



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

TATIANE MARCUSSO ORSINI

**ATIVIDADE LEISHMANICIDA *in vitro* DO COMPOSTO  
DOADOR DE ÓXIDO NÍTRICO *cis*-[Ru(NO)(bpy)<sub>2</sub>(SO<sub>3</sub>)](PF<sub>6</sub>)  
SOBRE *Leishmania (Leishmania) amazonensis***

TATIANE MARCUSSO ORSINI

**ATIVIDADE LEISHMANICIDA *in vitro* DO COMPOSTO  
DOADOR DE ÓXIDO NÍTRICO *cis*-[Ru(NO)(bpy)<sub>2</sub>(SO<sub>3</sub>)](PF<sub>6</sub>)  
SOBRE *Leishmania (Leishmania) amazonensis***

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  
2015

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

**Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)**

O76a Orsini, Tatiane Marcusso.

Atividade leishmanicida *in vitro* do composto doador de óxido nítrico *cis*-  
[Ru(NO)(bpy)<sub>2</sub>(SO<sub>3</sub>)](PF<sub>6</sub>) sobre *Leishmania (Leishmania) amazonensis* / Tatiane  
Marcusso Orsini. – Londrina, 2015.  
59 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, 2015.

Inclui bibliografia.

1. Oxido nítrico – Teses. 2. Compostos de rutênio – Uso terapêutico –  
Teses. 3. Resposta imune – Teses. 4. Leishmaniose – Tratamento – 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

TATIANE MARCUSSO ORSINI

**ATIVIDADE LEISHMANICIDA *in vitro* DO COMPOSTO DOADOR DE  
ÓXIDO NÍTRICO *cis*-[Ru(NO)(bpy)<sub>2</sub>(SO<sub>3</sub>)](PF<sub>6</sub>) SOBRE *Leishmania*  
(*Leishmania*) *amazonensis***

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.

**BANCA EXAMINADORA**

---

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

---

Prof. Dr. Phileno Pinge Filho  
Universidade Estadual de Londrina – UEL

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Lucy Megumi Yamauchi Lioni  
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Londrina, 24 de abril de 2015.

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus meu refúgio e força, permanecendo sempre ao meu lado, me guiando em meio às dificuldades e me capacitando para tudo aquilo que Ele me destina.

À minha família, pelo amor, confiança, cuidado e sabedoria, a qual tenho maior orgulho. Meu eterno agradecimento por estarem ao meu lado me apoiando e me fazendo acreditar que nada é impossível e que sou capaz de chegar onde desejo. Ao meu namorado Armando por todo amor, compreensão e apoio condicional nos momentos difíceis, e também por compartilharmos mais esta conquista. Amo vocês.

Ao meu orientador Prof<sup>o</sup> Dr. Wander Rogério Pavanelli por ter me acolhido no Laboratório de Parasitologia, onde pude crescer tanto profissionalmente quanto como pessoa. Obrigada pelos ensinamentos, pela ajuda, paciência e dedicação dispensadas no auxílio à concretização desse mestrado.

A Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Ivete Conchon Costa, coração de mãe, obrigada por ter me recebido tão bem no Laboratório, por toda orientação e por estar sempre disposta a ajudar.

A Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Carolina Panis, um anjo na vida de todos, obrigada por toda ajuda, discussões e conhecimentos científicos dedicados ao meu trabalho.

Ao Prof<sup>o</sup> Juliano Bordignon da FIOCRUZ, o meu muito obrigada pelo fornecimento dos animais.

Aos amigos do laboratório, por toda ajuda durante os experimentos, por todo conhecimento científico e por fazerem parte dos meus dias. Obrigada pela amizade de sempre. Vou sentir saudades.

A Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Idessania, obrigada por todo conhecimento compartilhado.

A todos os funcionários do Departamento de Patologia Experimental.

A todos os Professores do Programa de Patologia Experimental por todo o conhecimento científico transmitidos durante as disciplinas.

A todos que diretamente ou indiretamente acreditaram em mim e contribuíram para que eu chegasse até aqui.

O meu carinho e muito obrigada!

“Fazer o que você gosta é liberdade.  
Gostar do que você faz é felicidade.”  
*Frank Tyger*



1 ORSINI, Tatiane Marcusso. **Atividade leishmanicida *in vitro* do composto doador**  
2 **de óxido nítrico *cis*-[Ru(NO)(bpy)<sub>2</sub>(SO<sub>3</sub>)](PF<sub>6</sub>)<sub>o</sub> sobre *Leishmania (Leishmania)***  
3 ***amazonensis***. 2015. 59p. Dissertação apresentada ao Programa de 3 Pós-  
4 Graduação em Patologia Experimental da Universidade Estadual de Londrina, como  
5 requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Patologia  
6 Experimental. Londrina, 2015.

## 7 8 9 **RESUMO**

10  
11  
12 A Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) é uma doença causada por  
13 protozoários do gênero *Leishmania*, transmitida ao homem durante o repasto  
14 sanguíneo de fêmeas dípteras. A resistência e/ou a susceptibilidade a infecção esta  
15 relacionado à resposta imunológica e também aos mecanismos de escape do  
16 parasito. Parasitos deste gênero podem permanecer no interior de macrófagos e  
17 consequentemente escaparem de vários agentes microbicidas, incluindo o óxido  
18 nítrico (NO). Para a produção de NO, a enzima óxido nítrico sintase induzível  
19 (iNOS), requer L-arginina como substrato, porém o parasito também faz uso deste  
20 aminoácido para a produção de poliaminas, que são essenciais para o seu  
21 metabolismo. Este seqüestro de L-arginina pela arginase do parasito acaba  
22 comprometendo a produção de NO pelo macrófago, consequentemente permitindo  
23 ao parasito maior permanência e sobrevivência. Na tentativa de fornecer NO  
24 exógeno, diversos complexos metálicos estão sendo utilizados como possíveis  
25 fármacos doadores de NO, dentre estes estão os compostos de Rutênio. Neste  
26 sentido, este estudo teve como objetivo investigar a atividade leishmanicida do  
27 composto *cis*-[Ru(NO)(bpy)<sub>2</sub>(SO<sub>3</sub>)]PF<sub>6</sub>, bem como elucidar os mecanismos de ação  
28 envolvidos. Nossos resultados demonstraram que o composto exerceu atividade  
29 leishmanicida sobre formas promastigotas de *Leishmania (Leishmania)*  
30 *amazonensis*, bem como sobre formas amastigotas, durante os ensaios de  
31 fagocitose. O mecanismo envolvido nesta atividade está relacionado com a  
32 capacidade deste composto em doar NO e também devido ao aumento na  
33 expressão de Akt, NFκB e iNOS. Portanto, estes resultados evidenciam a  
34 propriedade leishmanicida *in vitro* do composto *cis*-[Ru(NO)(bpy)<sub>2</sub>(SO<sub>3</sub>)]PF<sub>6</sub>,  
35 podendo ser utilizado como alternativa terapêutica para o tratamento da  
36 Leishmaniose.

37  
38 **Palavras-chave:** Doadores de óxido nítrico. *Leishmania (Leishmania) amazonensis*.  
39 Leishmanicida. Rutênio. Terapêutico.  
40



1 ORSINI, Tatiane Marcusso. **Antileishmanial activity *in vitro* of nitric oxide donor**  
2 **compound *cis*-[Ru(NO)(bpy)<sub>2</sub>(SO<sub>3</sub>)](PF<sub>6</sub>) ON *Leishmania (Leishmania)***  
3 ***amazonensis***. 2015. 59 p. Dissertation (Master's degree in Experimental Pathology)  
4 – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2015.

5  
6  
7 **ABSTRACT**  
8  
9

10 The American Cutaneous Leishmaniasis (ACL) is a disease caused by parasites of  
11 the genus *Leishmania*, transmitted to humans during the blood meal of  
12 phlebotomines. The resistance and/or susceptibility of infection are related with the  
13 immune response to the parasite as well as escape mechanisms. Parasites of this  
14 kind may remain within macrophages and thus escape from various microbial agents,  
15 including nitric oxide (NO). For the NO production, the inducible nitric oxide synthase  
16 (iNOS) requires L-arginine as a substrate, but also makes use of this parasite amino  
17 acid to produce polyamines, which are essential for the parasite metabolism. This  
18 kidnapping of L-arginine by arginase the parasite just committing NO production by  
19 macrophages, thus allowing the parasite greater permanence and survival. In an  
20 attempt to provide NO exogenous, various metal complexes have been used as  
21 potential donor drugs, among these are the compounds of ruthenium. Thus, this  
22 study aimed to investigate the activity of *cis*-[Ru(NO)(bpy)<sub>2</sub>(SO<sub>3</sub>)]PF<sub>6</sub> and elucidate  
23 the mechanisms involved. Our results demonstrate that the compound demonstrated  
24 leishmanicidal activity on *Leishmania amazonensis* promastigotes and amastigotes  
25 in during the phagocytosis assays. The mechanism involved in this activity is related  
26 to the ability of this compound to donate NO and also due to the increased  
27 expression of Akt, NFκB and iNOS. Therefore, these results show the property  
28 leishmanicidal of compound and can be used as a therapeutic alternative for the  
29 treatment of leishmaniasis.

30  
31 **Keywords:** Nitric oxide donors. Ruthenium. *Leishmania (Leishmania) amazonensis*.



## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Mapa mundial destacando as áreas onde leishmaniose visceral, cutânea e tegumentar americana são endêmicas ..... 17
- Figura 2: Ciclo biológico *Leishmania* spp ..... 19

## LISTA DE ABREVIATURAS

Akt	Proteína Kinase B
BALB/c	Linhagem de camundongos isogênicos
C57BL/6	Linhagem de camundongos isogênicos
Células Th1	Células T helper tipo 1
Células Th2	Células T helper tipo 2
cNOS	Enzima óxido nítrico sintase constitutiva
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
Gp63	Glicoproteína de 63Kda expressa na superfície de promastigotas e amastigotas
H2O2	Peróxido de Hidrogênio
IL- 2	Interleucina-2
IL- 4	Interleucina-4
IL-10	Interleucina-10
INF- $\gamma$	Interferon-gama
iNOS	Enzima óxido nítrico sintase induzível
LC	Leishmaniose cutânea
LCD	Leishmaniose cutânea difusa
LCM	Leishmaniose cutâneo-mucosa
L-NAME	L-nitro arginina metil ester
LTA	Leishmaniose Tegumentar Americana
LV	Leishmaniose Visceral
LPS	Lipopolissacarídeo
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NF $\kappa$ B	Fator nuclear $\kappa$ B

NO	Óxido nítrico
NO <sub>2</sub> -	Dióxido de nitrogênio
N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	Dióxido de dinitrogênio
NOS	Enzima óxido nítrico sintase
O <sub>2</sub> -	Ânion superóxido
OH-	Radical hidroxila
ONOO-	Peroxinitrito
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
ROS	Espécies reativas de oxigênio
RNS	Espécies reativas de nitrogênio
TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral- $\alpha$

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	16
1.1 Leishmanioses .....	16
1.2 Ciclo biológico e Vetor .....	17
1.3 Resposta Imune .....	20
1.4 Diagnóstico.....	21
1.5 Tratamento .....	21
1.6 Óxido Nítrico (NO) e Compostos doadores de NO.....	23
<b>2. REFERÊNCIAS</b> .....	27
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	34
3.1 Objetivo Geral .....	34
3.2 Objetivos Específicos .....	34
<b>4. PRODUÇÃO CIENTÍFICA</b> .....	35
4.1 Artigo .....	35
<b>5. ANEXOS</b> .....	59
5.1 Anexo 1 – Aprovação do Comitê de Ética .....	59



# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 Leishmanioses

As leishmanioses são consideradas zoonoses, que ocasionalmente infectam o homem, causadas por protozoários da ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae, do gênero *Leishmania*. Podem ser encontradas em várias formas clínicas e as principais ocorrências observadas nos pacientes podem ser classificadas também conforme seus aspectos patológicos e imunológicos (NEVES, 2011). Apresenta-se através de diferentes formas clínicas, como Leishmaniose Visceral (LV) e Leishmaniose Cutânea (LC), que afetam aproximadamente 350 milhões de pessoas no mundo todo. Dados recentes indicam que a doença é endêmica em 98 países (Figura 1), com mais de 1,6 milhões de novos casos por ano e mais de 20.000 mortes/ano (ALVAR et al., 2012).

A Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) é comumente encontrada nas Américas, a qual é caracterizada por úlceras na pele e mucosas, com bordas salientes e fundo granuloso com aspecto de exsudato purulento devido à presença de infecções secundárias, que agrupa três tipos:

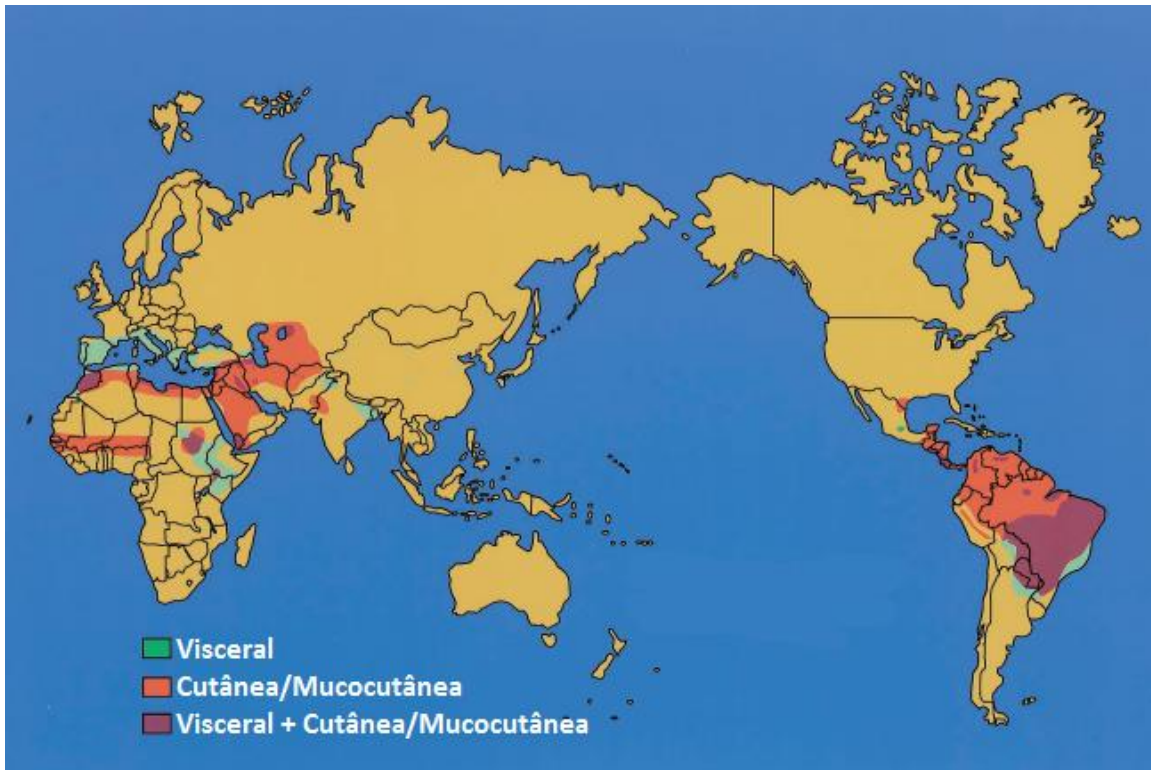
- Leishmaniose Cutânea (LC): é caracterizada pela formação de úlceras únicas ou múltiplas confinadas na derme, com a epiderme ulcerada. A densidade de parasitos é grande nas fases iniciais da infecção, com tendência a úlceras crônicas.

