



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

MILENA MENEGAZZO MIRANDA

**O EFEITO DA TERAPIA ASSOCIADA: ÓXIDO NÍTRICO E
PRÓPOLIS NA LEISHMANIOSE EXPERIMENTAL**

Londrina
2013

MILENA MENEGAZZO MIRANDA

**O EFEITO DA TERAPIA ASSOCIADA: ÓXIDO NÍTRICO E
PRÓPOLIS NA LEISHMANIOSE EXPERIMENTAL**

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

Orientador: Prof. Dr. Wander Rogério Pavanelli.

Londrina
2013

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

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

M672e Miranda, Milena Menegazzo.

O efeito da terapia associada : óxido nítrico e própolis na leishmaniose experimental. – Londrina, 2013.

74 f. : il.

Orientador: Wander Rogério Pavanelli.

Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental, 2013.

Inclui bibliografia.

1. Leishmaniose – Teses. 2. Oxido nítrico – Teses. 3. Própolis – Teses. 4. Doenças parasitárias – Teses. 5. Camundongo como animal de laboratório – Teses. 6. Patologia experimental – Teses. I. Pavanelli, Wander Rogério. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental. III. Título.

CDU 616-092

MILENA MENEGAZZO MIRANDA

**O EFEITO DA TERAPIA ASSOCIADA: ÓXIDO NÍTRICO E PRÓPOLIS
NA LEISHMANIOSE EXPERIMENTAL**

Dissertação apresentada ao Programa de pós graduação em Patologia Experimental, Centro de Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Londrina.

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof. Dr. Wander Rogério
Pavanelli
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dr. Jean Jerley da Silva
Universidade Estadual de Roraima - UERR

Prof. Dr. Waldiceu Ap. Verri Junior
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 03 de maio de 2013.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por sempre guiar meus caminhos e conduzir minhas vitórias, conquistas e faltar a minha vida de pessoas especiais.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Wander R. Pavanelli pela amizade, oportunidade, confiança, paciência e dedicada orientação. Obrigada por me introduzir à vida acadêmica e científica, proporcionado meu crescimento pessoal e profissional.

Agradeço a Prof^a. Dr^a. Ivete Conchon Costa pelo apoio, incentivo e colaboração inestimáveis nas mais variadas etapas deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Jean Jerley Nogueira da Silva e ao Prof. Dr. Luiz Gonzaga de França Lopes por me fornecerem os compostos doadores de óxido nítrico e Prof. Dr. José Maurício Sforcin pelo extrato de própolis utilizados neste estudo.

À Prof^a. Dr^a Carolina Panis um agradecimento muitíssimo especial pela tão estimada ajuda na realização de metodologias sempre discutindo os objetivos e resultados do meu trabalho.

Ao Prof. Dr. Eduardo José de Almeida Araújo pela cooperação nos estudos histológicos.

À Prof^a. Dr^a Idessania Nazareth Costa pela sua amizade, sugestões e correção deste trabalho.

Ao Dr. Juliano Bordignon e ao Instituto Carlos Chagas pelos animais utilizados para a realização deste estudo.

Ao Programa de Pós Graduação em Patologia Experimental pelo incentivo à pesquisa e apoio institucional. À Capes, CNPQ e Fundação Araucária, e à PROPPG-UEL, pelo apoio financeiro para o desenvolvimento deste projeto.

Aos novos e grandes amigos do Laboratório de Parasitologia: Ana Paula, Cayo, Fernanda, Graciele, Gabriel, Hugo, Juliana, Larissa, Tatiane, Sarah em especial à Suelen, Allan e Natália pela ajuda na realização de grande parte dos experimentos, que não pouparam esforços em me ajudar. Agradeço todo o apoio, ensinamentos, espírito de equipe e por tornarem agradáveis as longas horas de trabalho.

Ao Pedro e Adernaldo que durante este período sempre deram o seu apoio técnico, incentivo e companhia.

Aos professores, que ministraram as disciplinas do programa, meus agradecimentos por contribuírem para o meu desenvolvimento profissional e pessoal.

Agradeço muito à toda a minha família, que eu amo tanto, em especial à minha mãe Maria Alice, meu exemplo e incentivo diário de como “os estudos sempre valem a pena”, meu pai Jairo, aos meus irmãos Mariana e Michel, ao meu sobrinho Pedro e cunhados Paola e Neco por toda a alegria, incentivo, carinho e apoio que recebi ao longo da minha vida, sem vocês essa “história” nunca se completaria.

Agradeço especialmente, meu amor Rudner por todo amor, carinho, compreensão, dedicação, respeito. Eu te amo muito e você foi a base para o cumprimento desta etapa na minha vida.

Aos meus amigos queridos que fiz ao longo da vida, obrigado pela amizade, por fazer da minha vida uma “caixinha de histórias incríveis”, por perdoarem meus momentos de ausência, por gentilmente me ouvirem nas horas de estresse e desabafo, pelas mensagens de apoio incondicionais, meus sinceros agradecimentos.

MIRANDA, Milena Menegazzo. **O efeito da terapia associada:** óxido nítrico e própolis na leishmaniose experimental. 2013. 74f. Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2013.

RESUMO

O óxido nítrico (NO) é definido como um dos mais potentes radicais com atividade leishmanicida produzido por macrófagos. No entanto este parasito impede a ativação de uma resposta imune eficaz, diminuindo a produção de NO e sobrevivendo no interior desta célula. Assim, o uso de doadores exógenos de NO pode ser uma importante alternativa no tratamento da leishmaniose. Associado a esta estratégia, estudos têm demonstrado que a própolis, resina produzida por abelhas, apresenta grande potencial para o desenvolvimento de novas drogas devido à suas inúmeras atividades como: ação anti-inflamatória, imunomoduladora, antiparasitária e de reparo tecidual. O objetivo do trabalho foi analisar o efeito da terapia associada: doador de NO cis-[Ru(bpy)₂imN(NO)](PF₆)₃ (I) e extrato hidroalcoólico de própolis brasileira em camundongos BALB/c infectados com *Leishmania amazonensis*. Os animais foram infectados na pata direita traseira e tratados por 30 dias após o aparecimento das lesões. Estes animais foram então sacrificados, o soro plasmático coletado e a pata infectada retirada para análise. Os resultados demonstram que a associação I e própolis brasileira nas concentrações testadas não provocaram dano hepatocelular após o tratamento. No local da lesão a terapia associada aumentou a população de macrófagos eficientes diminuindo o número destas células parasitadas. Assim, com o controle da infecção, o processo inflamatório também foi reduzido, diminuindo o recrutamento de linfócitos e a expressão do fator de transcrição NF-κB, e da citocina pró inflamatória TNF-α no local. Com 30 dias de tratamento, a associação PF6 e própolis brasileira foi capaz de induzir o reparo tecidual, controlando a evolução da lesão leishmaniótica dos camundongos BALB/c. Estes resultados foram reforçados pelo aumento de fibroblastos, expressão do fator de transcrição STAT-3 e da citocina TGF-β1 na lesão. Em geral, os nossos resultados experimentais sugerem que os efeitos da associação de PF6 e própolis brasileira em lesões de camundongos BALB/c infectados com *L. amazonensis* foram efetivos podendo ser testada para o desenvolvimento de novas abordagens para o tratamento da Leishmaniose Tegumentar Americana.

Palavras-chave: Óxido Nítrico. *Leishmania*. Doador de Óxido Nítrico. Própolis. Leishmaniose Cutânea.

MIRANDA, Milena Menegazzo. **The effect of associated therapy: nitric oxide and propolis in experimental leishmaniasis.** 2013. 74p. Dissertation (Master's Degree in Experimental Pathology). – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2013.

ABSTRACT

Nitric oxide (NO) is established as one of the most potent radicals with leishmanicidal activity produced by macrophages. However, this parasite prevents the activation of an effective immune response, reducing the production of NO and surviving inside this cell. Thus, the use of exogenous NO donors can be an important alternative for the treatment of leishmaniasis. Associated with this strategy, studies have shown that propolis, the resin produced by bees, presents great potential for the development of new drugs due to its numerous activities such as anti-inflammatory, immunomodulatory, anti-parasitical and tissue repair actions. The aim of this study was to analyze the effect of this associated therapy: NO donor (cis-[Ru(bpy)₂imN(NO)](PF₆)₃) (I) and hydroalcoholic extract of Brazilian propolis in BALB/c mice infected with *Leishmania amazonensis*. The animals were infected in the right hindpaw and treated for 30 days after the arising of lesions. These animals were then sacrificed, the plasma serum was collected and the infected paw was withdrawn for analysis. The results demonstrate that the association PF6 and Brazilian propolis at the tested concentrations did not cause hepatocellular injury after treatment. At the site of lesion the associated therapy increased the population of efficient macrophages by reducing the number of these parasitized cells. Thus, with the control of infection, the inflammatory process was also reduced by decreasing the recruitment of lymphocytes and the expression of the transcription factor NF-κB, and of the proinflammatory cytokine TNF-α on site. With 30 days of treatment, the association I and Brazilian propolis was able to induce tissue repair by controlling the evolution of the leishmaniotic lesion of BALB/c mice. These findings were reinforced by an increase of fibroblasts, by the expression of the STAT-3 transcription factor and of the TGF-β1 cytokine in the wound. In general, our experimental results suggest that the effects of the association PF6 and Brazilian propolis in lesions of BALB/c mice infected with *L. amazonensis* were effective being able to be tested for the development of new approaches for the treatment of American Cutaneous Leishmaniasis.

Keywords: Nitric Oxide. *Leishmania*. Nitric Oxide donor. Propolis. Cutaneous Leishmaniasis.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1** - Ciclo biológico de *Leishmania* spp. 18
- Figura 2** - Reação catalisada por iNOS. 27
- Artigo
- Figura 3** - Effect of treatment with I + propolis or saline on ALT and AST levels. BALB/c mice were treated with I (0.385 $\mu\text{mol.kg}^{-1}$ day⁻¹, i.p.) and propolis (5 mg.kg⁻¹, p.o) for 30 consecutive days. ALT and AST were measured 24 hrs after the last treatment day (n = 5-6). Results are expressed as means \pm SEM * indicates P < 0.05 versus control. 65
- Figura 4** - Effect of I and propolis on lesion development in BALB/c mice infected with *L. amazonensis*. Animals were inoculated in the right hindpaw with 1 x 10⁵ promastigote forms. After eight weeks of infection, mice were treated with saline (i.p.) (■), Glucantime® (33 $\mu\text{mol.kg}^{-1}$ day⁻¹, i.p.) (□), Propolis (5 mg.kg⁻¹ day⁻¹, p.o.) (▼), I (0.385 $\mu\text{mol.kg}^{-1}$ day⁻¹, i.p.) (◆) or Propolis + I (5 mg.kg⁻¹ day⁻¹, p.o + 0.385 $\mu\text{mol.kg}^{-1}$ day⁻¹, i.p.) (○) for 4 weeks. The results represent the mean \pm SEM of lesion size for each group (n=5-6). Significant difference relative to the infected control * P<0.05 and ** P<0.01 unpaired t-test. 66
- Figura 5** - Histological analysis of mice infected paws at 12 weeks post-infection. BALB/c mice were infected with 1x10⁵ promastigotes of *L. amazonensis* in the right hindpaw and treated with I (0.385 $\mu\text{mol.kg}^{-1}$ day⁻¹, i.p.), propolis (5 mg.kg⁻¹ day⁻¹, p.o.) or Glucantime (33 $\mu\text{mol.kg}^{-1}$ day⁻¹, i.p.) for 4 weeks post lesion appearance. The paw sections (HE) were analyzed for A) number of macrophages, B) % vacuolated macrophages, C) fibroblasts and D) lymphocytes at a final magnification of 200x. The dotted line (--) represents the uninfected control. Bars

represent the mean \pm SEM (n=5-6). Significant difference relative to the infected control */+ P<0.05, **/++ P<0.01 and +++P < 0.0001.67

Figura 6 - Lymphocyte population in paws sections of BALB/c by immunohistochemistry. The treated groups were analyzed by the levels of TCD4+ and TCD8+ in paw sections. The dotted line (--) represents the uninfected control. Bars represent the mean \pm SEM (n=5-6). Significant difference relative to the infected control */+ P<0.05, **/++ P<0.01 and +++P < 0.0001.68

Figura 7 - Effect of I and propolis on cytokines and transcription factor expressed in supernatant of BALB/c macerated paw. After 30 days of treatments, the infected paw was macerated and the levels of A) NF- κ B, B) STAT-3, C) TNF- α , D) IL-10 and E) TGF- β were determined by western blotting. The results represent the mean \pm SEM of three experiment. The dotted line (--) represents the uninfected control. Significant difference relative to infected control */+ P<0.05, **/++ P<0.01, ***/+++P<0.0001.69

Figura 8 - NO was estimated by measuring nitrite levels in supernatant of macerated paw employing the cadmium–copper system followed by Griess reaction. The dotted line (--) represents the uninfected control. The result is expressed as the mean \pm SEM from 5-6 animals per group. +P < 0.05 compared with infected control.....70

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Animal groups and respective treatments.....	64
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BALB/c	Linhagem de Camundongos isogênicos
Bpy	2,2-bipiridina
C57BL/6	Linhagem de Camundongos isogênicos
CR	Receptor de Complemento
DMSO	Dimetilsulfóxido
eNOS	Enzima Óxido Nítrico Sintase Endotelial
FAD	flavina dinucleotídeo
FMN	mononucleótido de flavina
Gp63	Glicoproteína de 63 Kda expressa na superfície de promastigotas e amastigotas
GPI	Glicosilfosfatidilinositol
I	<i>cis</i> -[Ru(bpy) ₂ imN(NO)](PF ₆) ₃
i.p	Intraperitoneal
IL	Interleucina
IL-10	Interleucina-10
IL-13	Interleucina-13
IL-17	Interleucina-17
IL-1β	Interleucina-1 beta
IL-4	Interleucina-4
imN	imidazol coordenado pelo nitrogênio
INF-γ	Interferon gama
iNOS	Enzima Óxido Nítrico Sintase Induzível
<i>L. (L.) major</i>	<i>Leishmania (Leishmania) major</i>
<i>L. (V.) brasiliensis</i>	<i>Leishmania (Viannia) brasiliensis</i>
<i>L. (V.) guyanensis</i>	<i>Leishmania (Viannia) guyanensis</i>
<i>L.(L.) amazonensis</i>	<i>Leishmania (Leishmania) amazonensis</i>
LM	Leishmaniose Mucosa
LMC	Leishmaniose Mucocutânea
LPG	Lipofosfoglicano
LT	Leishmaniose Tegumentar

LTA	Leishmaniose Tegumentar Americana
LV	Leishmaniose Visceral
MAC	Complexo de ataque à membrana
NADPH	nicotinamida-adenina-dinucleótido-fosfato
NF- κ B	Fator de transcrição Nuclear kappa B
nNOS	Enzima Óxido Nítrico Sintase Neuronal
NO	Óxido nítrico
OMS	Organização Mundial da Saúde
p.i	Pós-infecção
p.o	Per oral (via oral)
PBS	phosphate-buffered saline (tampão fosfato)
ROS	Espécies Reativas de Oxigênio
Ru	Rutênio
STAT-3	Transdutor de Sinal e Ativador de Transcrição-3
TCD4 ⁺	Linfócito T CD4 ⁺
TGF- β	Fator beta de crescimento e transformação
Th1	Linfócito T auxiliar tipo 1
Th17	Linfócito T auxiliar tipo 17
Th2	Linfócito T auxiliar tipo 2
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral alfa
TNF- α	Linfócito T auxiliar tipo 1
Treg	Linfócito T regulador
WHO	Organização Mundial da Saúde

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
1.1	ASPECTOS GERAIS DAS LEISHMANIOSES	14
1.2	FORMAS CLÍNICAS DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA.....	15
1.3	AGENTE ETIOLÓGICO E CICLO BIOLÓGICO	16
1.4	INTERAÇÃO PARASITO-HOSPEDEIRO E RESPOSTA IMUNE NA LTA.....	18
1.5	MECANISMOS DE EVASÃO.....	21
1.5.1	Atividade da Enzima Arginase	23
1.6	TRATAMENTO	24
1.7	ÓXIDO NÍTRICO	25
1.7.1	Doadores de Óxido Nítrico na Leishmaniose	27
1.8	PRÓPOLIS	29
1.8.1	Definição, Origem e Composição Química	29
1.8.2	Propriedades Biológicas da Própolis.....	30
2	OBJETIVO	32
2.1	OBJETIVOS.....	32
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	32
3	REFERÊNCIAS	33
4	PRODUÇÃO CIENTÍFICA	45
	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	45
Artigo -	THE ASSOCIATION OF NITRIC OXIDE DONOR AND BRAZILIAN PROPOLIS INCREASES EFFICIENT MACROPHAGES POPULATION ACCELERATING THE HEALING PROCESS OF LESION IN EXPERIMENTAL LEISHMANIASIS.....	46
	ABSTRACT	48
	INTRODUCTION.....	49
	MATERIAL AND METHODS.....	50
	RESULTS.....	54

DISCUSSION.....	56
REFERENCES.....	62
ANEXO	71
ANEXO A – AUTHOR GUIDELINES.....	71

1 INTRODUÇÃO

1.1 ASPECTOS GERAIS DAS LEISHMANIOSES

Leishmanioses são infecções causadas por protozoários pertencentes ao gênero *Leishmania* e transmitidas ao homem por meio da picada de insetos flebotomíneos. É uma antropozoonose de importância mundial na saúde pública, uma vez que representam um complexo de doenças com ampla diversidade epidemiológica, com participação de diversos agentes etiológicos, vetores e hospedeiros no seu ciclo de transmissão (Marinho, 2010). Apresentam-se sob duas formas clínicas: Leishmaniose Tegumentar (LT), com acometimento de pele, cartilagens e/ou mucosa, e, Leishmaniose Visceral (LV), que acomete vísceras, principalmente, baço e fígado (Lainson; Shaw, 1998). Estas manifestações são determinadas pela espécie do parasito e pelo estado imunológico do hospedeiro (Murray et al., 2005; Reithinger et al., 2007).

Nas Américas, a forma cutânea é conhecida como Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) apresentando alta incidência, ampla distribuição e grande complexidade, podendo acarretar lesões destrutivas, desfigurantes e até mesmo incapacitantes (Schriefer et al., 2005; Lonardonni et al., 2006; Monteiro et al., 2008).

A Organização Mundial de Saúde (OMS) insere a leishmaniose na relação de doenças prioritárias, consideradas negligenciadas, uma vez que 350 milhões de pessoas em 88 países vivem sob o risco de desenvolver uma das formas clínicas da doença, sendo considerada, dentre as infecções promovidas pelos protozoários, a segunda mais importante, superada apenas pela malária (Desjeux, 2004; Reithinger et al., 2007; WHO, 2010).

O Brasil é considerado área endêmica de maior extensão territorial da LTA no continente, e um dos países com as maiores taxas de notificação da doença, confirmada em todos os Estados brasileiros tendo como as principais espécies circulantes: *Leishmania (Viannia) braziliensis*, *Leishmania (Leishmania) amazonensis* e *Leishmania (Viannia) shawi*, esta última encontrada apenas na região amazônica (Ministério da Saúde, 2007).

No Estado do Paraná, a LTA é endêmica com notificação em 276 dos 399 municípios, principalmente das regiões norte e oeste. Em 2012, dados do

Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN), confirmam 167 casos notificados no Estado (Ministério da Saúde/SVS - Sistema de Informação de Agravos de Notificação - Sinan Net, 2012).

Apesar dos avanços nos estudos acerca do agente etiológico, bem como dos conhecimentos sobre a doença, é sabido que as medidas de controle, incluindo a atual terapia para a LTA ainda são insatisfatórias, devido principalmente à limitada eficácia, tratamento prolongado, alto custo e efeitos secundários indesejáveis da mesma (Chen et al., 2001; Richard; Werbovetz, 2010).

1.2 FORMAS CLÍNICAS DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA

A LTA é considerada uma enfermidade polimórfica, que atinge a pele e as mucosas, agrupadas em diferentes formas clínicas. Assim, os parasitos ao invadir um hospedeiro mamífero, no local da picada, formam, geralmente, uma única lesão limitada, porém, dependendo da espécie do protozoário e da resposta imune do hospedeiro, a doença pode apresentar amplo espectro de severidade e uma série de formas clínicas. Tais como: cutânea aguda ou localizada; mucocutânea e cutânea difusa (Garnier; Croft, 2002).

A forma cutânea é determinada pelo surgimento de úlceras únicas ou múltiplas na derme, resultando em úlceras leishmanióticas típicas, ou então, evoluindo para formas vegetantes verrugosas. Na forma ulcerativa, o parasito está confinado à pele e a lesão pode apresentar variações de tamanho e formato dependentes do tempo de evolução. Essas lesões são consideradas de fase aguda e são caracterizadas pelo desenvolvimento de nódulos, geralmente no local da picada, que evoluem para lesões ulcerativas indolores, cobertas por uma crosta aderente de exsudato seco. As alterações epidermais, são decorrentes da resposta imunológica à infecção resultando em hiperplasia e espessamento da epiderme (González et al., 2008).

A forma cutânea difusa caracteriza-se pela formação de lesões difusas não ulceradas e distribuídas amplamente na pele, particularmente nas extremidades, onde erupções papulares ou nodulares não ulceradas podem ser observadas. Desta forma, esse tipo de lesão assume caráter crônico e

progressivo que persiste por toda a vida do paciente (Ashford, 2000). No Brasil, o desenvolvimento da forma cutânea difusa é exclusivamente atribuído às infecções por *L. (L.) amazonensis* (Silveira et al., 2009)

A forma cutâneo-mucosa é considerada mais agressiva podendo apresentar lesões destrutivas secundárias de curso crônico, envolvendo mucosas e cartilagens como: nariz, faringe, boca e laringe (Barral et al., 1991; Modabber, 1993). Estima-se que 3 a 5% dos casos de Leishmaniose Cutânea desenvolvam lesão mucosa, visto que a forma clássica de Leishmaniose Mucosa (LM) é secundária à lesão cutânea, devido à má resolução da doença ou pela terapia inadequada. Desta forma, acredita-se que a lesão mucosa é metastática e ocorra por disseminação hematogênica ou linfática com surgimento, geralmente, após a cura clínica da LC, com início insidioso e pouca sintomatologia. O agente etiológico da LM, no Brasil é a *L. (V.) braziliensis*, entretanto há relatos de casos atribuídos à *L. (L.) amazonenses* e *L. (V.) guyanensis* (Oliveira-Neto et al., 1998).

