UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA

PAPEL DO PEROXINITRITO NA ATIVIDADE LEISHMANICIDA
DE MACRÓFAGOS EM MODELOS MURINOS

EDLAINE LINARES

TESE DE DOUTORADO

ORIENTADORA: PROFA. DRA. OHARA AUGUSTO

CO-ORIENTADORA: PROFA. DRA. SELMA GIORGIO

SÃO PAULO
2003

"Papel do peroxinitrito na atividade leishmanicida de macrófagos em modelos murinos"

EDLAINE LINARES

Tese de Doutorado submetida ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Doutor em Ciências – Área: Bioquímica.

Aprovado por:

Prof. Dra. OHARA AUGUSTO
IQ – USP
(Orientadora e Presidente)

Prof. Dr. ETELVINO JOSÉ HENRIQUES BECHARA
IQ – USP

Prof. Dr. ROBERT SCHUMACHER
IQ – USP

Profa. Dra. GLORIA COLET ARAÚJO LIMA
ICB – USP

Profa. Dra. FERNANDA RAMOS GADELHA
IB – UNICAMP

SÃO PAULO
23 DE SETEMBRO 2003.

Para meus pais Irineu e Zilá,

pelo amor recíproco

Meus sinceros agradecimentos

À Ohara, pela orientação, oportunidades concedidas e todo esforço despendido para a realização dessa tese.

À Selma, pela co-orientação e paciência.

Ao professor Áureo Yamada pela colaboração.

Ao professor Renato Mortara e à Noemi, pelo trabalho caprichoso que deixou essa tese mais colorida.

Aos meus pais, minha avó e familiares, pelo aconchego de tê-los por perto.

Ao Carlos, pelo carinho, compreensão e apoio.

À Vera, pela amizade e ajuda na revisão da tese.

À Telma e aos seus pais Francisco e Helena, pela amizade sincera e pelo apoio freqüente.

Aos amigos Sonia e Gyva, Diana, Felipe, Rosangela e William, pelas reuniões divertidas e por todas as vezes que me ajudaram a recuperar a energia.

Aos amigos do laboratório, Berê, Denise, Marcelo, Lia e Célio, pela colaboração.

Aos amigos de outros laboratórios, Valdemir, Michelle, Kátia e Ronaldo, Paula e Érico, Maria, Ivan, Miriam e Adriana, pela amizade e toda assessoria prestada.

À Emília, pelo profissionalismo que muito me ajudou.

Aos funcionários do biotério, pelo cuidado com os animais utilizados.

Índice

ABREVIATURAS.....	1
RESUMO	2
SUMMARY	3
1. INTRODUÇÃO	4
1.1. Papéis biológicos de oxidantes e radicais livres	4
1.2. Oxidantes derivados do óxido nítrico	5
1.3. Infecção por <i>Leishmania amazonensis</i>	6
2. OBJETIVOS.....	13
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	14
3.1. Infecção de camundongos pela <i>Leishmania amazonensis</i>	14
3.2. Monitoramento da infecção <i>in vivo</i>	14
3.3. Ressonância paramagnética eletrônica (RPE) dos tecidos	15
3.4. Microscopia ótica de amostras das lesões	16
3.5. Atividade peroxidase nas lesões	16
3.6. Microscopia confocal, imuno-histoquímica das lesões - Detecção de óxido nítrico sintase induzível e de proteínas nitradas e hidroxiladas	17
3.7. Detecção de 3-nitro-tirosina por Western e dot blot	18
3.7.1. Western blot	19
3.7.2. Dot blot	19
3.8. Tratamento com tempol.....	20
3.9. Atividade leishmanicida em culturas	21

3.9.1. Cultura de amastigotas axênicos	21
3.9.2. Tratamento de amastigotas com doador de NO e peroxinitrito	21
4. RESULTADOS	23
4.1. Curso da infecção por <i>Leishmania amazonensis</i> em camundongos BALB/c e C57BL/6	23
4.2. Produção de óxido nítrico durante a infecção por <i>Leishmania amazonensis</i>	28
4.3. Infecção secundária e atividade peroxidásica	35
4.4. Presença de proteínas nitradas nas lesões	39
4.5. Presença de proteínas hidroxiladas nas lesões	49
4.6. Tratamento com tempol	53
4.7. Atividade leishmanicida de peroxinitrito e NO em culturas	59
5. DISCUSSÃO	62
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	66
CURRICULUM VITAE	72