- Leishmaniose Cutânea Mucosa (LCM): um dos aspectos mais típicos são as lesões intensas que chegam a comprometer as mucosas e cartilagens. Trata-se de um processo lento e crônico e as áreas mais comumente afetadas são a boca, faringe e nariz.

- Leishmaniose Cutânea Difusa (LCD): caracterizada pela formação de lesões difusas por toda a pele, sem formação de úlceras, porém contém grande número de amastigotas. A disseminação do parasito é através de vasos linfáticos ou migração de macrófagos parasitados.

Nas Américas existem pelo menos 11 espécies 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*) *lindenbergi* e *Leishmania* (*Viannia*) *shawi* – e uma espécie do

1 subgênero *Leishmania* – *Leishmania (Leishmania) amazonensis* (MINISTÉRIO DA  
2 SAÚDE, 2007).



3 Figura 1: Mapa mundial destacando as áreas onde leishmaniose visceral, cutânea e tegumentar  
4 americana são endêmicas (HANDMAN, 2001).  
5

6 Segundo a Organização Mundial da Saúde (2011), a leishmaniose está  
7 diretamente associada a fatores sociais, além de ambiental e do clima que  
8 influenciam diretamente a sua epidemiologia. No caso da LC, os países mais  
9 afetados são Brasil, Colômbia, Peru e Bolívia. Anualmente, existem cerca de 64.000  
10 casos, com cerca de 60.000 da forma cutânea e mucosa, e 4.000 de leishmaniose  
11 visceral.

12 Esta doença é transmitida pelo inseto vetor encontrado em 88 países das  
13 regiões tropicais e subtropicais de todo o mundo. A infecção por *Leishmania* pode  
14 dar origem a um amplo espectro de manifestações clínicas, que vão desde úlceras  
15 da pele com auto-cura, até lesões de mucosa desfigurantes e infecções viscerais  
16 fatais (BOGITSH et al., 2005).

17

## 18 1.2 Ciclo biológico e vetor

19

20 Estes protozoários são transmitidos pelo inseto vetor, o qual é a fêmea

1 infectada que serve como hospedeiro intermediário, pertencente à ordem Diptera,  
2 família Psychodidae, subfamília Phlebotominae, gênero *Lutzomyia* no novo mundo  
3 ou *Phlebotomus* no velho mundo. No Brasil são conhecidos como mosquito palha,  
4 birigui e tatuquira (BATES, 2007; KILLICK-KENDRICK, 1999; MINISTÉRIO DA  
5 SAÚDE, 2007).

6 As principais espécies envolvidas na transmissão de LTA são: *Lutzomyia*  
7 *whitmani*, *L. flaviscutellata*, *L. umbretilis*, *L. intermedia*, *L. wellcomei* e *L. migonei*,  
8 ainda que as espécies de *Leishmania* estão associadas à espécies de  
9 flebotomíneos, como por exemplo, *L. (L.) amazonensis* é transmitida por *L.*  
10 *flaviscutellata* e *L. (V.) braziliensis* por *L. whitmani*, *L. wellcomei* e *L. intermédia*.  
11 (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007).

12 Estes parasitos são heteroxênicos, onde seu ciclo de vida apresenta  
13 diferentes formas de desenvolvimento tanto em hospedeiros vertebrados, quanto em  
14 invertebrados. Esta característica é importante para a adaptação e sucesso do  
15 parasito entre o vetor e hospedeiro (BARRETT et al., 2003; SIMPSON et al., 2004).

16 São caracterizados por duas formas, onde a forma promastigota é alongada,  
17 com flagelo ligado ao cinetoplasto que emerge a partir de uma invaginação da  
18 membrana plasmática. O comprimento do flagelo é rigorosamente controlado ao  
19 longo do ciclo de vida do parasito, especialmente sob a forma promastigota, onde é  
20 essencial para a mobilidade e a sobrevivência no interior do hospedeiro  
21 invertebrado, já a forma amastigota possui característica morfológica arredondada  
22 com flagelo curto não exteriorizado (GLUENZ et al., 2010).

23 O ciclo deste parasito começa quando o flebotomíneo fêmea infectado pica o  
24 hospedeiro para se alimentar (Figura 2). Durante o repasto sanguíneo, o inseto  
25 injeta saliva que impede a coagulação do sangue. Através disso, formas  
26 promastigotas metacíclicas são inoculadas na pele do hospedeiro (TEIXEIRA et al.,  
27 2013). No repasto sanguíneo, muitas substâncias são liberadas, induzindo o  
28 recrutamento de neutrófilos e macrófagos para a pele. Os parasitos inoculados na  
29 pele do hospedeiro e invadem primeiramente os neutrófilos, que são rapidamente  
30 recrutados (PETERS et al., 2008), para logo após infectar os macrófagos, que são  
31 importantes para o estabelecimento e amplificação da infecção.

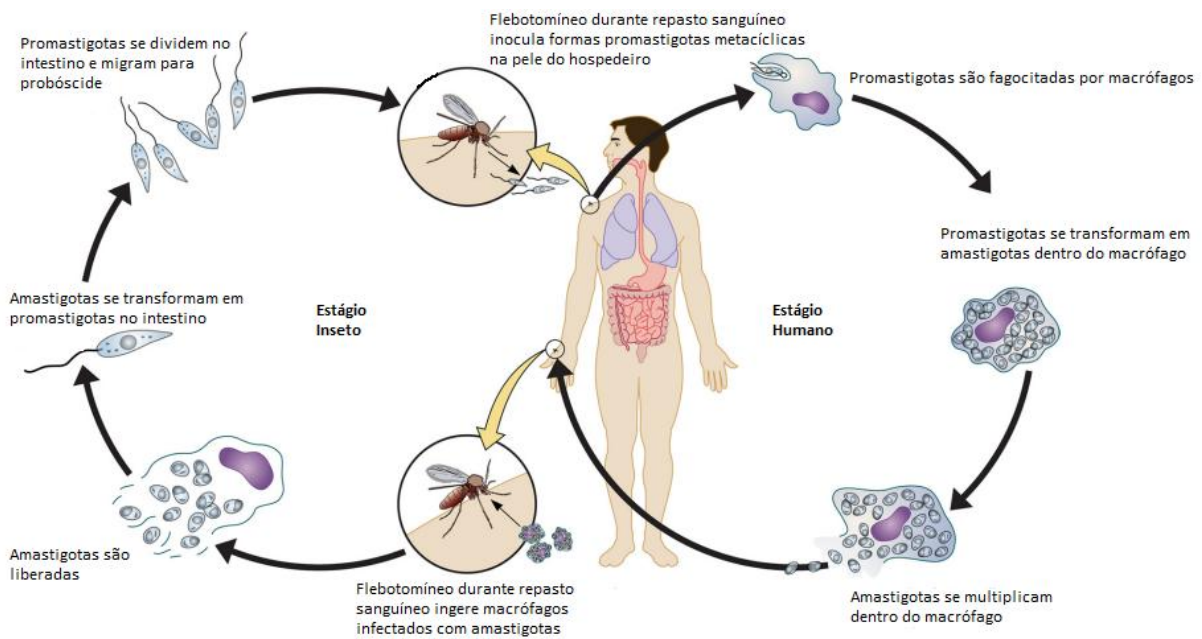


Figura 2: Ciclo biológico da Leishmaniose (ESCH; PETERSEN, 2013).

O processo de fagocitose começa com a formação de pseudópodes, e a partir disto o parasito é internalizado no vacúolo parasitóforo. Neste vacúolo, as formas promastigotas metacíclicas transformam-se em amastigotas e logo após ocorre a fusão com o lisossoma, formando o fagolisossoma. As amastigotas começam a se proliferar, promovendo a ruptura do macrófago liberando os parasitos. Essas formas podem invadir novos macrófagos ou serem ingeridas pelo flebotomíneo durante o repasto sanguíneo (STUART et al., 2008). No inseto, quando as amastigotas chegam ao intestino, se diferenciam em promastigotas procíclicas. As formas promastigotas se dividem por fissão binária e se fixam nas microvilosidades no epitélio do intestino. Após um período, estas formas se diferenciam em promastigotas metacíclicas infectantes. Todo este processo de diferenciação é chamado de metaciclogênese. Conseqüentemente, durante a alimentação do flebotomíneo, formas promastigotas metacíclicas são liberadas infectando um novo hospedeiro.

Uma vez interiorizada, a promastigota metacíclica se transforma na forma amastigota, que possui na membrana a proteína gp63, cuja ação proteolítica degrada enzimas lisossomais, dando à amastigota resistência para sobreviver no ambiente ácido do fagolisossoma (AWASTHI et al., 2004; UMAKANTI; SINGH, 2009). Outros mecanismos de escape do parasito são: a inibição da fusão do

1 fagosossoma com o lisossoma (NYLÉN; AKUFFO, 2009), como também, a  
2 capacidade do parasito de diminuir a atividade da enzima óxido nítrico sintase  
3 induzível (iNOS), responsável pela produção de óxido nítrico, importante agente  
4 leishmanicida produzido quando macrófagos estão ativados (DA SILVA, 2010).

### 6 **1.3 Resposta Imune**

8 O modelo de infecção de LC mais estudado é com a espécie *Leishmania*  
9 *major* (SACKS; NOBEN-TRAUTH, 2002). Este modelo de infecção é importante para  
10 se conhecer a resposta imune associada à cicatrização da lesão em camundongos  
11 C57BL/6 que são resistentes á infecção e desenvolvem um padrão de resposta Th1,  
12 com produção de Interleucina-2 e Interferon- $\gamma$  e também respostas relacionadas com  
13 a susceptibilidade ao parasito, como acontece em camundongos BALB/c, que  
14 apresentam um padrão de resposta Th2, com produção de IL-4 e IL-10.

15 Em contraste com a infecção por *L. major*, a maioria dos camundongos são  
16 susceptíveis à *L. amazonensis*, incluindo C57BL/6, apresentando lesões crônicas.  
17 Na infecção por *L. amazonensis*, a resistência e a susceptibilidade não está  
18 estritamente relacionada com o desenvolvimento de uma resposta Th1 e uma  
19 resposta Th2, respectivamente.

20 Muitos fatores parecem estar associados com a susceptibilidade a *L.*  
21 *amazonensis*. Em primeiro lugar, o parasito é capaz de inibir a maturação de células  
22 dendríticas e subsequente produção de IL-12 por estas células, podendo impedir o  
23 desenvolvimento de uma resposta Th1 exacerbada (AFONSO; SCOTT, 1993). Além  
24 das falhas na resposta imunológica adquirida, as funções efetoras de macrófagos  
25 também ficam comprometidas. O parasito desenvolveu estratégias adaptativas para  
26 escapar das defesas do hospedeiro, incluindo a inativação do complexo NF- $\kappa$ B, que  
27 suprime a expressão de iNOS por macrófagos infectados, favorecendo a replicação  
28 e o sucesso da infecção por *L. amazonensis* (CALEGARI-SILVA et al., 2009). Além  
29 disso, a morte de amastigotas de *L. amazonensis* por macrófagos exige elevados  
30 níveis de óxido nítrico e também de ânion superóxido (MUKBEL et al., 2007).

31 Macrófagos são as principais células-alvo para a replicação do parasito, e  
32 como se sabe, estes são capazes de matar organismos intracelulares, mas  
33 *Leishmania* tem a capacidade de subverter os mecanismos antimicrobianos e  
34 persistir em longo prazo no processo de infecção dentro destas células,

1 apresentando uma vantagem para o parasito e um grande desafio para o hospedeiro  
2 controlar esta infecção. Estes macrófagos totalmente ativados podem produzir  
3 moléculas leishmanicidas, como óxido nítrico (NO) e mediadores oxidativos,  
4 eliminando os parasitos de forma eficaz. Alternativamente macrófagos ativados  
5 preferencialmente ativam a via arginase para produzir poliaminas e aumentar a  
6 replicação do parasito e sua sobrevivência (KREIDER et al., 2007; NOEL et al.,  
7 2004).

8 Portanto, a ativação do macrófago pode levar a resultados diferentes da  
9 infecção, estas duas vias utilizam a L-arginina como um substrato comum para as  
10 suas atividades enzimáticas. Diante disso, L-arginina está dividida entre a vida e a  
11 morte destes parasitos, e seu metabolismo é um fator determinante para o resultado  
12 da infecção (PELUFFO et al., 2004; POPOVIC et al., 2007).

13

#### 14 **1.4 Diagnóstico**

15

16 Para o diagnóstico da LTA é necessária associação entre dados clínicos,  
17 epidemiológicos e laboratoriais, que incluem pesquisa parasitológica e imunológica.  
18 Muitas vezes as lesões podem ser confundidas com hanseníase, sífilis, micoses e  
19 até mesmo câncer (SINGH, 2006).