1.3 AGENTE ETIOLÓGICO E CICLO BIOLÓGICO

Os protozoários do gênero *Leishmania* estão inseridos na ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae, compreendendo mais de 30 espécies (Ashford, 2000). Nas Américas, existem pelo menos onze espécies dermatrópicas de *Leishmania*, das quais sete já foram identificadas no Brasil como causadoras de LTA. Destas espécies, seis pertencem ao subgênero *Viannia* - *Leishmania (Viannia) braziliensis*, *Leishmania (Viannia) guyanensis*, *Leishmania (Viannia) lainsoni*, *Leishmania (Viannia) naiffi*, *Leishmania (Viannia) lindenberg*, *Leishmania (Viannia) shawi* - e uma ao subgênero *Leishmania* - *Leishmania (Leishmania) amazonensis* (Ministério da Saúde, 2007).

Estes protozoários são parasitas obrigatórios, unicelulares, heteróxenos, alternando o ciclo biológico entre hospedeiros invertebrados (fêmeas de flebotomíneos, insetos hematófagos da família Psychodidae, dos gêneros *Phlebotomus* no Velho Mundo e *Lutzomyia* no Novo Mundo) e hospedeiros vertebrados mamíferos (Lainson; Shaw, 1987).

No hospedeiro vertebrado encontram-se obrigatoriamente dentro de células do sistema fagocítico, principalmente macrófagos sob a forma amastigota. Sua morfologia celular é arredondada, variando de tamanho entre 2 e 6 µm em extensão e 1,5 e 3 µm de largura, com um flagelo muito reduzido. Localizam-se no interior de vacúolos parasitóforos (ou fagossomos) dos macrófagos formados devido à fagocitose do parasito, onde se multiplicam por divisão binária, rompendo o macrófago e liberando as amastigotas aptas para infectar outros macrófagos (Rey, 2001; Neves et al., 2007).

Ao picar o indivíduo ou animal parasitado, os flebotomíneos ingerem juntamente com o sangue ou a linfa, macrófagos periféricos infectados com amastigotas de *Leishmania*. Uma vez no tubo digestivo do mosquito, essas formas são liberadas e se diferenciam em promastigotas pro cíclicas, formas delgadas com cerca de 1,5 µm de largura e 20 µm de comprimento, com um flagelo típico que emerge da extremidade anterior. Essas formas se multiplicam intensamente por divisão binária e colonizam o tubo digestório do inseto vetor. De acordo com a posição ocupada pelo parasito no inseto do vetor, foram descritos dois subgêneros: *Leishmania* (*Leishmania*), para os parasitos que se aderem ao epitélio do intestino anterior, e *Leishmania* (*Viannia*), para os parasitos que se aderem ao epitélio do intestino posterior. Quando atingem grande número, diferenciam-se em formas promastigotas metacíclicas infectivas, um processo chamado de metaciclogênese, que invadem as porções anteriores do estômago e proventrículo do mosquito. No próximo repasto sanguíneo, ocorre à regurgitação destas formas infectivas em um novo hospedeiro vertebrado, as quais são fagocitadas por macrófagos, formando vacúolos parasitóforos onde se revertem para a forma amastigota e caso consigam evadir-se dos mecanismos microbicidas, dá-se início à multiplicação destas formas, recomeçando o ciclo (Rey 2001; Gupta et al., 2001; Awasthi; Mathur; Saha, 2004) (**Figura 1**).

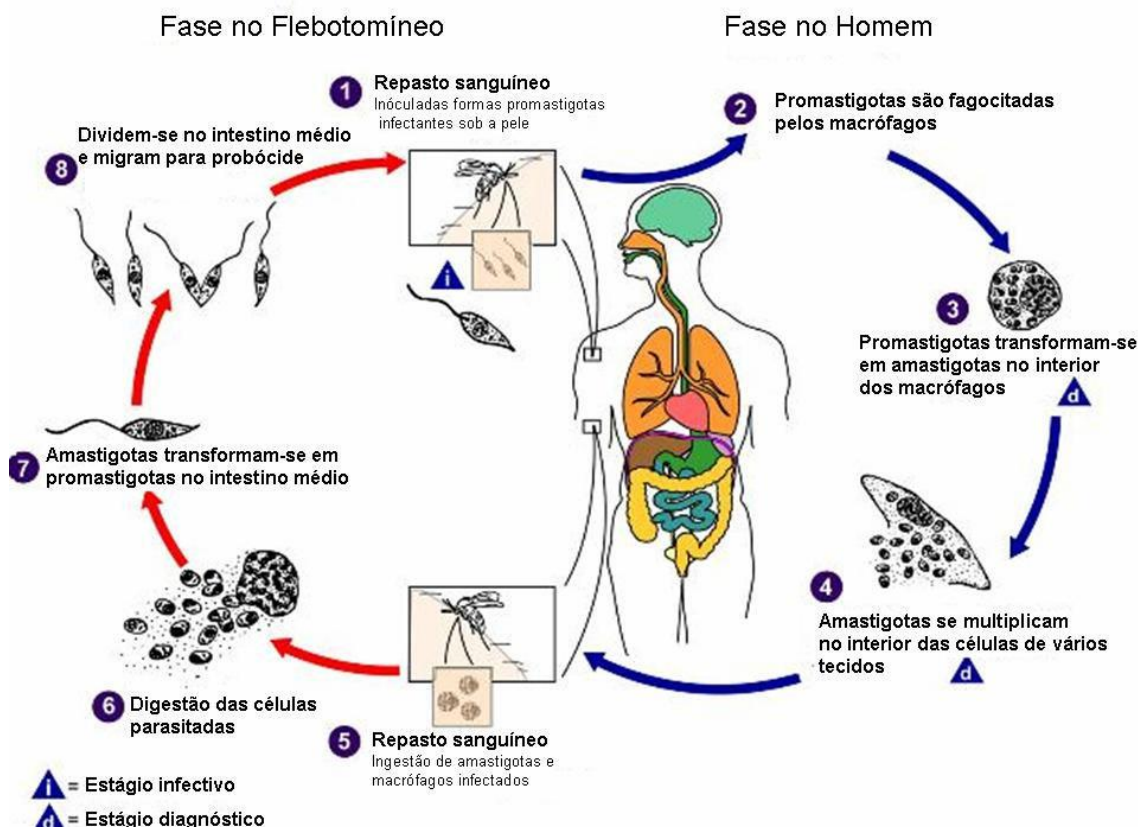


Figura 1- Ciclo biológico de *Leishmania* spp. **Fonte:** Adaptado de Center Diseases Control – CDC, 2009).

1.4 INTERAÇÃO PARASITO-HOSPEDEIRO E RESPOSTA IMUNE NA LTA

O processo de instalação da LTA no hospedeiro é determinado por complexa associação, principalmente entre os fatores relacionados à virulência do parasito e a resposta imunológica do hospedeiro. Tudo tem início quando formas promastigotas metacíclicas, inoculadas na derme do hospedeiro, interagem com proteínas do soro, sistema complemento, saliva e fluidos digestivos do inseto, assim como com os receptores das células hospedeiras. Nesta fase inicial da infecção, um dos grandes desafios do parasito é estabelecer residência no interior dos fagócitos, que compõem a primeira linha de defesa na leishmaniose, sem que estes disparem seus mecanismos de defesas (Genaro, 2005).

No local da picada do inseto, ocorre rápida e intensa migração, seguido de infiltração de neutrófilos e um recrutamento substancial de macrófagos. Os neutrófilos tem como principal função, fagocitar a grande maioria (80 a 90%)

dos parasitas presentes, e produzir quimiocinas e citocinas que influenciam a resposta imune durante a infecção por *Leishmania* (Scapini et al., 2000; Peters et al., 2008).

No entanto, apenas neutrófilos e macrófagos ativados são capazes de eliminar os parasitas intracelulares. Assim, o sucesso ou o fracasso da infecção dependerá do desenvolvimento da resposta imune adaptativa, a qual está intimamente relacionada com o quadro clínico da leishmaniose (Launois et al., 1996). Desta forma, para se entender melhor os fatores que conferem os fenótipos de resistência ou susceptibilidade à infecção por *Leishmania*, estudos mais detalhados sobre a imunidade tem sido realizados em modelos murinos. Infecções por este parasito promovem a ativação específica da resposta imunológica do hospedeiro, caracterizada pelo aumento de células T CD4+, apresentando um perfil de citocinas Th1 ou Th2 (Holzmuller et al., 2006; Reis et al., 2006). Camundongos C57BL/6 infectados com *Leishmania (L.) major* são resistentes à infecção, enquanto que camundongos da linhagem BALB/c são susceptíveis (Sacks; Noben-Trauth, 2002). É sabido que a resistência apresentada pelos camundongos C57BL/6 é estabelecida pela ativação preferencial da subpopulação de linfócitos Th1, que por sua vez produzem várias citocinas, principalmente INF- γ e TNF- α , que em conjunto levam a ativação dos macrófagos, desencadeando o “burst” oxidativo, durante o processo de endocitose do parasito (Pearson; Steigbigel, 1981). Este fenômeno se caracteriza pelo aumento da atividade respiratória da célula, ativando enzimas como a nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidase (NADPH oxidase) que transfere prótons para moléculas de oxigênio, formando moléculas altamente reativas denominadas espécies reativas de oxigênio (ROS) como superóxidos, peróxido de hidrogênio e radicais hidroxila; e aumento na atividade da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS), com consequente aumento na produção de NO, a principal molécula microbicida envolvida na eliminação do parasito (Qadoumi, Becker et al. 2002; Cunningham 2002).

Contudo, embora a resposta Th1 esteja relacionada ao fenótipo de resistência à infecção, alguns estudos tem demonstrado que o aparecimento de lesões leishmanióticas típicas está diretamente relacionado à exacerbação

desta resposta, culminando em dano tecidual importante (Pirmez et al., 1993; Lessa et al., 2001; Laskay et al., 2008; Peters et al., 2008).

Já a ativação preferencial da subpopulação Th2, com produção de IL-4 e IL-13 gera suscetibilidade à infecção (Launois et al., 2002; Awasthi; Mathur; Saha, 2004). Diante da correlação de uma resposta imune polarizada e o resultado da infecção estabeleceu-se o conceito de que o balanço da resposta Th1/Th2 é que determina o resultado clínico da infecção (Roberts, 2006).

Além do perfil Th1/Th2, tem-se demonstrado nos últimos anos a importância das células Th17 e T reguladoras (Tregs) nas infecções por *Leishmania* spp. Células Th17 possuem propriedades pró-inflamatórias e secretam principalmente IL-17. Esta citocina atua principalmente no recrutamento e ativação de neutrófilos, o que contribui para o agravamento da doença (Lopez Kostka et al., 2009). Camundongos BALB/c, considerados susceptíveis à infecção por *Leishmania* spp., produzem níveis mais elevados de IL-17 após a infecção com *L. major*. Trabalhos demonstram que camundongos BALB/c “knockout” para IL-17 apresentam redução no número de neutrófilos, no tamanho das lesões, e na quantidade de parasitos (Lopez Kostka et al., 2009). Sugerindo que as células Th17 estão diretamente relacionadas com o desenvolvimento e agravamento da lesão.

Em contraste, estudos mostram que células T reguladoras (Tregs), provenientes de modelos murinos de leishmaniose cutânea causada por *L. major*, foram capazes de inibir a enfermidade, mesmo em camundongos susceptíveis (Belkaid et al., 2002; Aseffa et al., 2002; Xu et al., 2003; Mendez et al., 2004). O papel protetor das Tregs foi comprovado recentemente por Barth e colaboradores (2012), onde verificaram que a redução da população destas células no início da infecção esta correlacionada com aumento significativo dos níveis de INF- γ e conseqüente agravamento da lesão na leishmaniose cutânea.

É complexa e intrincada a interação parasito-hospedeiro nas infecções experimentais de diferentes linhagens de camundongos com *L. (L.) amazonensis* quando comparada às causadas por *L. (L.) major*, uma vez que diferem em muitos aspectos. Sabe-se que todas as linhagens isogênicas de camundongos desenvolvem lesões progressivas com vacúolos parasitóforos repletos de parasitos em infecção causada por *L. (L.) amazonensis* (Soong et

al., 1997). Para alguns autores, esta susceptibilidade generalizada não está diretamente relacionada à expansão polarizada de células Th2 mas sim à ativação de células T CD4+ que produzem níveis relativamente baixos de IFN- γ , IL-10, IL-17 e outras citocinas (Soong et al, 1997.; Xin et al., 2007). Interessantemente, essa resposta imune não polarizada para os perfis Th1/Th2 observada em camundongos infectados com *L. (L.) amazonensis*, é semelhante à resposta observada em infecções humanas, validando a relevância biológica deste modelo de infecção experimental para o estudo de doenças humanas (Osorio y Fortea et al., 2007; Pereira; Alves, 2008; Silveira et al., 2009).

1.5 MECANISMOS DE EVASÃO

Apesar dos diversos mecanismos microbicidas apresentados pelos hospedeiros, *Leishmania* spp. apresentam estratégias para subverter e escapar da resposta imune. Estudos demonstram como formas promastigotas e amastigotas do parasito em questão são capazes de estabelecer a infecção nos estágios iniciais, interferindo nas principais funções dos macrófagos, como: atividade microbicida, produção de citocinas, apresentação de antígenos e ativação de células T (Racoosin; Beverley, 1997; Matte; Olivier, 2002; Ji et al., 2003).

Em relação aos constituintes da membrana deste parasito, as formas promastigota e amastigota de *Leishmania* variam de acordo com o estágio de desenvolvimento do mesmo. Os promastigotas metacíclicos são revestidos por denso glicocálice. Esta cobertura é quase completamente ausentes nas amastigotas, sugerindo que o revestimento celular em promastigota é uma estrutura de estágio específico que pode ser perdida após a fagocitose e depois da transformação intracelular (Pimenta et al., 1991).

O glicocálice é constituído por glicosilfosfatidilinositol (GPI) ancorado à proteínas, fosfoglicanos, lipofosfoglicano (LPG) e uma família de glicolípídeos livres denominados glicoinositolfosfolípídeos (GIPLs) (Naderer et al., 2004). A proteína mais abundante é a enzima de superfície gp63 (glicoproteína de 63 Kda), também conhecida como metaloproteinase dependente de zinco (MSP)

(Gomez et al., 2009). LPG é a principal molécula em promastigotas composta por unidades repetitivas de dissacarídeo e fosfato. Estudos em modelos experimentais por inoculação de cepas de *Leishmania (L.) major* mutantes que não expressavam as moléculas gp63 ou LPG mostraram redução na virulência da *Leishmania*, indicando importância destas moléculas no estabelecimento da infecção (Joshi et al., 2002).

A presença das moléculas de superfície do parasito estão diretamente envolvidas nestes mecanismos de evasão. O primeiro mecanismo de escape das promastigotas é evitar a lise direta pelo sistema complemento. Durante a metaciclogênese, ocorrem modificações bioquímicas na membrana do parasito, como o alongamento na estrutura do LPG e maior expressão das moléculas de gp63. Estas atuam por fosforilação inativando componentes do sistema Complemento como o C3, C5 e C9, com a subsequente inibição das vias clássica e alternativa do Complemento, dificultando a inserção do complexo C5b-C9 (MAC) (Puentes et al., 1990; McConville et al., 1992). A gp63 também atua na conversão proteolítica na superfície do parasito do C3b para C3bi que funciona como uma opsonina, facilitando a ligação com receptores do Complemento (CR1 e CR3) nos macrófagos (Bogdan et al., 1996 Bogdan; Rollinghoff, 1998).

A ligação aos receptores CR3 e CR1, bem como a entrada do parasito via receptor de manose-fucose, que se liga aos resíduos de manana do LPG não ativam os mecanismos oxidativos microbicidas dos fagócitos, facilitando a entrada do parasito na célula-alvo (Blackwell, 1985; Mosser et al., 1987).

Uma vez no interior das células fagocíticas, os parasitos modulam o micro-ambiente, a fim de estabelecer a infecção. A presença das moléculas de LPG também é responsável pelo atraso na fusão do vacúolo parasitóforo com o lisossomo, permitindo que a forma promastigota transforme-se em amastigota, a qual é mais resistente à ação de NO, ROS e ao pH ácido (Zambrano-Villa et al., 2002; Rodríguez et al., 2011). A presença da gp63 promove a degradação das enzimas lisossomais presentes no fagolisossomo, promovendo a persistência do parasito (Cunningham, 2002).

A infecção por *L. amazonensis* se caracteriza pela formação de um grande vacúolo parasitóforo repleto de parasitos. Wilson e colaboradores (2008) sugerem que estes vacúolos gigantes teriam ação protetora aos

protozoários, diluindo os efeitos leishmanicidas de NO e ROS nas células infectadas. Além disso, essas formas amastigotas são capazes de expor fosfatidilserina em sua superfície. Esta molécula é expressa na superfície de células em apoptose e seu reconhecimento leva a uma desativação dos fagócitos, caracterizada pela expressão das citocinas anti-inflamatórias como TGF- β e IL-10 e inibição da expressão de citocina pró-inflamatória TNF- α (Wanderley et al., 2006; Wanderley ; Barcinski, 2010).

A modulação de citocinas também são mecanismos que auxiliam nas estratégias de escape da defesa do hospedeiro. *Leishmania* spp. assim como outros patógenos intracelulares, são capazes de interferirem em vias de sinalização como o fator de transcrição nuclear κ B (NF- κ B), proteína quinase C (PKC) e proteínas quinases ativadas por mitógeno (MAPK), inibindo a produção de IL-12 e do desenvolvimento da resposta Th1, estimulação da produção das citocinas imunossupressoras IL-10 e TGF- β (Olivier et al., 2005). Também é capaz de reprimir a expressão do complexo principal de histocompatibilidade de classe II (MHC II) ou até mesmo interferir com a carga de antígenos apresentada em MHC II (Fruth et al.,1993; Prine et al.,1993) e diminuir a expressão das moléculas co-estimulatórias como B7 -1 e CD40 (Kaye et al.,1994; Kamanaka et al., 1996; Zambrano-Villa et al., 2002; Olivier et al., 2005; Mougneau et al.,2011).

1.5.1 Atividade da Enzima Arginase

Dentre os mecanismos de escape mais importantes apresentados por estes tripanossomatídeos refere-se à diminuição da atividade da enzima iNOS, responsável pela produção de NO, principal molécula leishmanicida gerada por macrófagos ativados (Bogdan; Rollinghoff 1999).

A produção de NO é dependente da oxidação do aminoácido L-arginina (Traylor; Sharma, 1992) (detalhado no item 1.7). No entanto, a L-arginina é extremamente versátil, servindo como precursor para a síntese de diversos compostos e pode ser modulada tanto por resposta Th1 na qual um aumento na síntese de IFN- γ induz a conversão de L-arginina em NO mediada por iNOS, quanto Th2 que promove a indução da arginase, uma metaloenzima que utiliza esse aminoácido como substrato para produzir L-ornitina e uréia,

modulando a disponibilidade de arginina nas células onde é expressa, levando à diminuição da produção de NO e conseqüentemente comprometendo o papel de defesa do macrófago (Wu;Morris 1998; da Silva et al. 2008).

Além disso, *Leishmania* spp. é capaz de codificar sua própria arginase, competindo diretamente com o hospedeiro pela L-arginina. Assim o parasito utiliza a L-ornitina produzida por si próprio ou pelo hospedeiro para a síntese de poliaminas necessárias para a replicação das amastigotas dentro do vacúolo parasitóforo e assim progressão da infecção (Muleme et al., 2009).

1.6 TRATAMENTO

O tratamento atual da Leishmaniose se baseia na eliminação da forma infectiva (amastigota) de *Leishmania*. Contudo, a localização intramacrofágica desta forma, impossibilita uma atuação mais eficaz dos atuais fármacos. Tal localização do parasito é crucial para a susceptibilidade quimioterápica, que é também influenciada pela presença de transportadores mediadores do influxo e do efluxo de drogas para as células (Rodrigues et al., 2006).

As formas de tratamento têm se baseado no uso de antimônios pentavalentes, como o antimonato de *N*-metil glucamina (Glucantime®) e o estibogluconato de sódio (Pentostam® da Glaxo ou Solustibosan® da Bayer) que apresentam dificuldades de administração, alto custo e importantes efeitos colaterais que incluem mialgia, artralgia, aumento sérico das enzimas hepáticas, pancreatite, disfunção gastrintestinal, dores musculares difusas, enrijecimento das articulações, arritmias, pancitopenia, insuficiência renal reversível e cardiotoxicidade. Aliado a isso, existem relatos de a cura clínica não ser acompanhada de cura parasitológica, pois tem sido observados parasitos na cicatriz de indivíduos após tratamento (Lucumi et al., 1990; Rath et al., 2003; Croft et al., 2005)

Outros fármacos como anfotericina B, pentamidina, miltefosine e a paramomicina têm sido usados como alternativas nos casos de resistência aos antimoniais, mas não possuem um índice terapêutico tão favorável e também apresentam várias reações adversas (Bray et al., 2003; Berman, 2006).