Abreviaturas

BALB/c.....	linhagem isogênica de camundongo suscetível à leishmaniose
C57BL/6.....	linhagem isogênica de camundongo resistente à leishmaniose
Cy3.....	corante fluorescente à base de cianina, marca registrada de Amersham Pharmacia Biotech, UK Ltd.
DAPI.....	4',6'-diamino-2-fenilindol, dilactato
DME.....	meio de cultura, Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DNA.....	ácido desoxirribonucleico
EDTA.....	ácido etilenodiamino tetracético
FITC.....	isotiocianato de fluoresceína, corante fluorescente
HbNO.....	nitrosil-hemoglobina
IFN.....	interferon, citocina
IgG.....	imunoglobulina G
iNOS.....	óxido nítrico sintase, forma induzível
NO.....	óxido nítrico
NOC-5.....	1-hidroxi-2 oxo-3-(3-aminopropil)-3-isopropil-1-triazeno, doador de NO
PBS.....	tampão salina-fosfato
Peroxinitrito.....	Soma do ânion peroxinitrito (ONOO^- , oxoperoxonitrato (-1)) e ácido peroxinitroso (ONOOH , oxoperoxonitrato de hidrogênio)
PGN.....	PBS contendo 0,2 % de gelatina e 0,1 % de saponina
PMSF.....	fluoreto de fenilmetanossulfonila
RPE.....	ressonância paramagnética eletrônica
RPMI 1640.....	meio de cultura desenvolvido no Roswell Park Memorial Institute , hoje comercialmente vendido
SFB.....	soro fetal bovino
Tempol.....	4-hidroxi-2,2,6,6-tetrametil-1-piperidiniloxila
TRIS.....	tris (hidroximetil) aminometano

Resumo

Os mecanismos oxidativos pelos quais macrófagos exercem atividade microbicida permanecem em discussão, e estudos com hospedeiros animais serão essenciais para elucidar tal questão. Nesse trabalho, estudamos os mecanismos microbicidas de macrófagos *in vivo* comparando parâmetros de infecção nas lesões de camundongos resistentes (C57Bl/6) e suscetíveis (BALB/c) ao protozoário *Leishmania amazonensis*. A comparação mostrou que o controle da infecção pelos camundongos resistentes é dependente da ativação de macrófagos com expressão da enzima óxido nítrico sintase induzível, síntese de óxido nítrico e extensa nitração e hidroxilação das proteínas dos parasitas dentro dos fagolisossomos dos macrófagos. O principal agente tóxico aos parasitas parece ser derivado do peroxinitrito porque a nitração dos parasitas ocorreu na ausência virtual de células polimorfonucleares e foi acompanhada de hidroxilação. Além disso, tempol, um inibidor de reações de nitração mediadas por peroxinitrito, inibiu a nitração de proteínas da lesão e aumentou o número de parasitas nelas presentes. Também, estudos com parasitas em cultura confirmaram que o peroxinitrito é citotóxico aos parasitas enquanto o óxido nítrico é citostático. O camundongo suscetível se mostrou capaz de sintetizar óxido nítrico mas o fez em estágios tardios da infecção e, provavelmente, em resposta a uma infecção secundária por bactérias. Tomados conjuntamente, os resultados indicam que o peroxinitrito e radicais dele derivados são os principais agentes leishmanicidas produzidos por macrófagos *in vivo*.

Summary

Macrophage oxidative microbicidal mechanisms remain debatable and their elucidation is likely to depend on studies with mammalian hosts. To examine macrophage microbicidal mechanisms *in vivo*, we compared infection parameters in the lesions of resistant (C57Bl/6) and susceptible (BALB/c) mice to the protozoan *Leishmania amazonensis*. This comparison demonstrated that infection control by resistant mice relied on macrophage activation with inducible nitric oxide synthase expression, nitric oxide synthesis and extensive nitration and hydroxylation of the proteins of the parasites inside macrophage phagolysosomes. The toxic agent to the parasite is likely to be peroxynitrite-derived because parasite nitration occurred in the virtual absence of polymorphonuclear cells and was accompanied by parasite hydroxylation. In addition, tempol, an inhibitor of peroxynitrite-mediated nitrations, inhibited protein nitration of the lesions and increased the number of parasites in them. Also, studies with parasite cultures confirmed that peroxynitrite is cytotoxic to the parasites whereas nitric oxide is cytostatic. The susceptible mice were also able to synthesize nitric oxide but only at late infection time and, most likely, in response to a secondary bacterial infection. Taken together, the results indicate that peroxynitrite and derived radicals are the main leishmanicidal agents produced by macrophages *in vivo*.

