferença entre hMM x hMM + Pb;  $[\text{Ru}(\text{Na}_2)\text{Fe}(\text{CN}_5)(\text{NO})]$  x Pb +  $[\text{Ru}(\text{Na}_2)\text{Fe}(\text{CN}_5)(\text{NO})]$  e Pb +  $[\text{Ru}(\text{Na}_2)\text{Fe}(\text{CN}_5)(\text{NO})]$  x hMM + Pb +  $[\text{Ru}(\text{Na}_2)\text{Fe}(\text{CN}_5)(\text{NO})]$  ( $p > 0.05$ ).



## 6.5 ELISA PARA DETERMINAÇÃO DO NÍVEL DE IGG ANTI-FRAÇÃO DE HMM

Os resultados de ELISA demonstraram níveis elevados de anticorpos anti-fração hMM expresso em densidade óptica (D.O.) nos grupos: Pb, hMM + Pb, Pb + [Ru(Na<sub>2</sub>)Fe(CN<sub>5</sub>)(NO)] e hMM + Pb + [Ru(Na<sub>2</sub>)Fe(CN<sub>5</sub>)(NO)], após 28 dias de infecção, em relação ao grupo controle ( $p < 0.05$ ) e, como esperado, entre o grupo hMM e controle ( $p < 0.05$ ). Foram observadas também diferenças significativas entre o grupo hMM + Pb e grupo hMM + Pb + [Ru(Na<sub>2</sub>)Fe(CN<sub>5</sub>)(NO)] em relação ao grupo Pb ( $*p < 0.05$ ); destes mesmo grupos em relação ao grupo hMM ( $†p < 0.05$ ) e entre hMM + Pb + [Ru(Na<sub>2</sub>)Fe(CN<sub>5</sub>)(NO)] x Pb + [Ru(Na<sub>2</sub>)Fe(CN<sub>5</sub>)(NO)] ( $§p < 0.05$ ). Não foi observada diferença significativa entre os grupos hMM e Pb + [Ru(Na<sub>2</sub>)Fe(CN<sub>5</sub>)(NO)] x Pb e entre hMM + Pb x hMM + Pb + [Ru(Na<sub>2</sub>)Fe(CN<sub>5</sub>)(NO)] ( $p > 0.05$ ) (fig. 6).

**Figura 6** – Determinação de níveis séricos de IgG anti-hMM de *P. brasiliensis* em camundongos Balb/c. Resultados de ELISA, expressos em D.O. a 492nm, em grupos de camundongos Balb/c (n=6): Pb: infectado com  $1 \times 10^6$  leveduras de Pb18; hMM: imunizado com 100 $\mu$ g da fração de hMM; hMM + Pb: Imunizado e infectado com Pb18; [Ru(Na<sub>2</sub>)Fe(CN<sub>5</sub>)(NO)]: tratado com 100 $\mu$ M [Ru(Na<sub>2</sub>)Fe(CN<sub>5</sub>)(NO)]; Pb + [Ru(Na<sub>2</sub>)Fe(CN<sub>5</sub>)(NO)]: infectado e tratado; hMM + Pb + [Ru(Na<sub>2</sub>)Fe(CN<sub>5</sub>)(NO)]: imunizado, infectado e tratado, após 28 dias de infecção. Diferença significativa nos grupos Pb, hMM, hMM + Pb, Pb + [Ru(Na<sub>2</sub>)Fe(CN<sub>5</sub>)(NO)] e hMM + Pb + [Ru(Na<sub>2</sub>)Fe(CN<sub>5</sub>)(NO)] x o grupo controle ( $p < 0.05$ ). Entre os grupos hMM + Pb e hMM + Pb + [Ru(Na<sub>2</sub>)Fe(CN<sub>5</sub>)(NO)] x o grupo Pb ( $*p < 0.05$ ); hMM + Pb e hMM + Pb + [Ru(Na<sub>2</sub>)Fe(CN<sub>5</sub>)(NO)] x o grupo hMM ( $†p < 0.05$ ) e entre hMM + Pb + [Ru(Na<sub>2</sub>)Fe(CN<sub>5</sub>)(NO)] x Pb + [Ru(Na<sub>2</sub>)Fe(CN<sub>5</sub>)(NO)] ( $§p < 0.05$ ). Não houve diferença entre hMM e Pb + [Ru(Na<sub>2</sub>)Fe(CN<sub>5</sub>)(NO)] x Pb e entre hMM + Pb x hMM + Pb + [Ru(Na<sub>2</sub>)Fe(CN<sub>5</sub>)(NO)] ( $p > 0.05$ ).

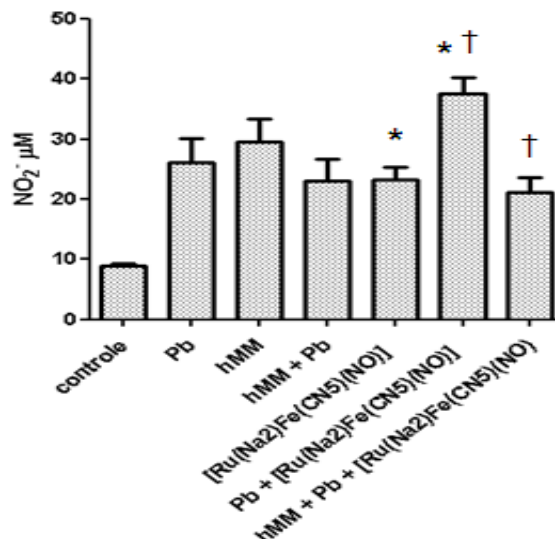


## 6.6 NÍVEIS DE ÓXIDO NÍTRICO *IN VITRO* E *IN VIVO*

### 6.6.1 Níveis Séricos de Óxido Nítrico em Camundongos Balb/c

Os resultados obtidos pela dosagem sérica de NO após 28 dias de infecção, demonstraram aumento nos níveis de NO nos grupos: Pb, hMM, hMM + Pb, [Ru(Na<sub>2</sub>)Fe(CN<sub>5</sub>)(NO)], Pb + [Ru(Na<sub>2</sub>)Fe(CN<sub>5</sub>)(NO)] e hMM + Pb + [Ru(Na<sub>2</sub>)Fe(CN<sub>5</sub>)(NO)] x controle ( $p < 0.05$ ); Pb + [Ru(Na<sub>2</sub>)Fe(CN<sub>5</sub>)(NO)] x [Ru(Na<sub>2</sub>)Fe(CN<sub>5</sub>)(NO)] ( $*p < 0.05$ ) e Pb + [Ru(Na<sub>2</sub>)Fe(CN<sub>5</sub>)(NO)] x hMM + Pb + [Ru(Na<sub>2</sub>)Fe(CN<sub>5</sub>)(NO)] ( $†p < 0.05$ ). Não foi observada diferença entre os grupos hMM, hMM + Pb, [Ru(Na<sub>2</sub>)Fe(CN<sub>5</sub>)(NO)], Pb + [Ru(Na<sub>2</sub>)Fe(CN<sub>5</sub>)(NO)] e hMM + Pb + [Ru(Na<sub>2</sub>)Fe(CN<sub>5</sub>)(NO)] x Pb ( $p > 0.05$ ) (fig. 7).