Outras variáveis que influenciam na descoberta de novos fármacos para o tratamento da LTA é a diversidade de espécies de *Leishmania* no Brasil, o que configura quadros clínicos variados, com respostas terapêuticas diversas. Além disso, a desnutrição e as co-infecções (*Plasmodium* sp, HIV, etc) aumentam as taxas de mortalidade em consequência desta patologia (Paredes et al., 2003). Principalmente quando indivíduos apresentam quadro de imunocomprometimento e, portanto, tornam-se incapazes de eliminar os parasitos pelo mecanismo natural de defesa.

Desta forma, o tratamento da LTA representa um grande desafio, porque as drogas disponíveis apresentam elevada toxicidade e nenhuma delas tem demonstrado ser plenamente eficaz (Falqueto; Sessa, 2005). A recidiva, a falha terapêutica em pacientes imunodeprimidos e a resistência ao tratamento são fatores que motivam a busca por fármacos que apresentem ações leishmanicidas mais eficazes e menos tóxicas ao paciente.

Acreditamos que uma terapia potencial para esta parasitose pode ser a doação exógena da molécula leishmanicida NO, através de complexos nitrosilados de rutênio, sem a necessidade de sua síntese a partir da L-arginina por macrófagos. Associada a esta estratégia, os efeitos anti-inflamatórios exercidos pela própolis poderiam resolver os fenômenos fisiopatológicos desta doença além de agir no reparo tecidual das lesões leishmanióticas.

1.7 ÓXIDO NÍTRICO

A produção de NO como uma via efetora comum de defesa contra *Leishmania* spp. tem sido documentada (Green et al., 1990; Melby et al., 1998; Gantt et al., 2001). O NO em seu estado puro, sob condições normais de temperatura e pressão, é um gás com habilidade de difundir-se livremente no meio fisiológico atravessando membranas sem a necessidade de canais ou receptores, podendo colidir aproximadamente 10 bilhões de vezes e deslocar-se entre células por um raio de até 25 μ m em menos de 1 segundo, seu tempo de meia vida (Malinsk et al., 1993; Meleumans, 1994; Lancaster, 2000; Pacher et al., 2007).

Esta molécula executa papéis importantes em diversos processos fisiológicos, tais como, relaxamento da musculatura do endotélio, regulação do sistema vascular e participação no sistema imunológico principalmente como agente microbicida de patógenos intracelulares (Lancaster, 2000).

No organismo, o óxido nítrico é produzido pela oxidação da L-arginina que é convertida a L-citrulina, reação catalisada pelas enzimas NO sintases (NOS) (Traylor; Sharma, 1992). Existem três isoformas conhecidas da NOS sendo duas formas constitutivas dependente de íons cálcio (Ca^{++}) e de calmodulina (eNOS e nNOS) que estão presentes em condições fisiológicas e uma forma indutível (iNOS):

- Óxido Nítrico Sintase endotelial –(eNOS ou NOS3) gera os menores níveis de NO e foi originalmente descoberto no endotélio vascular, mas também é encontrada em neurônios, células epiteliais e cardiomiócitos (Dudzinski; Michel, 2007). Está intimamente relacionada com as forças físicas importantes na função vascular, como tensão de cisalhamento induzida por fluxo sanguíneo (Kone et al.,2003; Sessa, 2004).

- Óxido Nítrico Sintase neuronal (nNOS ou NOS1) é constitutivamente presente em neurônios, músculo esquelético e células epiteliais (Kone et al.,2003).

- Óxido Nítrico Sintase induzível (iNOS ou NOS2) apresenta maior capacidade para gerar NO. Esta isoforma é expressa em vários tipos de células incluindo macrófagos, neutrófilos e fibroblastos, em resposta a estímulos inflamatórios, tais como endotoxinas e citocinas e está permanentemente ativa quando expressa, ou seja, é independente de Ca^{2+} /calmodulina (Kone et al.,2003; Kleinert et al., 2004).

A síntese de NO, envolve duas etapas. Na primeira, ocorre a hidroxilação de um dos nitrogênios guanidinos da L-arginina para gerar NG-hidroxi-L-arginina (NHA). Esta reação utiliza NADPH e oxigênio (O_2) e, provavelmente, envolve o complexo heme da NOS. Na segunda etapa, ocorre a conversão da NHA em NO e L- citrulina (Dusse et al.,2003) (**Figura 2**).

A iNOS remove de forma oxidativa o átomo de nitrogênio guanidino terminal de L-arginina. Uma vez expressa a atividade da iNOS depende não só da presença da L-arginina, mas também dos cofatores NADPH, FAD, FMN e tetrabiopterina (Fukuto, 1995; Stuehr,1997).

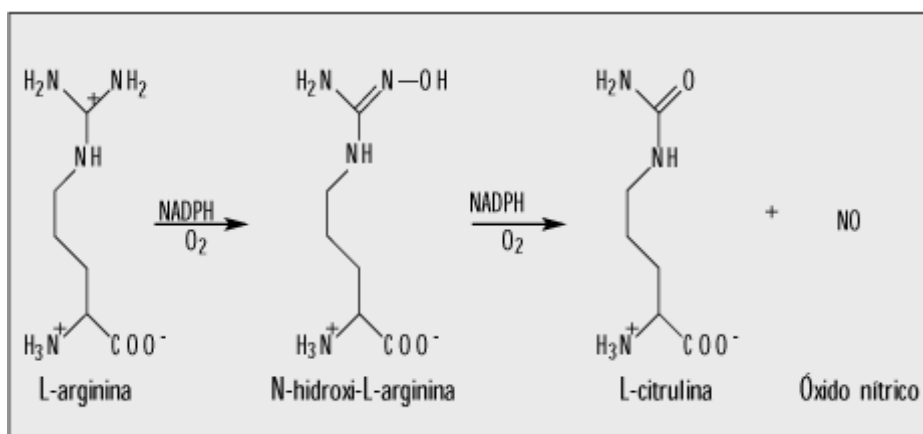


Figura 2- Reação catalisada por iNOS. **Fonte:** Dusse et al., 2003.

No sistema imunológico, o NO é produzido em quantidades significativas durante a resposta inflamatória por macrófagos e outras células do sistema imune, que expressam a iNOS. Esta síntese é estimulada por citocinas inflamatórias como TNF- α , IFN- γ , IL-1 e IL-2, por produtos bacterianos (LPS), e outras citocinas (Jorrens et al., 1995). O NO gerado pode associar-se com o ânion superóxido (O₂⁻), oriundo do “burst respiratório” para formar o peroxinitrito (ONOO⁻), um potente agente oxidante de proteínas, lipídeos de membrana e DNA (Marletta, et al., 1988). Por outro lado, citocinas como TGF- β , IL-4, IL-10 e IL-3 podem inibir a iNOS, consequentemente a produção de NO por macrófagos ativados (Jorrens et al., 1995).

1.7.1 Doadores de Óxido Nítrico na Leishmaniose

Como descrito no item 1.5.1 *Leishmania* spp. é capaz de sintetizar sua própria enzima arginase, competindo diretamente pela L-arginina, levando a diminuição da produção de NO. Assim, uma alternativa seria o uso de doadores exógenos de NO capazes de liberar estas moléculas de forma controlada, não necessitando da arginina para sua síntese.

Estudos mostraram que doadores de NO utilizados contra formas promastigotas e amastigotas de *Leishmania* inibem a respiração mitocondrial do parasito (Mauël et al., 1997, Souza et al, 2006). Salvati e colaboradores (2001) mostraram que culturas de promastigotas de *L. infantum* tratadas por uma hora com a molécula doadora de NO, S-nitroso-N-acetilpenicilamina

(SNAP), apresentaram 90% de redução no número de parasitos. Holzmuller e colaboradores (2002) exibiram este mesmo índice de redução em culturas axênicas de amastigotas de *L. amazonensis* quando incubadas com albumina nitrosilada (NO-BSA). A ação do nitroprussiato de sódio, *in vitro*, também foi relatada sobre formas promastigotas e amastigotas axênicas de *L. amazonensis* apresentando uma redução no número de parasitos de maneira dependente da concentração (Genestra et al., 2008).

O estudo com complexos metálicos de rutênio como liberadores de NO em meio fisiológico tem aumentado nos últimos anos. Moléculas de NO podem ser acopladas a uma molécula de rutênio formando tetraaminas de rutênio nitrosiladas. Estes compostos são metalofármacos promissores visto que são solúveis em água e estáveis em solução aquosa na presença de oxigênio. Além disto, estes compostos exibem baixa toxicidade *in vitro* (células V79) e *in vivo* (Rodriguez et al., 1997; Torsoni et al., 2002; Silva et al. 2007).

Resultados *in vitro* e *in vivo* utilizando compostos *trans*-[RuNO(NH₃)₄L]₃, (X = BF₄⁻ ou PF₆⁻ e L = imN, 4-pic, pz, py, P(OEt)₃, L- hist, isn, imC, nic, SO₃²⁻) contra *Trypanosoma cruzi*, demonstraram que estes são ativos contra o parasita sem promover danos a célula hospedeira (Silva et al., 2007). Este mesmo composto apresentou efeito leishmanicida contra *L. major* *in vitro* e *in vivo* reduzindo em 98% a carga parasitária além de diminuir o tamanho das lesões leishmanióticas em camundongos BALB/c (Melo Pereira et al., 2010).

Estes doadores de NO além de sua ação microbicida apresentaram efeito na atenuação do processo inflamatório em alguns modelos experimentais. Guedes e colaboradores (2010) demonstraram que o tratamento com o *trans*-[RuCl([15] aneN₄)NO]^{+ 2} sozinho ou associado com benznidazol foram eficazes contra *Trypanosoma cruzi* e promoveu a redução da resposta inflamatória no tecido cardíaco aumentando a sobrevivência do hospedeiro. O tratamento com *cis*-[Ru(bpy)₂(NO)SO₃](PF₆) apresentou efeito fungicida e diminuiu a inflamação no modelo de paracoccidiodomicose experimental (Pavanelli et al. 2011).

Associado a ação microbicida e anti-inflamatória do NO, esta molécula exerce um papel fundamental durante todo o processo de reparação tecidual incluindo angiogênese, deposição de matriz extracelular e remodelação do

tecido (Luo; Shen, 2005; Isenberg et al., 2005; Soneja et al., 2005; Broughton et al., 2006).

1.8 PRÓPOLIS

1.8.1 Definição, Origem e Composição Química

A própolis é uma substância resinosa, coletada e produzida por abelhas, através da coleta de diversas partes das plantas, como dos ramos, flores, pólen, brotos e exsudados de árvores (Bankova, 2005). A palavra própolis tem origem grega e significa “em defesa (pro) da cidade (polis)” (Ghisalberti, 1979). Esta substância é utilizada para a construção e manutenção das colmeias atuando como agente esterilizante, em vedação das paredes, proteção, além de ajudar na termorregulação (Salatino et al., 2005).

No Brasil, várias espécies tem sido consideradas fontes vegetais para a síntese da própolis. Sendo *Araucaria angustifolia* (Bertolini) Otto Kuntze (“pinheiro-do-Paraná”), *Baccharis dracunculifolia* D.C. (“alecrim do campo”) e *Eucalyptus citriodora* Hook as principais fontes vegetais visitadas por abelhas africanizadas (*Apis mellifera* L.) no sudeste do Brasil, com preferência por *B. dracunculifolia* como fonte vegetal de própolis (Bankova et al., 1999; Teixeira et al., 2005).

Em geral, própolis *in natura* é composta por 30% de cera, 50% resina e bálsamos vegetais, 10% óleos aromáticos e essenciais, 5% pólen, e 5% de outras substâncias (Burdock, 1998; Bankova et al., 2000). A coloração da própolis pode variar entre amarelo claro e vermelho escuro, passando pelo verde e marrom, dependendo de fatores como: a origem vegetal e composição química (Salatino et al., 2005). As substâncias presentes na propolis geralmente não aparecem na secreção coletada pelas abelhas, mas sim como resultado de modificações enzimáticas após secreção das glândulas salivares ou da adição de cera e novos compostos, durante a elaboração da resina bruta coletada (Burdock, 1998). Em sua composição química, já foram identificados mais de 300 compostos sendo os principais componentes biologicamente ativos na própolis brasileira: ácidos diterpênicos e ácidos *p*-cumáricos prenilados, chalconas, ácido benzoico, benzoaldeído, alcoóis, acetona,

compostos fenólicos, ácido cinâmico, ácido cafeico e derivados, di- e triterpenos (de Castro, 2001).

1.8.2 Propriedades Biológicas da Própolis

O grande número de componentes químicos encontrados na própolis pode justificar a existência de inúmeras atividades biológicas atribuídas a esse produto, ou mesmo ao sinergismo entre alguns de seus componentes (Sforcin, 2009). Dentre as principais propriedades biológicas encontram-se as atividades: antibacteriana (Sforcin et al., 2000; Gonsales et al., 2006; Scazzocchio et al., 2006), antiviral (Vynograd et al., 2000), antifúngica (Murad et al., 2002; Dota et al., 2011) anti-inflamatória (Hu et al., 2005; Machado et al., 2012) e imunomodulatória (Sforcin et al., 2007).

Em relação à atividade antimicrobiana, muitos autores têm relatado estudos *in vitro* da atividade da própolis frente diferentes microorganismos, como *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* Thyphimurium, *Candida albicans*, *Trypanosoma cruzi*, *Giardia duodenalis* e *Leishmania (Viannia) braziliensis* (Higashi; Castro, 1994; Marcucci et al., 2001; Miorin et al., 2003; Uzel et al., 2005; Dantas et al., 2006; Freitas et al. 2006; Salomão et al., 2011; Silva et al. 2013).

Esta atividade tem sido atribuída a presença dos flavonóides e ácidos cafeico, benzóico e cinâmico capazes de atuar na membrana ou parede celular do microorganismo, causando danos funcionais e estruturais (Sforcin et al., 2000; Castaldo; Capasso, 2002; Scazzocchio et al., 2005).

Os efeitos anti-inflamatórios e imunomoduladores de substâncias naturais tem sido considerados como terapias alternativas para o tratamento de diversas doenças. No caso da própolis, sabe-se que este composto é capaz de diminuir a intensidade da resposta inflamatória inibindo ou modulando fatores envolvidos neste processo como citocinas, quimiocinas e prostaglandinas, em diferentes modelos experimentais (Khayyal et al., 2003; Hu et al. 2005; Paulino et al., 2006).

A própolis apresentou efeito inibitório na produção dos mediadores NO e prostaglandinas (Hu et al., 2005; Tan-No et al., 2006) e diminuiu a síntese de citocinas pró-inflamatórias como IL-1 β , INF- γ IL-6 e IL-12 em modelos murinos

(Orsatti et al., 2010; Missima et al., 2010). Compostos isolados também apresentam funções anti-inflamatórias como o éster fenético do ácido cafeico (CAPE) que é capaz de inibir a expressão de iNOS, TNF- α , leucotrienos e prostaglandinas devido a inibição da ciclooxigenase (COX) e afetar a ativação do fator de transcrição nuclear NF- κ B (Natarajan et al., 1996; Shin et al., 2004)

Ansorge e colaboradores (2003) demonstraram que a própolis apresenta efeito inibitório sobre a proliferação de células mononucleares do sangue periférico (PBMC) e células T humanas, reduz a síntese de citocinas pro inflamatórias IL-1 β , IL-12, IL-2 e IL-4 e induz a síntese de TGF- β .

Embora a própolis apresente ação anti-inflamatória, dependendo do modelo experimental e das condições adotadas, este produto pode apresentar ação estimuladora. Em relação à imunidade inata, a ação da própolis sobre macrófagos aumentou a capacidade fagocítica com indução da produção de H₂O₂ (Orsi et al., 2000), estimulação da secreção de citocinas, tais como TNF- α , além de melhorar a ação microbicida (Dimov et al., 1992; Ivanovska *et al.*, 1995 ; Orsi *et al.*, 2000; Khayyal *et al.*, 2003; Silva et al., 2013).

Alguns estudos tem relatado também o importante papel da própolis na cicatrização de lesões em modelos animais evidenciando a reparação tecidual, neo-formação vascular, seguida de rápida regeneração do tecido. Assim, foi demonstrado que o uso da própolis em feridas diminuiu o tempo de cicatrização, acelerou o processo de regeneração tissular além de oferecer recuperação dos tecidos lesionados por sua ação antimicrobiana e anti-inflamatória (Bernardo et al., 1990; Peruchi et al., 2001; Barroso et al., 2012).

Neste contexto, o presente trabalho apresenta resultados obtidos da terapia associada: composto de rutênio doador de óxido nítrico *cis*-[Ru(bpy)₂imN(NO)](PF₆)₃ e extrato hidroalcoólico da própolis brasileira em infecção experimental de camundongos BALB/c com formas promastigotas de *L. amazonensis*.

2 OBJETIVO

2.1 OBJETIVOS

Avaliar o efeito da terapia associada: *cis*-[Ru(bpy)₂imN(NO)](PF₆)₃ e extrato hidroalcoólico de própolis brasileira na leishmaniose experimental.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar toxicidade hepática em camundongos BALB/c submetidos ao tratamento com a associação I e própolis.
- Analisar o desenvolvimento da lesão dos grupos de camundongos BALB/c infectados com *L. amazonensis* tratados ou não com a associação terapia associada I e própolis.
- Avaliar o processo de hiperalgesia em camundongos BALB/c infectados com *L. amazonensis* e tratados com I + própolis.
- Analisar quantitativamente e qualitativamente o perfil celular encontrado na lesão dos camundongos infectados após o tratamento ou não com a associação através das técnicas de Hematoxilina/Eosina (HE) e Imunohistoquímica.
- Determinar os níveis de fatores de transcrição (STAT-3 e NF-κB) e citocinas (TNF-α, IL-10 e TGF-β) no tecido lesionado de camundongos BALB/c infectados com *L. amazonensis*, tratados ou não com a associação I e própolis por *western blotting*
- Quantificar os níveis de óxido nítrico pelo método de Griess (Cádmio), no tecido da pata infectada após o tratamento com a terapia associada.

3 REFERÊNCIAS

ANSORGE, S.; REINHOLD, D.; LENDECKEL, U. Propolis and some of its constituents down-regulate DNA synthesis and inflammatory cytokine production but induce TGF-beta1 production of human immune cells. **Z Naturforsch C**. 58(7-8), 580-9, 2003.

ASEFFA, A.; GUMY, A.; LAUNOIS, P.; MACDONALD, H. R.; LOUIS, J. A.; TACCHINI-COTTIER, F. The early IL-4 response to *Leishmania major* and the resulting Th2 cell maturation steering progressive disease in BALB/c mice are subject to the control of regulatory CD4+CD25+ T cells. **J. Immunol**. 169, 3232–3241, 2002.

ASHFORD, R. W. The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. **Int J Parasitol**. 30(12-13), 1269-1281, 2000.

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

BANKOVA V, BOUDOUROVA-KRASTEVA G, SFORCIN JM, FRETE X, KUJUMGIEV A, MAIMONI-RODELLA R, POPOV S. Phytochemical evidence for the plant origin of Brazilian **propolis** from São Paulo state. **Z Naturforsch C**. 54(5-6), 401-5, 1999.

BANKOVA, V.; CASTRO, S.L.; MARCUCCI, M.C. Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. **Apidologie** 31, 3–15. 2000.

BANKOVA, V. Recent trends and important developments in propolis research. **Evid Based Complement Alternat Med**. 2(1), 29-32, 2005.

BARRAL, A.; PEDRAL-SAMPAIO, D.; GRIMALDI JUNIOR, G.; MOMEN, H.; MCMAHON-PRATT, D.; JESUS, A. R.; ALMEIDA, R.; BADARO, R.; BARRAL-NETTO, M.; CARVALHO, E. M. Leishmaniasis in Bahia, Brazil: evidence that *Leishmania amazonensis* produces a wide spectrum of clinical disease. **Am J Trop Med Hyg**. 44(5), 536-46, 1991.

BARROSO, P. R.; LOPES-ROCHA, R.; PEREIRA, E. M.; MARINHO, S. A.; DE MIRANDA, J.L.; LIMA, N. L.; VERLI, F. D. Effect of propolis on mast cells in wound healing. **Inflammopharmacology**. 20(5), 289-94, 2012.

BARTH, T.; SCHMIDT, D.; BOTTERON, C.; NGUYEN, T. T. T.; RITTER, U.; Männel, D. N.; Lechner, A. An Early Reduction in Treg Cells Correlates with Enhanced Local Inflammation in Cutaneous Leishmaniasis in CCR6-Deficient Mice. **Plos One** 7(9), e44499. doi:10.1371/journal.pone.0044499, 2012.

BELKAI, Y.; PICCIRILLO, C. A.; MENDEZ, S.; SHEVACH, E. M.; SACKS, D. L. CD4+ CD25+ regulatory T cells control *Leishmania major* persistence and immunity. **Nature**. 420, 502–507, 2002.

BERMAN, J. Visceral leishmaniasis in the New World & Africa. **Indian J Med Res** 123, 289-294, 2006.

BERNARDO, C. L. E.; SOUZA, I. A. F.; COLAVITTI, C.; GARCIA, C. Própolis: cicatrizante e antibiótico natural. **Rev Bras Enferm.** 43(1/4),101-6. 1990.

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

BOGDAN, C., ROLLINGHOFF, M. The immune response to *Leishmania*: mechanisms of parasite control and evasion. **Inter J Parasitol.** 28 (1),121-134, 1998.

BOGDAN, C.; GESSNER, A.; WERNER, S.; RÖLLINGHOFF, M. Invasion, control and persistence of *Leishmania* parasites. **Cur Opin Immunol.** 8, 517-525, 1996.

BRAY, P. G.; BARRET, M. P.;WARD,S. A.; DE-KOING, H. P. Pentamidine uptake and resistance in pathogenic protozoa: past, present and future. **Trends Parasitol.**, 19(5), 223-239, 2003.