20 No exame parasitológico é realizado biópsia da lesão, analisando parâmetros  
21 histopatológicos, esfregaços direto corados, também cultivo *in vitro* para  
22 identificação de formas promastigotas, ensaio imunoenzimático (ELISA), e também  
23 extração de DNA realizado por PCR (REITHINGER et. al, 2007).

24 O teste de Intradermorreação de Montenegro é o mais utilizado no Brasil,  
25 onde o objetivo deste é avaliar a reação de hipersensibilidade tardia do paciente. Foi  
26 padronizado antígeno de formas promastigotas mortas que oferece melhores  
27 resultados, onde no caso de testes positivos verifica-se a formação de uma reação  
28 inflamatória, como um nódulo (NEVES, 2011).

29

#### 30 **1.5 Tratamento**

31

32 O tratamento das leishmanioses é realizado com a utilização de fármacos  
33 quimioterápicos. Diversos fármacos são utilizados e estão disponíveis para o

1 tratamento da doença, mas o antimonial pentavalente utilizado há mais de 50 anos,  
2 ainda é o fármaco de primeira escolha (AREVALO et al., 2007).

3 O tratamento da LTA foi implantado pelo médico brasileiro Gaspar Vianna,  
4 em 1912, com o uso do antimonial tártaro emético. Esta substância se constituiu  
5 durante muito tempo como ótima ação terapêutica em todo o mundo. No momento  
6 utiliza-se antimoniais pentavalentes como fármaco de primeira escolha, o  
7 Glucantime® (antimoniato de N-metilglucamina), e também Pentostan®  
8 (estibogluconato de sódio) (NEVES, 2011).

9 O Ministério da Saúde e a OMS recomendam para o tratamento da LTA, a  
10 utilização de 20 mg de antimônio pentavalente/kg durante 20 dias, no caso da forma  
11 cutânea e difusa, ou durante 30 dias para a forma mucosa da doença, podendo ser  
12 repetido o tratamento caso haja falha terapêutica (OMS, 2011).

13 Durante o tratamento, pode haver efeitos colaterais como náuseas, vômitos,  
14 febre e cefaleia, além de ocorrer resistência do parasito ao tratamento e algumas  
15 complicações como cardiotoxicidade e elevação das enzimas hepatocelulares  
16 (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007).

17 A Anfotericina B e a Pentamidina foram escolhidas como fármacos de  
18 segunda escolha para o tratamento da leishmaniose. A anfotericina B é utilizada  
19 como antifúngico, pois ela interage com esteróis da membrana do fungo, tendo  
20 como prioridade o ergosterol. *Leishmania* também possui esteróis similares ao  
21 ergosterol em sua membrana, o que explica a sua ação contra este parasito  
22 (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007).

23 No tratamento das leishmanioses, a Pentamidina tem sido muito utilizada,  
24 pois alguns casos apresentam resistência ao tratamento com antimônio. O  
25 mecanismo de ação da Pentamidina inclui a inibição da síntese de poliaminas, um  
26 nutriente para *Leishmania*. Mas sua utilização pode causar efeitos colaterais como  
27 hipotensão, hipoglicemia, diabetes, nefrotoxicidade, taquicardia (CROFT et al, 2006).  
28 A via de administração normalmente é intramuscular, mas pode ser realizado  
29 também por via endovenosa ou local. Porém, estes tratamentos apresentam  
30 algumas contra-indicações como em caso de: gravidez, diabetes, nefropatias com  
31 insuficiência renal e cardiopatias. A medicação pode produzir alguns efeitos  
32 colaterais como: náuseas, vômitos, cefaléia, hipoglicemia, hipotensão durante a  
33 infusão, aumento de ureia e creatinina (FUNASA, 2000).

1 O miltefosine é um novo fármaco que mostrou-se mais eficaz na  
2 leishmaniose visceral, e pacientes com leishmaniose cutânea difusa e mucosa  
3 também já foram tratados (SUNDAR et al., 2002). Esse fármaco tem atividade  
4 leishmanicida devido à sua interferência nas vias metabólicas do parasito e na  
5 indução à apoptose, e é o primeiro a ser utilizada via oral para tratamento (SOTO;  
6 SOTO, 2006).

7 Em consonância com a falta de medicamentos seguros e os efeitos  
8 secundários graves causados pela quimioterapia disponível, há uma necessidade  
9 urgente em identificar novas terapias.

## 11 1.6 Óxido Nítrico (NO) e Compostos Doadores de NO

13 O NO é encontrado em estado gasoso, contém um elétron desemparelhado, e  
14 possui meia-vida de 5 a 10 segundos, especialmente frente a outras moléculas  
15 paramagnéticas, tais como oxigênio molecular ( $O_2$ ) e ânion superóxido ( $O_2^-$ )  
16 (BARRETO et al., 2005).

17 A síntese do NO é resultado da oxidação do aminoácido L-arginina, o qual é  
18 convertido em L-citrulina e NO, onde esta reação é catalisada pela enzima óxido  
19 nítrico sintase (iNOS). Estudos bioquímicos e análises de aminoácidos revelaram  
20 que existem isoformas onde representam uma família de proteínas e,  
21 aparentemente, são produtos de três genes distintos. Assim, as isoformas da NOS  
22 são classificadas em duas categorias, a NOS constitutiva (cNOS) que é dependente  
23 de íons cálcio ( $Ca^{2+}$ ) e de calmodulina da qual fazem fazer a enzima óxido nítrico  
24 sintase neuronal (nNOS) e a enzima óxido nítrico sintase endotelial (eNOS), e a  
25 outra categoria é a NOS induzível (iNOS), também conhecida como NOS2, que está  
26 presente em macrófagos e outras células ativadas por citocinas (DUSSE et al.,  
27 2003).

28 A iNOS atua na produção de NO, exibindo uma importante resposta  
29 microbicida dessas células aos patógenos. A enzima Arginase, compete com a iNOS  
30 pela L-arginina, onde os parasitos modulam a resposta das células através da  
31 ativação desta. Este mecanismo leva à depleção de L-arginina, com alteração na  
32 produção de NO pelo hospedeiro e aumento da produção de poliaminas essenciais  
33 ao crescimento e diferenciação do próprio parasito (WANASEN; SOONG, 2008).

1 Entre vários mecanismos efetores, a produção de NO pela iNOS desempenha  
2 um papel fundamental contra infecções por bactérias intracelulares, tais como  
3 *Mycobacterium tuberculosis*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enterica* e  
4 parasitos, *Leishmania* e *Trypanosoma cruzi* (FANG, 2004).

5 Parasitos do gênero *Leishmania* residem e replicam-se em vacúolos  
6 parasitóforos dentro de fagócitos mononucleares, incluindo macrófagos (KAYE;  
7 SCOTT, 2011). A indução de iNOS é um processo totalmente organizado que exige  
8 a ativação concomitante das vias STAT e NF-κB (FARLIK et al., 2010). Tipicamente,  
9 experimentos *in vitro* mostraram que a combinação de IFN-γ com LPS ou TNF-α  
10 desencadeia eficientemente a expressão de iNOS em macrófagos (LIEW et al.,  
11 1990; XIE et al., 1993).

12 Ao contrário das espécies reativas de oxigênio (ROS), que estão  
13 concentradas no fagossoma, o NO é sintetizado no citoplasma da célula. De lá, ele  
14 pode chegar ao vacúolo parasitóforo e gerar compostos tóxicos, como o peroxinitrito  
15 (ONOO<sup>-</sup>) (BOGDAN et al., 2000), ou se difundir para fora da célula (BOGDAN,  
16 2001). Sendo assim, através da sua difusão o NO pode exercer a sua atividade  
17 antimicrobiana a uma distância maior. Isto poderia explicar como NO atua para  
18 controlar os parasitos em células que não parecem expressar iNOS.

19 Após a fagocitose dos agentes patogênicos, macrófagos geram ânion  
20 superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) através do complexo de NADPH-oxidase. O<sub>2</sub><sup>-</sup> pode ser dismutado à  
21 peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), um oxidante que facilmente se difunde através da  
22 membrana e tem a propensão para gerar o radical hidroxila altamente reativo (OH<sup>•</sup>)  
23 através da sua reação com o ferro (FANG, 2011).

24 É provável que a atividade leishmanicida que emana de iNOS envolva uma  
25 grande quantidade de compostos de NO, incluindo o dióxido de nitrogênio (NO<sub>2</sub>),  
26 dióxido de dinitrogênio (N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) e peroxinitrito (ONOO<sup>-</sup>), que são gerados na reação  
27 de NO com O<sub>2</sub> e O<sub>2</sub><sup>-</sup>. Em particular, a forte ação do ONOO<sup>-</sup> tem mostrado mediar a  
28 toxicidade contra *Leishmania* (LINARES et al., 2001), muito provavelmente através  
29 da nitração e/ou oxidação de proteínas de membrana destes parasitos (RADI, 2013).  
30 Estas moléculas são cruciais para controlar a carga parasitária durante o  
31 desenvolvimento da leishmaniose cutânea e visceral (KHOURI et al., 2009). Sabe-se  
32 também que tanto espécies reativas de oxigênio (ROS) como espécies reativas de  
33 nitrogênio (RNS), podem mediar citotoxicidade através da oxidação ou nitrosilação  
34 de tióis de cisteína em proteínas essenciais para a função celular (VÁZQUES-

1 TORRES, 2012; LINARES et al., 2008). Além disso, o efeito leishmanicida de NO  
2 pode ser parcialmente atribuído à inativação do fator de virulência cisteína protease  
3 através de nitrosilação de resíduos catalíticos (SALVATI et al., 2001; BOCEDI et al.,  
4 2004).

5 A fim de sobreviver no fagolissoma, este parasito tem desenvolvido um  
6 sistema distinto para a defesa contra as espécies reativas derivadas do hospedeiro.  
7 Estes parasitos são conhecidos por diminuir ativamente a produção de ROS e RNS,  
8 interferindo na montagem da NADPH-oxidase (LODGE; DESCOTEAUX, 2006), ou  
9 através da ruptura das vias de sinalização que regulam a transcrição de iNOS  
10 (WILKINS-RODRIGUEZ et al., 2010).

11 Curiosamente, a susceptibilidade a ROS e RNS é altamente variável entre as  
12 espécies de *Leishmania* e aos seus estágios de desenvolvimento, apesar de dados  
13 genômicos indicarem que todas as espécies sequenciadas possuem sistemas  
14 antioxidantes semelhantes. Por exemplo, *L. mexicana*, *L. amazonensis*, *L. pifanoi*  
15 apresentam uma melhor resistência ao ROS e RNS, *in vitro* (SOONG et al., 2012).  
16 Além disso, amastigotas são mais resistentes à atividade leishmanicida de RNS em  
17 comparação com promastigotas (BARR; GEDAMU, 2003).

18 As diversas atividades de NO em meio biológico tem aumentado o estudo da  
19 sua interação com complexos de metais, como por exemplo, o rutênio, que tem  
20 como principal objetivo utilizar estes compostos como possível substância  
21 transportadora de NO em condições biológicas (FORD; LORKOVIC, 2002).

22 Os compostos de Rutênio estão sendo utilizados devido aos seus efeitos  
23 farmacológicos e também por exibirem características químicas semelhantes as do  
24 metal ferro, presente nas enzimas de sistemas biológicos. É importante citar que  
25 esses complexos podem controlar infecções causadas por *T. cruzi* (SILVA et al.,  
26 2010), *Paracoccidioides brasiliensis* (PAVANELLI et al. 2011) e *L. major* (PEREIRA  
27 et al. 2010), e também são eficazes contra células cancerígenas (CLARKE et al.  
28 1999). Além disso, os compostos de rutênio possuem excelentes propriedades  
29 como: baixa citotoxicidade contra as células do hospedeiro; alta solubilidade em  
30 água (TFOUNI et al., 2012), e capacidade de liberar NO controladamente (SOUZA et  
31 al., 2006), justificando o grande interesse destes como doadores de NO.

32 Estudos analisaram que alguns doadores utilizados em formas promastigotas  
33 e amastigotas, inibiram a atividade mitocondrial do parasito (MAUËL; RANSIJN,  
34 1997).

1 Para uma melhor liberação do NO, e nitrosilação dessas moléculas de  
2 rutênio, é necessária a adição de um redutor biológico como o ácido ascórbico. De  
3 fato, estudos comprovaram que a adição deste, aumentou a ação leishmanicida do  
4 complexo (PEREIRA et al., 2010).

5 Silva e colaboradores (2007) relataram que estudos realizados *in vitro* e *in*  
6 *vivo* utilizando compostos *trans*-[RuNO(NH<sub>3</sub>)<sub>4</sub>SO<sub>3</sub>]PF<sub>6</sub> e [RuNO(Hedta)] contra *T.*  
7 *cruzi* mostraram que estes apresentaram ação tripanocida sem promover danos à  
8 células do hospedeiro.

9 Foi confirmado que complexos de rutênio, por exemplo [RuCl<sub>2</sub>(clotrimazol)<sub>2</sub>]  
10 (SANCHEZ-DELGADO et al., 1993) e *trans*-[Ru(benznidazol)(NH<sub>3</sub>)<sub>4</sub>SO<sub>2</sub>](CF<sub>3</sub>SO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>  
11 (SILVA ET AL., 2009), atuam na eliminação de *T. cruzi* e *Plasmodium* sp e o  
12 complexo *trans*-[Ru(NO)(NH<sub>3</sub>)<sub>4</sub>SO<sub>3</sub>](PF<sub>6</sub>)<sub>3</sub> exibe atividade leishmanicida *in vitro* e *in*  
13 *vivo* contra *Leishmania major* (PEREIRA et al., 2010).

14 Levando em conta o potencial catalítico deste complexo de rutênio, podendo  
15 ser uma fonte adicional de NO em meio biológico, o nosso grupo de pesquisa se  
16 propôs a investigar suas propriedades microbicidas na leishmaniose experimental.