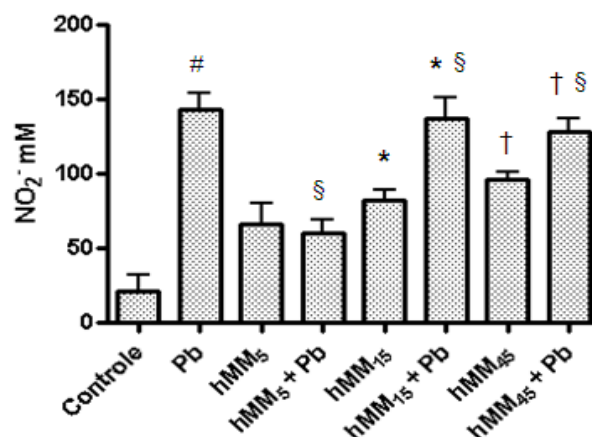
**Figura 7** – Determinação de níveis séricos de NO em camundongos Balb/c infectados com *P. brasiliensis*. Grupos de camundongos Balb/c (n=6): Pb: infectado com  $1 \times 10^6$  leveduras de Pb18; hMM: imunizado com 100µg da fração de hMM; hMM + Pb: Imunizado e infectado com Pb18; [Ru(Na<sub>2</sub>)Fe(CN<sub>5</sub>)(NO)]: tratado com 100µM [Ru(Na<sub>2</sub>)Fe(CN<sub>5</sub>)(NO)]; Pb + [Ru(Na<sub>2</sub>)Fe(CN<sub>5</sub>)(NO)]: infectado e tratado; hMM + Pb + [Ru(Na<sub>2</sub>)Fe(CN<sub>5</sub>)(NO)]: imunizado, infectado e tratado. Diferença significativa entre os grupos Pb, hMM, hMM + Pb, [Ru(Na<sub>2</sub>)Fe(CN<sub>5</sub>)(NO)], Pb + [Ru(Na<sub>2</sub>)Fe(CN<sub>5</sub>)(NO)] e hMM + Pb + [Ru(Na<sub>2</sub>)Fe(CN<sub>5</sub>)(NO)] x grupo controle ( $p < 0.05$ ). Grupo Pb + [Ru(Na<sub>2</sub>)Fe(CN<sub>5</sub>)(NO)] x [Ru(Na<sub>2</sub>)Fe(CN<sub>5</sub>)(NO)] ( $*p < 0.05$ ) e entre Pb + [Ru(Na<sub>2</sub>)Fe(CN<sub>5</sub>)(NO)] x hMM + Pb + [Ru(Na<sub>2</sub>)Fe(CN<sub>5</sub>)(NO)] ( $†p < 0.05$ ). Não houve diferença entre os grupos hMM, hMM + Pb, [Ru(Na<sub>2</sub>)Fe(CN<sub>5</sub>)(NO)], Pb + [Ru(Na<sub>2</sub>)Fe(CN<sub>5</sub>)(NO)] e hMM + Pb + [Ru(Na<sub>2</sub>)Fe(CN<sub>5</sub>)(NO)] x Pb ( $p > 0.05$ ).



### 6.6.2 Níveis de Óxido Nítrico em Sobrenadante de Macrófagos Peritoneais Murinos Sensibilizados com hMM

Os resultados obtidos pela dosagem de NO *in vitro*, após 24 horas de incubação, demonstraram aumento nos níveis de NO nos grupos: Pb, hMM<sub>5</sub>, hMM<sub>5</sub> + Pb, hMM<sub>15</sub>, hMM<sub>15</sub> + Pb, hMM<sub>45</sub>, hMM<sub>45</sub> + Pb x controle ( $p < 0.05$ ); hMM<sub>15</sub> x hMM<sub>15</sub> + Pb ( $*p < 0.05$ ); hMM<sub>45</sub> x hMM<sub>45</sub> + Pb ( $†p < 0.05$ ); hMM<sub>15</sub> + Pb, hMM<sub>45</sub> + Pb x hMM<sub>5</sub> + Pb ( $§p < 0.05$ ); e hMM<sub>5</sub>, hMM<sub>15</sub> e hMM<sub>45</sub> x Pb ( $#p < 0.05$ ). Não foi observada diferença entre os grupos hMM<sub>15</sub> + Pb e hMM<sub>45</sub> + Pb x Pb; hMM<sub>15</sub> e hMM<sub>45</sub> x hMM<sub>5</sub>; e hMM<sub>5</sub> x hMM<sub>5</sub> + Pb ( $p > 0.05$ ) (fig. 8).