BROUGHTON, G.; JANIS, J. E.; ATTINGER, C. E. The basic science of wound healing. **Plast Reconstr Surg.** 117, 12S-34S, 2006.

BURDOCK, G.A. Review of the biological properties and toxicity of bee propolis (propolis). **Food and Chemical Toxicology.** 36, 347–363. 1998.

CASTALDO, S.; CAPASSO, F. Propolis, an old remedy used in modern medicine. **Fitoterapia.** 73 Suppl 1.S1-6, 2002.

CHEN, M.; ZHAI, L.; CHRISTENSEN, S. B.; THEANDER, T. G.; KHARAZMI, A. Inhibition of Fumarate Reductase in *Leishmania major* and *L. donovani* by Chalcones. **Antimicrob. Agents Chemother.** 45, 2023-2029, 2001.

CROFT, S. L.; BARRETT, M. P.; URBINA, J. A. Chemotherapy of trypanosomiasis and leishmaniasis **Trends Parasitol.** 21(11), 508-12, 2005

CUNNINGHAM, A. C. Parasitic adaptive mechanisms in infection by *Leishmania*. **Exp Mol Pathol** 72, 132-141, 2002.

DA SILVA, E. R.; DA SILVA, M. F.; FISCHER, H.; MORTARA, R. A.; MAYER, M. G.; FRAMESQUI, K.; SILBER, A. M.; FLOETER-WINTER, L. M. Biochemical and biophysical properties of a highly active recombinant arginase from *Leishmania amazonensis* and subcellular localization of native enzyme. **Mol BiochemParasitol.** 159,104-111, 2008.

DANTAS, A .P.; SALOMÃO, K.; BARBOSA H. S.; DE CASTRO S. L. The effect of Bulgarian propolis against *Trypanosoma cruzi* and during its interaction with host cells. **Men Inst Oswaldo Cruz.**101, 207-211, 2006.

DE CASTRO, S.L. Propolis: biological and pharmacological activities. Therapeutic uses of this bee-product. **Ann Rev Biomed Sci.** 3, 49–83. 2001

DESJEUX, P. Leishmaniasis. **Nat. Rev. Microbiol.** 2 (9), 692, 2004.

DIMOV, V.; IVANOVSKA, N.; BANKOVA, V.; POPOV, S. Immunomodulatory action of propolis: IV. Prophylactic activity against Gram-negative infections and adjuvant effect of the water-soluble derivate. **Vaccine**.10(12), 817-823, 1992.

DOTA, K. F.; CONSOLARO, M. E.; SVIDZINSKI, T. I.; BRUSCHI, M. L. Antifungal Activity of Brazilian Propolis Microparticles against Yeasts Isolated from Vulvovaginal Candidiasis. **Evid Based Complement Alternat Med**. 2011:201953, 2011.

DUDZINSKI, D. M.; MICHEL, T. Life history of eNOS: partners and pathways. **Cardiovasc. Res**. 75, 247–260, 2007.

DUSSE, L. M. S.; VIEIRA, L. M.; CARVALHO, M. G. Revisão sobre óxido nítrico. **J. Bras. Patol. Med. Lab**. 39(4), 343-350, 2003.

FALQUETO, A.; SESSA, P.A. Leishmaniose tegumentar americana. In: VERONESI, R.; FOCACCIA, R. **Tratado de Infectologia**. (3a Ed). Sao Paulo: Atheneu, 1543-1557, 2005.

FREITAS, S. F.; SHINOHARA, L.; SFORCIN, J. M.; GUIMARÃES, S. *In vitro* effects of propolis on *Giardia duodenalis* trophozoites. **Phytomedicine**.13, 170-175, 2006.

FRUTH, U.; SOLIOZ, N.; LOUIS, J. A. Leishmania major interferes with antigen presentation by infected macrophages. **J. Immunol**.150, 1857-1864, 1993.

FUKUTO, J.M.; CHAUDHURI, G. Inhibition of constitutive and inducible nitric oxide synthesis: potential selective inhibition.. **Annu. Rev. Pharm Toxic.**, 35, 165-194, 1995.

GANTT, K.R.; GOLDMAN, T.L.; MCCORMICK, M.L.; MILLER, M.A.; JERONIMO, S.M.; NASCIMENTO, E.T.; BRITIGAN, B.E.; WILSON, M.E. Oxidative responses of human and murine macrophages during phagocytosis of *Leishmania chagasi*. **J Immunol**.167, 893-901, 2001.

GARNIER, T.; CROFT, S. L. Topical treatment for cutaneous leishmaniasis. **Curr. Opin. Investig. Drugs**. 3(4), 538-544, 2002

GENARO, O. Leishmaniose Tegumentar Americana. In: Neves DP, Melo AL, Linardi PM, Vitor RWA. **Parasitologia Humana**. 11 ed. São Paulo: Atheneu, p.41-83, 2005.

GENESTRA M.; SOARES-BEZERRA R. J.; GOMES-SILVA L.; FABRINO D. L.; BELLATO-SANTOS T.; CASTRO-PINTO D. B.; CANTO-CAVALHEIRO M. M.; LEON L. L. In vitro sodium nitroprusside-mediated toxicity towards *Leishmania amazonensis* promastigotes and axenic amastigotes. **Cell Biochem Func**. 26, 709–717, 2008.

GHISALBERTI, E. L. Propolis: A review. **Bee World** 60 (2): 59-84. 1979.

GOMEZ, M. A.; CONTRERAS, I.; HALLÉ, M.; TREMBLAY, M. L.; MCMASTER, R. W.; OLIVIER, M. *Leishmania* GP63 Alters Host Signaling Through Cleavage-Activated Protein Tyrosine Phosphatases. **Sci. Signal**. 2(90) 58. 2009.

GONSALES, G. Z.; ORSI, R. O.; FERNANDES, JR A.; RODRIGUES, P.; FUNARI, S. R. C. Antibacterial activity of propolis collected in different regions of Brazil. **J Venom Anim Toxins incl Trop Dis**. 12, 276-84. 2006.

GONZALEZ, U.; PINART, M.; REVEIZ, L.; ALVAR, J. Interventions for Old World cutaneous leishmaniasis. **Cochrane Database Syst Rev.** 2008.

GREEN, S.J.; MELTZER, M.S.; HIBBS, J.B.; NACY, C.A. Activated macrophages destroy intracellular *Leishmania major* amastigotes by an L-arginine-dependent killing mechanism. **J Immunol.** 144, 278-283, 1990.

GUEDES, P. M.; OLIVEIRA, F. S.; GUTIERREZ, F. R.; DA SILVA, G. K.; RODRIGUES, G. J.; BENDHACK, L. M.; FRANCO, D. W.; DO VALLE M. A.; ZAMBONI, D. S.; DA SILVA, R. S.; SILVA, J. S. Nitric oxide donor *trans*-[RuCl([¹⁵]aneN)NO] as a possible therapeutic approach for Chagas' disease. **British J Pharmacol**, 160, 270–282, 2010.

GUPTA, N.; NOYAL, N.; RASTOGI, A. K. *In vitro* cultivation and characterization of axenic amastigotes of *Leishmania*. **Trends Parasitol.** 17(3), 150-153, 2001.

HIGASHI, K.O.; DE CASTRO, S.L. Propolis extracts are effective against *Trypanosoma cruzi* and have an impact on its interaction with host cells. **J Ethnopharmacol.** 43, 149-155, 1994.

HOLZMULLER, P.; BRAS-GONÇALVES, R.; LEMESRE, J. R. Phenotypical characteristics, biochemical pathways, molecular targets and putative role of nitric oxide-mediated programmed cell death in *Leishmania*. **Parasitology**, 132, 19-32, 2006.

HOLZMULLER, P.; SERENO, D.; CAVALEYRA, M.; MANGOT, I.; DAULOUEDE, S.; VINCENDEAU, P.; LEMESRE, J. L. Nitric oxide-mediated proteasome-dependent oligonucleosomal DNA fragmentation in *Leishmania amazonensis* amastigotes. **Infect. Immun.**, 70(7), 3727-35, 2002.

HU, F.; HEPBURN, H. R.; LI, Y.; CHEN, M.; RADLOFF, S. E.; DAYA S. Effects of ethanol and water extracts of **propolis** (bee glue) on acute inflammatory animal models. **J Ethnopharmacol.** 100(3), 276-83, 2005.

ISENBERG, J. S.; RIDNOUR, L. A.; ESPEY, M. G.; WINK, D. A.; ROBERTS, D. D. Nitric oxide in wound-healing. **Microsurgery.** 25, 442–451, 2005.

IVANOVSKA, N.D.; DIMOV, V.B.; PAVLOVA, S.; BANKOVA, V.S.; POPOV, S.S. Immunomodulatory action of propolis. V. Anticomplementary activity of a water-soluble derivate. **J Ethnopharmacol.** 47, 135-143, 1995.

JI, J.; SUN, J.; SOONG, L. Impaired expression of inflammatory cytokines and chemokines at early stages of infection with *Leishmania amazonensis*. **Infect Immun**, 71, 4278-4288, 2003.

JORRENS, P.G.; MATHYS, K.E.; BULTS, H. Modulation of nitric oxide synthase activity in macrophages. **Med. Inflamm.**, 4; 75-89, 1995.

JOSHI, P. B.; SACKS, D. L.; MODI, G.; MCMASTER, W. R. Targeted gene deletion of *Leishmania major* genes encoding developmental stage-specific leishmanolysin (GP63). **Mol. Microbiol.** 27, 519–530, 2002.

KAMANAKA, M., YU, P; YASUI, T.; YOSHIDA, K; KAWABE, T.; HORII, T.; KISHIMOTO, T.; KIKUTANI, H. Protective role of CD40 in *Leishmania major* infection at two distinct phases of cell-mediated immunity. **Immunity.** 4 , 275-281, 1996.

KAYE, P. M.; ROGERS, N. J.; CURRY, A. J.; SCOTT, J. C. Deficient expression of co-stimulatory molecules on Leishmania-infected macrophages. **Eur. J. Immunol.** 24, 2850-2854, 1994.

KHAYYAL, M.T.; EL-GHAZALY, M.A.; EL-KHATIB, A.S.; HATEM, A.M.; VRIES, P.J.F.; EL-SHAFEI, S.; KHATTAB, M.M. A clinical pharmacological study of the potential beneficial effects of a propolis food product as an adjuvant in asthmatic patients. **Fund Clin Pharmacol.** 17, 93-102, 2003.

KLEINERT, H.; PAUTZ, A.; LINKER, K.; SCHWARZ, P. M. Regulation of the expression of inducible nitric oxide synthase. **Eur J Pharmacol.** 500(1-3), 255-66, 2004

KONE, B. C.; KUNCEWICZ, T.; ZHANG, W.; YU, Z. Y. Protein interactions with nitric oxide synthases: controlling the right time, the right place, and the right amount of nitric oxide. **Am. J. Physiol. Renal Physiol.** 285, F178–F190

LAINSON, R.; SHAW, J. J. Evolution, classification and geographical distribution. The leishmaniasis in biology and medicine. Ed. PETERSW, LILLICK-KENDRICK R. vol. 1, cap.7, pp1-120. **Academic Press Inc.**, London, England. 1987.

LAINSON, R.; SHAW, J. J. New World Leishmaniasis – The Neotropical *Leishmania* Species. **Topley & Wilson's Microbiology and Microbial Infections**, 9th ed., Vol. 5 Parasitology, Arnold, London, 242-266, 1998.

LANCASTER, J.R. The physiological properties of nitric oxide. Determinants of the dynamics of NO in tissue. Nitric Oxide. **Academic Press**, 209-223, 2000.

LASKAY, T.; VAN ZANDBERGEN, G.; SOLBACH, W. Neutrophil granulocytes as host cells and transport vehicles for intracellular pathogens: apoptosis as infection-promoting factor. **Immunobiology** 213 (3-4), 183-191, 2008.

LAUNOIS, P.; GUMY, A.; HIMMELRICH, H.; LOCKSLEY, R.M.; ROCKEN, M.; LOUIS, J.A. Rapid IL-4 production by Leishmania homolog of mammalian RACK1-reactive CD4+ T-cells in resistance mice treated once with anti-IL-12R or IFN- γ antibodies at the onset of infection with Leishmania major instructs Th2 cell development, resulting in nonhealing lesions. **J. Immunol.** 168,4628-4635, 2002.

LAUNOIS, P.; SWIHART, K.; CONCEICAO-SILVA, F.; MILON, G.; LOUIS, J.A. T-cell responses elicited by *Leishmania major* in mice. In: Molecular and Immune mechanisms in the pathogenesis of cutaneous leishmaniasis. Eds. Tapia, F.J.; Caceres-Dittmar, G. & Sanches, M.A., 4032-4039, 1996.

LESSA, H. A.; MACHADO, P.; LIMA, F.; CRUZ, A. A.; BACELLAR, O.; GUERREIRO, J.; CARVALHO, E. M. Successful treatment of refractory mucosal leishmaniasis with pentoxifylline plus antimony. **Am J Trop Med Hyg.** 65,87-89, 2001.

LONARDONI, M. V.; SILVEIRA, T. G.; ALVES, W. A.; MAIA-ELKHOURY, A. N.; MEMBRIVE, U. A.; MEMBRIVE, N. A.; RODRIGUES, G.; REIS, N.; ZANZARINI, P. D.; ISHIKAWA, E.; TEODORO, U.. Human and canine American cutaneous leishmaniasis in Mariluz, Parana State, Brazil. **Cad Saude Publica.** 22(12), 2713-2716, 2006.

LOPEZ KOSTKA, S.; DINGES, S.; GRIEWANK, K.; IWAKURA, Y.; UDEY, M. C.; VON STEBUT, E. IL-17 promotes progression of cutaneous leishmaniasis in susceptible mice. **J. Immunol.** 182, 3039–3046, 2009.

LUCUMI, A.; ROBLEDO, S.; GAMA, V.; SARAVIA, N. G. Sensitivity of *Leishmania viannia panamensis* to pentavalent antimony is correlated with the formation of cleavable DNA-protein complexes. **Antimicrob Agents Chemother** 42, 1990–1995, 1998.

LUO, J. D.; CHEN, A. F. Nitric oxide. A newly discovered function on wound healing. **Acta Pharmacol Sin.** 26, 259–264, 2005.

MACHADO, J. L.; ASSUNÇÃO, A. K.; DA SILVA, M. C.; DOS REIS, A. S.; COSTA, G. C.; ARRUDA, D. D. E. S.; ROCHA, B. A.; VAZ, M. M.; PAES, A. M.; GUERRA, R. N.; BERRETTA, A. A.; DO NASCIMENTO, F. R. Brazilian green propolis: anti-inflammatory property by an immunomodulatory activity. **Evid Based Complement Alternat Med.** 2012:157652, 2012.

MALINSKI, T.; TAHA, Z.; GRUNFELD, S.; PATTON, S.; KAPTURCZAK, M.; TOMBOULIAN, P. Diffusion of nitric oxide in the aorta wall monitored in situ by porphyrinic microsensors. **Biochem Biophys Res Commun.** 193(3), 1076-82, 1993.

MARCUCCI, M.C. FERRERES, F.; GARCIA-VIGUEIRA, C.; BANKOVA, V.S.; DE CASTRO, S.L.; DANTAS, A.P.; VALENTE, P.H.M.; PAULINO, N. Phenolic compounds from Brazilian propolis with pharmacological activities. **J Ethnopharmacol.** 74,105-112, 2001.

MARINHO-JUNIOR, J.F. Infecção Natural por *Leishmania* spp. em Pequenos Mamíferos Silvestres e Sinantrópicos Envolvidos na Manutenção da Leishmaniose Tegumentar Americana em Área Endêmica da Zona Da Mata Norte de Pernambuco, Brasil, Dissertação (Mestrado Acadêmico em Saúde Pública) – Fundação Oswaldo Cruz, p.77 2010

MARLETTA, M. A.; YOON, P. S.; IYENGAR, R.; LEAF, C.D.; WISHNOK, J. S. Macrophage oxidation of L-arginine to nitrite and nitrate: nitric oxide is an intermediate. **Biochemistry.** 27(24),8706-11,1988.

MATTE, C.; OLIVIER, M. Leishmania-induced cellular recruitment during the early inflammatory response: modulation of proinflammatory mediators. **J Infect Dis.** 185, 673-681, 2002.

MAUËL, J.; RANSIJN, A. *Leishmania* spp.: mechanisms of toxicity of nitrogen oxidation products. **Exp Parasitol.** 87, 98-111, 1997.

MCCONVILLE, M. J.; TURCO, S. J.; FERGUSON, M. A. J; SACKS, D. L. Developmental modification of lipophosphoglycan during the differentiation of *Leishmania*-major promastigotes to an infectious stage. **EMBO J.** 11, 3593-3600, 1992.

MELBY PC; YANG Y; CHENG J; ZHAO W. Regional difference in the cellular immune response to experimental cutaneous or visceral infection with *L. donovani*. **Infect Immun.** 66; 18-27, 1998.

MELO PEREIRA, J. C.; CARREGARO, V.; COSTA, D. L.; SANTANA DA SILVA, J.; CUNHA, F. Q.; FRANCO, D. W. Antileishmanial activity of ruthenium(II)tetraammine nitrosyl complexes. **Eur J Med Chem.** 45(9), 4180-4187, 2010.

MENDEZ, S.; RECKLING, S. K.; PICCIRILLO, C. A.; SACKS, D.; BELKAID, Y. Role for CD4(+) CD25(+) regulatory T cells in reactivation of persistent leishmaniasis and control of concomitant immunity. **J Exp Med.** 200(2), 201-10, 2004.

MEULEMANS, A. Diffusion coefficients and half-lives of nitric oxide and N-nitroso-L-arginine in rat cortex. **Neurosci Lett.** 171(1-2), 89-93, 1994.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde.** – 2. ed. atual. – Brasília : Editora do Ministério da Saúde. (Serie A. Normas e Manuais Técnicos) 180, 2007.

MIORIN, P.L.; LEVY JUNIOR, N.C.; CUSTODIO, A.R.; BRETZ, W.A.; MARCUCCI, M.C. Antibacterial activity of honey and propolis from *Apis mellifera* and *Tetragonisca angustula* against *Staphylococcus aureus*. **J Appl Microbiol.** 95, 913-920, 2003.

MISSIMA, F.; PAGLIARONE, A. C.; ORSATTI, C. L.; ARAÚJO, J. P. JR; SFORCIN, J. M. The Effect of propolis on Th1/Th2 cytokine expression and production by melanoma-bearing mice submitted to stress. **Phytother Res.** 24(10), 1501-7, 2010.

MODABBER, F. Leishmaniasis. In: Tropical Diseases Research Progress 1991-1992. **World Health Organization.** Geneve, 77-87, 1993.

MONTEIRO, W. M.; NEITZKE, H. C.; LONARDONI, M. V. C.; SILVEIRA, T. G. V.; FERREIRA, M. E. M. C. TEODORO, U. Distribuição geográfica e características epidemiológicas da leishmaniose tegumentar americana em áreas de colonização antiga do Estado do Paraná, Sul do Brasil. **Cad Saúde Pública.** 24 (6), 1291-1303, 2008.

MOSSER, D. M.; EDELSON, P. J. The third component of complement (C3) is responsible for the intracellular survival of *Leishmania major*. **Nature.** 327(6120), 329-331, 1987.

MOUGNEAU E.; BIHL F.; GLAICHENHAUS N. Cell biology and immunology of *Leishmania*. **Immunol Rev.** 240, 286–296, 2011.

MULEME H. M.; REGUERA R. M.; BERARD A.; AZINWI R.; JIA P.; OKWOR I. B.; BEVERLEY S.; UZONNA J. E. Infection with arginase-deficient *Leishmania major* reveals a parasite number-dependent and cytokine-independent regulation of host cellular arginase activity and disease pathogenesis. **J Immunol.** 183, 8068–8076, 2009.

MURAD, J. M.; CALVI, S. A.; SOARES, A. M.; BANKOVA, V.; SFORCIN, J. M. Effects of propolis from Brazil and Bulgaria on fungicidal activity of macrophages against *Paracoccidioides brasiliensis*. **J Ethnopharmacol.** 79(3), 331-4, 2002.

MURRAY, H. W.; BERMAN, J. D.; DAVIES, C. R.; SARAVIA, N. G. Advances in Leishmaniasis. **Lancet** 366, 1561–1577, 2005.

NADERER, T.; VINCE, J. E.; MC CONVILLE, M. J. Surface determinants of *Leishmania* parasites and their role in infectivity in the mammalian host. **Curr. Mol. Med.** 4, 649-665, 2004.

NATARAJAN, K.; SINGH, S.; BURKE, T. R.; GRUNBERGER, D.; AGGARWAL, B. B. Caffeic acid phenethyl ester is a potent and specific inhibitor of activation of nuclear transcription factor NF-kappa B. **Proc Natl Acad Sci USA.** 93, 9090–9095, 1996.

NEVES, D. P.; MELO, A. L.; LINARDI, P. M.; VITOR, R. W. A. **Parasitologia Humana.** 12 ed. São Paulo: Editora Atheneu; 2011.

OLIVEIRA-NETO, M. P.; MATTOS, M.; DA SILVA, C.; DE SOUZA, F.; FERNANDES, O.; PIRMEZ, C. Leishmaniasis recidiva cutis in New World cutaneous leishmaniasis. **Int J Dermatol.** 37(11), 846–849, 1998.

OLIVIER, M.; GREGORY, D.J.; FORGET, G. Subversion Mechanisms by which *Leishmania* Parasites can Escape the Host Immune Response: a Signaling Point of View. **Clin. Microbiol. Rev.** 18, 293-305, 2005.

ORSATTI, C. L.; MISSIMA, F.; PAGLIARONE, A. C.; SFORCIN, J. M.; Th1/Th2 cytokines' expression and production by propolis-treated mice. **J Ethnopharmacol.** 129(3), 314-8, 2010.