## 2. REFERÊNCIAS

- AFONSO, L.C. & SCOTT, P. Immune responses associated with susceptibility of C57BL/10 mice to *Leishmania amazonensis*. **Infection and Immunity**, v.61, (7), p.2952-9, 1993.
- ALVAR, J.; VÉLEZ, I.D.; BERN, C.; HERRERO, M.; DESJEUX, P.; CANO, J.; JANNIN, J.; BOER, M. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. **Plos One**, v.7, (5), p. e35671, 2012.
- AREVALO, J.; RAMIREZ, L.; ADAUI, V.; ZIMIC, M.; TULLIANO, G.; MIRANDA-VERÁSTEQUI, C.; LAZO, M.; LOAYZA-MURO, R.; DE DONCKER, S.; MAURER, A.; CHAPPUIS F.; DUJARDIN, J.C.; LLANOS-CUENTAS, A. Influence of *Leishmania (Viannia)* species on the response to antimonial treatment in patients with American Tegumentary Leishmaniasis. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 195, n.12, p.1846-51, 2007.
- AWASTHI, A.; MATHUR, R. K.; SAHA, B. Immune response to *Leishmania* infection. **Indian Journal of Medical Research**, v.119, p.238-258, 2004.
- BARR, S.D.; GEDAMU, L. Role of peroxidoxins in *Leishmania chagasi* survival. Evidence of an enzymatic defense against nitrosative stress. **The Journal of Biological Chemistry**, v.278, p.10816–10823, 2003.
- BARRETO, R.L.; CORREIA, C.R.D.; MUSCARÁ, M.N. Óxido nítrico: propriedades e potenciais usos terapêuticos. **Química Nova**, v.28. p.1046-1054, 2005.
- BARRETT, M.P.; BURCHMORE, R.J.; STICH, A.; LAZZARI, J.O.; FRASCH, A.C.; CAZZULO, J.J.; KRISHNA, S. The trypanosomiases. **The Lancet**, v. 362, p.1469–1480, 2003.
- BATES, P. A. Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. **International Journal of Parasitology**, v. 37, n. 10, p. 1097-106, 2007.
- BOCEDI, A.; GRADONI, L.; MENEGATTI, E.; ASCENZI, P. Kinetics of parasite cysteine proteinase inactivation by NO-donors. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1703, p.69–77, 2004.

BOGDAN, C. Nitric oxide and the immune response. **Nature Immunology**, v.2, (10), p.907–916, 2001.

BOGDAN, C.; ROLLINGHOFF, M.; DIEFENBACH, A. Reactive oxygen and reactive nitrogen intermediates in innate and specific immunity. **Current Opinion in Immunology**, v.12, (1), p.64–76, 2000.

BOGITSH, B.J.; CARTER, C.E.; OELTMANN, T.N. Blood and tissue protozoa I: hemaflagellates. **Human Parasitology**, vol.3rd ed. Elsevier Academic Press; Burlington, p.101-14, 2005.

CALEGARI-SILVA. T.C.; PEREIRA, R.M.; DE-MELO, L.D.; SARAIVA, E.M.; SOARES, D.C.; BELLIO, M.; LOPES, U.G. NF-kappaB-mediated repression of iNOS expression in *Leishmania amazonensis* macrophage infection. **Immunology Letters**, v.127, 2009.

CLARKE, M.J.; ZHU, F.; FRASCA, D.R. Non-platinum chemotherapeutic metallopharmaceuticals. **Chemical Reviews**, v.99, p.2511–2534, 1999.

CROFT, S.L.; SUNDAR, S.; FAIRLAMB, A.H. Drug resistance in leishmaniasis. **Clinical Microbiology Reviews**, v.19, n.1, p.111-26, 2006.

DA SILVA, M.F.L. A relação entre a localização celular da arginase na *Leishmania (Leishmania) amazonensis* e seu papel durante a infecção em macrófago. Tese. Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

DUSSE, L.M.S.; VIEIRA, L.M.; CARVALHO, M.G. Revisão sobre óxido nítrico. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v.39, p.343-350, 2003.

ESCH, K.J.; PETERSEN, C.A. Transmission and Epidemiology of zoonotic protozoal diseases of companion animals. **Clinica Microbiology Reviews**, v.26, n.1, p.58-85, 2013.

FANG, F.C. Antimicrobial reactive oxygen and nitrogen species: concepts and controversies. **Nature Reviews Microbiology**, v.2, (10), p.820–832, 2004.

FANG, F.C. Antimicrobial Actions of Reactive Oxygen Species. **mBio**, v.2, 2011.

FARLIK, M.; REUTTERER, B.; SCHINDLER, C.; GRETEN, F.; VOGL, C.; MÜLLER, M.; DECKER, T. Nonconventional initiation complex assembly by STAT and NF- $\kappa$ B transcription factors regulates nitric oxide synthase expression. **Immunity**, v.33, (1), p.25–34, 2010.

FORD, P.C.; LORKOVIC, I.M. Mechanistic aspects of the reactions of nitric oxide with transition–metal complexes. **Chemical Reviews**, v.102, (4), p.993–1018, 2002.

FUNASA. Manual de Controle da Leishmaniose Tegumentar Americana / Organização: Gerência Técnica de Doenças Transmitidas por Vetores e Antropozoonoses. - Coordenação de Vigilância Epidemiológica - Centro Nacional de Epidemiologia – Fundação Nacional de Saúde - Ministério da Saúde. Brasília – p: 7-28, 2000.

GLUENZ, E.; GINGER, M.L.; MCKEAN, P.G. Flagellum assembly and function during the *Leishmania* life cycle. **Current Opinion in Microbiology**, v.13, p.473-479, 2010.

HANDMAN, E. Leishmaniasis: Current status of vaccine development. **Clinical Microbiology Reviews**, v.14, n.12, p.229-243, 2001.

KAYE, P.; SCOTT, P. Leishmaniasis: complexity at the host-pathogen interface. **Nature Reviews Microbiology**, v.9, (8), p.604–615, 2011.

KHOURI R, BAFICA A, SILVA MDPP, NORONHA A, KOLB J-P.; WIETZERBIN, J.; BARRAL, A.; BARRAL-NETTO, M.; VAN WEYENBERGH, J. IFN $\gamma$  impairs superoxide-dependent parasite killing in human macrophages: evidence for a deleterious role of SOD1 in cutaneous leishmaniasis. **The Journal of Immunology**, v.182, p.2525–2531, 2009.

KILLICK-KENDRICK, R. The biology and control of Phlebotomine sand flies. **Clinics in Dermatology**, v. 17, n. 3, p. 279 - 289, 1999.

KREIDER, T.; ANTHONY, R.M.; URBAN, J.F. JR.; GAUSE, W.C. Alternatively activated macrophages in helminth infections. **Current Opinion in Immunology**, v.19, p.448–53, 2007.

LIEW, F.Y.; LI, Y.; MILLOTT, S. Tumor necrosis factor-alpha synergizes with IFN- $\gamma$  in mediating killing of *Leishmania major* through the induction of nitric oxide. **The Journal of Immunology**, v.145, (12), p.4306–4310, 1990.

LINARES, E.; GIORGIO, S.; MORTARA, R.A.; SANTOS, C.X.C.; YAMADA, A.T.; AUGUSTO, O. Role of peroxynitrite in macrophage microbicidal mechanisms *in vivo* revealed by protein nitration and hydroxylation. **Free Radical Biology and Medicine**, v.30, p.1234–1242, 2001.

LINARES, E.; GIORGIO, S.; AUGUSTO, O. Inhibition of *in vivo* leishmanicidal mechanisms by tempol: Nitric oxide down-regulation and oxidant scavenging. **Free Radical Biology and Medicine**, v.44, p.1668–1676, 2008.

LODGE, R.; DESCOTEAUX, A. Phagocytosis of *Leishmania donovani* amastigotes is Rac1 dependent and occurs in the absence of NADPH oxidase activation. **European Journal of Immunology**, v.36, p.2735–2744, 2006.

MAUËL, J.; RANSIJN, A. *Leishmania* spp.: Mechanisms of Toxicity of Nitrogen Oxidation Products. **Experimental Parasitology**, v. 87, p. 98-111, 1997.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana**. Série A. Normas e Manuais Técnicos. Brasília – DF: Editora do Ministério da Saúde, p. 182, Série A. Normas e Manuais Técnicos, 2 ed. 2007.

MUKBEL, R.M.; PATTEN, C. JR; GIBSON, K.; GHOSH, M.; PETERSEN; C.; JONES, D.E. Macrophage killing of *Leishmania amazonensis* amastigotes requires both nitric oxide and superoxide. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.76, p.669-675, 2007.

NEVES, D.P. Parasitologia Humana. 11. ed. Capítulo 8, p. 49. São Paulo: Atheneu, 2011.

NOEL, W.; RAES, G.; HASSANZADEH, G.G.; DE BAETSELIER, P.; BESCHIN, A. Alternatively activated macrophages during parasite infections. **Trends in Parasitology**, v.20, p.126–33, 2004.

NYLÉN, S.; AKUFFO, H. Tracing immunity to human leishmaniasis. **Future Microbiology**, v.4, (2), p.241–254, 2009.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Control of the Leishmaniasis. **WHO Technical Reports Series**, 2011.

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.D.E.;

WATANABE, M.A.; ITANO, E.N. Experimental chemotherapy in paracoccidioidomycosis using ruthenium NO donor. **Mycopathologia**, v.172, (2), p.95–107, 2011.

PELUFFO, G.; PIACENZA, L.; IRIGOIN, F.; ALVAREZ, M.N.; RADI, R. L-arginine metabolism during interaction of *Trypanosoma cruzi* with host cells. **Trends in Parasitology**, v.20, p.363–9, 2004.

PEREIRA, J.C.; CARREGARO, V.; COSTA, D.L.; DA SILVA, J.S.; CUNHA, F.Q.; FRANCO, D.W. Antileishmanial activity of ruthenium(II)tetraammine nitrosyl complexes. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 45, p. 4180-7, 2010.

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**, v.321, p.970–974, 2008.

POPOVIC, P.J.; ZEH, H.J.; OCHOA, J.B. Arginine and immunity. **The Journal of Nutrition**, v.137, p.1681S–6S, 2007.

RADI, R. Peroxynitrite, a stealthy biological oxidant. **The Journal of Biological Chemistry**, v.288, p.26464–26472, 2013.

REITHINGER, R.; DUJARDIN, J.C.; LOUZIR, H.; PIRMEZ, C.; ALEXANDER, B.; BROOKER, S. Cutaneous Leishmaniasis. **The Lancet Infectious Disease**, v.7, n.9, p.581-96, 2007.

SACKS, D.; NOBEN-TRAUTH, N. The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice. **Nature Reviews Immunology**, v. 2, n. 11, p. 845-858, 2002.

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

SANCHEZ-DELGADO, R.A.; LAZARDI, K.; RINCO´N, L.; URBINA, J.A.; HUBERT, A.J.; NOELS, A.F. Toward a novel metal-based chemotherapy against tropical diseases. 1. Enhancement of the efficacy of clotrimazole against *Trypanosoma cruzi* by complexation to ruthenium in RuCl<sub>2</sub>(clotrimazole)<sub>2</sub>. **Journal of Medical Chemistry**, v.36, p. 2041-2043, 1993.

SILVA, J.J.N.; OSAKABE, A. L.; PAVANELLI, W. R.; SILVA, J .S.; FRANCO, D. W. In vitro and in vivo antiproliferative and trypanocidal activities of ruthenium NO donors. **British Journal of Pharmacology**, v.152, p.112-121, 2007.

SILVA, J.J.N.; PAVANELLI, W.R.; PEREIRA, J.C.M.; SILVA, J.S.; FRANCO, D.W. Experimental chemotherapy against *Trypanosoma cruzi* infection using ruthenium NO-donors. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, 2009.

SILVA, J.J.N.; GUEDES, P.M.M.; ZOTTIS, A.; BALLIANO, T.L.; SILVA, F.O.N.; LOPES, L.G.F.; ELLENA, J.; OLIVA, G.; ANDRICOPULO, A.D.; FRANCO, D.W.; SILVA, J.S. Novel ruthenium complexes as potential drugs for Chagas's disease: enzyme inhibition and in vitro/in vivo trypanocidal activity. **British Pharmacological Society**, 2010.

SIMPSON, A.G.B.; GILL, E.E.; HEATHER, A.; CALLAHAN, R.; LITAKER, W.; ROGER, A.J. Early evolution within kinetoplastids (Euglenozoa) and the late emergence of trypanosomatids. **Protist**, v.155, p.407-422, 2004.

SINGH, S. New developments in diagnosis of leishmaniasis. **Indian Journal of Medical Research**, v.123, p 311-330, 2006.

SOONG, L.; HENARD, C.A.; MELBY, P.C. Immunopathogenesis of non-healing American cutaneous leishmaniasis and progressive visceral leishmaniasis. **Seminars in Immunopathology**, v.34, p.735–751, 2012.

SOTO, J.; SOTO, P. Miltefosine: oral treatment of leishmaniasis. **Expert Review Anti-Infective Therapy**, v.4, n.2, p. 177-85, 2006.

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: Biology and Chemistry**, v. 15, p. 209-216, 2006.

STUART, K.; BRUN, R.; CROFT, S.; FAIRLAMB, A.; GÜRTLER RE.; MCKERROW, J.; REED, S.; TARLETON, R. Kinetoplastids: related protozoan pathogens, different diseases. **The Journal of Clinical Investigation**, v.118, p.1301–1310, 2008.

SUNDAR, S.; JHA T. K. et al. Oral miltefosine for Indian visceral leishmaniasis. **New England Journal of Medicine**, v.347, n.22, p. 1739-46, 2002.

TEIXEIRA, D.E.; BENCHIMOL, M.; RODRIGUES, J.C.F.; CREPALDI, P.H.; PIMENTA, P.F.P.; SOUZA, W. The Cell Biology of *Leishmania*: How to Teach Using Animations. **Plos Pathogens**, v.9, (10), 2013.

TFOUNI, E.; TRUZZI, D.R.; TAVARES, A.; GOMES, A.J.; FIGUEIREDO, L.E.; FRANCO, D.W. Biological activity of ruthenium nitrosyl complexes, **Nitric Oxide**, v.26, (1), p.38–53, 2012.

UMAKANTI, S.; SINGH, S. Immunobiology of leishmaniasis. **Indian Journal of Experimental Biology**, v.47, p.412-423, 2009.