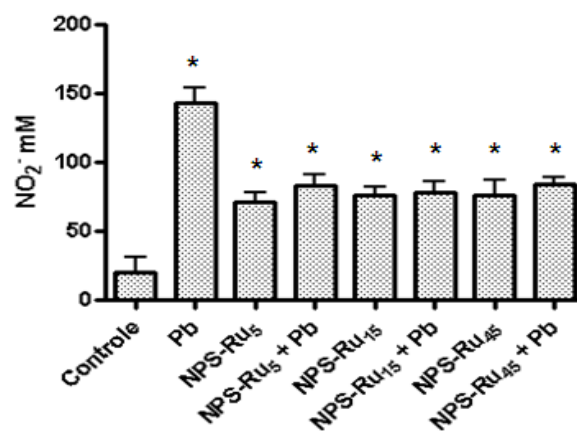
**Figura 8** – Determinação de níveis de NO em sobrenadante de macrófagos peritoneais murinos sensibilizados com a fração de hMM. Resultado de dosagem de NO, expresso em mM, em sobrenadante de macrófagos peritoneais murinos sensibilizados com a fração de hMM nas três diferentes concentrações de hMM (5µg: hMM<sub>5</sub>, 15µg: hMM<sub>15</sub> e 45µg: hMM<sub>45</sub>), associados ou não com as leveduras de Pb18 ( $1 \times 10^6$ ) (hMM<sub>5</sub> + Pb, hMM<sub>15</sub> + Pb e hMM<sub>45</sub> + Pb), após 24 horas de incubação. Controle: somente macrófagos ( $1 \times 10^6$ ). Diferença significativa entre os grupos Pb, hMM<sub>5</sub>, hMM<sub>5</sub> + Pb, hMM<sub>15</sub>, hMM<sub>15</sub> + Pb, hMM<sub>45</sub>, hMM<sub>45</sub> + Pb x controle ( $p < 0.05$ ); hMM<sub>15</sub> x hMM<sub>15</sub> + Pb ( $*p < 0.05$ ), hMM<sub>45</sub> x hMM<sub>45</sub> + Pb ( $†p < 0.05$ ); hMM<sub>15</sub> + Pb, hMM<sub>45</sub> + Pb x hMM<sub>5</sub> + Pb ( $§p < 0.05$ ) e hMM<sub>5</sub>, hMM<sub>15</sub> e hMM<sub>45</sub> x Pb ( $#p < 0.05$ ). Não houve diferença entre os grupos hMM<sub>15</sub> + Pb e hMM<sub>45</sub> + Pb x Pb; hMM<sub>15</sub> e hMM<sub>45</sub> x hMM<sub>5</sub> e hMM<sub>5</sub> x hMM<sub>5</sub> + Pb ( $p > 0.05$ ).



### 6.6.3 Níveis de Óxido Nítrico em Sobrenadante de Macrófagos Peritoneais Murinos Tratados com $[\text{Ru}(\text{Na}_2)\text{Fe}(\text{CN}_5)(\text{NO})]$

Os resultados de dosagem de NO em sobrenadante de macrófagos após 24 horas de incubação com  $5\mu\text{M}$  de  $[\text{Ru}(\text{Na}_2)\text{Fe}(\text{CN}_5)(\text{NO})]$  (NPS-Ru<sub>5</sub>),  $15\mu\text{M}$  (NPS-Ru<sub>15</sub>) e  $45\mu\text{M}$  (NPS-Ru<sub>45</sub>) demonstraram aumento no nível de NO em relação ao grupo controle ( $p < 0.05$ ), o mesmo ocorrendo com a incubação com as formas de leveduras de Pb18 (NPS-Ru<sub>5</sub> + Pb, NPS-Ru<sub>15</sub> + Pb e NPS-Ru<sub>45</sub> + Pb) e o grupo Pb em relação ao grupo controle ( $p < 0.05$ ). No entanto, houve diminuição nos níveis de NO quando NPS-Ru<sub>5</sub>, NPS-Ru<sub>15</sub>, NPS-Ru<sub>45</sub> foram incubadas com as formas de leveduras de Pb18 em relação ao grupo Pb ( $*p < 0.05$ ). Não foi observada diferença dos grupos NPS-Ru<sub>5</sub>, NPS-Ru<sub>5</sub> + Pb, NPS-Ru<sub>15</sub>, NPS-Ru<sub>15</sub> + Pb, NPS-Ru<sub>45</sub> e NPS-Ru<sub>45</sub> + Pb entre si ( $p > 0.05$ ) (fig. 9).

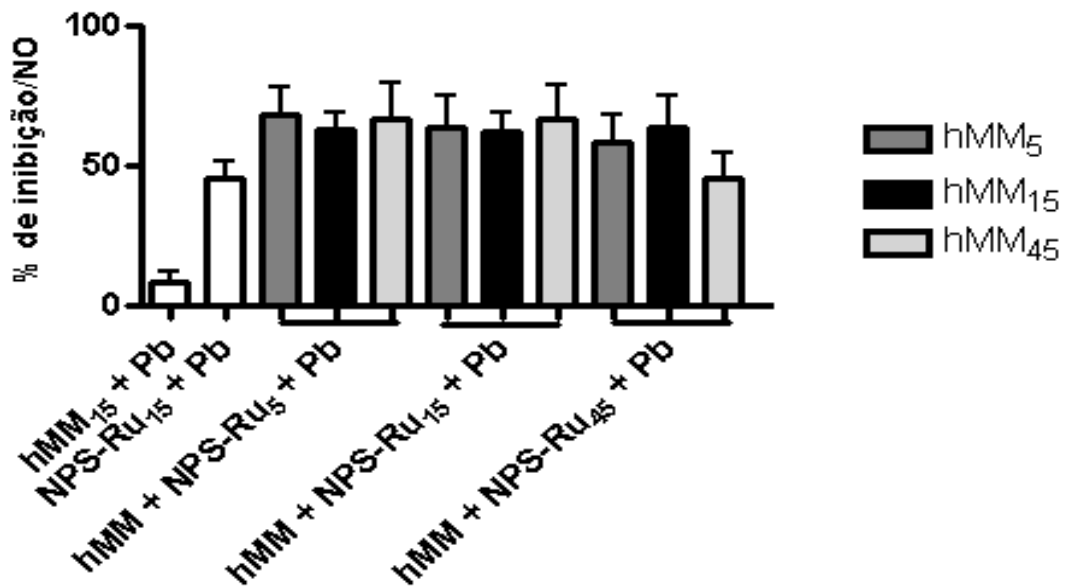
**Figura 9** – Determinação de níveis de NO em sobrenadante de macrófagos peritoneais murinos tratados com  $[\text{Ru}(\text{Na}_2)\text{Fe}(\text{CN}_5)(\text{NO})]$ . Resultado de dosagem de NO, expresso em mM, em sobrenadante de macrófagos peritoneais murinos tratados com  $5\mu\text{M}$  de  $[\text{Ru}(\text{Na}_2)\text{Fe}(\text{CN}_5)(\text{NO})]$  (NPS-Ru<sub>5</sub>),  $15\mu\text{M}$  (NPS-Ru<sub>15</sub>) e  $45\mu\text{M}$  (NPS-Ru<sub>45</sub>) associados ou não com as formas leveduriformes de Pb18 (NPS-Ru<sub>5</sub> + Pb, NPS-Ru<sub>15</sub> + Pb e NPS-Ru<sub>45</sub> + Pb), após 24 horas de incubação. Controle: somente macrófagos ( $1 \times 10^6$ ). Diferença significativa entre os grupos NPS-Ru<sub>5</sub>, NPS-Ru<sub>5</sub> + Pb, NPS-Ru<sub>15</sub>, NPS-Ru<sub>15</sub> + Pb, NPS-Ru<sub>45</sub>, NPS-Ru<sub>45</sub> + Pb e Pb x grupo controle ( $p < 0.05$ ); grupos NPS-Ru<sub>5</sub>, NPS-Ru<sub>5</sub> + Pb, NPS-Ru<sub>15</sub>, NPS-Ru<sub>15</sub> + Pb, NPS-Ru<sub>45</sub>, NPS-Ru<sub>45</sub> + Pb x grupo Pb ( $*p < 0.05$ ). Não houve diferença entre os grupos NPS-Ru<sub>5</sub>, NPS-Ru<sub>5</sub> + Pb, NPS-Ru<sub>15</sub>, NPS-Ru<sub>15</sub> + Pb, NPS-Ru<sub>45</sub> e NPS-Ru<sub>45</sub> + Pb ( $p > 0.05$ ).