ORSI, R.O.; FUNARI, S.R.C.; SOARES, A.M.V.C.; CALVI, S.A.; OLIVEIRA, S.L.; SFORCIN, J.M.; BANKOVA, V. Immunomodulatory action of propolis on macrophage activation. **J Venom Anim Toxins incl Trop Dis.** 6, 205–219, 2000.

OSORIO Y FORTEA, J.; PRINA, E.; DE LA LLAVE, E.; LECOEUR, H.; LANG, T.; MILON, G. Unveiling pathways used by *L. amazonensis* amastigotes to subvert macrophage function. **Immunol Rev.** 219, 66–74, 2007.

PACHER, P.; BECKMAN, J. S.; LIAUDET, L. Nitric Oxide and Peroxynitrite in Health and Disease. **Physiol Rev.** 87, 315–424, 2007.

PAREDES, R.; CLOTET, B. New antiretroviral drugs and approaches to HIV treatment. **AIDS.** 17 Suppl 4, S85-96, 2003.

PAULINO, N.; TEIXEIRA, C.; MARTINS, R.; SCREMIN, A.; DIRSCH, V. M.; VOLLMAR, A. M.; ABREU, S. R.; DE CASTRO, S. L.; MARCUCCI, M. C. Evaluation of the analgesic and anti-inflammatory effects of a Brazilian green propolis. **Planta Med.** 72(10), 899-906, 2006.

PAVANELLI W. R.; DA SILVA, J. J.; PANIS, C.; CUNHA, T. M.; COSTA, I. C.; DE MENEZES, M. C.; OLIVEIRA, F. J.; LOPES, L. G.; CECCHINI, R.; CUNHA, F. Q.; WATANABE, M. A.; ITANO, E. N. Experimental chemotherapy in paracoccidiodomycosis using ruthenium NO donor. **Mycopathologia**, 172(2), 95-107, 2011.

PEARSON, R. D.; STEIGBIGEL, R. T. Phagocytosis and killing of the protozoan *Leishmania donovani* by human polymorphonuclear leukocytes. **J Immunol.** 127(4), 1438-1443, 1981 .

PEREIRA, B. A. S.; ALVES, C. R.; Immunological characteristics of experimental murine infection with *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. **Vet Parasitol**, 158, 239-255, 2008.

PERUCHI, C. M. S.; SILVA, E. B.; ANDRADE, R. A.; FRANCO, S. L.; RAMATHO, L. T. O. Efecto del propóleos en la cicatrización de lesiones subcutáneas inducidas en el dorso de ratones: estudio histológico. **Rev Fac Odontol Univ Chile.** 19(2), 23-34, 2001.

PETERS, N. C.; EGEN, J. G.; SECUNDINO, N.; DEBRABANT, A.; KIMBLIN, N.; KAMHAWI, S.; LAWYER, P.; FAY, M. P.; GERMAIN, R. N.; SACKS, D. *In vivo* imaging reveals an essential role for neutrophils in leishmaniasis transmitted by sand flies. **Science** 321, 970-973, 2008.

- PIMENTA, P. F. TURCO, S. J.; MCCONVILLE, M. J.; LAWYER, P. G.; PERKINS, P. V.; SACKS, D. L. Stage-specific adhesion of *Leishmania* promastigotes to the sandfly midgut. **Science**. 256 (5065), 1812-1815, 1992.
- PRINA, E.; JOUANNE, C.; DE SOUZA, L. S.; SZABO, A.; GUILLET, J. G.; ANTOINE, J. C. Antigen presentation capacity of murine macrophages infected with *Leishmania amazonensis* amastigotes. **J. Immunol.**151, 2050-2061, 1993.
- PUNTES, S. M.; SILVA, R. P.; SACKS, D. L.; HAMMER, C. H.; JOINER, K. A. Serum resistance of metacyclic stage *Leishmania major* promastigotes is due to release of C5b-9. **Immunol.** 145, 4311-4316, 1990.
- QADOUMI, M.; BECKER, I.; DONHAUSER, N.; ROLLINGHOFF, M.; BOGDAN, C. Expression of inducible nitric oxide synthase in skin lesions of patients with American cutaneous leishmaniasis. **Infect Immun.**70, 4638–4642, 2002.
- RACOOSIN, E. L.; BEVERLEY, S. M. *Leishmania major*: promastigotes induce expression of a subset of chemokine genes in murine macrophages. **Exp Parasitol.** 85, 283-295,1997.
- RATH, S; TRIVELIN, L.A; IMBRUNITO, T.R; TOMAZELA, D.M; JESÚS, M.N; MARZAL, P.C, Antimoniais empregados no tratamento da leishmaniose; estado da arte. **Química nova** 26(4), 550-555, 2003.
- REIS, L. C.; BRITO, M. E. F.; SOUZA, M. A.; PEREIRA, V. R. A. Mecanismo imunológico da resposta celular e humoral na Leishmaniose Tegumentar Americana. **Rev Pat Trop.** 35(2), 103-115, 2006.
- REITHINGER, R.; DUJARDIN, J. C.; LOUZIR, H.; PIRMEZ, C.; ALEXANDER, B.; BROOKER, S. Cutaneous leishmaniasis. **Lancet Infect. Dis.** 7, 581–596, 2007.
- REY, L. **Parasitologia**. 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 182-225. 2001.
- RICHARD, J. V.; WERBOVETZ, K. A. New Antileishmanial Candidates and Lead Compounds. **Curr. Opin. Chem. Biol.** 14, 1-9, 2010.
- ROBERTS, M. T. M.; Current understandings on the immunology of leishmaniasis and recent developments in prevention and treatment. **British Medical Bulletin**,75-76, 115–130, 2006.
- RODRIGUES, A. M.; HUEB, M.; SANTOS, T.A.R.R.; FONTES, C. J. F. Fatores Associados ao Insucesso do Tratamento da Leishmaniose Cutânea com Antimoniato de Meglumina. **Rev Soc Bras Med Trop.** 39(2)139-145, 2006.
- RODRIGUEZ, J. A.; SOUZATORSONI, A. ; HAUN, M. ; Franco DW . Cytotoxic Evaluation Of New Synthesized Ruthenium Nitrosyl Compounds.. In: XXVI Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 1997, Caxambú. **Livro de Resumos da XXVI Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular**, 32, 1997.
- RODRÍGUEZ, N. E.; DIXIT, P. G.; ALLEN, L-A. H.; WILSON, M. E. Stage-specific pathways of *Leishmania infantum chagasi* entry and phagosome maturation in macrophages. **Plos One**, 28, 6 (4): e19000, 2011.
- SACKS, D.; NOBEN-TRAUTH, N. The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice. **Nat. Rev. Immunol.** 2,845-858, 2002.

SALATINO, A.; TEIXEIRA, E.W.; NEGRI, G.; MESSAGE, D. Origin and chemical variation of Brazilian propolis. **Evid Based Complement Alternat Med** 2,33–38, 2005.

SALOMÃO, K.; DE SOUZA, E. M.; HENRIQUES-PONS, A.; BARBOSA, H. S.; DE CASTRO, S. L. Brazilian Green Propolis: Effects In Vitro and In Vivo on *Trypanosoma cruzi*. **Evid Based Complement Alternat Med**. 2011:185918, 2011.

SALVATI, L.; MATTU, M.; COLASANTI, M.; SCALONE, A.; VENTURINI, G.; GRADONI, L.; ASCENZI, P. NO donors inhibit *Leishmania infantum* cysteine proteinase activity. **Biochim. Biophys. Acta**, 1545(1-2), 357-66, 2001.

SCAPINI, P. J.; LAPINET-VERA, A.; GASPERINI, S. The neutrophil as a cellular source of chemokines. **Immunol Rev**. 177, 195–203, 2000.

SCAZZOCCHIO, F.; D'AURIA, F. D.; ALESSANDRINI, D.; PANTANELLA, F. Multifactorial aspects of antimicrobial activity of propolis. **Microbiol Res**. 161(4), 327-33, 2006.

SCHRIEFER, A. L. F.; SOUSA, R. S.; GUIMARÃES, L. H.; GÓES-NETO, A., ALBERT SCHRIEFER, A. Papel do Parasita e do Hospedeiro na Expressão Clínica das Leishmanioses. **Gaz. Med. Bahia** 75(1), 46-56, 2005.

SESSA, W. C. eNOS at a glance. **J Cell Sci**. 117(Pt 12), 2427-9, 2004.

SFORCIN, J. M. Propolis and the immune system: a review. **J Ethnopharmacol**. 113, 1-14. 2007.

SFORCIN, J. M. Própolis e Imunidade - Comprovações Científicas. São Paulo, Ed. UNESP, p.67, 2009.

SFORCIN, J.M.; FERNANDES, J.R.A.; LOPES, C.A.M.; BANKOVA, V.; FUNARI, S.R.C. Seasonal effect on Brazilian propolis antibacterial activity. **J Ethnopharmacol**. 73, 243–249, 2000.

SHIN, K. M.; KIM, I. T.; PARK, Y. M.; HA, J.; CHOI, J. W.; PARK, H. J.; LEE, Y. S.; LEE, K T .Anti-inflammatory effect of caffeic acid methyl ester and its mode of action through the inhibition of prostaglandin E2, nitric oxide and tumor necrosis factor-alpha production. **Biochem Pharmacol**. 68(12),2327-36, 2004.

SILVA, 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. **British J Pharmacol**.152,112-121, 2007.

SILVA, S. S.; THOMÉ, G. D. S.; CATANEO, A. H. D.; MIRANDA, M. M.; FELIPE,i.; ANDRADE, C. G. T. J.; WATANABE, M. A. E.; PIANA,G. M.; SFORCIN, J. M.; PAVANELLI, W. P.; CONCHON-COSTA, I. Brazilian propolis with Leishmanicidal and immunomodulatory activities: Effect on *Leishmania (Viannia) braziliensis* promastigotes and production of TNF- α by macrophages. **Evid Based Complement Alternat Med**. 2013(in press).

SILVEIRA, F. T.; LAINSON, R.; DE CASTRO GOMES, C. M.; LAURENTI, M. D.; CORBETT, C. E. Immunopathogenic competences of *Leishmania (V.) braziliensis* and *L. (L.) amazonensis* in American cutaneous leishmaniasis. **Parasite Immunol.** 31, 423-431, 2009.

SISTEMA DE INFORMAÇÃO DE AGRAVOS DE NOTIFICAÇÃO (Brasil). LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA - **Casos confirmados Notificados no Sistema de Informação de Agravos de Notificação - Sinan Net.** Disponível em: <http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/tabnet/tabnet?sinannet/Ita/bases/Itabrnet.def>. Acesso em 20 março de 2012.

SONEJA, A., DREWS, M., MALINSKI, T. Role of nitric oxide, nitroxidative and oxidative stress in wound healing. **Pharmacol Rep.** 57, 108–119, 2005.

SOONG, L.; CHANG, C. H.; SUN, J.; LONGLEY, B. J.; RUDDLE, JR. N. H.; FLAVELL, R. A.; MCMAHON-PRATT, D. Role of CD4+ T cells in pathogenesis associated with *Leishmania amazonensis* infection. **J Immunol** 158,5374-83, 1997.

SOUZA, G. F. P.; YOKOYAMA-YASUNAKA, J. K. U.; SEABRA, A. B.; MIGUEL, D. C.; OLIVEIRA, M. G.; ULIANA, S. R. B. Leishmanicidal activity of primary S-nitrosothiols against *Leishmania major* and *Leishmania amazonensis*: Implications for the treatment of cutaneous leishmaniasis. **Nitric Oxide.** 15, 209-216, 2006.

STUEHR, D.J. Structure-function aspect nitric oxide syntase. **Rev Pharmacol. Toxicol.** 37, 339-359, 1997.

TAN-NO, K.; NAKAJIMA, T.; SHOJI, T.; NAKAGAWASAI, O.; NIIJIMA, F.; ISHIKAWA, M.; ENDO, Y.; SATO, T.; SATOH, S.; TADANO, T. Anti-inflammatory effect of propolis through inhibition of nitric oxide production on carrageenin-induced mouse paw edema. **Biol Pharm Bull.** 29(1), 96-9, 2006.

TEIXEIRA, E. W.; NEGR, I. G.; MEIRA, R. M.; MESSAGE, D.; SALATINO, A. Plant Origin of Green Propolis: Bee Behavior, Plant Anatomy and Chemistry. **Evid Based Complement Alternat Med.** 2(1), 85-92, 2005.

TORSONI A.S.; BARROS, B.F.; TOLEDO, J.C., HAUN, M.; KRIEGER, M.H.; TFOUNI, E.; FRANCO, D.W. Hypotensive properties and acute toxicity of trans-[Ru(NH₃)₄P(OEt)₃(NO)](PF₆)₃, a new nitric oxide donor. **Nitric Oxide.** 6, 247-354, 2002.

TRAYLOR, T. G.; SHARMA, V. S. Why NO? **Biochemistry.** 31(11), 2847-9, 1992.

UZEL, A.; SORKUN, K.; ONCAG, O.; COGULU, D.; GENÇAY, O.; SALIH, B. Chemical compositions and antimicrobial activities of four different Anatolian propolis samples. **Microbiol Res.**160, 189-195. 2005.

VYNOGRAD, N.; VYNOGRAD, I.; SOSNOWSKI, Z. A comparative multicentre study of the efficacy of propolis, acyclovir and placebo in the treatment of genital herpes (HSV). **Phytomedicine.** 7, 1–6, 2000.

WANDERLEY, J. L.; BARCINSKI, M. A. Apoptosis and apoptotic mimicry: the *Leishmania* connection. **Cell. Mol. Life Sci.** 67, 1653–1659, 2010.

WANDERLEY, J. L.; MOREIRA, M. E.; BENJAMIN, A.; BONOMO, A. C.; BARCINSKI, M. A. Mimicry of apoptotic cells by exposing phosphatidylserine participates in the establishment of amastigotes of *Leishmania (L) amazonensis* in mammalian hosts. **J. Immunol.** 176, 1834–1839, 2006.

WILSON, J.; HUYNH, C.; KENNEDY, K. A.; WARD, D. M.; KAPLAN, J.; ADEREM, A.; ANDREWS, N. W. Control of parasitophorous vacuole expansion by LYST/Beige restricts the intracellular growth of *Leishmania amazonensis*. **PLoS Pathog.** 4, e1000179, 2008.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Control of the Leishmaniasis. WHO **Technical Reports Series**. 201, 2010.

WU, G.; MORRIS, JR. S. M. Arginine metabolism: nitric oxide and beyond. **Biochem.** 1-17, 1998.

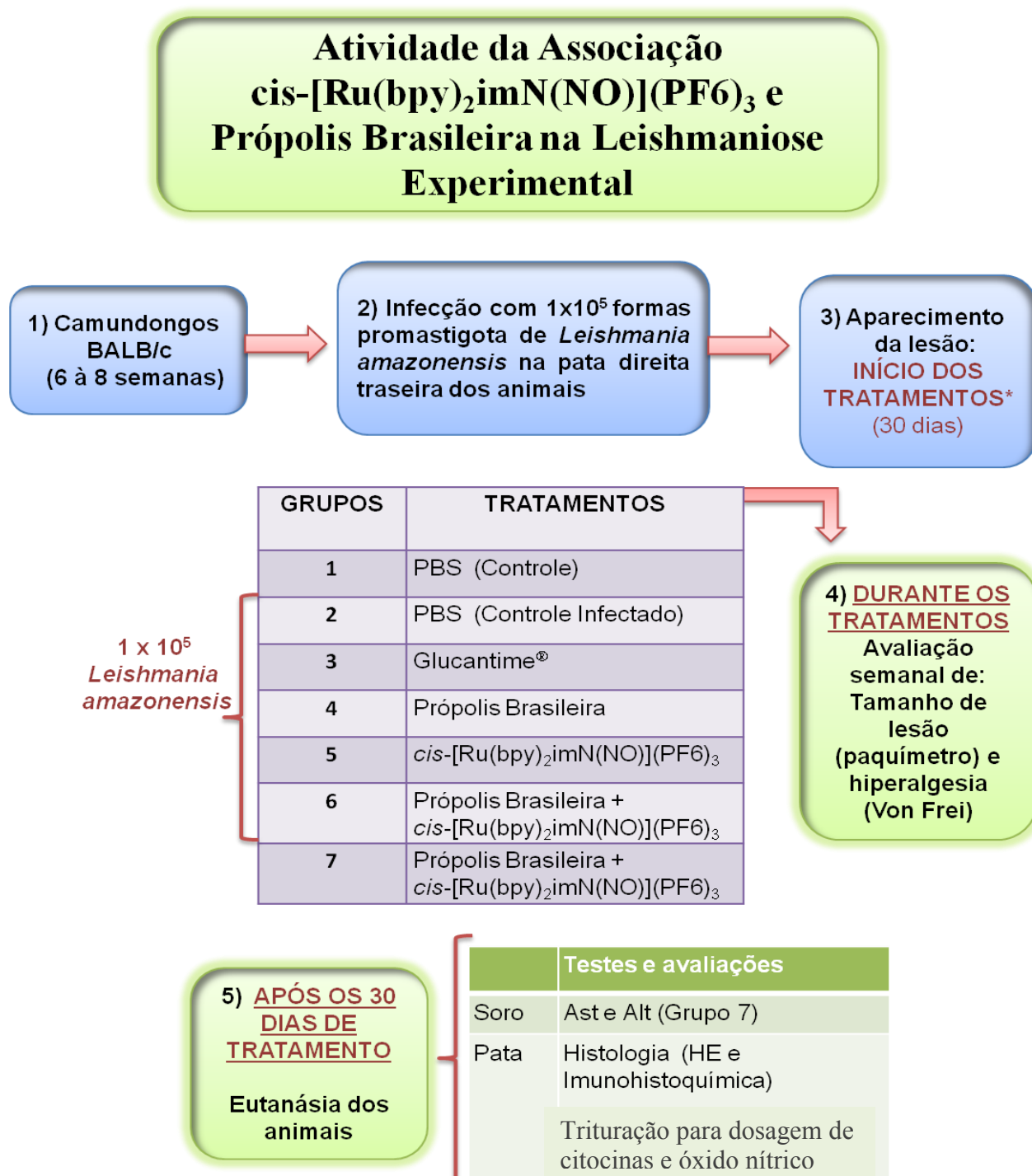
XIN L., Li Y., SOONG L. Role of interleukin-1 β in activating the CD11chigh CD45RB-dendritic cell subset and priming *Leishmania amazonensis*-specific CD4⁺ T cells in vitro and in vivo. **Infect. Immun.** 75, 5018–5026, 2007.

XU, D.; LIU, H.; KOMAI-KOMA, M.; CAMPBELL, C.; MCSHARRY, C.; ALEXANDER, J.; LIEW, F. Y. CD4+CD25+ regulatory T cells suppress differentiation and functions of Th1 and Th2 cells, *Leishmania* major infection, and colitis in mice. **J. Immunol.** 170, 394–399, 2003.

ZAMBRANO-VILLA, S.; ROSALES-BORJAS, D.; CARRERO, J. C.; ORTIZ-ORTIZ, L. How protozoan parasites evade the immune response. **Trends Parasitol.** 18, 272–278, 2002.

4 PRODUÇÃO CIENTÍFICA

DELINEAMENTO EXPERIMENTAL



Artigo Científico a ser submetido à Revista

Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine (eCAM)

THE ASSOCIATION OF NITRIC OXIDE DONOR AND BRAZILIAN PROPOLIS INCREASES THE EFFICIENCY OF MACROPHAGES ACCELERATING THE HEALING PROCESS OF LESION IN EXPERIMENTAL LEISHMANIASIS

Milena M. Miranda, Carolina Panis, Allan Henrique Depieri Catâneo, Suelen Santos da Silva, Ana Carla Zarpelon, Waldiceu Aparecido Verri Junior, Eduardo José de Almeida Araújo, José Maurício Sforcin, Luiz Gonzaga de França Lopes, Jean Jerley Nogueira da Silva, Ivete Conchon-Costa, Wander Rogério Pavanelli.

The association of nitric oxide donor and Brazilian propolis increases the efficiency of macrophages accelerating the healing process of lesion in experimental leishmaniasis

Milena M. Miranda^a, Carolina Panis^a, Allan Henrique Depieri Catâneo^a, Suelen Santos da Silva^a, Ana Carla Zarpelon^a, Waldiceu Aparecido Verri Junior^a, Eduardo José de Almeida Araújo^b, José Maurício Sforcin^c, Luiz Gonzaga de França Lopes^d, Jean Jerley Nogueira da Silva^e, Ivete Conchon-Costa^a, Wander Rogério Pavanelli^{a,*}.

Department of Pathology Science^a, CCB, State University of Londrina-UEL, Londrina, PR, Brazil

Department of Histology^b, CCB, State University of Londrina-UEL, Londrina, PR, Brazil

Department of Microbiology and Immunology^c, Biosciences Institute- UNESP, Botucatu, SP, Brazil

Department of Organic and Inorganic Chemistry^d, Federal University of Ceará, CE, Brazil

Department of Chemistry^e State University of Roraima - UERR, Roraima, RR, Brazil

Potential conflicts of interest: None reported

Financial support: CAPES, Fundação Araucária/SETI, FAEPE-UEL

*Corresponding author: Wander Rogério Pavanelli

E-mail: wanderpavanelli@uel.br or wanderpavanelli@yahoo.com.br

Universidade Estadual de Londrina-UEL-Rodovia Celso Garcia Cid

Campus Universitário, Cx. Postal 6001, CEP 86051-990 - Londrina – PR.