1. Introdução

1.1. Papéis biológicos de oxidantes e radicais livres

A evolução dos estudos sobre o papel de oxidantes e radicais livres em sistemas biológicos foi lenta e marcada por controvérsias. A história começou em meados do século XX quando se demonstrou que a deposição de radiação de alta energia em células leva à formação de radicais livres e, concomitantemente, à mutação e morte celular. Esses estudos em radiobiologia levaram à generalização de que radicais livres seriam formados em organismos vivos a partir de fontes exógenas e seriam necessariamente deletérios aos mesmos. A formação endógena de radicais livres passa a ser considerada seriamente só a partir da caracterização da enzima superóxido dismutase por McCord & Fridovich ao final dos anos 60 (para revisão vide McCord e cols., 1971). Nos vários estudos que se seguiram ficou claramente estabelecido que radicais livres são também formados durante o metabolismo normal, o metabolismo de xenobióticos e durante o combate a microrganismos invasores. Todos os oxidantes então considerados (identificados) eram, direta ou indiretamente derivados do oxigênio molecular, levando ao conceito amplo de espécies reativas de oxigênio (ROS, "reactive oxygen species"). Assim, se tornou bastante difundida a generalização de que a possibilidade de dano oxidativo à biomoléculas é inerente ao uso de oxigênio molecular pelos organismos aeróbicos. Permaneceu dominante a idéia de que radicais livres seriam deletérios aos organismos vivos e essa generalização foi reforçada com a caracterização de várias enzimas cuja função era reparar biomoléculas oxidadas. Esse período bastante fértil para a área se estendeu até final do século XX e levou a um grande acúmulo de informações sobre a oxidação de biomoléculas *in vitro* (sistemas enzimáticos e químicos) e *in vivo* (células em cultura, microrganismos, animais experimentais e humanos) (para revisão vide Halliwell & Gutteridge, 1998; Gilbert & Colton, 1999). Paralelamente, foram sendo caracterizadas novas enzimas antioxidantes, vários antioxidantes de baixo peso molecular e diversas enzimas capazes de reparar biomoléculas oxidadas, principalmente DNA oxidado e mais recentemente, proteínas oxidadas em resíduos de metionina (Weissbach e cols., 2002) e cisteína (Wood e cols., 2003; Woo e cols., 2003). Nesse período foi cunhado o conceito de estresse oxidativo, uma situação em que ocorreria um desbalanço entre oxidantes e antioxidantes celulares com predominância dos primeiros (Sies, 1986). Mais ainda, situações de estresse oxidativo foram extensivamente associadas a processos degenerativos como envelhecimento, câncer, inflamação, etc.

Ao final do século XX vários investigadores já colocavam a hipótese de que radicais livres participariam de processos fisiológicos normais, mas a idéia começa a se fortalecer só após a descoberta de que os mamíferos produzem óxido nítrico a partir da oxidação enzimática do aminoácido arginina. O óxido nítrico, um radical livre pequeno, difusível através de membranas biológicas, logo se mostrou imprescindível a uma série de processos fisiológicos fundamentais como o controle do tônus vascular, a transmissão nervosa e a resposta imunológica (para revisão vide Ignarro, 1990; Moncada e cols., 1991). A descoberta da síntese e dos papéis do óxido nítrico em mamíferos ocasionou uma revolução na Biologia ao demonstrar, por exemplo, que receptores não eram imprescindíveis em mecanismos de transdução de sinal. Evidentemente, ocorreu uma mudança de paradigmas na área de estresse oxidativo e, em consequência, a visão sobre as fontes e os papéis fisiológicos de radicais livres ficou mais complexa e sutil (Fig. 1). Na visão atual, radicais livres e oxidantes são produzidos em organismos vivos a partir de fontes exógenas e endógenas e suas concentrações celulares são controladas dentro de limites estreitos. Concentrações "adequadas" de alguns radicais livres são essenciais na manutenção da homeostase celular, mas falta ou excesso dessas espécies pode levar a disfunções fisiológicas como o comprometimento da defesa contra patógenos e o dano a biomoléculas, respectivamente (Fig. 1). Por outro lado, aumentos transientes de "alguns" oxidantes disparariam rotas específicas de sinalização, hoje conhecidas como "redox-sensitive signaling pathways" (Aslund & Beckwith, 1999; Finkel & Holbrook, 2000) (Fig. 1). Deve-se ainda notar que a produção enzimática do óxido nítrico trouxe para o foco biológico espécies reativas outras que não as clássicas, derivadas do oxigênio. Atualmente, a literatura refere-se também às espécies reativas derivadas de nitrogênio (RNS, reactive nitrogen species) e utiliza os termos estresse oxidativo e estresse nitrosoativo, embora eles não sejam claramente distinguidos (Darley-Usmar e cols., 1995). Desse modo, a elucidação dos mecanismos pelos quais os radicais livres atuam em processos patofisiológicos ficou mais complexa e sutil. Conhecer a reatividade (química e bioquímica) dessas espécies em condições fisiológicas é fundamental para estabelecer e também prever em que condições essas espécies, e quais espécies, são essenciais à homeostase celular e em que condições passam a ser deletérias (Fig. 1). Da mesma forma, tornou-se essencial compreender melhor as interações entre essas espécies e as delas com metais de transição.