6.6.4 Inibição dos níveis de óxido nítrico em sobrenadante de macrófagos murinos sensibilizados com hMM e tratados com  $[\text{Ru}(\text{Na}_2)\text{Fe}(\text{CN}_5)(\text{NO})]$  na presença de *P. brasiliensis*

Os resultados obtidos pela associação de hMM,  $[\text{Ru}(\text{Na}_2)\text{Fe}(\text{CN}_5)(\text{NO})]$  e Pb nas três diferentes concentrações, *in vitro*, após 48 de sensibilização e tratamento, demonstraram que houve uma inibição na produção de NO em todas as associações. Porém, quando observamos estes mesmos grupos entre si, foi observada uma leve diminuição da porcentagem de inibição quando observamos o grupo hMM<sub>45</sub> + NPS-Ru<sub>45</sub> + Pb.

**Figura 10** – Porcentagem de inibição dos níveis de NO em sobrenadante de macrófagos murinos sensibilizados com hMM e tratados com  $[\text{Ru}(\text{Na}_2)\text{Fe}(\text{CN}_5)(\text{NO})]$  na presença de *P. brasiliensis*. Porcentagem de inibição dos níveis de NO em sobrenadante de macrófagos peritoneais murinos tratados com a fração de hMM nas três diferentes concentrações de hMM (5 $\mu\text{g}$ : hMM<sub>5</sub>, 15 $\mu\text{g}$ : hMM<sub>15</sub> e 45 $\mu\text{g}$ : hMM<sub>45</sub>) associadas a  $[\text{Ru}(\text{Na}_2)\text{Fe}(\text{CN}_5)(\text{NO})]$  nas três concentrações (5 $\mu\text{M}$ : NPS-Ru<sub>5</sub>, 15 $\mu\text{M}$ : NPS-Ru<sub>15</sub> e 45 $\mu\text{M}$ : NPS-Ru<sub>45</sub>) e na presença de leveduras de Pb18 ( $1 \times 10^6$ ), após 24 horas de incubação. Controle negativo: somente macrófagos ( $1 \times 10^6$ ) e controle positivo: somente leveduras de Pb18. % inibição:  $100 - ([\text{média da produção de NO}/\text{controle positivo}] \times 100)$ .



## 7 DISCUSSÃO

Os conhecimentos de mecanismos que possam modular uma resposta imune adequada e efetiva poderão contribuir para o desenvolvimento de processos imunoterápicos no tratamento da PCM, doença que afeta milhões de pessoas na América Central e Sul.

É neste conceito e considerando o potencial de utilização da fração de hMM de *P. brasiliensis* como vacina (PAVANELLI et al., 2007), e dos compostos doadores de NO acoplados à metais de transição como o rutênio, os quais exercem efeito microbicida contra vários microrganismos, mostrando serem mais efetivos que os doadores convencionais (SANCHEZ-DELGADO et al., 1998; NAVARRO et al., 2000), que o presente trabalho analisou a atividade protetora da fração de hMM em associação com um composto doador de NO [Ru(Na<sub>2</sub>)Fe(CN<sub>5</sub>)(NO)] e deste composto na PCM experimental em camundongos Balb/c.

A ausência de fungos no pulmão e fígado observados pela técnica de CFU bem como pela análise histopatológica, em camundongos previamente imunizados com fração de hMM e a intensa resposta de DTH, demonstraram um papel protetor da fração de hMM na PCM experimental em camundongos Balb/c. Essa proteção foi mais eficiente que observado por Pavanelli et al. (2007), onde ainda foi possível observar fungos viáveis nos animais imunizados, possivelmente, este fato, seja devido a utilização da fração de hMM mais purificada.

A diminuição no número de CFU de *P. brasiliensis* e do número de fungos nos cortes histológicos tanto no pulmão como no fígado de camundongos tratados com [Ru(Na<sub>2</sub>)Fe(CN<sub>5</sub>)(NO)] (Pb + [Ru(Na<sub>2</sub>)Fe(CN<sub>5</sub>)(NO)]), composto ainda não avaliado na PCM, também sugerem que o mesmo apresenta papel protetor na PCM experimental em camundongos, todavia seu efeito parece ser inferior a da fração hMM. Essa eficiência, possivelmente, está relacionada com os altos níveis séricos de NO observados em nosso estudo, já que não houve uma maior indução da resposta imune humoral e celular, pelo [Ru(Na<sub>2</sub>)Fe(CN<sub>5</sub>)(NO)], em relação ao grupo infectado. Em estudo anterior, Pavanelli et al. (2011), utilizando um composto doador de NO acoplado a molécula de rutênio, *cis*-[Ru(bpy)<sub>2</sub>(NO)SO<sub>3</sub>](PF<sub>6</sub>), demonstraram que também não houve uma eficiente resposta imune celular nos grupos infectados com *P. brasiliensis* e tratados com o composto, utilizando exoantígeno o qual contém uma variedade de antígenos de *P. brasiliensis*.