Tel: +055-43-3371-4539

ABSTRACT

Due to the parasite acquired resistance to available treatments and the high toxicity of these drugs, there has been an increase in the search for new therapies for the treatment of American Tegumentary Leishmaniasis. In this study, BALB/c mice were infected in the hindpaw with *Leishmania (Leishmania) amazonensis* and subsequently treated with the association of nitric oxide (NO) donor (cis-[Ru(bpy)₂imN(NO)](PF₆)₃) (**I**) and Brazilian propolis. Histological and immunological effects were investigated and the results demonstrated that this therapy increased efficiency of macrophages decreasing the number of these parasited cells. In addition, these drugs associated were able to induce wound healing, leading to control the evolution of BALB/c cutaneous lesions. These results were reinforced by cytokines measurement at the lesion site. The treatment with combined therapy for 30 days caused a reduction in the expression of the proinflammatory cytokine TNF- α and increased expression of TGF- β 1. Overall, our experimental findings suggest that the association of NO donor **I** and Brazilian propolis displays activity in the resolution of lesions caused by *L. amazonensis* in susceptible mice and can be used as a candidate for the development of new approaches on treatment of leishmaniasis.

Key Words: NO donor, propolis, leishmaniasis

INTRODUCTION

Leishmania (Leishmania) amazonensis is an obligatory intracellular parasite of mammal cells and the causative agent of Tegumentary American Leishmaniasis. The infection occurs through the bite of infected phlebotomine sandfly and may result in various clinical manifestations ranging from a single granulomatous lesion of skin at the bite site to diffuse lesions, may or not affects the mucous membranes or even progress for visceral disease¹. These manifestations caused by this parasite species will depend mainly on the host immune response^{1,2}.

The antiparasitic agent of first choice in Brazil since the 40s is Glucantime[®] (N-methyl glucamine antimoniate); however, despite being used against all forms of leishmaniasis, it presents serious limitations in the clinical practice³.

Experimental models have shown that the outcome of *Leishmania* infection is critically dependent on the activation of one of the two subsets of CD4 T cells⁴. The susceptibility to this disease is assigned to a Th2 immune response, which leads to development and multiplication of the parasite⁵. On the other hand, the resistance is established by preferential activation of Th1 subpopulation of lymphocytes, which produce IFN- γ and TNF- α , which together lead to activation of macrophages, increased activity of inducible nitric oxide synthase (iNOS) and NADPH oxydase, with consequent increase the production of nitric oxide (NO) and reactive oxygen species (ROS), respectively⁵⁻⁷. Among the microbicidal mechanisms presented by phagocytic cells, the production of NO has been cited as the most important for *Leishmania* spp.².

Nevertheless, *Leishmania* presents numerous escape mechanisms⁸. For instance, it can reduce NO production by macrophages increasing the expression of arginase enzyme, which acts in the cleavage of L-arginine (precursor of NO production)⁹⁻¹¹. Therefore, the parasite can multiply and escape of the microbicidal actions of the host and on attempt to eliminate it and control the infection, there is an intense activation of many defense mechanisms resulting in a strong inflammatory response, increasing the tissue damage and exacerbation of injury¹².

Some authors have presented synthetic or natural substances with leishmanicidal and even anti-inflammatory capacity as an alternative to conventional treatment. The therapy with exogenous compounds that donate NO can be an important strategy for the treatment of leishmaniasis. Some studies had already reported that NO donors can inhibit the mitochondrial respiration in amastigote and promastigote forms of

Leishmania, promoting the killer of parasite^{13,14}. In this sense, Ruthenium NO donor complexes have emerged as potential therapeutic approach due to stability controlled release, low toxicity and stable in aqueous media in the presence of oxygen, which are liberated by reducing agents present in biological media^{15,16}.

In addition, propolis has been widely used in folk medicine, showing promising results in several disease models has a great potential for protective immune response against leishmaniasis^{17,18}. The major components of this bee product are phenolic compounds (flavonoids, aromatic acids and benzopyranes), di- and triterpenes and essential oils¹⁹ that have already been described as anti-inflammatory^{20,21} and immunomodulatory²²⁻²⁵ agent. Furthermore it has been shown that propolis increased the generation of hydrogen peroxide, suggesting that this product modulates the activation of macrophages and acts against intracellular parasite^{26,27}.

Since NO and propolis can play an important role in the genesis and control of various parasites disease, the objective of this study was to evaluate the effect of the combined therapy using NO donor cis-[Ru(bpy)₂imN(NO)](PF₆)₃ (**I**) where bpy = 2,2'-bipyridine and imN = imidazole and Brazilian propolis during infection with *Leishmania (Leishmania) amazonensis*.

MATERIAL AND METHODS

Leishmania (Leishmania) amazonensis (MHOM/BR/1989/166MJO) was used in promastigote forms, on stationary growth phase (5 days) in all experiments. The parasites were obtained from popliteal lymph nodes of *L. amazonensis* infected mice and maintained in culture medium 199 (GIBCO® Invitrogen) supplemented with 10% fetal bovine serum-FBS (GIBCO® Invitrogen), 1M HEPES, 0.1% human urine, 0.1% L-glutamine, 10µg/mL penicillin and streptomycin (GIBCO® Invitrogen) and 10% sodium bicarbonate. The cell culture was maintained in an incubator-type B.O.D. at 25° C, in 25 cm² flasks.

Chemicals, drugs, and reagents

Propolis was collected in the Beekeeping Section of the Lageado Farm, São Paulo State University (UNESP), Botucatu, SP, Brazil, from *Apis mellifera* L. colonies. Propolis was ground and a 30% extract in 70% ethanol was prepared. Its chemical

composition was analyzed using gas-chromatography (GC), gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) and thin layer chromatography (TLC)¹⁹. The final concentration of the solvent in the experiments did not exceed 0.1% ethanol.

NO donor compound cis-[Ru(bpy)₂imN(NO)](PF₆)₃ (**I**) was synthesized as described by Silva *et al.*²⁸. Glucantime[®] (N- methyl glucamine antimoniate) was obtained from Aventis and DMSO from Sigma.

Animals and infection

Female BALB/c mice weighing approximately 25-30g, aged 6 - 8 weeks old from the Institute Carlos Chagas-Fiocruz, Curitiba-PR, Brazil, were infected in the right hindpaw with 1×10^5 *L. amazonensis* promastigote forms. Mice were kept under pathogen-free conditions and used according to protocols approved by the institutional Animal Care. This study was approved by Londrina State University Ethics Committee for Animal Experimentation (n. 56/2012).

Experimental procedures

A total of seven groups of 5 animals each were used (**table 1**). Five groups were infected with *L. amazonensis* promastigote forms. The treatment started after lesion appearance in all animals, which occurred 6-8 weeks post inoculation (p.i.). Propolis diluted in PBS was administered p.o. at 5 mg.kg⁻¹ of body weight for 30 consecutive days²⁷. **I** (0.385 μmol.kg⁻¹ day⁻¹)²⁹ diluted in PBS 1% DMSO and Glucantime[®] (33 μmol.kg⁻¹ day⁻¹)¹³ were given by i.p. injection for 30 consecutive days. The control groups received PBS vehicle only (p.o.).

The lesion size (in mm, mean ± SD) was measured weekly during the treatment using a digital caliper (Starrett 799). At the end of therapy (84 days p.i.) animals were euthanized. Blood serum was collected and injured hindpaw was excised for analysis.

AST and ALT levels

The levels of aspartate aminotransferase (AST) and alanine aminotransferase (ALT) were used as markers of hepatocellular damage, and determined in blood serum of groups I, II and VII by a colorimetric assay using a commercial kit from Labtest Diagnóstica[™] (Lagoa Santa, MG, Brazil).

Evaluation of hyperalgesia

Mechanical hyperalgesia was evaluated in mice as previously reported³⁰. Mice were placed in acrylic cages with wire grid floors. The test consisted of evoking a hindpaw flexion reflex with a handheld force transducer (electronic anesthesiometer; IITC Life Science, Woodland Hills, CA) adapting with a 0.5-mm² polypropylene tip. The final value was obtained by averaging three measurements. The animals were tested weekly before and during the treatments and the results of flexion-elicited threshold was expressed by delta (Δ) withdrawal threshold in grams (g).

Histological analysis

The infected hindpaw of each animal was removed and divided in two fragments. One fragment was washed in PBS and fixed in Bouin's solution. Paw fragments were decalcified during 45 days in EDTA 5% and processed for paraffin embedding, sectioned (4 μ m), stained with hematoxylin-eosin, and examined by light microscopy. The cellular profile (macrophages, vacuolated macrophages, fibroblasts and lymphocytes) was determined. The tissue sections of 5-6 mice from each group were analyzed with a photomicroscope (Olympus, Miami, FL, USA) at a final magnification of 200x. Five images from each mouse were captured using Motic Images Plus v.2.0 (Motic China Group Co. Ltd., Xiamen, China). These images were divided into four quadrants, two of which were randomly selected for cell quantification with ImageJ 1.45s software (NIH, USA - 2011).

Immunohistochemistry

The paw sections were also analyzed by immunohistochemistry³¹ identifying T CD4⁺ and T CD8⁺ lymphocytes by the labeled streptavidin–biotin method using an LSAB kit (DAKO Japan, Kyoto, Japan). The paraffin-embedded sections were deparaffinized and rehydrated, treated for 40 min with 2% BSA and incubated overnight at 4°C with primary antibody (anti- CD4⁺, anti- CD8⁺ rabbit polyclonal antibody diluted 1:500, Sigma). Horseradish peroxidase activity was visualized by treatment with H₂O₂ and 3,30-diaminobenzidine (DAB) for 5 min. In the last step, the sections were weakly counterstained with Harry's hematoxylin (Merck). For each assay, negative controls were prepared on serial sections. Intensity and localization of immuno-reactivities against all primary antibodies used were examined on all sections using a microscope (Olympus BX41, Olympus Optical Co., Ltd., Tokyo, Japan). As a negative control, the primary antibody was omitted. For the image analysis study, photomicroscopic color

slides of representative areas (objective lens $\times 40$) were digitally acquired. After conversion of the images into grey scale (Adobe Photoshop) positive pixels and total pixels were set to a consistent threshold and then the images were processed using Image J program (NIH, USA). Positive immuno-stained area was calculated as a ratio of positive pixels/total pixels (%).

Determination of cytokines profile by *Western blotting*

The other paw fragment was macerated and the supernatant was used to measure the cytokines and transcription factor expressed in the lesion by *Western blotting*³². Supernatant samples were previously centrifuged and the content of total protein determined by Lowry's method modified by Miller³³. Supernatant samples were diluted 1:2000 in 0.9% NaCl and added to 300 μL of cupric reagent for 10 minutes. Afterwards, the mixture was vortexed and added to 900 μL of Folin-Ciocalteu's reagent and maintained at 50° C in a water bath for 10 minutes. The absorbance was obtained from reading the samples at 660 nm and the protein concentration obtained from the standard curve of bovine serum albumin. Then, was added volume of sample corresponding to 20 μg of proteins for separation by gel electrophoresis in 10% acrylamide and transferred to a nitrocellulose membrane³². Membranes were blocked in 5% milk and incubated overnight with antibodies p-NF- κB (p65), STAT-3, TNF- α , IL-10 and TGF- $\beta 1$ diluted 1:1000 (Santa Cruz Biotechnology, USA). Subsequently, the membranes were washed in PBS-0.1% tween for 30 minutes and incubated with secondary antibody specific for each primary antibody for 2 hours at room temperature (diluted 1:2000). The detection of the bands of respective antibodies was performed using the ECL Plus kit (GE Healthcare, United Kingdom). The images of the bands were scanned (Labscan Software, EG Healthcare) and quantified in Image J software (NIH, USA).

Nitrite quantification as estimative of nitric oxide levels (NO)

Nitrite production in the sera and supernatants of macerated paws of non infected and infected mice was measured by accumulation of nitrite, a NO metabolite. The nitrite present in the samples was performed following the protocol used by Panis *et al.* (2011)³¹. Aliquots (60 μL) were deproteinized with 50 μL of 75 mM ZnSO₄ and centrifuged at 9500 x g for 2 minutes. Then added 70 μL of 55mM NaOH (Merck) and again centrifuged the sample at 9500 g, 5 min, 25° C. The supernatant was recovered

and diluted in glycine buffer (45g/L pH 9.7, Merck) at a ratio of 1:5. Cadmium beads (Fluka) were previously activated with 5 mM CuSO₄ solution in glycine–NaOH buffer (15 g/L, pH 9.7, Merck) for 5 minutes and then added to the supernatant diluted sample to incubation for 10 minutes. In this step, there was complete conversion of nitrate to nitrite present in the sample. For detection of the levels of nitrite added to Griess reagent (Reagent I: 50 mg of *N*-naphthylethylenediamine in 250 mL of distilled water; Reagent II: 5 g of sulfanilic acid in 500 mL of 3M HCl, Sigma). The nitrite concentration in the samples was obtained from the absorbance reading at 550 nm in microplate reader. Results were expressed as μM of nitrite.

Statistical analysis

Results were expressed as the mean \pm errors of the means (SEM) and analyzed with the Prism 5.0 statistical program (Graphpad Software, San Diego, CA), using the Student's *t*-test to all assays comparing with infected control. Differences were considered significant when $P < 0.05$.

RESULTS

The treatment with I and propolis not promote hepatic lesions

In attempted to verify if the treatment I + propolis association daily for 30 days presents toxic effect, the levels of hepatic enzymes ALT and AST was evaluated. Data showed that the association did not increased ALT and AST levels when compared of infected control group (**Fig 1**).

The association I and propolis delayed lesion development

To address the effect of combined therapy in the lesion development, mice were infected with *L. amazonensis* and the lesion was monitored during 84 days p.i. One may observe that the lesions of infected control group increased progressively over infection and the ulcer size ranged from 9.7 to 12.5 mm. In contrast, the lesions in all treated groups showed a significant slowly development compared to infected control. Interestingly, the treatment with the association I + propolis, I and propolis was similar to Glucantime[®] treated mice. Cutaneous lesions in treated animals were smaller than

those in infected control and there was the establishment of an inflammatory process with reduced severity of lesions (**Fig 2**).

The combined therapy I + propolis increased the macrophage and fibroblast population

To investigate which cells were found in the epithelial lesion, after the treatment with **I** and propolis, histological and immunohistochemical analyses were carried out.

There was a significant increase in macrophages number at the site of injury in all the treated groups after 84 days p.i. (**Fig 3A**). The group treated with **I** + Propolis showed smaller number of vacuolated macrophages (76.5%) than infected control group (89%) (**Fig 3B**). In addition, mice treated with propolis (95.8%) and **I** (93%) showed more parasites than other treated groups. These results suggest that the combined therapy help macrophages to eliminate intracellular forms of *L. amazonensis*.

Furthermore, we verified that the animals treated with the association **I** + propolis presented a considerable increase in fibroblasts number at the lesion site (**Fig 3C**). Moreover, the group that received propolis and Glucantime[®] alone presented a decreased of this cell type in the lesions.

The association I plus propolis did not change the number of CD4 and CD8 T cell

A similar number of T cells in the tissues of infected control and Glucantime[®] group, however in mice treated with propolis, **I** and **I** + propolis, this population was significantly diminished (**Fig 3D**).

Immunohistochemical studies using specific monoclonal antibodies for T CD4+ and T CD8+ have revealed that the combined therapy did not induce CD4 and CD8 recruitment to the lesion (**Fig 4**). Nevertheless, the treatment with propolis and Glucantime[®] only was able of to increase T CD4⁺ cells and T CD8⁺, respectively (**Fig 4**).

The associated therapy modulates cytokines production

In an attempt to verify whether the association of **I** + propolis modulates the cytokines production, we initially investigated the signaling pathways involved during the infection. The analysis of protein markers expression NF- κ B (p65), TGF- β 1, TNF- α , STAT-3 and IL-10 was performed using the supernatant of macerated hindpaw. All markers had their expression significantly altered during infection (**Fig 5**).

Glucantime[®] treatment caused a significant increase in NF- κ B and IL-10 expression compared to infected control group. The expression levels of TGF- β 1, TNF- α and STAT-3 were not affected.

The animals treated with propolis showed a significant increase in expression of NF- κ B, TNF- α and STAT-3, associated with a reduced expression of TGF- β 1 and IL-10, compared to infected control. The **I** treated group resulted in an increased expression of NF- κ B, STAT-3 and TGF- β 1 with concomitant reduction in the expression of TNF- α and IL-10 compared to the infected control.

The treatment with the association **I** + propolis for 30 days caused a reduction in expression of NF- κ B, TNF- α and IL-10 and increased expression of TGF- β 1 and STAT-3, compared to the group infected untreated.

The association increased NO levels in the site of the lesion

It is known that NO can directly and indirectly modulate the immune response through diverse mechanisms such as mediating microbicidal effects of NO-derived free radicals. The association administration clearly increased NO production compared to infected control, but treatment with Glucantime[®], propolis and **I** only, did not affect the production of NO in lesion tissue (**Fig 6**). It is important to note that the infection itself was able to increase the NO levels when compared to the uninfected control.

DISCUSSION

The inflammatory response observed during Leishmaniasis is essential for eliminating the parasite but uncontrolled or continued inflammation is correlated with extended collateral damage and may constitute a crucial factor for the development of features of chronic disease (deforming ulcers) and subsequent morbidity^{12,34}.

Glucantime[®] is the basis of leishmaniasis therapy worldwide for over 70 years, however this drug increased parasite resistance and severe side effects^{3,35}. Therefore, the development of new therapeutic approaches to eliminate parasite and control exacerbated inflammation is a challenge.

The study revealed new perspectives for the therapy of experimental cutaneous leishmaniasis to make use of the combined therapy NO and propolis. Data demonstrated

that this associated therapy was capable to increase the efficiency of macrophage population, consequently decreasing the number these parasited load.

Leishmania is an obligatory intracellular pathogen which infects mainly macrophages which are specialized for the destruction of invading pathogens². During various years, several works has confirmed that NO is involved in death of many microorganisms and this molecule is the main death effector produced by macrophages against *Leishmania* amastigotes^{2,36}.

However, *L. amazonensis* adopted various defense mechanisms to deal with oxidative stress and inhibit NO production^{11,9}. Therefore, taking into account that NO is crucial in parasite killing and it is a target to *Leishmania*; therapeutic approaches that use NO-releasing compounds associated with compounds that presents anti-inflammatory properties could improve the protective immune response and resolution of *Leishmania* infection .

There is significant evidence suggesting that NO plays an important role in a variety of physiological and pathological processes (reviewed in Pacher et al., 2007³⁷). Several studies also reported that propolis presents important properties like antimicrobial³⁸, leishmanicidal³⁹, anti-inflammatory⁴⁰ and immunomodulatory^{35,22,23}.

In fact, the analysis of the cellular profile of the infected footpad at 84 days p. i. showed that all treatments resulted in the recruitment of macrophages, and mainly vacuolated macrophages filled with amastigotes (**Fig 3A**). In agreement caffeoylquinic acid derivatives, a propolis compound, enhance the motility and spreading of macrophages⁴¹.

Despite the similar recruitment of macrophages to wound site, only the group treated with association **I** + propolis was efficient to control parasitic burden in this cell type (**Fig 3B**). Thus one could infer that the association acted synergistically enhancing the leishmanicidal effect of propolis and NO released by NO-donors, which reduced parasite count and inflammation (**Fig 2**).

In experimental leishmaniasis, some compounds such prenylated and benzophenones⁴² have already been associated with the inhibition of amastigotes proliferation by macrophage activation or by direct effect on promastigote forms (caffeic acid, p-coumaric acid, aromadendrine-4'-methyl ether, 3-prenyl-p-coumaric and 3,5-diprenyl-p-coumaric)⁴³. Our group also reveled that macrophages pretreated with Brazilian propolis and infected with *L. braziliensis* *in vitro* showed a significant increase in ingestion and killing of amastigotes forms³⁹.

The leishmanicidal effects of NO donors against *L. major* were demonstrated *in vitro* and *in vivo* treated with trans-[Ru(NO)(NH₃)₄L](X)₃¹³. *L. amazonensis* when co-cultured with sodium nitroprusside *in vitro*, also demonstrated a decrease in the number of promastigotes and axenic amastigotes in a concentration-dependent manner⁴⁴.

Cytokines are also essentials in leishmaniasis control⁴⁵. In this study, we showed that the combined therapy promoted increased in TGF-β1 and STAT-3 expression in the infection loci. However, expression of TNF-α, IL-10 and NF-κB was lower in these animals when compared to infected control (**Fig 5**).

The invasion of host cells by pathogens triggers the induction of transcription nuclear factor NF-κB which induces genes coding of various pro-inflammatory cytokines, including TNF-α, chemokines and co-stimulatory molecules^{46,47}. This frame shows that although there has been a decrease in the levels of NF-κB and TNF-α, there was a reduction in parasitic load (**Fig 3B**), probably by direct action of the associated treatment on amastigote forms.

Pavanelli *et al.* (2011)⁴⁸ observed that the treatment with cis-[Ru(bpy)₂(NO)SO₃](PF₆) decreased TNF-α production and consequently inflammation in paracoccidioidomycosis infection model. The reduced production of TNF-α, IL-10 and INF-γ was also associated with reduced myocarditis in mice treated with Ruthenium NO donor in Chaga's infected model⁴⁹

The increase in TGF-β1 and STAT-3 expression reinforce the occurrence of anti-inflammatory effect, healing frame and tissue repair. Attenuated inflammatory response was observed in our model because the recruitment of lymphocytes to the injury was decreased (**Fig 3D** and **4**). It is possible that this profile found in the paw of animals treated with combined therapy was due in part to the reduced burden parasites found in vacuole macrophage (**Fig 3B**) and to the presence of TGF-β1, NO and flavonoids found in propolis extract which have inhibitory effects on T cell proliferation^{24,50,51}. Together data suggest that the association is crucial in modulating the local inflammatory response, exerting both regulatory and effectors roles during the parasite elimination.

Besides, Ansorge *et al.* (2003)⁵² showed that Germany propolis was able to induce TGF-β synthesis by human T cells. Ogata *et al.* (2006)⁵³ propose that STAT3 up regulates TGF-β1 which is an important signal for the initiation of healing cascade by attracting macrophages⁵⁴.