1.2. Oxidantes derivados do óxido nítrico

As diversas funções fisiológicas do óxido nítrico demonstram claramente a importância de estudar a reatividade e as interações entre os vários oxidantes biológicos. Provavelmente, o óxido nítrico foi selecionado durante a evolução como um mensageiro biológico pela sua hidrofobicidade, que permite sua difusão através de membranas biológicas, e sua pouca

reatividade como radical livre. Esta, ocasiona uma meia vida da ordem de segundos em condições fisiológicas e a possibilidade de reações específicas com grupos heme, ferro-enzimas e tióis, todos envolvidos em mecanismos de transdução de sinais. Por outro lado, sendo um radical livre, ele reage rapidamente com oxigênio e outras espécies paramagnéticas (radicais livres e metais de transição), e essas reações fornecem vias rápidas para eliminá-lo sempre que as células precisem se adaptar a novas condições fisiológicas ("apagar" o sinal anterior). Essas mesmas rotas, todavia, podem gerar oxidantes mais potentes que os radicais livres de partida. Exemplos desses oxidantes potentes são o dióxido de nitrogênio e o peroxinitrito produzidos pela reação do óxido nítrico com oxigênio e com o ânion radical superóxido, respectivamente (Fig. 2) (Beckman e cols., 1990; Radi e cols., 2000; Augusto e cols., 2002 a, b).

Muito importante, a formação desses oxidantes secundários estará favorecida em condições de superprodução de óxido nítrico, ou seja, em condições infecciosas e inflamatórias (Fig. 2). De fato, em mamíferos, o óxido nítrico é sintetizado controladamente pelas sintases constitutivas (cNOS), atinge concentrações da ordem de nM e parece atuar principalmente como um mensageiro celular. Nesse caso, devem preponderar suas reações específicas com grupos tióis e heme de proteínas envolvidas em mecanismos de transdução de sinal (Fig. 2). Em situações infecciosas e inflamatórias, a sintase induzível (iNOS) é expressa e as concentrações celulares de óxido nítrico podem atingir níveis de μM e ele parece atuar como agente citotóxico (Fig. 2). Como ele é pouco reativo com biomoléculas, essa citotoxicidade tem sido atribuída a oxidantes dele derivados como o dióxido de nitrogênio e o peroxinitrito (Fig. 2) (Beckman e cols., 1990; Radi e cols., 2000; Augusto e cols., 2002 a, b). Esses intermediários reativos podem oxidar e nitrar lipídeos, proteínas e ácidos nucleicos. Não é trivial distinguir esses oxidantes em ambientes biológicos porque neles, o peroxinitrito pode gerar dióxido de nitrogênio via sua decomposição catalisada por prótons ou por sua reação com o dióxido de carbono que está presente em altas concentrações nos fluidos biológicos (Fig. 3). De qualquer forma, os mecanismos citotóxicos do óxido nítrico, inclusive os microbicidas, permanecem em discussão. Para abordar esse problema, estudamos a formação e os papéis do NO e de oxidantes dele derivados na evolução da infecção murina por *Leishmania amazonensis*.

1.3. Infecção por *Leishmania amazonensis*

A leishmaniose é uma parasitose causada por várias espécies do gênero *Leishmania*, um parasita que apresenta dois estágios evolutivos: a forma promastigota que é flagelada, extracelular e se multiplica no tubo digestivo de insetos flebotomíneos e a forma amastigota, não flagelada e presente exclusivamente em fagolisossomos de macrófagos dos hospedeiros

vertebrados mamíferos. O ciclo se inicia quando formas promastigotas, inoculadas no hospedeiro mamífero durante o repasto sangüíneo do vetor, são rapidamente fagocitadas pelos macrófagos da pele. Os promastigotas se diferenciam em amastigotas que se multiplicam dentro dos fagolisossomos dos macrófagos (Fig. 4) até ocorrer a lise da célula infectada. Os amastigotas então infectam macrófagos vizinhos, disseminando assim a infecção. O ciclo se fecha quando um flebotomíneo realiza o repasto sangüíneo e ingere células infectadas com os amastigotas.

A severidade da infecção produzida por diferentes espécies que infectam humanos varia desde infecções cutâneas e mucocutâneas benignas, até infecções viscerais letais. A forma mais comumente causada por *Leishmania amazonensis* está associada à lesões cutâneas benignas e localizadas (Grimaldi e cols., 1989).