Evidências mostram que a formação do granuloma, induzido pela infecção por *P. brasiliensis*, está intimamente relacionado com a resposta imune do hospedeiro. Na PCM, a formação do granuloma e o controle eficiente da proliferação fúngica em seu interior, estão a favor de uma resposta imune celular (MONTENEGRO et al., 1994). A análise de cortes histológicos de pulmão e fígado de animais previamente imunizados com hMM, demonstraram ausência de granulomas nesses órgãos. Possivelmente, a não indução de resposta granulomatosa se deve a eliminação do fungo na fase inicial de infecção, pois além da não detecção do fungo nesses tecidos, o resultado de CFU também foi negativo. Já nos animais infectados e tratados com  $[\text{Ru}(\text{Na}_2)\text{Fe}(\text{CN}_5)(\text{NO})]$  foi observado um infiltrado celular com a presença de fungos dispersos no tecido e formação de um número reduzido de granulomas e de fungos viáveis, respectivamente, no pulmão e fígado desses animais, sendo coerentes com os dados observados no CFU. Este resultado está de acordo com estudo anterior, o qual demonstrou que complexos de rutênio foram capazes de inibir 70% da proliferação das formas epimastigotas de *T. cruzi* (SANCHEZ-DELGADO et al., 2004).

No caso do fungo *P. brasiliensis*, a resistência à infecção depende, principalmente, da imunidade celular do hospedeiro (CALICH et al., 1998; POLONELLI et al., 2000), sendo que os macrófagos ativados por  $\text{IFN-}\gamma$  apresentam importante papel na resistência na PCM (BRUMMER et al., 1994; CANO et al., 1998; KURITA et al., 1999). Em geral, a principal atividade microbicida dos macrófagos relaciona-se com a produção de NO e seus metabólicos (RIN) como o peroxinitrito, que subsequentemente decompõe-se em moléculas adicionais também altamente reativas (BOGDAN et al., 2000; MISSAL et al., 2004). Especificamente, uma ação fungicida do NO sobre o *P. brasiliensis* foi observada *in vitro* por Gonzalez et al. (2000) utilizando cultura de macrófagos murinos ativados por  $\text{IFN-}\gamma$  e Nascimento et al. (2002) confirmaram o papel fungicida do NO na PCM experimental por meio da utilização de camundongos geneticamente deficientes para o gene da iNOS.

Considerando a intensa resposta a fração hMM em camundongos previamente imunizados e infectados com *P. brasiliensis* em relação aos infectados e tratados com  $[\text{Ru}(\text{Na}_2)\text{Fe}(\text{CN}_5)(\text{NO})]$ , foi realizada a dosagem sérica de NO e os resultados demonstraram níveis elevados de NO em animais imunizados bem como em animais tratados com  $[\text{Ru}(\text{Na}_2)\text{Fe}(\text{CN}_5)(\text{NO})]$ , sendo mais evidente em animais infectados e tratados com  $[\text{Ru}(\text{Na}_2)\text{Fe}(\text{CN}_5)(\text{NO})]$ . Considerando que nesse último

grupo a proteção foi parcial, sugere que no grupo imunizado, além de NO, outros mecanismos de defesa devem ter contribuído para a eliminação do fungo nos órgãos avaliados. Adicionalmente, Pavanelli et al. (2011), observaram que os níveis séricos de NO nos animais infectados com *P. brasiliensis* e tratados com *cis*-[Ru(bpy)<sub>2</sub>(NO)SO<sub>3</sub>](PF<sub>6</sub>), não apresentaram diferença significativa em relação ao grupo infectado nos 20 dias de infecção, sendo somente significativo no grupo avaliado após 40 dias. Mesmo assim, nos dois trabalhos foram verificados que os compostos utilizados reduziram o número de células fúngicas em ambos os órgãos, demonstrando que o NO foi capaz de matar o fungo e, conseqüentemente, controlar a multiplicação do parasita. Todavia, no presente trabalho, são necessários estudos adicionais com a dosagem de NO tanto no período anterior como por um período superior aos 28 dias de infecção e tratamento.

A investigação da associação entre imunização com a fração de hMM e tratamento com [Ru(Na<sub>2</sub>)Fe(CN<sub>5</sub>)(NO)] resultou em CFU negativo, mas com presença de granulomas e de fungos nos cortes histológicos nos órgãos analisados, além de menor resposta de DTH em relação aos grupos imunizados e menor níveis séricos de NO que o grupo infectado e tratado com [Ru(Na<sub>2</sub>)Fe(CN<sub>5</sub>)(NO)]. Esses resultados sugerem uma modulação da resposta imune celular pela ação do [Ru(Na<sub>2</sub>)Fe(CN<sub>5</sub>)(NO)], suprimindo a resposta induzida por hMM e também uma supressão na produção de NO pelo processo de imunização com a fração hMM. Considerando que além de ter efeitos protetores no hospedeiro, o NO está envolvido também na imunossupressão. Essa atividade imunossupressora do NO tem sido relatada *in vitro* e em diversos modelos de infecção *in vivo*, incluindo *Toxoplasma gondii* (CANDOLFI et al., 1994), *Listeria monocytogenes* (GREGORY et al., 1993) e *Plasmodium vinckei* (ROCKETT et al., 1994). Além disso, há evidências de que o NO reduz a habilidade de DCs pulmonares em apresentar antígenos (HOLT et al., 1992), inibindo, também, a expressão de produtos de genes do complexo principal de histocompatibilidade de classe II (moléculas Ia) em macrófagos estimulados por IFN- $\gamma$  (SICHER et al., 1994), responsável por apresentar os antígenos a outras células linfóides e favorecer o curso da infecção.

A droga [Ru(Na<sub>2</sub>)Fe(CN<sub>5</sub>)(NO)], por alguma razão desconhecida, por si só, sem a infecção pelo fungo, induziu resposta de DTH a fração de hMM, de forma similar ao grupo Pb e ao grupo Pb + [Ru(Na<sub>2</sub>)Fe(CN<sub>5</sub>)(NO)]. Por outro lado, a droga [Ru(Na<sub>2</sub>)Fe(CN<sub>5</sub>)(NO)], por si só, não interferiu na resposta imune humoral a

fração de hMM, mantendo os níveis basais do grupo controle e quando associado à infecção, manteve níveis similares de IgG anti-hMM ao grupo Pb + [Ru(Na<sub>2</sub>)Fe(CN<sub>5</sub>)(NO)], indicando nenhuma ação positiva ou negativa na indução da resposta imune humoral. Porém, diferentemente da resposta de DTH, a associação de hMM e [Ru(Na<sub>2</sub>)Fe(CN<sub>5</sub>)(NO)], resultou em intensa resposta de IgG anti-hMM. Na PCM a resposta imune humoral não é considerada protetora e uma forte resposta imune humoral está correlacionada com a gravidade da doença (SINGER-VERMES et al., 1993), mas tem sido descrito a eficácia da imunidade humoral na proteção do hospedeiro contra fungos patogênicos, tais como, anticorpos contra polissacarídeos de *Cryptococcus neoformans* ou contra os componentes da parede celular de *Candidas albicans* (POLONELLI et al., 2000). Possivelmente o papel protetor esteja ligado aos diferentes anticorpos do fungo. E neste contexto, Márquez et al. (2005) observaram níveis mais elevados de IgG anti-hMM em soros de pacientes de forma crônica, que a forma mais grave, a aguda. Assim, possivelmente, a resposta imune via IgG anti-hMM tenha participado na proteção parcial uma vez que os resultados da análise histopatológica demonstraram números reduzidos de fungos em relação ao grupo não imunizado (Pb + [Ru(Na<sub>2</sub>)Fe(CN<sub>5</sub>)(NO)]), visto que a resposta imune celular nesse grupo de animais não foi tão evidente.