Propolis, NO and TGF- β 1 play central roles in wound healing, and can cross-regulate each other^{55,56}. In addition, TGF- β 1 promotes the chemotaxis of fibroblasts and muscle cells to the site of injury, confirming our results (**Fig 3D**), suggesting that this association might also play a significant role in remodeling phase of leishmaniasis disease. The synergistic signals are a vigorous response matrix-producing cells to provide a rapid deposition of remodeling tissue at the lesion site during the proliferative phase which follows the inflammation⁵⁷.

In recent years, NO has emerged as a critical molecule in wound healing. In most studies, treatment with NO donors, dietary L-arginine or iNOS overexpression via gene therapy, increases collagen content of experimental wounds⁵⁸⁻⁶⁰. Potentiating this effect, propolis extract is remarkably used in dermatology for wound healing, burn and external ulcers treatment, healing time reduction, wound contraction increase and tissue repair acceleration⁶¹

Finally, in order to verify whether the combined therapy could modulate inflammatory pain, hyperalgesia was evaluated in both groups during the 30 days of treatment. Corroborating Haber et al. (2009)⁶², animals showed pain in the infected foot, however, all treatments were not able to decrease this threshold (data not shown). Nevertheless our group recently demonstrated that a similar ruthenium complex has analgesic effect on inflammatory pain⁶³, this difference may be due the chemical composition of this compound and the dose, which was approximately 12 fold lower than the present study.

Our results clearly show that the combined therapy resulted in the improvement of the inflammatory response, protected the tissue damage and significantly promoted a preservation of the tissue. In summary, the data obtained strongly suggest that the association *cis*-[Ru(NO)(bpy)₂imN](PF₆)₃ plus Brazilian propolis is effective against *L. amazonensis in vivo*, permitting infer that this combined therapy can be an alternative for the treatment of leishmaniasis.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors would like to acknowledge Juliano Bordignon for supplying the animals, the financial support from Fundação Araucária/SETI-PR, FAEPE/UEL, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). Lopes, L. G. F. gratefully acknowledge CNPq (301825/2011-4, 470054/2011-5) and FUNCAP for the grants

DISCLOSURES

The authors have no financial conflict of interest.

REFERENCES

1. Barral A, Pedral-Sampaio D, Grimaldi G, et al. Leishmaniasis in Bahia, Brazil: Evidence that *Leishmania amazonensis* Produces a Wide Spectrum of Clinical Disease. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 1991;44(5):536-546.
2. Van Assche T, Deschacht M, da Luz RAI, Maes L, Cos P. *Leishmania*–macrophage interactions: Insights into the redox biology. *Free Radical Biology and Medicine*. 2011;51(2):337-351.
3. Alvar J, Croft S, Olliaro P. Chemotherapy in the Treatment and Control of Leishmaniasis. In: David HM, ed. *Advances in Parasitology*. 2006; 61:223-274.
4. Reiner SL, Locksley RM. The regulation of immunity to *Leishmania major*. *Annual Review of Immunology*. 1995;13:151-177.
5. Sacks DN-T, Nancy. The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice. *Nature Review Immunology*. 2002;2(11):845-858
6. Babior BM. Phagocytes and oxidative stress. *The American Journal of Medicine*. 2000;109(1):33-44.
7. Cunningham AC. Parasitic Adaptive Mechanisms in Infection by *Leishmania*. *Experimental and Molecular Pathology*. 2002;72(2):132-141.
8. Olivier M, Gregory DJ, Forget G. Subversion Mechanisms by Which *Leishmania* Parasites Can Escape the Host Immune Response: a Signaling Point of View. *Clinical Microbiology Reviews*. 2005;18(2):293-305.
9. Wanasen N, Soong L. L-arginine metabolism and its impact on host immunity against *Leishmania* infection. *Immunologic Research*. 2008;41(1):15-25.
10. da Silva MFL, Zampieri RA, Muxel SM, Beverley SM, Floeter-Winter LM. *Leishmania amazonensis* Arginase Compartmentalization in the Glycosome Is Important for Parasite Infectivity. *PLoS ONE*. 2012;7(3):e34022.
11. Bogdan C, Rölinghoff M. How do Protozoan Parasites Survive inside Macrophages? *Parasitology today (Personal ed.)*. 1999;15(1):22-28.
12. Lira R, Doherty M, Modi G, Sacks D. Evolution of Lesion Formation, Parasitic Load, Immune Response, and Reservoir Potential in C57BL/6 Mice following High- and Low-Dose Challenge with *Leishmania major*. *Infection and Immunity*. 2000;68(9):5176-5182.
13. Melo Pereira JC, Carregaro V, Costa DL, Santana da Silva J, Cunha FQ, Franco DW. Antileishmanial activity of ruthenium(II)tetraammine nitrosyl complexes. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2010;45(9):4180-4187.
14. Lemesre J-L, Sereno D, Daulouède S, Veyret B, Brajon N, Vincendeau P. *Leishmania* spp.: Nitric Oxide-Mediated Metabolic Inhibition of Promastigote and Axenically Grown Amastigote Forms. *Experimental Parasitology*. 1997;86(1):58-68.
15. Toledo JC, dos Santos Lima Neto B, Franco DW. Mutual effects in the chemical properties of the ruthenium metal center and ancillary ligands upon coordination. *Coordination Chemistry Reviews*. 2005;249(3–4):419-431.
16. Silva FON, Cândido MCL, Holanda AKM, Diógenes ICN, Sousa EHS, Lopes LGF. Mechanism and biological implications of the NO release of cis-

- [Ru(bpy)₂L(NO)]ⁿ⁺ complexes: A key role of physiological thiols. *Journal of Inorganic Biochemistry*. 2011;105(5):624-629.
17. Sforcin JM. *Própolis e imunidade - Comprovações científicas*. 1 ed. São Paulo 2009.
 18. Sforcin JM, Bankova V. Propolis: Is there a potential for the development of new drugs? *Journal of Ethnopharmacology*. 2011;133(2):253-260.
 19. Sforcin JM. Propolis and the immune system: a review. *Journal of Ethnopharmacology*. 2007;113(1):1-14.
 20. Hu F, Hepburn HR, Li Y, Chen M, Radloff SE, Daya S. Effects of ethanol and water extracts of propolis (bee glue) on acute inflammatory animal models. *Journal of Ethnopharmacology*. 2005;100(3):276-283.
 21. Amarante MK, Watanabe MAE, Conchon-Costa I, et al. The effect of propolis on CCL5 and IFN- γ expression by peripheral blood mononuclear cells from leishmaniasis patients. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 2012;64(1):154-160.
 22. Orsatti CL, Missima F, Pagliarone AC, et al. Propolis immunomodulatory action in vivo on Toll-like receptors 2 and 4 expression and on pro-inflammatory cytokines production in mice. *Phytotherapeutic Research* 2010;24(8):1141-1146.
 23. Orsatti CL, Missima F, Pagliarone AC, Sforcin JM. Th1/Th2 cytokines' expression and production by propolis-treated mice. *Journal of Ethnopharmacology*. 2010;129(3):314-318.
 24. Sá-Nunes A, Faccioli LH, Sforcin JM. Propolis: lymphocyte proliferation and IFN- γ production. *Journal of Ethnopharmacology*. 2003;87(1):93-97.
 25. Sforcin JM, Orsi RO, Bankova V. Effect of propolis, some isolated compounds and its source plant on antibody production. *Journal of Ethnopharmacology*. 2005;98(3):301-305.
 26. Missima F, Sforcin JM. Green Brazilian Propolis Action on Macrophages and Lymphoid Organs of Chronically Stressed Mice. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2008(1):71-75
 27. Orsi RO, Funari SRC, Soares AMVC, et al. Immunomodulatory action of propolis on macrophage activation. *Journal of Venomous Animals and Toxins*. 2000;6:205-219.
 28. Silva FON, Araújo SXB, Holanda AKM, et al. Synthesis, Characterization, and NO Release Study of the cis- and trans-[Ru(Bpy)₂(SO₃)(NO)]⁺ Complexes. *European Journal of Inorganic Chemistry*. 2006;2006(10):2020-2026.
 29. Silva JJN, Guedes PMM, Zottis A, et al. Novel ruthenium complexes as potential drugs for Chagas's disease: enzyme inhibition and in vitro/in vivo trypanocidal activity. *British Journal of Pharmacology*. 2010;160(2):260-269.
 30. Cunha TM, Verri Jr WA, Vivancos GG, et al. An electronic pressure-meter nociception paw test for mice. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 2004;37:401-407.
 31. Panis C, Mazzuco TL, Costa CZF, et al. 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. *Experimental Parasitology*. 2011;127(1):58-65.
 32. Pizzatti L, Panis C, Lemos G, et al. Label-free MSE proteomic analysis of chronic myeloid leukemia bone marrow plasma: disclosing new insights from therapy resistance. *PROTEOMICS*. 2012;12(17):2618-2631.
 33. Miller GL. Protein determination for large numbers of samples. *Analytical Chemistry* 1959; 31 (5):964.

34. Pirmez C, Yamamura M, Uyemura K, et al. Cytokine patterns in the pathogenesis of human leishmaniasis. *The Journal of Clinical Investigation*. 1993;91(4):1390-1395.
35. Oliveira LF, Schubach AO, Martins MM, et al. Systematic review of the adverse effects of cutaneous leishmaniasis treatment in the New World. *Acta Tropica*. 2011;118(2):87-96.
36. Stuart LM, Ezekowitz RAB. Phagocytosis: Elegant Complexity. *Immunity*. 2005;22(5):539-550.
37. Pacher P, Beckman JS, Liaudet L. Nitric Oxide and Peroxynitrite in Health and Disease. *Physiological Reviews*. 2007;87(1):315-424.
38. Marcucci MC, Ferreres F, Garcia-Viguera C, et al. Phenolic compounds from Brazilian propolis with pharmacological activities. *Journal of Ethnopharmacology*. 2001;74(2):105-112.
39. Silva SS, Thomé GdS, Cataneo AHD, et al. Brazilian propolis with Leishmanicidal and immunomodulatory activities: Effect on *Leishmania (Viannia) braziliensis* promastigotes and production of TNF- α by macrophages. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine (eCAM)*. 2013(in press).
40. Machado JL, Assunção AKM, da Silva MCP, et al. Brazilian Green Propolis: Anti-Inflammatory Property by an Immunomodulatory Activity. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2012;2012:10
41. Tatefuji T, Izumi N, Ohta T, Arai S, Ikeda M, Kurimoto M. Isolation and identification of compounds from Brazilian propolis which enhance macrophage spreading and mobility. *Biological & pharmaceutical bulletin*. 1996;19(7):966-970.
42. Ayres DC, Marcucci MC, Giorgio S. Effects of Brazilian propolis on *Leishmania amazonensis*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2007;102:215-220.
43. Pontin K, Da Silva Filho A, Santos F, et al. In vitro and in vivo antileishmanial activities of a Brazilian green propolis extract. *Parasitology Research*. 2008;103(3):487-492.
44. Genestra M, Soares-Bezerra RJ, Gomes-Silva L, et al. In vitro sodium nitroprusside-mediated toxicity towards *Leishmania amazonensis* promastigotes and axenic amastigotes. *Cell Biochemistry and Function*. 2008;26(6):709-717.
45. Cummings HE, Tuladhar R, Satoskar AR. Cytokines and Their STATs in Cutaneous and Visceral Leishmaniasis. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. 2010; 2010:294389.
46. Caamaño J, Hunter CA. NF- κ B Family of Transcription Factors: Central Regulators of Innate and Adaptive Immune Functions. *Clinical Microbiology Reviews*. 2002;15(3):414-429.
47. Bonizzi G, Karin M. The two NF- κ B activation pathways and their role in innate and adaptive immunity. *Trends in Immunology*. 2004;25(6):280-288.
48. Pavanelli W, Silva J, Panis C, et al. Experimental Chemotherapy in Paracoccidioidomycosis Using Ruthenium NO Donor. *Mycopathologia*. 2011;172(2):95-107.
49. Guedes PMM, Oliveira FS, Gutierrez FRS, et al. Nitric oxide donor trans-[RuCl([15]aneN4)NO] $_2^+$ as a possible therapeutic approach for Chagas' disease. *British Journal of Pharmacology*. 2010;160(2):270-282.

50. Mazzoni A, Bronte V, Visintin A, et al. Myeloid Suppressor Lines Inhibit T Cell Responses by an NO-Dependent Mechanism. *The Journal of Immunology*. 2002;168(2):689-695.
51. Tiemessen MM, Kunzmann S, Schmidt-Weber CB, et al. Transforming growth factor- β inhibits human antigen-specific CD4⁺ T cell proliferation without modulating the cytokine response. *International Immunology*. 2003;15(12):1495-1504.
52. Ansorge S, Reinhold D, Lendeckel U. Propolis and some of its constituents down-regulate DNA synthesis and inflammatory cytokine production but induce TGF- β 1 production of human immune cells. *Zeitschrift für Naturforschung*. 2003;58c:580-589.
53. Ogata HC, T Yoshida, T Kinjyo, I Takaesu, G Shiraishi, H Iida, M Kobayashi, T Yoshimura, A. Loss of SOCS3 in the liver promotes fibrosis by enhancing STAT3-mediated TGF- β 1 production. *Oncogene*. 2006;25(17):2520 - 2530.
54. Diegelmann RF, Evans MC. Wound healing: an overview of acute, fibrotic and delayed healing. *Frontiers in Bioscience*. 2004;9:283-289.
55. Moghtaday Khorasgan E, Karimi AH, Nazem MR. A Comparison of Healing Effects of Propolis and Silver Sulfadiazine on Full Thickness Skin Wounds in Rats. *Pakistan Veterinary Journal*. 2010 30(2):72-74.
56. Barbosa MH, Zuffi FB, Maruxo HB, Jorge LLR. Ação terapêutica da própolis em lesões cutâneas. *Acta Paulista de Enfermagem*. 2009;22:318-322.
57. Kim W-H, Gittes G, Longaker M. Signal transduction in wound pharmacology. *Archives of Pharmacal Research*. 1998;21(5):487-495.
58. Thornton FJ, Schäffer MR, Witte MB, et al. Enhanced Collagen Accumulation Following Direct Transfection of the Inducible Nitric Oxide Synthase Gene in Cutaneous Wounds. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 1998;246(3):654-659.
59. Muscará MN, McKnight W, Asfaha S, Wallace JL. Wound collagen deposition in rats: effects of an NO-NSAID and a selective COX-2 inhibitor. *British Journal of Pharmacology*. 2000;129(4):681-686.
60. Shi HP, Efron DT, Most D, Tantry US, Barbul A. Supplemental dietary arginine enhances wound healing in normal but not inducible nitric oxide synthase knockout mice. *Surgery*. 2000;128(2):374-378.
61. Ramos AFN, Miranda JL. Propolis: a review of its anti-inflammatory and healing actions. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*. 2007;13:697-710.
62. Haber ME, Daher CF, Karam MC, Baroody GM. *Leishmania major*: Interleukin-13 increases the infection-induced hyperalgesia and the levels of interleukin-1 β and interleukin-12 in rats. *Experimental Parasitology*. 2009;121(3):224-229.
63. Staurengo-Ferrari L, Mizokami SS, Silva JJ, et al. The ruthenium NO donor, [Ru(bpy)₂(NO)SO₃](PF₆), inhibits inflammatory pain: Involvement of TRPV1 and cGMP/PKG/ATP-sensitive potassium channel signaling pathway. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. 2013;105(0):157-165.

TABLE**Table 1.** Animal groups and respective treatments.

Group	Infection	Treatment
I (Control)	No	Vehicle
II (Infected Control)	Yes*	Vehicle
III	Yes*	Glucantime [®]
IV	Yes*	Propolis
V	Yes*	I
VI	Yes*	Propolis + I
VII	No	Propolis + I

*Mice infected in the left footpad with 1×10^5 *Leishmania amazonensis* promastigote forms

FIGURES

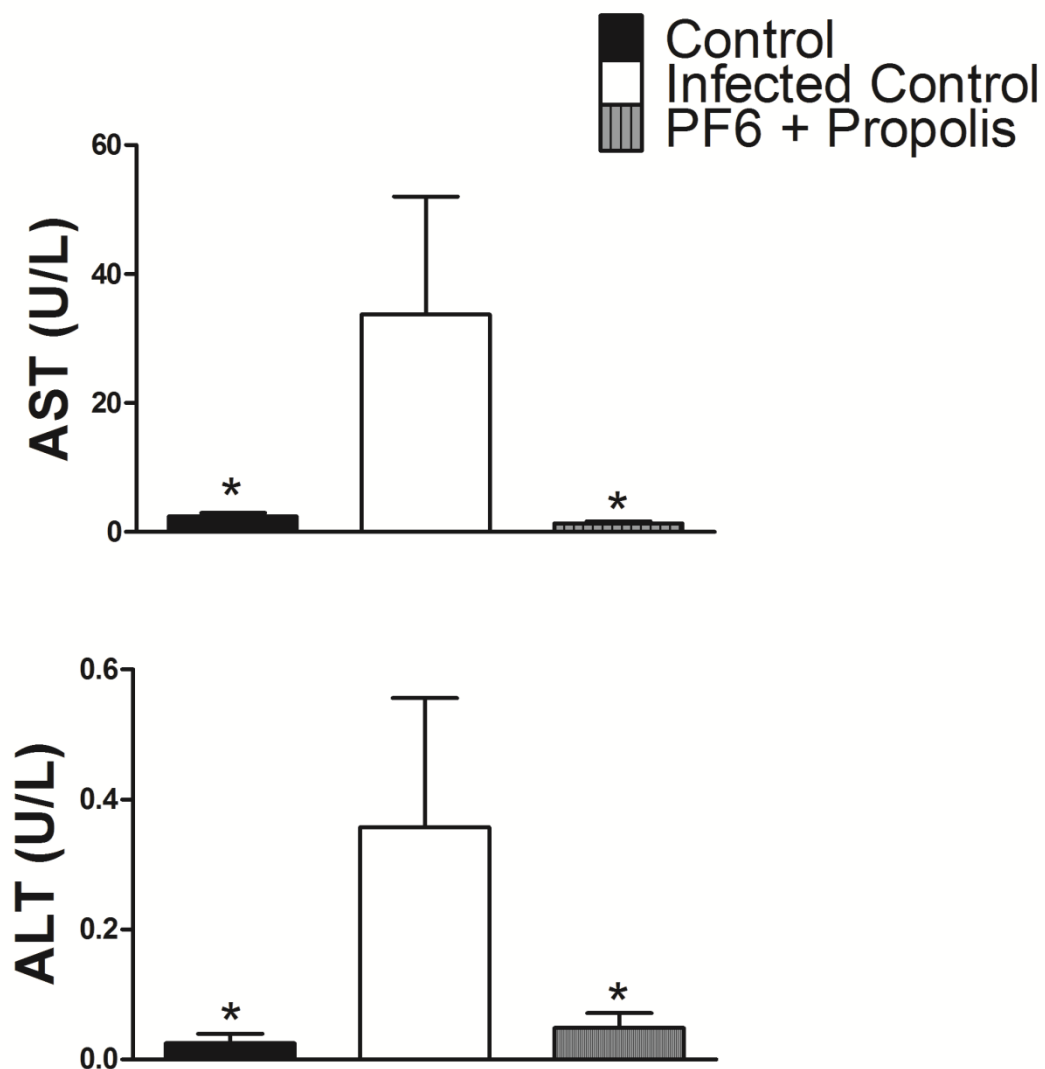


Fig 3 - Effect of treatment with **I** + propolis or saline on ALT and AST levels. BALB/c mice were treated with **I** ($0.385 \mu\text{mol.kg}^{-1} \text{day}^{-1}$, i.p.) and propolis (5mg.kg^{-1} , p.o) for 30 consecutive days. ALT and AST were measured 24 hrs after the last treatment day (n = 5-6). Results are expressed as means \pm SEM * indicates $P < 0.05$ versus control.