VÁZQUEZ-TORRES, A.A. Redox active thiol sensors of oxidative and nitrosative stress. **Antioxidants and Redox Signaling**, v.17, p.1201–1214, 2012.

WANASEN, N.; SOONG, L. L-arginine metabolism and its impact on host immunity against *Leishmania* infection. **Immunologic Research**, v.41, p.15-25, 2008.

WILKINS-RODRÍGUEZ, A.A.; ESCALONA-MONTAÑO, A.R.; AGUIRRE-GARCÍA, M.; BECKER, I.; GUTIÉRREZ-KOBEH, L. Regulation of the expression of nitric oxide synthase by *Leishmania mexicana* amastigotes in murine dendritic cells. **Experimental Parasitology**, v.126, p.426–434, 2010.

XIE, Q.W.; WHISNANT, R.; NATHAN, C. Promoter of the mouse gene encoding calcium-independent nitric oxide synthase confers inducibility by interferon gamma and bacterial lipopolysaccharide. **The Journal of Experimental Medicine**, v.177, (6), 1779–1784, 1993.

1 **3. OBJETIVOS**

2

3 **3.1 Geral**

4 Avaliar a atividade biológica do Composto Doador de Óxido Nítrico *cis-*  
5  $[\text{RuNO}(\text{bpy})_2\text{SO}_3](\text{PF}_6)$  *in vitro* sobre formas promastigotas de *Leishmania*  
6 (*Leishmania*) *amazonensis*.

7

8

9 **3.2 Objetivos específicos**

- 10 • Analisar *in vitro* a atividade leishmanicida do composto sobre formas  
11 promastigotas de *L. amazonensis*
- 12 • Avaliar *in vitro* a atividade leishmanicida do composto sobre formas amastigotas  
13 durante o ensaio fagocítico;
- 14 • Determinar a concentração de óxido nítrico e a produção de citocinas (pró e  
15 anti-inflamatória) a partir do sobrenadante do ensaio fagocítico.
- 16 • Determinar a via de sinalização (NF- $\kappa$ B, iNOS e Akt) ativada pelo composto  
17 durante o ensaio fagocítico.



## 4. PRODUÇÃO CIENTÍFICA

### 4.1 Artigo

#### **Antileishmanial activity and inducible nitric oxide synthase activation by RuNO complex**

Tatiane Marcusso Orsini<sup>a</sup>, Natalia Yoshie Kawakami<sup>a</sup>, Carolina Panis<sup>b</sup>, Ana Paula Fortes dos Santos Thomazelli<sup>a</sup>, Allan Henrique Depieri Cataneo<sup>a</sup>, Fernanda Tomiotto Pellisier<sup>a</sup>, Florêncio S. Gouveia Júnior<sup>c</sup>, Luiz Gonzaga de França Lopes<sup>c</sup>, Rubens Cecchini<sup>a</sup>, Idessânia Nazareth Costa<sup>a</sup>, Jean Jerley Nogueira da Silva<sup>d</sup>, Ivete Conchon-Costa<sup>a</sup>, Wander Rogério Pavanelli<sup>a\*</sup>.

<sup>a</sup> Department of Pathological Sciences, Center of Biological Sciences, State University of Londrina, Londrina, Paraná, Brazil.

<sup>b</sup> Laboratory of Inflammatory Mediators, State University of Western Paraná, Francisco Beltrão, Paraná, Brazil.

<sup>c</sup> Department of Organic and Inorganic Chemistry, Federal University of Ceará, Fortaleza, Ceará, Brazil.

<sup>d</sup> Department of Chemistry, State University of Roraima, Boa Vista, Roraima, Brazil.

\*Corresponding author:

Wander Rogério Pavanelli, Department of Pathological Sciences, Center of Biological Sciences, State University of Londrina, Londrina, Brazil.

Address: Rodovia Celso Garcia Cid, Campus Universitário, Cx. Postal 6001, Londrina, PR 86051-990, Brazil.

E-mail address: [wanderpavanelli@yahoo.com.br](mailto:wanderpavanelli@yahoo.com.br)

**Abstract**

Parasites of the genus *Leishmania* are capable of inhibiting the effector functions of macrophages. This parasite has developed adaptive ability to escape host defenses; for example, it inactivates NF- $\kappa$ B complex and suppresses iNOS expression in infected macrophages, which is responsible for the production of the major antileishmanial substance nitric oxide (NO), favoring then its replication and successful infection. Metal complexes with NO have been studied as potential compounds for the treatment of certain tropical diseases, such as ruthenium compounds, known to be exogenous NO donors. In the present work, the compound *cis*-[RU(BPY)<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>(NO)]PF<sub>6</sub>, or RuNO, showed leishmanicidal activity at different concentrations, both directly and indirectly, on promastigotes of *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. In addition, treatment with RuNO increased NO production by reversing the depletion of NO caused by *Leishmania*. We also found increased expression of Akt, iNOS and NF $\kappa$ B in infected and treated macrophages. These results demonstrated that RuNO was able to kill the parasite by NO release, and modulate the transcriptional capacity of the cell.

**Key-words:** Antileishmanial; Inducible nitric oxide synthase; Leishmaniasis; Nitric oxide donor.

## 1. Introduction

American cutaneous leishmaniasis (ACL) is an endemic disease in Brazil, in which the causative agents are the protozoan *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. ACL has several clinical forms: localized, disseminated or diffuse skin lesions and aggressive and mutilating mucocutaneous wounds [13]; manifestations depend not only on the species of the parasite but also the immune response of the host [24].

The recommended treatment of ACL is the use of pentavalent antimonials such as sodium stibogluconate (Pentostam<sup>®</sup>) and methylglucamine antimoniate (Glucantime<sup>®</sup>) [1]. However, the treatment has several side effects, such as nausea, vomiting and hepatic and cardiotoxicity, leading patients to discontinue treatment and favoring the emergence of resistant strains [30].

*Leishmania* has several mechanisms for escaping the immune response. An important one is its ability to interfere with nitric oxide (NO) production, by suppressing the expression of inducible nitric oxide synthase (iNOS) in macrophages, which consequently results in depletion of NO. NO is a key mediator of leishmanicidal activity, able to impair the replication of *L. amazonensis* [5].

The activation of iNOS is dependent on NF- $\kappa$ B transcription. Parasites of the genus *Leishmania* can cleave the NF- $\kappa$ B p65 subunit, preventing the transcription of several proinflammatory mediators, and consequently affecting iNOS expression and NO production [14].

In attempt to survive, *Leishmania* can further evade cytolytic mechanisms by reducing NO production through the increased expression of arginase, which cleaves L-arginine, a precursor of NO synthesis [4, 36].

Altogether, the lack of effective drugs and the serious side effects of those available, coupled with the inability of the host's body to deal with the parasite, have been the driving force behind the search for new chemotherapeutic agents against *Leishmania*. Therefore, NO-based complexes seem to be a promising approach.

Accordingly, the pivotal role of NO in ACL has increased interest in understanding its interaction with metal complexes, such as with ruthenium, aiming to use these compounds as possible NO donor drugs in biological conditions [9]. This kind of complex has been previously tested against *Leishmania*, and shown to inhibit mitochondrial respiration in amastigote and promastigote forms, killing the parasite [8, 21].

Some complexes such as  $\text{trans-}[\text{Ru}(\text{NO})(\text{NH}_3)_4\text{L}](\text{X})_3$ ,  $[\text{Ru}(\text{NO})\text{Hedta}]$  and  $\text{Na}_2[\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NO}] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  were very efficient when tested against *Leishmania* spp. forms [5, 11, 22], and other pathogens such as *Trypanosoma cruzi* [34] and *Paracoccidioides brasiliensis* [26].

Ruthenium NO donors have shown desirable properties for therapeutic use, such as low cytotoxicity, high water solubility [35], and controlled release of NO [8]. Accordingly, the present work investigated the microbicidal properties of the complex  $\text{cis-}[\text{Ru}(\text{NO})(\text{bpy})_2(\text{SO}_3)](\text{PF}_6)$ , or RuNO, in an *in vitro* experimental model of Leishmaniasis.

## 2. Materials and methods

### 2.1 *Leishmania (Leishmania) amazonensis* culture

Promastigote forms of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* (MHOM/BR/1989/166MJO) were maintained in 199 medium (GIBCO Invitrogen), supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS, GIBCO Invitrogen), 1M Hepes (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazine ethanesulfonic acid), 0.1% human urine, 0.1% L-glutamine, 10

$\mu\text{g/ml}$  penicillin and streptomycin (GIBCO Invitrogen), and 10% sodium bicarbonate. Promastigote cultures were incubated at  $24^{\circ}\text{C}$  in  $25\text{-cm}^2$  flasks, during 5 days.

## 2.2 Nitric oxide donor

Nitric oxide donor RuNO complex was synthesized and characterized by researchers[32] in the Department of Organic and Inorganic Chemical, University of Ceará-UFC.

## 2.3 Antiprotozoal activity

Promastigote forms ( $1 \times 10^6/\text{ml}$ ) grown in 199 medium were incubated with different concentrations of RuNO complex (30, 40, 60  $\mu\text{M}$ ) for 24h at  $24^{\circ}\text{C}$ . Promastigotes were counted in a Neubauer chamber after 24 h. Promastigotes grown in the culture medium alone served as the control.

## 2.4 Viability of peritoneal macrophages

Macrophages ( $3 \times 10^6/\text{ml}$ ) were obtained from the peritoneal cavity of BALB/c mice, resuspended in RPMI 1640 culture medium (GIBCO) supplemented with 10% fetal bovine serum and distributed in 24-well plates for 2 h of adherence in 5%  $\text{CO}_2$  at  $37^{\circ}\text{C}$ . After adherence, cells were treated with different concentrations of RuNO complex (10- 640  $\mu\text{M}$ ); the positive control contained only RPMI 1640 and the negative control contained  $\text{H}_2\text{O}_2$  (40%). After 24 h of treatment, MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) was added, and the plate was incubated for 4 h. The MTT-formazan crystals that formed were dissolved in DMSO (dimethylsulfoxide) and the absorbance was measured at 540 nm using a spectrophotometer [23].

### *2.5 Phagocytic assay*

Peritoneal macrophages ( $5 \times 10^5/\text{ml}$ ) were obtained by injection of 3 ml of RPMI 1640 culture medium (GIBCO®) supplemented with fetal bovine serum 10% (GIBCO) and grown in 24-well plates containing 13-mm diameter glass coverslips. Cells were preincubated with 200  $\mu\text{l}$  of RPMI medium for 2 h for adherence, and afterwards, the cells were washed with saline to remove non-adherent cells. Adherent cells were then infected with promastigotes forms (1:5) for 2 h, treated with RuNO complex (30, 40 and 60  $\mu\text{M}$ ) or with RPMI medium alone (control), and incubated for 24 h at 37°C/5%  $\text{CO}_2$ . Cells were stained with Giemsa to determine the phagocytic index as the percentage of infection and parasites/macrophage number.

### *2.6 Promastigote recovery*

Peritoneal macrophages ( $5 \times 10^5/\text{ml}$ ) were incubated in 24-well plates and after 2 h, macrophages were infected with promastigotes ( $2.5 \times 10^6/\text{ml}$ ) for 2 h. The culture was washed to remove extracellular parasites and incubated with 199 culture medium at 24°C, and the cells were treated at the same concentrations of RuNO complex. Recovered promastigotes were counted in a Neubauer chamber during four days.

### *2.7 Cytokine determination*

Supernatants in the phagocytic assay were collected, centrifuged at 460  $g$  at 4°C for 7 min, and stored at 20°C for cytokine determination. TNF- $\alpha$  (tumor necrosis factor alpha), IL-1 $\beta$  (Interleukin), IL-10, IFN- $\gamma$ , TGF- $\beta$  and IL-12 were determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), according to the manufacturer's instructions (eBiosciences®, USA). Plates were read at 450 nm, using an ELISA plate reader (Thermo Plate—TP-Reader).

### *2.8 Determination of nitrite levels*

Nitrite was measured in the supernatant of macrophages infected and then treated with nitric oxide donor [25]. Briefly, supernatants in phagocytic assays were deproteinized by adding zinc sulfate ( $ZnSO_4$ ) solution and sodium hydroxide (NaOH). The mixture was centrifuged (10.000 rpm, 5 minutes, 4°C). The supernatant was recovered and diluted in glycine buffer. Cadmium granules were rinsed in sterile distilled water and added to a copper sulfate ( $CuSO_4$ ) solution, which was allowed to stand for 5 min, and the copper-coated cadmium granules were then used within 10 min. Activated granules were added to glycine buffer-diluted supernatant and stirred for 10 min. Aliquots of 50  $\mu$ L of the supernatant aliquots were transferred to 96-well microplates and an equal volume of Griess reagent was added. A calibration curve was prepared using sodium nitrite ( $NaNO_2$ ) at different concentrations, and the absorbance was determined at 550 nm in a microplate reader.

### *2.9 NOS inhibition assay*

Peritoneal macrophages were stimulated with lipopolysaccharide (LPS), and others were subjected to infection and treatment with RuNO Complex as described in the phagocytic assay. However, for this test, before treatment with RuNO complex, the cells were incubated with 100  $\mu$ M NG-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) at 36°C and 5%  $CO_2$  for 24 h. The supernatant was used to measure NO levels (by determination of nitrite levels as previously described).

### *2.10 Immunocytochemistry for Akt, NF $\kappa$ B and iNOS.*

Immunocytochemistry for Akt, NF $\kappa$ B (p65) and iNOS were performed on coverslip-adherent cells (cells prepared as in the protocol described for the phagocytic assay) using the labeled streptavidin biotin method with the LSAB kit (DAKO Japan, Kyoto, Japan). The

coverslips were incubated with Triton X-100 solution for 1 h, washed in PBS and treated at room temperature with 10% BSA. Next, coverslips were incubated overnight at 4°C with mouse primary antibody (anti-Akt, anti-NFκB and anti-iNOS rabbit polyclonal antibody diluted 1:200; Santa Cruz Biotechnology, USA). After secondary antibody treatment (2 h, room temperature), horseradish peroxidase activity was visualized by treatment with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and 3,3'-diaminobenzidine (DAB) for 5 min. In the last step, the coverslips were weakly counterstained with Harry's hematoxylin (Merck). For each case, negative controls were performed by omitting the primary antibody. Intensity and localization of immunoreactivity against the primary antibody used were examined on all coverslips using a photomicroscope (Olympus BX41, Olympus Optical Co., Ltd., Tokyo, Japan). For the image analysis study, photomicroscopic color slides of representative areas (40x objective lens) were digitally acquired. For determining a semi-quantitative scoring, images were evaluated by using the color de-convolution tool from the Image J software (NIH, USA). Pixels were categorized as previously described by [6] as high positive (3+), positive (2+), low positive (1+) and negative (0).