A defesa anti-fúngica na fase inicial de infecção se deve ao mecanismo inato, sendo importante a participação das células fagocíticas. No presente trabalho, foi avaliado os níveis de NO produzido por macrófagos peritoneais de camundongos Balb/c incubados com a fração hMM em três concentrações distintas em presença ou não de leveduras de *P. brasiliensis*. Os resultados obtidos demonstraram que a fração hMM induz os macrófagos a liberarem NO, sendo os níveis dependente da dose de hMM utilizada, tanto na ausência como na presença do fungo. O composto [Ru(Na<sub>2</sub>)Fe(CN<sub>5</sub>)(NO)] também induziu os macrófagos a liberarem mais NO, porém, diferentemente de hMM, não houve diferença entre os níveis de NO com as três concentrações utilizadas. E, além disso, os níveis de NO inferior ao observado somente com o fungo, sugerem supressão da produção/liberação de NO pelos macrófagos quando associado ao referido composto. No entanto no modelo de PCM experimental em camundongos, os níveis séricos de NO, no grupo infectado e tratado com o composto, foi equivalente ao grupo somente infectado, possivelmente devido à contribuição de produção de NO por outras populações celulares. Surpreendentemente, como

observado em animais imunizados e infectados, foi observado, *in vitro*, um nível inferior de NO em sobrenadante de macrófagos tratados com a associação de fração hMM,  $[\text{Ru}(\text{Na}_2)\text{Fe}(\text{CN}_5)(\text{NO})]$  e o fungo. Essa inibição foi observada com a associação de diferentes doses de hMM e  $[\text{Ru}(\text{Na}_2)\text{Fe}(\text{CN}_5)(\text{NO})]$ , sendo essa inibição de menor intensidade com a maior dose utilizada. Esses resultados sugerem cautela quanto a utilização de composto  $[\text{Ru}(\text{Na}_2)\text{Fe}(\text{CN}_5)(\text{NO})]$ , sendo necessário estudos adicionais com diferentes doses do composto, períodos de tratamento e outros interferentes.

Concluímos pelos resultados obtidos que a fração hMM induz proteção nos principais órgãos como pulmão e fígado, e o tratamento com o  $[\text{Ru}(\text{Na}_2)\text{Fe}(\text{CN}_5)(\text{NO})]$  também induz proteção, porém parcial, nas condições do estudo. Tanto a fração hMM como o composto  $[\text{Ru}(\text{Na}_2)\text{Fe}(\text{CN}_5)(\text{NO})]$  induz aumento de nível sérico de NO na PCM experimental em camundongos. Além disso, a fração hMM como o composto  $[\text{Ru}(\text{Na}_2)\text{Fe}(\text{CN}_5)(\text{NO})]$  induz aumento de produção/liberação de NO pelos macrófagos peritoneais murinos. Todavia a associação da fração hMM em conjunto com o composto  $[\text{Ru}(\text{Na}_2)\text{Fe}(\text{CN}_5)(\text{NO})]$ , além de induzir diminuição no níveis de NO pelos macrófagos peritoneais murinos, suprime parcialmente a proteção induzida por imunização com hMM, possivelmente por indução de modulação da resposta imune celular, o que requer estudos adicionais.

## 8 CONCLUSÕES

A imunização de camundongos Balb/c com a fração hMM, induz proteção maior que o já evidenciado em estudo anterior na PCM experimental murino.

O composto  $[\text{Ru}(\text{Na}_2)\text{Fe}(\text{CN}_5)(\text{NO})]$  induz proteção parcial na PCM experimental murino.

A imunização de camundongos Balb/c com a fração hMM induz aumento na resposta celular e humoral em camundongos infectados com *P. brasiliensis*.

O tratamento de camundongos Balb/c com o composto  $[\text{Ru}(\text{Na}_2)\text{Fe}(\text{CN}_5)(\text{NO})]$  induz aumento de resposta imune humoral e do nível sérico de NO em camundongos infectados com *P. brasiliensis*.

A imunização de camundongos Balb/c com a fração hMM associado ao tratamento com o composto  $[\text{Ru}(\text{Na}_2)\text{Fe}(\text{CN}_5)(\text{NO})]$  induz diminuição no efeito protetor de hMM.

A fração hMM induz aumento na produção/liberação de NO em macrófagos peritoneais murinos de maneira dose dependente.

O tratamento de macrófagos peritoneais murinos com o composto  $[\text{Ru}(\text{Na}_2)\text{Fe}(\text{CN}_5)(\text{NO})]$  induz aumento na produção/liberação de NO.

A associação entre hMM e o composto  $[\text{Ru}(\text{Na}_2)\text{Fe}(\text{CN}_5)(\text{NO})]$  induz diminuição na produção/liberação de NO induzida pelo fungo *P. brasiliensis*.