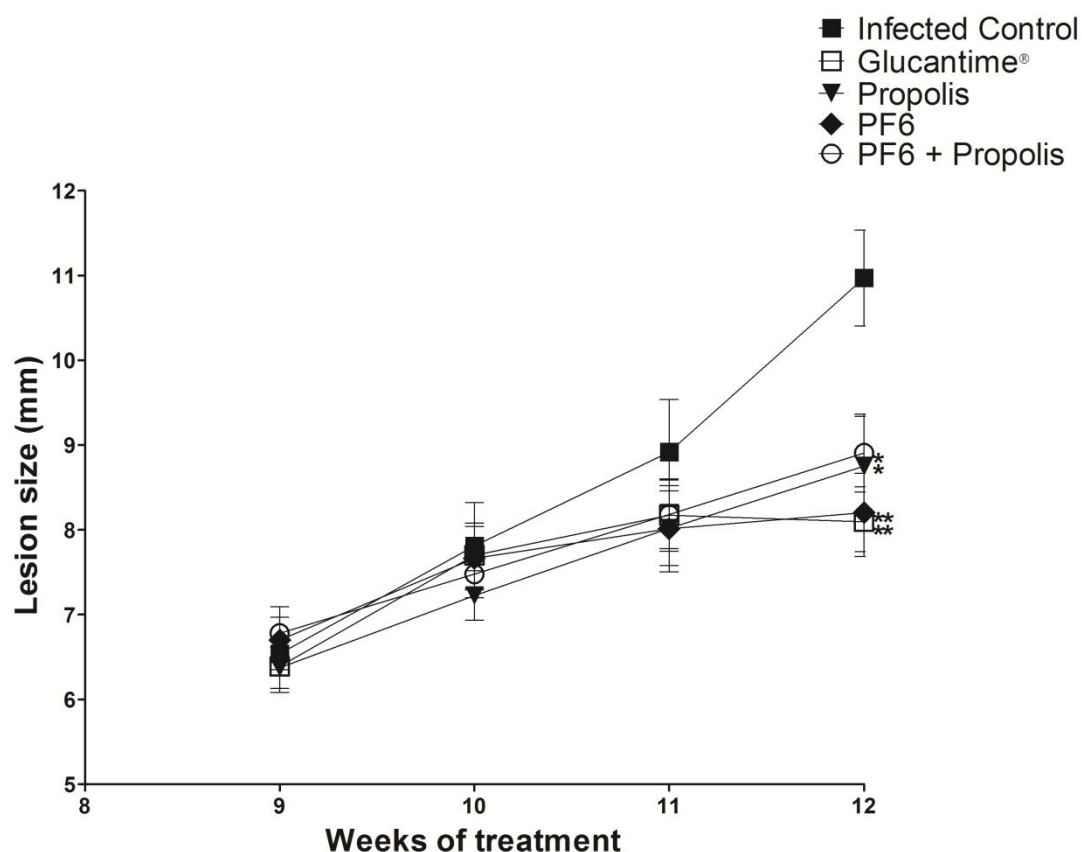


Fig 4 - Effect of **I** and propolis on lesion development in BALB/c mice infected with *L. amazonensis*. Animals were inoculated in the right hindpaw with 1×10^5 promastigote forms. After eight weeks of infection, mice were treated with saline (i.p.) (■), Glucantime® ($33 \mu\text{mol.kg}^{-1} \text{day}^{-1}$, i.p.) (□), Propolis ($5 \text{ mg.kg}^{-1} \text{day}^{-1}$, p.o.) (▼), **I** ($0.385 \mu\text{mol.kg}^{-1} \text{day}^{-1}$, i.p.) (◆) or Propolis + **I** ($5 \text{ mg.kg}^{-1} \text{day}^{-1}$, p.o + $0.385 \mu\text{mol.kg}^{-1} \text{day}^{-1}$, i.p.) (○) for 4 weeks. The results represent the mean \pm SEM of lesion size for each group (n=5-6). Significant difference relative to the infected control * $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$ unpaired t-test.

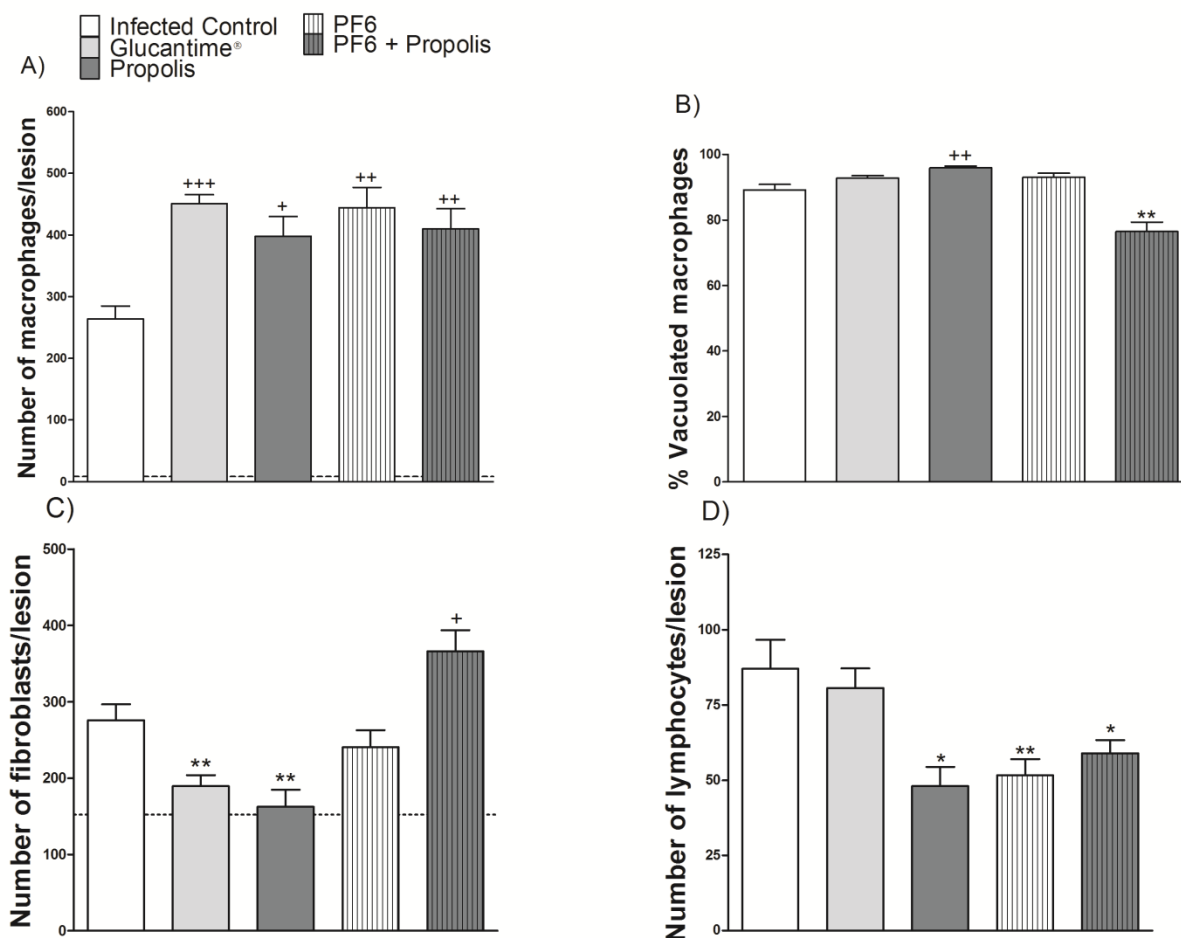


Fig 5 - Histological analysis of mice infected paws at 12 weeks post-infection. BALB/c mice were infected with 1×10^5 promastigotes of *L. amazonensis* in the right hindpaw and treated with **I** ($0.385 \mu\text{mol.kg}^{-1} \text{day}^{-1}$, i.p.), propolis ($5 \text{ mg.kg}^{-1} \text{day}^{-1}$, p.o.) or Glucantime ($33 \mu\text{mol.kg}^{-1} \text{day}^{-1}$, i.p.) for 4 weeks post lesion appearance. The paw sections (HE) were analyzed for **A**) number of macrophages, **B**) % vacuolated macrophages, **C**) fibroblasts and **D**) lymphocytes at a final magnification of 200x. The dotted line (--) represents the uninfected control. Bars represent the mean \pm SEM (n=5-6). Significant difference relative to the infected control $^{*/+} P < 0.05$, $^{**/+} P < 0.01$ and $^{+++} P < 0.0001$.

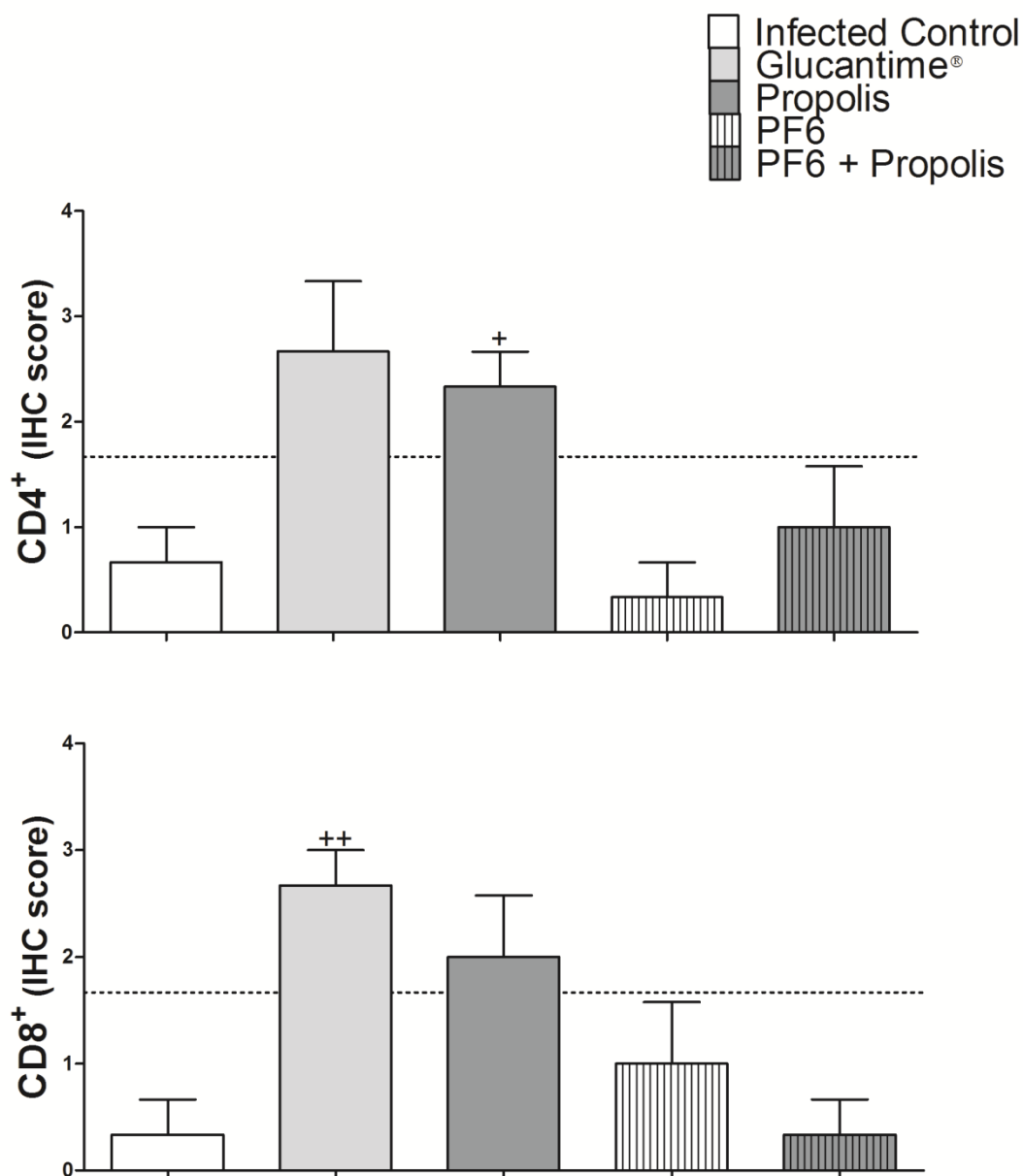


Fig 6 - Lymphocyte population in paws sections of BALB/c by immunohistochemistry. The treated groups were analyzed by the levels of TCD4⁺ and TCD8⁺ in paw sections. The dotted line (--) represents the uninfected control. Bars represent the mean \pm SEM (n=5-6). Significant difference relative to the infected control $^{*/+} P < 0.05$, $^{**/+} P < 0.01$ and $^{+++} P < 0.0001$.

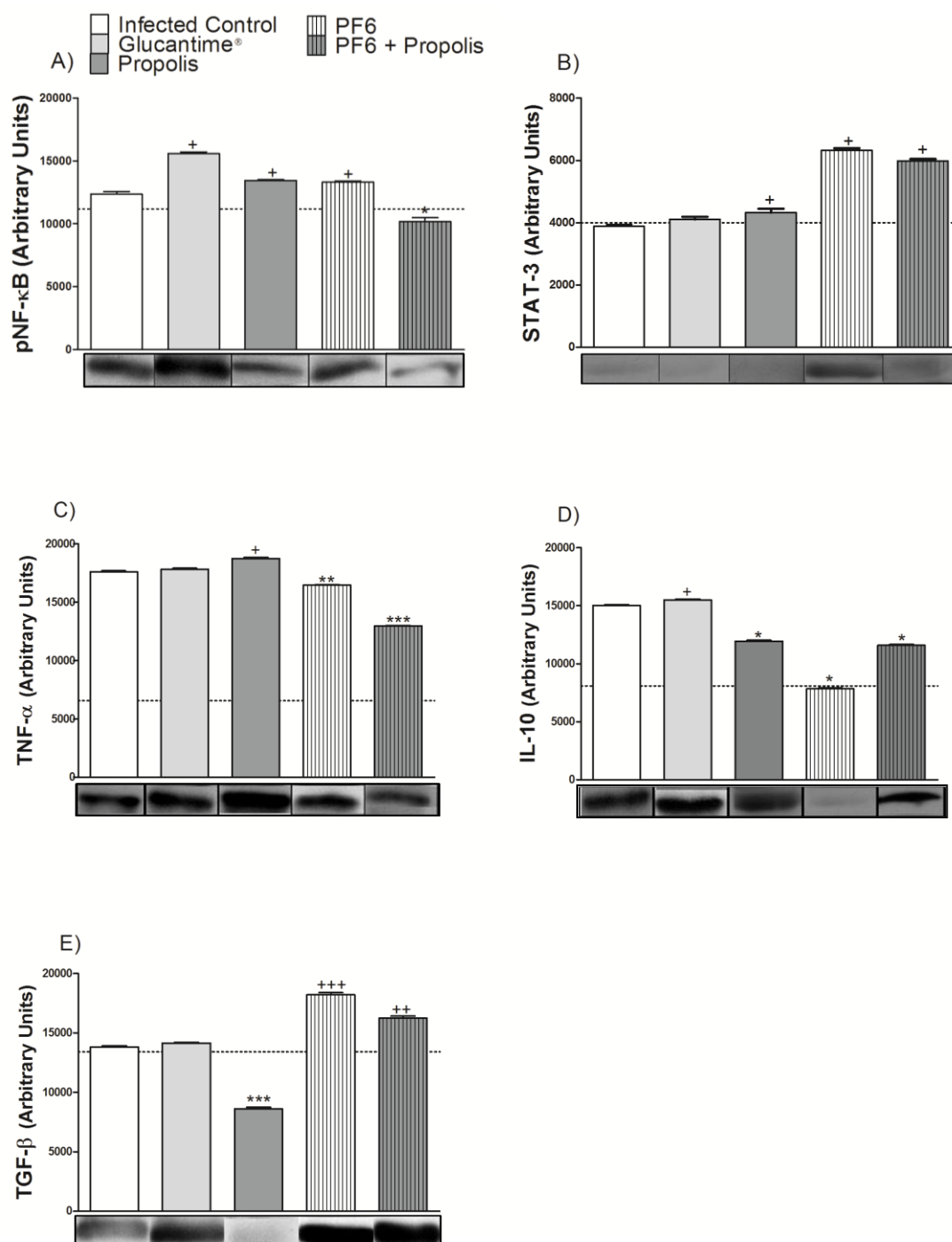


Fig 7 – Effect of **I** and propolis on cytokines and transcription factor expressed in supernatant of BALB/c macerated paw. After 30 days of treatments, the infected paw was macerated and the levels of **A)** NF-κB, **B)** STAT-3, **C)** TNF-α, **D)** IL-10 and **E)** TGF-β were determined by *western blotting*. The results represent the mean ±SEM of three experiment. The dotted line (--) represents the uninfected control. Significant difference relative to infected control ^{*/+} $P < 0.05$, ^{**/+} $P < 0.01$, ^{***/+} $P < 0.0001$.

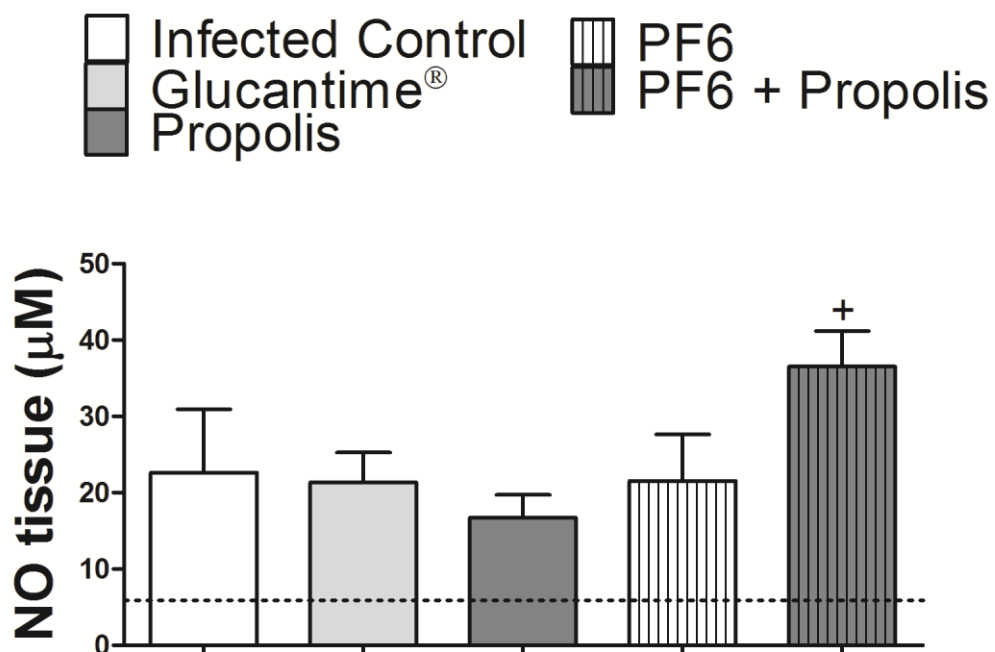


Fig 8 - NO was estimated by measuring nitrite levels in supernatant of macerated paw employing the cadmium–copper system followed by Griess reaction. The dotted line (--) represents the uninfected control. The result is expressed as the mean \pm SEM from 5-6 animals per group. ⁺ $P < 0.05$ compared with infected control.

ANEXO A

Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine

AUTHOR GUIDELINES

Submission

Manuscripts should be submitted by one of the authors of the manuscript through the online [Manuscript Tracking System](#). Regardless of the source of the word-processing tool, only electronic PDF (.pdf) or Word (.doc, .docx, .rtf) files can be submitted through the MTS. There is no page limit. Only online submissions are accepted to facilitate rapid publication and minimize administrative costs. Submissions by anyone other than one of the authors will not be accepted. The submitting author takes responsibility for the paper during submission and peer review. If for some technical reason submission through the MTS is not possible, the author can contact ecam@hindawi.com for support.

Terms of Submission

Papers must be submitted on the understanding that they have not been published elsewhere and are not currently under consideration by another journal published by Hindawi or any other publisher. The submitting author is responsible for ensuring that the article's publication has been approved by all the other coauthors. It is also the authors' responsibility to ensure that the articles emanating from a particular institution are submitted with the approval of the necessary institution. Only an acknowledgment from the editorial office officially establishes the date of receipt. Further correspondence and proofs will be sent to the author(s) before publication unless otherwise indicated. It is a condition of submission of a paper that the authors permit editing of the paper for readability. All enquiries concerning the publication of accepted papers should be addressed to ecam@hindawi.com.

Peer Review

All manuscripts are subject to peer review and are expected to meet standards of academic excellence. Submissions will be considered by an editor and “if not rejected right away” by peer-reviewers, whose identities will remain anonymous to the authors.

Article Processing Charges

Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine is an open access journal. Open access charges allow publishers to make the published material available for free to all interested online visitors. For more details about the article processing charges of Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, please visit the [Article Processing Charges](#) information page.

Units of Measurement

Units of measurement should be presented simply and concisely using System International (SI) units.

Title and Authorship Information

The following information should be included

- Paper title
- Full author names
- Full institutional mailing addresses
- Email addresses

Abstract

The manuscript should contain an abstract. The abstract should be self-contained and citation-free and should not exceed 200 words.

Introduction

This section should be succinct, with no subheadings.

Materials and Methods

This part should contain sufficient detail so that all procedures can be repeated. It can be divided into subsections if several methods are described.

Results and Discussion

This section may each be divided by subheadings or may be combined.

Conclusions

This should clearly explain the main conclusions of the work highlighting its importance and relevance.

Acknowledgments

All acknowledgments (if any) should be included at the very end of the paper before the references and may include supporting grants, presentations, and so forth.

References

Authors are responsible for ensuring that the information in each reference is complete and accurate. All references must be numbered consecutively and citations of references in text should be identified using numbers in square brackets (e.g., “as discussed by Smith [9]”; “as discussed elsewhere [9, 10]”). All references should be cited within the text; otherwise, these references will be automatically removed.

Preparation of Figures

Upon submission of an article, authors are supposed to include all figures and tables in the PDF file of the manuscript. Figures and tables should not be submitted in separate files. If the article is accepted, authors will be asked to provide the source files of the figures. Each figure should be supplied in a separate electronic file. All figures should be cited in the paper in a consecutive order. Figures should be supplied in either vector art formats (Illustrator, EPS, WMF, FreeHand, CorelDraw, PowerPoint, Excel, etc.) or bitmap formats (Photoshop, TIFF, GIF, JPEG, etc.). Bitmap images should be of 300 dpi resolution at least unless the resolution is intentionally set to a lower level for scientific reasons. If a bitmap image has labels, the image and labels should be embedded in separate layers.

Preparation of Tables

Tables should be cited consecutively in the text. Every table must have a descriptive title and if numerical measurements are given, the units should be included in the column heading. Vertical rules should not be used.

Proofs

Corrected proofs must be returned to the publisher within 2-3 days of receipt. The publisher will do everything possible to ensure prompt publication. It will therefore be appreciated if the manuscripts and figures conform from the outset to the style of the journal.

Copyright

Open Access authors retain the copyrights of their papers, and all open access articles are distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution and reproduction in any medium, provided that the original work is properly cited.

The use of general descriptive names, trade names, trademarks, and so forth in this publication, even if not specifically identified, does not imply that these names are not protected by the relevant laws and regulations.

While the advice and information in this journal are believed to be true and accurate on the date of its going to press, neither the authors, the editors, nor the publisher can accept any legal responsibility for any errors or omissions that may be made. The publisher makes no warranty, express or implied, with respect to the material contained herein.

Disclosure Policy

A competing interest exists when professional judgment concerning the validity of research is influenced by a secondary interest, such as financial gain. We require that our authors reveal all possible conflicts of interest in their submitted manuscripts.