### *2.11 Statistical analysis*

Experiments were performed in triplicate. Data were obtained from three independent experiments and expressed as mean±standard error of the mean. Statistical analyses were conducted by using the GraphPad Prism software (version 5.0). Groups were compared by using one-way ANOVA and Tukey's test.  $P < 0.05$  was considered significant.

## **3. Results**

### *3.1 Nitric oxide donor cis-[Ru(NO)(bpy)<sub>2</sub>(SO<sub>3</sub>)](PF<sub>6</sub>) exhibits antileishmanial effect*

The antileishmanial effect of RuNO complex was evaluated by determining the proliferation of promastigote forms of *L. amazonensis*. Parasites were incubated with RuNO complex at different concentrations (30, 40 and 60  $\mu\text{M}$ ) for 24 h. We observed that RuNO at all concentrations significantly inhibited, in a dose-dependent manner, the proliferation of *L. amazonensis* when compared with control group, demonstrating that RuNO complex had antileishmanial activity (Fig. 1A,  $P < 0.05$ ).

The concentrations of RuNO complex were early evaluated by MTT assay and the results showed no effect on cell viability of peritoneal macrophages from BALB/c at the concentrations tested (Fig. 1B).

### *3.2 Nitric oxide donor does not change phagocytic capacity but affects the output of promastigote forms from macrophages*

In attempt to see if treatment with RuNO complex could modify the phagocytic capacity of macrophages, we incubated these cells with different concentrations (30, 40 and 60  $\mu\text{M}$ ) of the compound for 24 h. After the incubation, we evaluated the phagocytic index by determining the average number of amastigotes per macrophage. We found that the treatment did not alter the percentage of infected macrophages as well as the number of amastigotes per macrophage (Fig. 1C and D,  $P < 0.05$ ).

However when were evaluated the recovery of promastigotes, we observed that all concentrations significantly reduced the number of parasites recovered when compared to the control group (Fig. 1E,  $P < 0.05$ ).

### *3.3 RuNO complex does not modulate cytokine pattern in infected macrophages but increases NO levels*

Aiming to understand the mechanism by which RuNO complex kills the parasite, we evaluated the cytokine profile of macrophages during *Leishmania* infection. After infection of macrophages, only TNF- $\alpha$  production was significantly decreased when compared with control, where treatment with RuNO complex showed no recovery of TNF- $\alpha$  levels (Fig. 2,  $P < 0.05$ ).

Regarding NO levels, the results revealed that treatment with RuNO complex significantly increased the levels of nitrite in infected macrophages (Fig. 3A,  $P < 0.05$ ).

### *3.4 RuNO complex increases nitric oxide levels*

In an attempt to explain if NO found in macrophage culture supernatant was due to the NO donor or endogenous nitric oxide synthase (NOS), we blocked NOS activity with L-NAME. The results showed a significant decrease in the amount of promastigotes recovered (Fig. 3B,  $P < 0.05$ ) in the group treated with RuNO complex, as well as a reduction in NO production in infected control. Treatment with RuNO complex showed an increase in nitrite levels (Fig. 3C,  $P < 0.05$ ), suggesting that most NO responsible for the death of parasites came from the NO donor.

### *3.5 RuNO complex increases the expression of Akt, iNOS and NF $\kappa$ B (p65) in macrophages*

Immunocytochemistry results showed a significant increase in Akt and NF $\kappa$ B expression, as well as enhanced iNOS labeling in infected macrophages treated with RuNO complex (Fig. 4,  $P < 0.05$ ).

## **4. Discussion**

It is well known that NO is one of the crucial molecules in the control of parasite load during the development of ACL [17]. To evade host immunity, parasites of the genus *Leishmania* modulate the response in macrophages by decreasing iNOS activity and NO production by depleting its substrate, as well as increasing the production of essential polyamines that are needed for the growth and differentiation of the parasites [36]. So far, there is still no known drug capable of restoring NO levels in macrophages.

In this study, we demonstrated *in vitro* that the NO donor RuNO complex showed antileishmanial activity by releasing NO and eliminating promastigote forms of *L. amazonensis*. Our group has previously demonstrated [33, 34] that NO donors based on ruthenium complexes display potent trypanocidal activity. Another study also demonstrated antileishmanial activity, but with another compound and with *L. major* [22].

In the present study, we demonstrated that the treatment with RuNO complex did not interfere with the phagocytic activity of macrophages; however, macrophages were able to kill the parasite. Another study [16] reported that when high concentrations of NO were produced *in vitro*, axenic amastigotes of *L. amazonensis* were susceptible. Another NO donor showed trypanocidal activity *in vitro* in Vero cells treated after infection with *T. cruzi*, which demonstrated the effectiveness of the treatment based on the use of exogenous NO donors [15]. The author also concluded that the NO donor utilized both *in vitro* and *in vivo* had trypanocidal activity and was capable of inducing a parasitological cure in a mouse model.

Beyond NO, experimental models have shown that the outcome of *Leishmania* infection is critically dependent on the immune response. In fact, the susceptibility to this disease is ascribed to a Th2 immune response, which leads to the development and multiplication of the parasite [28]. On the other hand, resistance is established by preferential activation of Th1 subpopulation of lymphocytes, which leads to the production of many

cytokines, particularly IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$ , which may lead to macrophage activation, increasing the activity of iNOS, which in turn increases the production of nitric oxide [2, 7].

Despite the immunomodulation that RuNO complex induced in peritoneal macrophages, the parasites can modulate the whole immune response. Gomes et al. [12], also reported that macrophages infected with *L. amazonensis* produced low levels of TNF- $\alpha$  when compared to macrophages infected with *L. major*. This explains the low production of TNF- $\alpha$ .

Kima (2007) [18] established that promastigotes and amastigotes of all species are capable of inhibiting the production of IL-12 from active cells. It is known that two stimuli are required for the expression and activation of iNOS; the first stimulus is IFN- $\gamma$ , which is followed by a second signal mediated by TNF- $\alpha$ , resulting in sustained NO production [16].

In our work, there were no high levels of these two cytokines, but when analyzed by immunocytochemistry (IHC), iNOS expression in the same was increased, suggesting that the RuNO complex can directly induce the enzyme, thereby increasing NO production.

In the present work, RuNO complex was able to increase the induction of Akt and consequently induce iNOS and NF $\kappa$ B activation (Fig. 4). It is possible that Akt acts in I $\kappa$ B degradation and translocation of NF $\kappa$ B to the nucleus, promoting iNOS production.

Some studies have reported the importance of the Akt pathway in epithelial cells and macrophages. It has been suggested that this pathway plays a significant role in signal transduction involved in the induction of iNOS and NF $\kappa$ B activation, stimulating the activation and release of NF- $\kappa$ B through the degradation of I $\kappa$ B [20, 29, 37].

Some studies have reported that NO positively regulates iNOS expression in mouse cell types and in human cells [3, 31]. Lee & Choy [19], reported that the inhibition of iNOS activity attenuated the expression of iNOS protein and that the addition of exogenous nitric

oxide donor was able to restore the levels of iNOS. The increase in NO by iNOS expression was due to Ras nitrosylation, which increased levels of iNOS by sustained Akt activation.

Having verified that the treatment with RuNO complex increased NO production, we also found that the majority of NO measured came from the donor, confirming the ability of RuNO complex to release NO.

In fact, by blocking iNOS with L-NAME, we proved that most of the NO detected (Fig. 3C) was from RuNO complex, and this was responsible for the death of the parasites.

Genestra et al. [10] demonstrated that peritoneal macrophages from BALB/c mice infected with *L. amazonensis* showed elevated NO levels after 24 h. Furthermore, when macrophages were incubated with L-NAME for 24 h, NO production was significantly reduced. Blocking NO synthesis with L-NAME was clearly seen, which was not reversed by the addition of L-arginine, and peritoneal macrophages treated with L-NAME showed a significantly lower infection index after 24 h. This report indicated that the NO pathway is truly important to the establishment of infection. Ballestieri et al. [27] suggested that the increase in the number of parasites in phagolysosomes leads to decreased production of NO by iNOS.

Therefore, a therapy using compounds that provide for the delivery of NO molecules, perhaps the best compound with leishmanicidal activity, can be a viable alternative for the treatment of leishmaniasis.

Accordingly, the NO donor used in the study may be one of these possibilities, because it was able to kill the parasite through the release of NO, as well as modulating the transcriptional capacity of the phagocytic cells.

### **Conflict of interest**

The authors declare that there are no conflicts of interest.

**Acknowledgments**

This work was supported by Fundação Araucaria/SETI, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), and Londrina State University Coordination for post-graduation (PROPPG-UEL). Dr. A. Leyva helped with English editing of the manuscript.

## References

- [1] J. Arevalo, L. Ramirez, V. Adai, M. Zimic, G. Tulliano, C. Miranda-Verástegui, M. Lazo, R. Loayza-Muro, S. De Doncker, A. Maurer, F. Chappuis, J.-C. Dujardin, A. Llanos-Cuentas, Influence of *Leishmania* (*Viannia*) species on the response to antimonial treatment in patients with american tegumentary leishmaniasis, *J. Infect. Dis.* 195 (2007) 1846-1851. DOI: [10.1086/518041](https://doi.org/10.1086/518041).
- [2] B.M. Babior, Phagocytes and oxidative stress, *Am. J. Med.* 109 33-44. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S0002-9343\(00\)00481-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0002-9343(00)00481-2).
- [3] M. Boese, R. Busse, A. Mülsch, V. Schini-Kerth, Effect of cyclic GMP-dependent vasodilators on the expression of inducible nitric oxide synthase in vascular smooth muscle cells: role of cyclic AMP, *Br. J. Pharmacol.* 119 (1996) 707-715.
- [4] C. Bogdan, M. Röllinghoff, How do protozoan parasites survive inside macrophages?, *Parasitol. Today* 15 (1999) 22-28. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S0169-4758\(98\)01362-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0169-4758(98)01362-3).
- [5] T.C. Calegari-Silva, R.M.S. Pereira, L.D.B. De-Melo, E.M. Saraiva, D.C. Soares, M. Bellio, U.G. Lopes, NF- $\kappa$ B-mediated repression of iNOS expression in *Leishmania amazonensis* macrophage infection, *Immunol. Lett.* 127 (2009) 19-26. DOI: [10.1016/j.imlet.2009.08.009](https://doi.org/10.1016/j.imlet.2009.08.009).
- [6] S. Chatterjee, R. Malhotra, F. Varghese, A.B. Bukhari, A. Patil, A. Budrukkar, V. Parmar, S. Gupta, A. De, Quantitative immunohistochemical analysis reveals association between sodium iodide symporter and estrogen receptor expression in breast cancer, *PLoS ONE* 8 (2013) e54055. DOI: [10.1371/journal.pone.0054055](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0054055).
- [7] A.C. Cunningham, Parasitic adaptive mechanisms in infection by *Leishmania*, *Exp. Mol. Pathol.* 72 (2002) 132-141. DOI: [10.1006/exmp.2002.2418](https://doi.org/10.1006/exmp.2002.2418).
- [8] G.F.P. de Souza, J.K.U. Yokoyama-Yasunaka, A.B. Seabra, D.C. Miguel, M.G. de Oliveira, S.R.B. Uliana, Leishmanicidal activity of primary S-nitrosothiols against *Leishmania major* and *Leishmania amazonensis*: Implications for the treatment of cutaneous leishmaniasis, *Nitric Oxide Biol. Ch.* 15 (2006) 209-216. DOI: [10.1016/j.niox.2006.01.011](https://doi.org/10.1016/j.niox.2006.01.011).
- [9] P.C. Ford, I.M. Lorkovic, Mechanistic aspects of the reactions of nitric oxide with transition-metal complexes, *Chem. Rev.* 102 (2002) 993-1018. DOI: [10.1021/cr0000271](https://doi.org/10.1021/cr0000271).
- [10] M. Genestra, L. Cysne-Finkelstein, D. Guedes-Silva, L.L. Leon, Effect of L-arginine analogs and a calcium chelator on nitric oxide (NO $\cdot$ ) production by *Leishmania* sp, *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* 18 (2003) 445-452. DOI: [10.1080/1475636031000138787](https://doi.org/10.1080/1475636031000138787).
- [11] M. Genestra, R.J. Soares-Bezerra, L. Gomes-Silva, D.L. Fabrino, T. Bellato-Santos, D.B. Castro-Pinto, M.M. Canto-Cavalheiro, L.L. Leon, In vitro sodium nitroprusside-