Em modelos experimentais, diferentes linhagens isogênicas de camundongos apresentam padrões distintos de suscetibilidade e resistência à infecção pela *Leishmania*. Por exemplo, camundongos BALB/c apresentam lesões crônicas disseminadas quando infectados subcutaneamente com *Leishmania amazonensis* (McElrath e cols., 1987) e camundongos C57Bl/6 apresentam lesões cutâneas controladas que não evoluem para a forma disseminada (Andrade e cols., 1984; McElrath e cols., 1987). A suscetibilidade e resistência à infecção estão relacionadas às respostas imunes desses animais. Camundongos que apresentam uma resposta imune celular do tipo Th1, isto é, a estimulação e a proliferação de linfócitos T Th1 que produzem linfocinas como IFN γ e interleucina 12, têm habilidade de ativar mecanismos leishmanicidas em seus macrófagos. Por outro lado, camundongos que apresentam uma resposta do tipo Th2, têm estimulados principalmente linfócitos T Th2 que produzem citocinas como as interleucinas 4 e 10. Estas são inibitórias da ativação de macrófagos, conferindo suscetibilidade à infecção (para revisão vide Solbach e Laskay, 2000).

Os mecanismos leishmanicidas de macrófagos ativados estão correlacionados à produção de óxido nítrico como extensivamente demonstrado em modelos *in vivo* e *in vitro*. Por exemplo, a administração de inibidores de NOS a camundongos de linhagem resistente provocou a exacerbação da infecção (Liew e cols., 1990). Macrófagos ativados com IFN γ *in vitro* apresentam maior índice fagocítico, em um processo dependente de L-arginina (Green e cols., 1990). Em camundongos resistentes, elevados níveis de nitrito urinário foram correlacionados com a resistência à infecção e a administração de N^G-monometil-L-arginina (inibidor de NOS) inibiu a excreção de nitrito na urina e levou ao desenvolvimento da doença. Em contraposição, camundongos suscetíveis produziram níveis menores de nitrito até 3^{1/2} semanas de infecção (Evans e cols., 1993). Além disso, estudos posteriores mostraram que um aumento na expressão de NOS induzível se correlacionava com resistência à infecção (Stenger e cols., 1994) e que

camundongos mutantes, incapazes de expressar NOS induzível, se tornam suscetíveis ao parasita (Wei e cols., 1995).

Esses dados demonstram a importância do NO no controle da infecção. Todavia, o mecanismo pelo qual ele exerce sua ação leishmanicida permanece em discussão.

Figura 1: Esquema da visão atual sobre as fontes e potenciais papéis de oxidantes biológicos.

Figura 2: Fontes e destinos do óxido nítrico em condições fisiológicas e patofisiológicas (Beckman e cols., 1990; Radi e cols., 2000; Augusto e cols., 2002a).

Figura 3: Representação esquemática das principais reações esperadas para o peroxinitrito produzido em condições fisiológicas (Augusto e cols., 2002a).

Figura 4: Corte histológico da lesão de pata de camundongo C57Bl/6 infectado, corado com hematoxilina-eosina. As setas mostram os amastigotas de *Leishmania amazonensis* nos fagolisossomos de macrófagos. Foto obtida no laboratório.

2. Objetivos

O objetivo desse trabalho foi contribuir para a elucidação dos mecanismos oxidativos pelos quais os macrófagos exercem atividades microbidas *in vivo*. Para abordar o problema, escolhemos modelos murinos de infecção pelo parasita *Leishmania amazonensis*. Foi no modelo murino de *Leishmania* que primeiro se demonstrou a importância do óxido nítrico nos mecanismos de defesa contra patógenos. Além disso, as respostas dos camundongos C57Bl/6 e BALB/c à *Leishmania amazonensis* representam extremos de resposta ao parasita mas, em ambos os casos, um infiltrado de macrófagos predomina na lesão cutânea. Assim, comparar a produção de óxido nítrico e outros parâmetros de infecção nesses dois modelos deveria fornecer informações sobre quais oxidantes são importantes para o controle da infecção e, em consequência, para os mecanismos microbidas de macrófagos.

3. Materiais e Métodos

3.1. Infecção de camundongos pela *Leishmania amazonensis*

Amastigotas de *Leishmania amazonensis* (MHOM/BR/73/M2269) foram obtidos das lesões de patas de camundongos BALB/c (Barbiéri e cols., 1993). Resumidamente, as lesões foram homogeneizadas em meio de cultura RPMI 1640 (Sigma, E.U.A.) contendo 10% SFB (soro fetal bovino) (CultiLab, Brasil). Para facilitar o rompimento das células, a suspensão foi pressionada através de uma agulha e foi centrifugada a 250 g por 10 minutos. O sobrenadante resultante foi novamente centrifugado a 1.400 g por 10 minutos e o pellet contendo os amastigotas foi ressuspensão em RPMI 1640 e mantido sob agitação por 4 horas à temperatura ambiente. Os amastigotas foram centrifugados a 250 g por 10 minutos e utilizados para inoculação em camundongos fêmeas BALB/c e C57BL/6 (idade de 6 semanas). Os camundongos foram obtidos do centro de bioterismo da UNICAMP e do biotério do Instituto de Química da USP. Os animais foram infectados subcutaneamente no coxim plantar da pata traseira direita por injeção de 2×10^6 amastigotas.