## 9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA, O. P.; JACKS, J. JR.; SCULLY, C. Paracoccidioidomycosis of the mouth: an emerging deep mycosis. *Crit. Rev. Oral. Biol. Med.*, 14(5):377–83, 2003.
- BOGDAN, C. M. R.; DIEFENBACH, A. Reactive oxygen and reactive nitrogen intermediates in innate and specific immunity. *Curr. Opin. Immunol.*, 12:64-76, 2000.
- BOGDAN, C. M. R. Nitric oxide and the immune response. *Nat. Immun.*, 10: 907–916, 2001.
- BRUMMER, E. Interaction of *Paracoccidioides brasiliensis* with host defense cells, p. 213–223. In: FRANCO, M.; SILVA LACAZ, C.; RESTREPO MORENO, A.; DEL NEGRO, G. (Ed.). *Paracoccidioidomycosis*. CRC Press, Boca Raton, 1994.
- CALICH, V. L.; KASHINO, S. S. Cytokines produced by susceptible and resistant mice in the course of *Paracoccidioides brasiliensis* infection. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 31: 615-23, 1998.
- CAMARGO, Z. P.; TABORDA, C. P.; RODRIGUES, E. G.; TRAVASSOS, L. R. The use of cell-free antigens of *Paracoccidioides brasiliensis* in serological tests. *J Med Vet Mycol.*, 29: 31–38, 1991.
- CANDOLFI, E.; HUNTER, C. A.; REMINGTON, J. S. Mitogen- and antigen-specific proliferation of T-cells in murine toxoplasmosis is inhibited by reactive nitrogen intermediates. *Infect. Immun.*, 62:1995, 1994
- CANO, L. E.; BRUMMER, E.; STEVENS, D.; RESTREPO, A. Fate of conidia from *Paracoccidioides brasiliensis* after ingestion by resident macrophages or cytokine-treated macrophages. *Infect. Immun.*, 60:2096–2100, 1992.
- CANO, L. E.; GOMEZ, B.; BRUMMER, E.; RESTREPO, A.; STEVENS, D. A. Inhibitory effect of deferoxamine or macrophage activation on transformation of *Paracoccidioides brasiliensis* conidia ingested by macrophages: reversal by holotransferrin. *Infect. Immun.*, 62:1494–1496, 1994.
- CANO, L. E.; KASHINO, S. S.; ARRUDA, C.; ANDRÉ, D.; XIDIEH, C. F.; SINGER-VERMES, L. M.; VAZ, C. A. C.; BURGER, E.; CALICH, V. L. G. Protective role of gamma interferon in experimental pulmonary paracoccidioidomycosis. *Infect. Immun.*, 66:800–806, 1998.
- COOPER, A. M.; ADAMS, L. B.; DALTON, D. K.; APPELBERG, R.; EHLERS, S. IFN-gama and NO in microbacterial disease: new jobs for old hands. *Trends in Microbiol.*, v. 10, p. 221-226, 2002.
- DIXON, D. M.; CASADEVALL, A.; KLEIN, B.; MENDOZA, L.; TRAVASSOS, L.; DEEPE, G. S. JR. Deselopmente of vaccines and their use in the prevention of fungal infections. *Med. Mycol.*, 1: 57-67, 1998.
- FUJI, S.; AKAIKE, T.; MAEDA, H. Role of nitric oxide in pathogenesis of Herpes simplex vírus encephalitis in rats. *Virologia*, v. 526, p. 203-212, 1999.

- GARNICA, M. R.; SILVA, J. S.; JUNIOR, A. Stromal cell-derived factor-1 production by spleen cells is affected by nitric oxide in protective immunity against blood-stage *Plasmodium chabaudi* CR in C57BL/6j mice. *Immun. Letter*, v. 89, p. 133-142, 2003.
- GONZALEZ, A.; GREGORI, W.; VELEZ, D.; RESTREPO, A.; CANO, L. E. Nitric Oxide Participation in the Fungicidal Mechanism of Gamma Interferon-Activated Murine Macrophages against *Paracoccidioides brasiliensis* Conidia. *Infect. Immun.*, 68:2546-2552, 2000.
- GREGORY, S. H.; WING, E. J.; HOFFMAN, R. A.; SIMMONS, R. L. Reactive nitrogen intermediates suppress the primary immunologic response to *Listeria*. *J. Immunol.*, 150:2901, 1993.
- HOLT, P. G.; OLIVER, J.; BILYK, N.; MCMENAMIN, C.; KRAALMCHENAMIN, G.; THEPEN, T. Downregulation of the antigen-presenting cell function(s) of pulmonary dendritic cells *in vivo* by resident alveolar macrophages. *J. Exp. Med.*, 177:397, 1992.
- KARIDI, K.; GAROUFIS, A.; TSIPIIS, A.; HADJILIADIS, N.; DEN DULK, H.; REEDIJK, J. Synthesis, characterization, *in vitro* antitumor activity, DNA binding properties and electronic structure (DFT) of the new complex cis-(Cl,Cl)[Ru<sup>II</sup>Cl<sub>2</sub>(NO<sup>+</sup>)(terpy)]Cl. *Dalton Transactions*, 7:1176, 2005.
- KURITA, N.; BISWAS, S. K.; OARADA, M.; SANO, A.; NISHIMURA, K.; MIYAJI, M. Fungistatic and fungicidal activities of murine polymorphonuclear leukocytes against yeast cells of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Med. Mycol.*, 37:19–24, 1999.
- LACAZ, C. L. *Paracoccidioides brasiliensis* morphology, Evolutionary cycle, maintenance during saprophytic life, biology, virulence, taxonomy. In: FRANCO, M.; LACAZ, C. S.; RESTREPO-MORENO, A; DEL NEGRO, G. (Ed.). *Paracoccidioidomycosis*. Flórida: CRC Press, Boca Raton, 1994. p. 109-120.
- LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Colorimetric assays: Lowry's method for protein determination. *J. Biol.Chem.*, (193) 265-275, 1951.
- LUDER, C. G. K.; ALGNER, M.; LANG, C.; BLEICHER, N.; GROB, U. Reduced expression of the inducible nitric oxide synthase after infection with *Toxoplasma gondii* facilitates parasite replication in activated murine macrophages. *Inter. J. Parasit.*, v. 33, p. 833-844, 2003.
- LUNARDI, C. N.; CACCIARI, A. L.; SILVA, R. S.; BENDHACK, L. M. Cytosolic calcium concentration is reduced by photolysis of a nitrosyl ruthenium complex in vascular smooth muscle cells. *Nitric Oxide*, 15(3): 252, 2006.
- MÁRQUEZ, A. S.; VICENTINI, P.; ONO, M. A.; WATANABE, M. A. E.; CAMARGO, Z. P.; ITANO, E. N. Reactivity of antibodies from patients with acute and chronic paracoccidioidomycosis to a high-mass molecular antigen from *Paracoccidioides brasiliensis*. *J. Clin. Labor. Anal.*, 19: 199–204, 2005.

MCEWEN, J. G.; GARCIA, A. M.; ORTIZ, B. L.; BOTERO, S.; RESTREPO, A. In search of the natural habitat of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Arch. Med. Res.*, 26(3):305–6, 1995.