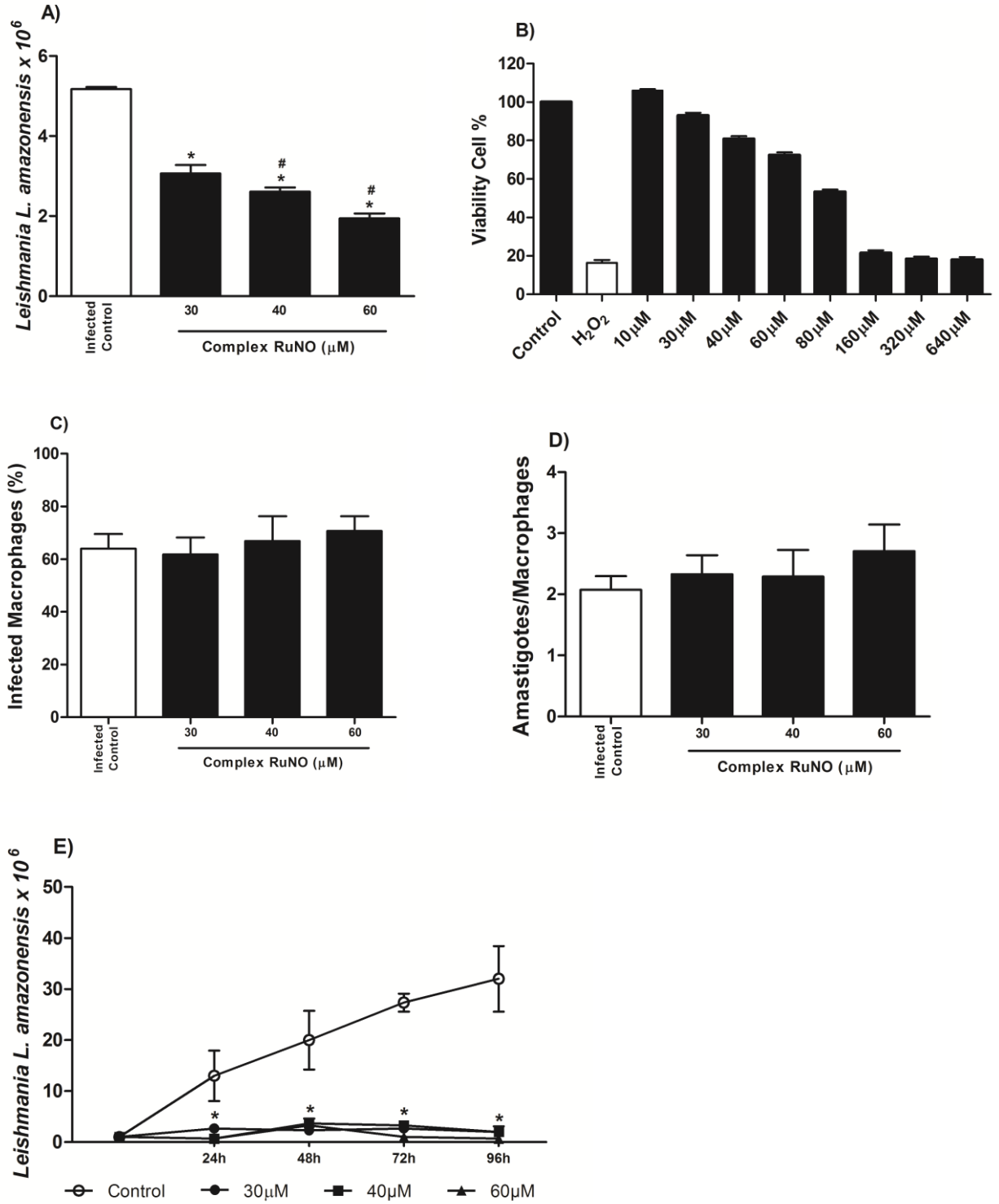
- mediated toxicity towards *Leishmania amazonensis* promastigotes and axenic amastigotes, *Cell Biochem. Funct.* 26 (2008) 709-717. DOI: 10.1002/cbf.1496.
- [12] I.N. Gomes, A.F.D.C. Calabrich, R.D.S. Tavares, J. Wietzerbin, L.A.R. de Freitas, P.S. Tavares Veras, Differential properties of CBA/J mononuclear phagocytes recovered from an inflammatory site and probed with two different species of *Leishmania*, *Microbes Infect.* 5 (2003) 251-260. DOI: [10.1016/S1286-4579\(03\)00025-X](https://doi.org/10.1016/S1286-4579(03)00025-X).
- [13] B. Gontijo, M.D.L.R.D. Carvalho, Leishmaniose tegumentar americana, *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 36 (2003) 71-80. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0037-86822003000100011>.
- [14] D.J. Gregory, M. Godbout, I. Contreras, G. Forget, M. Olivier, A novel form of NF- $\kappa$ B is induced by *Leishmania* infection: Involvement in macrophage gene expression, *Europ. J. Immunol.* 38 (2008) 1071-1081. DOI: 10.1002/eji.200737586.
- [15] P.M.M. Guedes, F.S. Oliveira, F.R.S. Gutierrez, G.K. da Silva, G.J. Rodrigues, L.M. Bendhack, D.W. Franco, M.A. Do Valle Matta, D.S. Zamboni, R.S. da Silva, J.S. Silva, Nitric oxide donor trans-[RuCl([15]aneN(4))NO](2+) as a possible therapeutic approach for Chagas' disease, *Br. J. Pharmacol.* 160 (2010) 270-282. DOI: [10.1111/j.1476-5381.2009.00576.x](https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2009.00576.x).
- [16] M.F. Horta, B.P. Mendes, E.H. Roma, F.S.M. Noronha, J.P. Macêdo, L.S. Oliveira, M.M. Duarte, L.Q. Vieira, Reactive oxygen species and nitric oxide in cutaneous leishmaniasis, *J. Parasitol. Res.* (2012) 11. DOI: <http://dx.doi.org/10.1155/2012/203818>.
- [17] R. Khouri, A. Bafica, M.D.P.P. Silva, A. Noronha, J.-P. Kolb, J. Wietzerbin, A. Barral, M. Barral-Netto, J. Van Weyenbergh, IFN- $\beta$  impairs superoxide-dependent parasite killing in human macrophages: evidence for a deleterious role of SOD1 in cutaneous leishmaniasis, *J. Immunol.* 182 (2009) 2525-2531. DOI: 10.4049/jimmunol.0802860.
- [18] P.E. Kima, The amastigote forms of *Leishmania* are experts at exploiting host cell processes to establish infection and persist, *Int. J. Parasitol.* 37 (2007) 1087-1096. DOI: [10.1016/j.ijpara.2007.04.007](https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2007.04.007).
- [19] M. Lee, J.C. Choy, Positive feedback regulation of human inducible nitric-oxide synthase expression by Ras protein S-nitrosylation, *J. Biol. Chem.* 288 (2013) 15677-15686. DOI: 10.1074/jbc.M113.475319.
- [20] L.V. Madrid, M.W. Mayo, J.Y. Reuther, A.S. Baldwin, Akt stimulates the transactivation potential of the RelA/p65 subunit of NF- $\kappa$ B through utilization of the I $\kappa$ B kinase and activation of the mitogen-activated protein kinase p38, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 18934-18940. DOI: 10.1074/jbc.M101103200.
- [21] J. Mauël, A. Ransijn, *Leishmania* spp.: Mechanisms of toxicity of nitrogen oxidation products, *Exp. Parasitol.* 87 (1997) 98-111. DOI: [10.1006/expr.1997.4205](https://doi.org/10.1006/expr.1997.4205).

- [22] J.C. Melo Pereira, V. Carregaro, D.L. Costa, J. Santana da Silva, F.Q. Cunha, D.W. Franco, Antileishmanial activity of ruthenium(II)tetraammine nitrosyl complexes, *Europ. J. Med. Chem.* 45 (2010) 4180-4187. DOI: [10.1016/j.ejmech.2010.06.010](https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2010.06.010).
- [23] T. Mosmann, Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays, *J. Immunol. Methods* 65 (1983) 55-63. DOI: [10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4).
- [24] D.P. Neves, *Parasitologia Humana*, Atheneu, São Paulo, 2011.
- [25] C. Panis, T.L. Mazzuco, C.Z.F. Costa, V.J. Victorino, V.L.H. Tatakihara, L.M. Yamauchi, S.F. Yamada-Ogatta, R. Cecchini, L.V. Rizzo, P. Pinge-Filho, *Trypanosoma cruzi*: effect of the absence of 5-lipoxygenase (5-LO)-derived leukotrienes on levels of cytokines, nitric oxide and iNOS expression in cardiac tissue in the acute phase of infection in mice, *Exp. Parasitol.* 127 (2011) 58-65. DOI: [10.1016/j.exppara.2010.06.030](https://doi.org/10.1016/j.exppara.2010.06.030).
- [26] W. Pavanelli, J. da Silva, C. Panis, T. Cunha, I. Costa, M. de Menezes, F. de Abreu Oliveira, L. de França Lopes, R. Cecchini, F. de Queiroz Cunha, M. Watanabe, E. Itano, Experimental chemotherapy in Paracoccidioidomycosis using ruthenium NO donor, *Mycopathol.* 172 (2011) 95-107. DOI: [10.1007/s11046-011-9416-8](https://doi.org/10.1007/s11046-011-9416-8).
- [27] F.M. Perrella Balestieri, A.R. Pires Queiroz, C. Scavone, V.M. Assis Costa, M. Barral-Netto, I.d.A. Abrahamsohn, *Leishmania (L.) amazonensis*-induced inhibition of nitric oxide synthesis in host macrophages, *Microbes Infect.* 4 (2002) 23-29. DOI: [10.1016/S1286-4579\(01\)01505-2](https://doi.org/10.1016/S1286-4579(01)01505-2).
- [28] D. Sacks, N. Noben-Trauth, The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice, *Nat. Rev. Immunol.* 2 (2002) 845-858. DOI: [10.1038/nri933](https://doi.org/10.1038/nri933).
- [29] B. Salh, R. Wagey, A. Marotta, J.S. Tao, S. Pelech, Activation of phosphatidylinositol 3-kinase, protein kinase B, and p70 S6 kinases in lipopolysaccharide-stimulated Raw 264.7 cells: differential effects of rapamycin, Ly294002, and wortmannin on nitric oxide production, *J. Immunol.* 161 (1998) 6947-6954.
- [30] D. Santos, C.R. Coutinho, M. Madeira, C. Bottino, R. Vieira, S. Nascimento, A. Bernardino, S. Bourguignon, S. Corte-Real, R. Pinho, C. Rodrigues, H. Castro, Leishmaniasis treatment—a challenge that remains: a review, *Parasitol. Res.* 103 (2008) 1-10. DOI: [10.1007/S00436-008-0943-2](https://doi.org/10.1007/S00436-008-0943-2).
- [31] L.A. Sheffler, D.A. Wink, G. Melillo, G.W. Cox, Exogenous nitric oxide regulates IFN-gamma plus lipopolysaccharide-induced nitric oxide synthase expression in mouse macrophages, *J. Immunol.* 155 (1995) 886-894.
- [32] F.O.N. Silva, S.X.B. Araújo, A.K.M. Holanda, E. Meyer, F.A.M. Sales, I.C.N. Diógenes, I.M.M. Carvalho, Í.S. Moreira, L.G.F. Lopes, Synthesis, characterization, and NO release study of the *cis*- and *trans*- [Ru(Bpy)<sub>2</sub>(SO<sub>3</sub>)(NO)]<sup>+</sup> Complexes, *Eur. J. Inorg. Chem.*, 2006, 2020–2026. DOI: [10.1002/ejic.200500871](https://doi.org/10.1002/ejic.200500871).

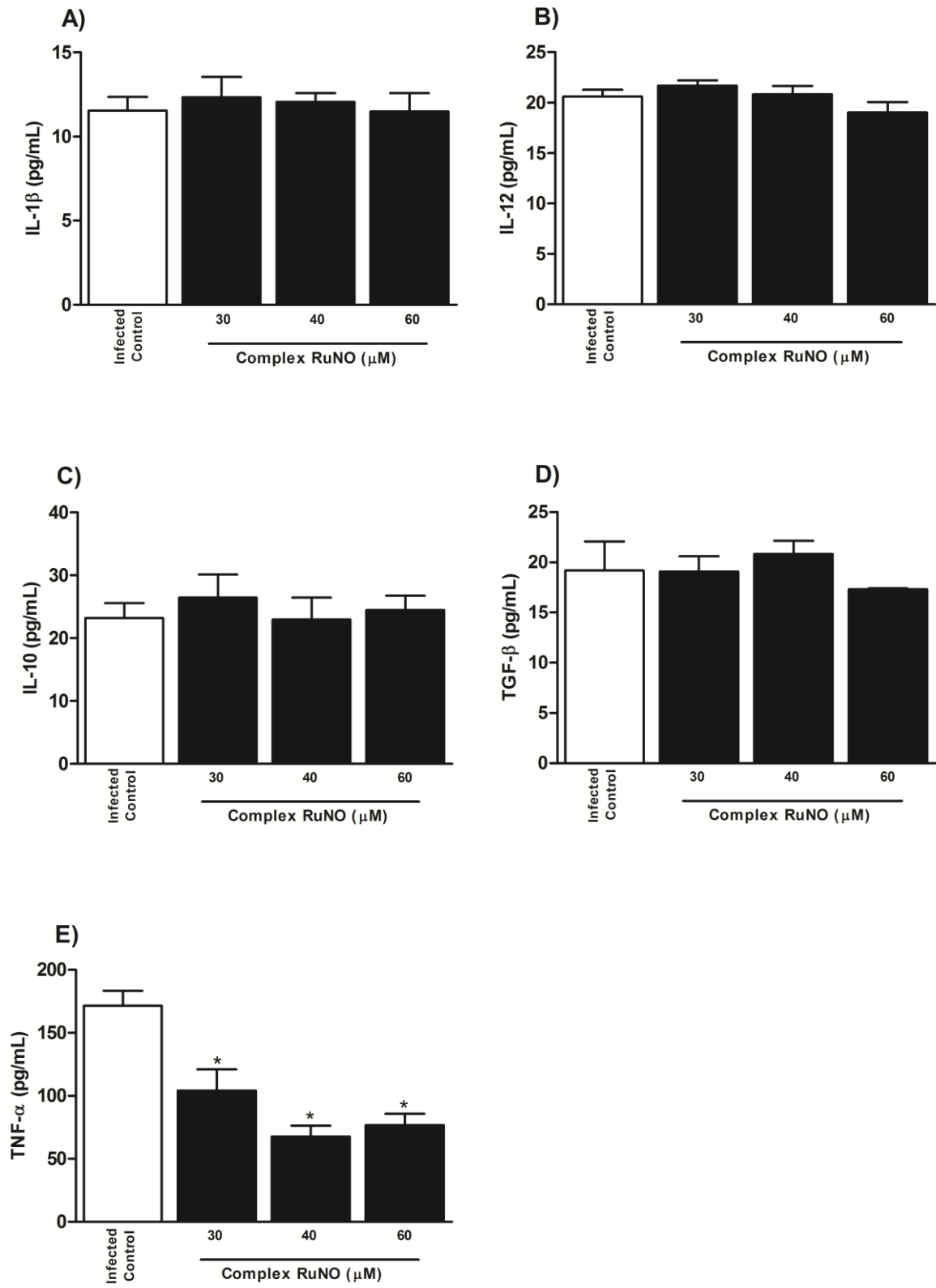
- [33] J.J.N. Silva, P.M.M. Guedes, A. Zottis, T.L. Balliano, F.O. Nascimento Silva, L.G. França Lopes, J. Ellena, G. Oliva, A.D. Andricopulo, D.W. Franco, J.S. Silva, Novel ruthenium complexes as potential drugs for Chagas's disease: enzyme inhibition and in vitro/in vivo trypanocidal activity, *Brit. J. Pharmacol.* 160 (2010) 260-269. DOI: 10.1111/j.1476-5381.2009.00524.x.
- [34] J.J.N. Silva, W.R. Pavanelli, J.C.M. Pereira, J.S. Silva, D.W. Franco, Experimental chemotherapy against *Trypanosoma cruzi* infection using ruthenium nitric oxide donors, *Antimicrob. Agents and Chemother.* 53 (2009) 4414-4421. DOI: 10.1128/AAC.00104-09.
- [35] E. Tfouni, D.R. Truzzi, A. Tavares, A.J. Gomes, L.E. Figueiredo, D.W. Franco, Biological activity of ruthenium nitrosyl complexes, *Nitric Oxide Biol. Ch.* 26 (2012) 38-53. DOI: 10.1016/j.niox.2011.11.005.
- [36] N. Wanasen, L. Soong, L-arginine metabolism and its impact on host immunity against *Leishmania* infection, *Immunol. Res.* 41 (2008) 15-25. DOI: [10.1007/s12026-007-8012-y](https://doi.org/10.1007/s12026-007-8012-y).
- [37] K. Wright, S.G. Ward, G. Kolios, J. Westwick, Activation of Phosphatidylinositol 3-Kinase by Interleukin-13: AN inhibitory signal for inducible nitric-oxide synthase expression in epithelial cell line HT-29, *J. Biol. Chem.* 272 (1997) 12626-12633. DOI: 10.1074/jbc.272.19.12626.