3.2. Monitoramento da infecção *in vivo*

A evolução da infecção foi monitorada através da medida da progressão da lesão, medindo-se periodicamente a espessura das patas com paquímetro (Mitutoyo corporation, Japão). O tamanho da lesão foi expresso como a diferença, em milímetros, entre o tamanho da pata infectada e o da pata contralateral (não infectada).

A carga parasitária foi avaliada através do ensaio de diluição-limite (Titus e cols., 1985). Resumidamente, tecido coletado da região central da lesão, após remoção da pele, foi pesado, cortado em vários pedaços e homogeneizado vigorosamente com um homogeneizador de tecidos, em meio de cultura DME (Sigma, E.U.A.) contendo 5 % de SFB. O homogenato foi submetido a diluição serial em micro placas de 96 poços (Costar, E.U.A.), incubados a 26 °C por 10 dias e a eficiência de plaqueamento foi comparada à curva controle e analisada em programa de computador desenvolvido por Taswell (Taswell, 1981).

A mortalidade dos animais foi avaliada durante trinta e sete semanas após o inóculo dos parasitas e acompanhada em um grupo de 10 animais para cada linhagem (BALB/c e C57BL/6). O resultado foi expresso como a porcentagem de camundongos que sobreviveram.

3.3. Ressonância paramagnética eletrônica (RPE) dos tecidos

A ressonância paramagnética eletrônica (RPE) é uma espectroscopia de absorção na faixa de frequência de microondas (~ 9 GHz). Na RPE, a absorção de energia ocorre quando a amostra é submetida a um campo magnético externo, o qual interage com dipolos magnéticos presentes na amostra, como o spin do elétron. Dessa forma, a RPE detecta e caracteriza amostras paramagnéticas (Knowles e cols., 1976).

O NO é uma substância paramagnética, mas sua detecção direta por RPE só é possível em fase gasosa. Em solução não é possível observar seu espectro, devido ao seu curto tempo de relaxação (Henry e cols., 1997). A detecção de NO por RPE em sistemas biológicos é possível através da detecção de seus complexos com metais de transição, principalmente às temperaturas de nitrogênio e hélio líquido. Assim, analisamos os tecidos dos camundongos infectados por *Leishmania amazonensis* por RPE à 77 °K para acompanhar a formação de NO durante a infecção.

Camundongos infectados e controles (não infectados) foram anestesiados com éter. O sangue foi coletado da cavidade orbicular sobre heparina, colocado em capilar de quartzo (3,8 mm de diâmetro) ou em seringa plástica de insulina e congelado em nitrogênio líquido. Para a coleta dos órgãos e patas, os camundongos foram submetidos a deslocamento cervical. As patas (sem osso) e órgãos como fígado e baço, foram cortados com bisturi e os pedaços foram colocados em uma seringa. Esta seringa foi pressionada, extrusando os pedaços mais homogeneamente para dentro de capilares de quartzo (4,2 mm de diâmetro) abertos nas extremidades ou para dentro de seringas plásticas de insulina. O material foi congelado em nitrogênio líquido.

As amostras foram submetidas à ressonância paramagnética eletrônica (espectrômetro Bruker ER 200D-SCR) à baixa temperatura (77 °K). Os capilares foram colocados diretamente no Dewar adaptável à cavidade do espectrômetro. As amostras que estavam nas seringas plásticas de insulina foram extrusadas para dentro do Dewar como um bastão de tecido congelado. Este bastão foi obtido cortando-se a extremidade da seringa após descongelamento brando das laterais da amostra. Então, o êmbolo foi pressionado e o tecido empurrado para dentro do Dewar.

A subtração de linha de base e a dupla integração dos espectros foram realizadas com o programa Bruker WinEPR.

As concentrações de complexos nitrosilados nas amostras foram estimadas por comparação com concentrações conhecidas de nitrosil-hemoglobina. O padrão de nitrosil-hemoglobina foi preparado a partir de 1 mM de hemoglobina (~ 55 mg/mL), $\epsilon_{577} = 1,46 \times 10^{-4}$