MISSAL, T. A.; LODGE, J. K.; MCEWEN, J. E. Mechanisms of resistance to oxidative and nitroative stress: implication for fungal survival in mammalian hosts. *Eukaryot. Cell.*, 3:835-846, 2004.

MONTENEGRO, M.; FRANCO, M. Pathology. In: FRANCO, M.; LACAZ, C.; RESTREPO, A.; DEL NEGRO, G. (Ed.). *Paracoccidioidomycosis*. Boca Raton, CRC Press, 1994. p. 136-8.

NASCIMENTO, F. R.; CALICH, V. L.; RODRIGUES, D.; RUSSO, M. Dual role for nitric oxide in paracoccidioidomycosis: essential for resistance, but overproduction associated with susceptibility. *J. Immunol.*, 168:4593-4600, 2002.

NAVARRO, M. T.; LAHMANN, E. J.; CISNEROS-FAJARDO, A.; FUENTES, R. A.; SÁNCHEZ-DELGADO, P.; SILVA, J. A. Toward a Novel Metal-Based Chemotherapy Against Tropical Diseases. Part 5. Synthesis and Characterization of New Ru(II) and Ru(III) Clotrimazole and Ketoconazole Complexes and Evaluation of Their Activity Against *Trypanosoma cruzi* Polyhedron. *J. Med. Chem.*, 19: 2319-2325, 2000.

PANIS, C.; MAZZUCO, T. L.; COSTA, C. Z.; VICTORINO, V. J.; TATAKIHARA, V. L.; YAMAUCHI, L. M.; YAMADA-OGATTA, S. F.; CECCHINI, R.; RIZZO, L. V.; PINGE-FILHO, P. *Trypanosoma cruzi*: Effect of the absence of 5-lipoxygenase (5-LO)-derived leukotrienes on levels of cytokines, nitric oxide and iNOS expression in cardiac tissue in the acute phase of infection in mice. *Exp. Parasitol.*, 2010. In press.

PAVANELLI, W. R.; KAMINAMI, M. S.; GERES, J. R.; SANO, A.; ONO, M. O.; CAMARGO, I. C. C.; ITANO, E. N. Protection induced in BALB/c mice by the high-molecular-mass (hMM) fraction of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Mycopathology.*, 163:117–128, 2007.

PAVANELLI, W. R.; SILVA, J. J. N.; PANIS, C.; COSTA, I. C.; MENEZES, M. C. N. D.; OLIVEIRA, F. J. A.; CUNHA, T. M.; CUNHA, F. Q.; CECCHINI, R.; WATANABE, M. A. E.; ITANO, E. N. Experimental chemotherapy in paracoccidioidomycosis using ruthenium NO-donor. *Mycopathology.*, 2011.

POLONELLI, L.; CASADEVALL, A.; HAN, Y.; BERNARDIS, F.; KIRKLAND, T. N.; MATTHEWS, R. C.; ADRIAN, D.; BOCCANERA, M.; BURNIE, J. P.; CASSONE, A.; CONTI, S.; CUTLER, J. E.; FRAZZI, R.; GREGORY, C.; HODGETTS, S.; ILIDGE, C.; MAGLIANI, W.; RIGG, G.; SANTONI, G. The efficacy of acquired humoral and cellular immunity in the prevention and therapy of experimental fungal infections. *Med Mycol*, 38: 281–292, 2000.

ROCKETT, K. A.; AUBURU, M. M.; ROCKETT, E. J.; CORIDE, W. B.; CLARK, I. Possible role of nitric oxide in malarial immunosuppression. *Parasite Immunol.*, 16:243, 1994.

SALVATI, L.; MATTU, M.; COLASANTI, M.; SCALONE, A.; VENTURINI, G.; GRADONI, L.; ASCENZI, P. NO donors inhibit *Leishmania infantum* cysteine proteinase activity. *Bioch. et Bioph. Acta*, v. 1545, p. 357-366, 2001.

SANCHEZ-DELGADO, R. A.; NAVARRO, M.; LAZARDI, K.; ATENCIO, R.; CAPPARELLI, M.; VARGAS, F.; URBINA, J. A.; BOUILLEZ, A.; NOELS, A. F.; MAIS, D. Toward a Novel Metal-Based Chemotherapy Against Tropical Diseases. Part 4. Synthesis and Characterization of New Metal–Clotrimazole Complexes and Evaluation of Their Activity Against *Trypanosoma cruzi*. *Inorg. Chim. Acta*, 528-540, 1998.

SANCHEZ-DELGADO, R. A.; ANZELLOTTI, A. Metal Complexes as Chemotherapeutic Agents Against Tropical Diseases: Trypanosomiasis, Malaria and Leishmaniasis. *Mini. Rev. Med. Chem.*, 4: 23-30, 2004.

SICHER, S. C.; VAZQUEZ, M. A.; LU, C. Y. Inhibition of macrophage Ia expression by nitric oxide. *J. Immunol.*, 153:1293, 1994.

SILVA, J. J. N.; OSAKABE, A. L.; PAVANELLI, W. R.; SILVA, J. S.; FRANCO, D. W. *In Vitro* and *in Vivo* Antiproliferative and Trypanocidal Activities of Ruthenium NO Donors. *Br. J. Pharmacol.*, 152: 112-121, 2007.

SINGER-VERNES, L. M.; CALDEIRA, C. B.; BURGER, E.; CALISH, L. G. Experimental murine paracoccidiodomycosis: Relationship among the dissemination of the infection, humoral and cellular immune responses. *Clin. Exp. Immunol.*, 94: 75-79, 1993.

TFOUNI, E.; KRIEGER, M.; MCGARVEY, B.; FRANCO, D. W. Structure, Chemical and Photochemical Reactivity and Biological Activity of Some Ruthenium Nitrosyl Complexes. *Coord. Chem. Rev.*, 236: 57-69, 2003.

TOLEDO, J. C.; SILVA, H. A. S.; SCARPELLINI, M.; MORI, V.; CAMARGO, A. J.; BERTOTI, M. et al. Ruthenium tetraamine as a model of nitric oxide donor compounds. *Eur J Inorg Chem*, 9: 1879–1885, 2004.

VESPA, G. N. R.; CUNHA, F. Q.; SILVA, J. S. Nitric oxide is involved in control of *Trypanosoma cruzi*-induced parasitemia and directly kills the parasite *in vitro*. *Infect. and Immun.*, v. 62, p. 5177-5182, 1994