## Figures

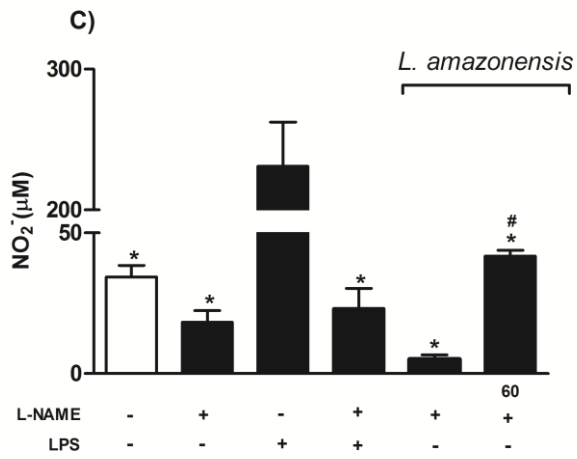
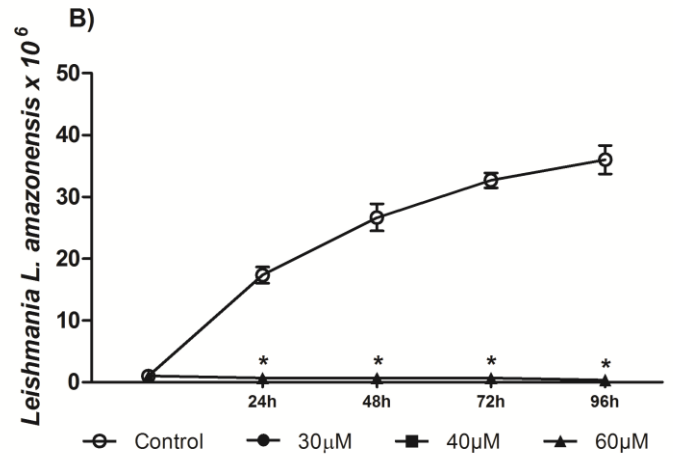
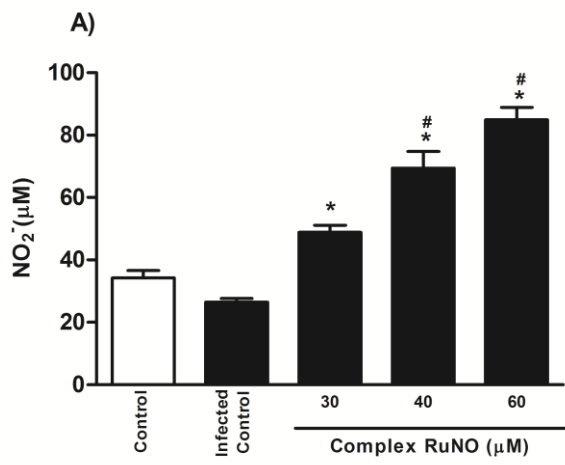
1)



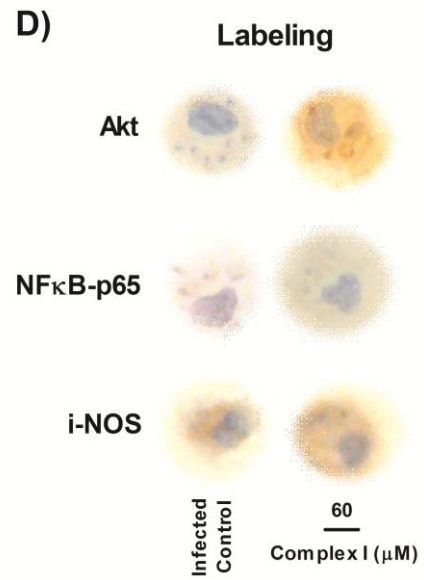
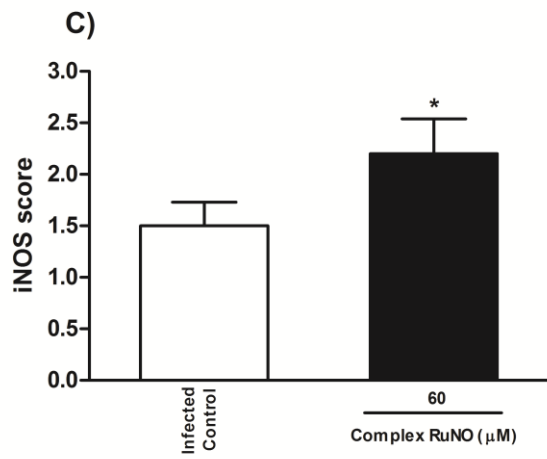
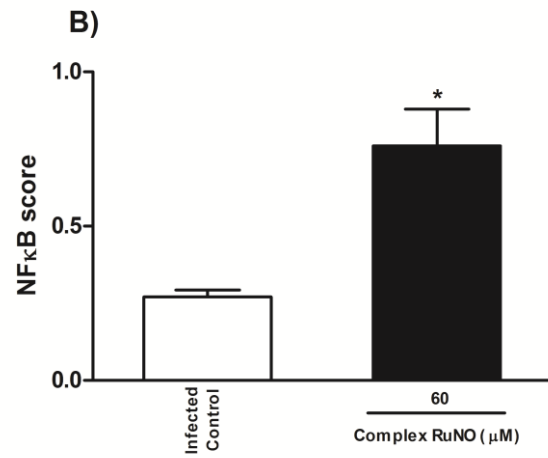
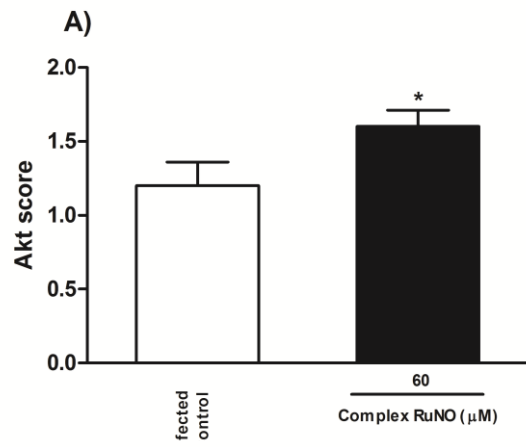
2)



3)



4)



**Figure 1: Antileishmanial activity by ruthenium complex.** A) RuNO complex inhibits the proliferation of *L. amazonensis* promastigote forms. Proliferation kinetics after treatment with RuNO complex (30, 40 and 60  $\mu\text{M}$ ) for 24 h. B) Viability of peritoneal macrophages of BALB/c mice treated with RuNO complex (10 - 640  $\mu\text{M}$ ) for 24 h. Macrophages infected with *L. amazonensis* and treated with RuNO complex. C) Percentage of infected macrophages after 24 h of incubation with RuNO complex (30, 40 and 60  $\mu\text{M}$ ). D) Mean number of amastigotes per macrophage after 24 h of incubation with RuNO complex (30, 40 and 60  $\mu\text{M}$ ). E) Recovery kinetics of promastigotes that had infected peritoneal macrophages, which were then treated with RuNO complex (30, 40 and 60  $\mu\text{M}$ ). [Values represent the mean  $\pm$  SEM of three independent experiments. ( $P < 0.05$ ) \*Significantly different from control, #Significantly different from concentrations].

**Figure 2: RuNO complex does not modulate cytokine production.** *In vitro* production of cytokines by peritoneal macrophages infected and then treated with RuNO complex (30, 40 and 60  $\mu\text{M}$ ). A) IL-1 $\beta$ , B) IL-12, C) IL-10, D) TGF- $\beta$  and E) TNF- $\alpha$ . [Values represent the mean  $\pm$  SEM of three independent experiments. ( $P < 0.05$ ) \*Significantly different from control].

**Figure 3: RuNO complex augments NO levels.** A) Nitrite levels of macrophages infected and then treated with RuNO complex (30, 40 and 60  $\mu\text{M}$ ) for 24 h. B) Recovery kinetics of promastigotes in peritoneal macrophages infected with *L. amazonensis*, treated with RuNO complex (60  $\mu\text{M}$ ) and the iNOS inhibitor L-NAME (100  $\mu\text{M}$ ) for 24 h. C) Determination of nitrite levels of peritoneal macrophages stimulated with LPS, infected with *L. amazonensis* and then treated with 100  $\mu\text{M}$  L-NAME and 60  $\mu\text{M}$  RuNO complex for 24 h. [Values

represent the mean  $\pm$  SEM of three independent experiments. (P<0.05) \*Significantly different from control LPS, #significantly different from infected control].

**Figure 4: RuNO complex induces up-regulation of Akt, NF $\kappa$ B and iNOS *in vitro*.**

Immunocytochemistry scoring of macrophages infected with *L. amazonensis* and treated with RuNO complex (60  $\mu$ M) for 24 h. A) Akt, B) NF $\kappa$ B, C) iNOS, D) Immunocytochemical staining. [Values represent the mean  $\pm$  SEM of three independent experiments. (P<0.05) \*Significantly different from control].

## 5. ANEXOS

### 5.1 Anexo Aprovação Comitê de Ética



Universidade  
Estadual de Londrina

#### COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

OF. CIRC. CEUA Nº 49/2013

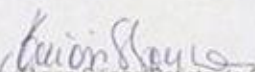
Londrina, 08 de Março de 2013.

Prezado Pesquisador,

A CEUA/UEL reunida em 19 de Fevereiro de 2013 avaliou o projeto de pesquisa intitulado "Uso de compostos naturais e sintéticos como alternativas terapêuticas para o tratamento da Leishmaniose", processo CEUA nº 33064.2012.42, do Centro de Ciências Biológicas, desenvolvido sob sua responsabilidade. Esclarecidos os aspectos metodológicos solicitados, o projeto de pesquisa está **aprovado** para execução entendendo-se que os princípios éticos postulados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal estão respeitados.

Serão utilizados 210 camundongos BALB/C com idade de 6 a 8 semanas e peso de 25 gramas, provenientes do Biotério da FIOCRUZ de Curitiba-PR. O projeto tem como objetivo investigar os mecanismos de ação dos compostos naturais e sintéticos na interação parasito/hospedeiro, em busca de encontrar alternativas terapêuticas para a Leishmaniose. Para isto será avaliada a atividade antileishmanicida *in vitro* dos compostos naturais e sintéticos, pelo teste de cultura com formas promastigotas de *Leishmania* sp e pelo teste em cultura de macrófagos de camundongos tratados com os compostos. Também será avaliada atividade antileishmanicida *in vivo*, pela infecção com *Leishmania* sp nos camundongos e tratamento com os compostos em diferentes concentrações. Será realizado o teste de análise de intradermoreação de Montenegro nos camundongos para confirmar a infecção pela *Leishmania* sp. 240 horas após infecção, os animais serão eutanasiados e os órgãos serão coletados para análise da carga parasitária, análise histopatológica, e análise imunohistoquímica para anticorpo anti-NO, anti-CD4 e anti-CD8, o soro será obtido para dosagem de óxido nítrico, dosagem de citocinas IL-4, IL-10, IL-17 e IFN, a determinação da expressão das citocinas também será avaliada por imunoblotting, e os parâmetros de estresse oxidativo como medida da capacidade antioxidante plasmática e quantificação dos níveis de glutatona reduzida das amostras também serão avaliadas. O projeto está previsto para ser desenvolvido em 30 meses após aprovação da CEUA.

Cumpra orientar que caso pretendam-se quaisquer alterações no protocolo de aula prática aprovado, deve-se submeter o novo protocolo à apreciação da CEUA/UEL anteriormente à execução das modificações. Sem mais para o momento, subscrevo-me. Cordialmente,

  
Prof.ª Dra. Mirian Siliane Batista de Souza  
Vice-Coordenadora da CEUA-UEL

Ilmo. Sr.  
**Prof. Dr. Wander Rogério Pavanelli**  
Coordenador do Projeto  
Departamento de Ciências Patológicas/Parasitologia  
Centro de Ciências Biológicas  
Com cópia para Sra. Egle Maria de Sousa (Chefe da DCA/PROPPG) e Diretor (a) do Centro de Ciências Biológicas