$M^{-1}.cm^{-1}$, em tampão fosfato 100 mM, pH 7,4. Esta solução foi tratada com ditionito (ponta de espátula) para reduzir o ferro e eliminar o oxigênio, mantendo uma solução de deoxi-hemoglobina. Solução de deoxi-hemoglobina diluída à 250 μM foi tratada com volume igual de uma solução saturada de NO (~ 2 mM) em anaerobiose. A solução saturada de NO foi preparada em tampão fosfato 100 mM, pH 7,4, em anaerobiose. O NO gasoso (Alphagaz, Brasil) passou por um frasco contendo pastilhas de hidróxido de sódio antes de atingir o tampão previamente desoxigenado. A solução saturada de NO foi mantida em frasco fechado com septo de borracha e retirada dele para o tubo de reação, com uma seringa Hamilton “Gastight”. O sistema deve ser montado em capela de fluxo, devido à toxicidade do dióxido de nitrogênio gasoso. A solução 125 μM de nitrosil-hemoglobina, formada pela reação de NO com deoxi-hemoglobina, foi diluída em tampão fosfato para concentrações entre 0 e 25 μM , sempre em anaerobiose. Essas soluções foram sugadas para seringas de insulina e congeladas em nitrogênio líquido. Os espectros foram obtidos nas mesmas condições descritas acima para as amostras de sangue. A equação da reta obtida na curva padrão, expressa em concentração versus área do espectro, foi aplicada para converter a área dos espectros em concentração de nitrosil-complexos, que no sangue foi expressa em molaridade e nas patas foi expressa em moles/cm³ de tecido. Nesse caso, considerou-se o diâmetro do capilar de 4,2 mm e a altura de 1cm referente à janela de leitura da cavidade do espectrômetro.

Em alguns experimentos, camundongos com 6 semanas de infecção por *Leishmania amazonensis* foram tratados com inibidor de NOS, N^G-monometil-L-arginina a 50 mg/Kg (i.p.) (Sigma, E.U.A.). Após 3 horas da administração do inibidor, o sangue dos animais foi coletado e os espectros obtidos.

3.4. Microscopia ótica de amostras das lesões

Material coletado assepticamente da região central das lesões foi homogeneizado em uma gota de salina estéril sobre uma lâmina de microscopia. O material seco e fixado, foi posteriormente corado com Gram e analisado microscopicamente com objetiva de imersão, para a presença de bactérias.

3.5. Atividade peroxidase nas lesões

Tecidos das patas foram homogeneizados em 2,5 volumes (2,5 mL de tampão para cada mg de tecido) de tampão TRIS 50 mM (Merck, Alemanha), pH 7,4, contendo 0,5 % de Triton X-100, 5 mM de EDTA (Merck, Alemanha), 2 $\mu g/mL$ de aprotinina, 2 $\mu g/mL$ de pepstatina, 1 mM

de PMSF and 1 mM de ortovanadato de sódio (todos os inibidores de proteases foram provenientes da Sigma, E.U.A.). O homogenato foi centrifugado à 10.000 rpm por 10 minutos à 4 °C e alíquotas dos sobrenadantes foram estocadas à temperatura de -80 °C.

A concentração de proteínas nas amostras foi determinada pelo método de Bradford (BioRad, E.U.A.). A atividade peroxidase foi determinada adicionando-se 10 µL do sobrenadante diluído (~ 5,5 µg protein/µL) em 1 mL de tampão fosfato 50 mM, pH 6,2, contendo 0,8 mM de o-dianisidina (3,3'-dimethoxybenzidina) (Merck, Alemanha) e 1,5 mM de peróxido de hidrogênio (Fluka, Suíça). A velocidade de oxidação do substrato foi acompanhada espectroscopicamente a 460 nm por 10 minutos. Os resultados foram expressos em unidades de atividade por mg de proteína. Uma unidade (1U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para produzir 1µmol de o-dianisidina oxidada ($\epsilon_{460} = 1,13 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) por minuto a 25 °C (Bradley e cols., 1982).

3.6. Microscopia confocal, imuno-histoquímica das lesões - Detecção de óxido nítrico sintase induzível e de proteínas nitradas e hidroxiladas

A fixação dos tecidos e a montagem em blocos de parafina foram realizadas no laboratório do professor Aureo Tatsumi Yamada, do Instituto de Biologia da UNICAMP. Os camundongos foram perfundidos com injeção intra-cárdica de para-formaldeído 4 % e glutaraldeído 1 % em salina-fosfato 0,1 M, pH 7,4, para fixação dos tecidos. As patas foram coletadas, desidratadas em gradiente de etanol (70 a 100 %) e embebidas em parafina com Histosec (Merck, Alemanha).

Os cortes histológicos, a imuno-histoquímica e a microscopia confocal foram realizadas no laboratório do professor Renato de Arruda Mortara, da Universidade Federal de São Paulo. Os cortes histológicos de 4-5 µm de espessura foram montados sobre lâminas de vidro tratadas com silano. Os cortes foram desparafinados mergulhando-se as lâminas em uma pequena cuba contendo xilol com 3 lavagens de 10 minutos. Foram então re-hidratados em gradientes de etanol: 100 % (3 x 3 min), 95 % (2 x 3 min), 70 % (1 x 3 min), água destilada (1x 3 min) e PBS pH 7,4 (Mortara e cols., 1999). Para reativação de antígeno, os cortes foram mergulhados em tampão TRIS 50 mM, pH 9,0 e aquecidos em microondas a 900 W por 15 minutos (Martins e cols., 1999). Posteriormente, os cortes foram lavados com PBS (1 x 3 min), bloqueados e permeabilizados por 15 minutos com PGN (PBS contendo 0,2 % de gelatina e 0,1 % de saponina).

A dupla marcação com anticorpo contra iNOS e anticorpo contra 3-nitrotirosina foi realizada em soluções de PGN. Primeiramente, os cortes foram incubados com o anticorpo primário de coelho contra iNOS (Alexis, E.U.A.) (1:30) por 1 hora, seguido de lavagem com PBS (3 x 1 min) e posterior incubação com o anticorpo secundário contra imunoglobulina de coelho, conjugado com fluoresceína, FITC (Sigma, E.U.A.) (1:30) por 50 minutos. Em seguida, os cortes foram lavados com PBS (3 x 1 min) e incubados com o anticorpo primário monoclonal contra 3-nitrotirosina (Beckman, Linus Pauling Institute) (1:20) por 1 hora, lavados com PBS (3 x 1 min) e incubados com o anticorpo secundário contra imunoglobulina de camundongo, conjugado com cianina, Cy3 (Sigma, E.U.A.) (1:50) por 50 minutos. DAPI (4',6'-diamino-2-fenilindol, dilactato) (Molecular Probes, E.U.A.) 1 mM em água, foi incubado (1:50) com o último conjugado para marcação de estruturas ricas em DNA. Após a última lavagem com PBS (3 x 1 min), as lâminas foram montadas sob lamínulas (glicerol/ 0,1 M Tris-HCl pH 8,8 contendo 0,1 % de p-fenilenodiamina) e seladas com esmalte. As lâminas foram protegidas da luz e armazenadas à 4 °C. Marcações individuais para iNOS e 3-nitrotirosina foram realizadas como controles; também, a marcação de 3-nitrotirosina com anticorpo policlonal (Beckman, Linus Pauling Institute). A especificidade foi testada com a incubação do anticorpo na presença de 10 mM 3-nitrotirosina.

A detecção de 3-hidroxitirosina foi realizada com Célio Xavier dos Santos, que produziu o anticorpo monoclonal durante seu trabalho de doutorado no laboratório (Santos, 2002). A dupla marcação para 3-hidroxitirosina e 3-nitrotirosina foi realizada como descrito acima, utilizando-se o anticorpo monoclonal contra 3-hidroxitirosina e o anticorpo secundário contra imunoglobulina de camundongo conjugado com FITC. Nesse caso, o anticorpo contra 3-nitrotirosina utilizado foi o comercial de ovelha (OXIS, E.U.A.) e o secundário contra imunoglobulina de ovelha conjugado com rodamina (Calbiochem, CA, USA).

A imunofluorescência foi detectada em um sistema confocal BioRad 1024-UV acoplado a um microscópio Zeiss Axiovert 100. As imagens foram trabalhadas com o programa BioRad Laserssharp 1024.

3.7. Detecção de 3-nitrotirosina por Western e dot blot

Tecidos das patas foram homogeneizados em 2,5 volumes (2,5 mL de tampão para cada mg de tecido) de tampão TRIS 50 mM, pH 7,4, contendo 0,5 % de Triton X-100, 5 mM de EDTA (Merck, Alemanha), 2 µg/mL de aprotinina, 2 µg/mL de pepstatina, 1 mM de PMSF and 1 mM de ortovanadato de sódio (todos os inibidores de proteases foram provenientes da Sigma, E.U.A.). O homogenato foi centrifugado à 10.000 rpm por 10 minutos à 4 °C e alíquotas dos

sobrenadantes foram estocadas à -80°C . A concentração de proteínas foi dosada pelo método de Bradford (BioRad, E.U.A.).

Como controle positivo foi utilizada uma solução de albumina (Sigma, E.U.A.) ($2,5\ \mu\text{g}/\mu\text{L}$) nitrada com $1\ \text{mM}$ de peroxinitrito em tampão fosfato $200\ \text{mM}$, $\text{pH}\ 7,4$, contendo $10\ \text{mM}$ de bicarbonato (Sigma, E.U.A.). Como controle negativo foi utilizada uma solução de albumina não tratada com peroxinitrito.

3.7.1. Western blot

As amostras ($20\ \mu\text{g}$), a albumina controle negativo ($0,60\ \mu\text{g}$), a albumina nitrada controle positivo ($0,25\ \mu\text{g}$) e amostras às quais foi adicionada albumina nitrada ($20\ \mu\text{g} + 0,25\ \mu\text{g}$) em tampão de amostra (tampão TRIS $\text{pH}\ 6,8$, $2\ \%$ SDS, $10\ \%$ glicerol, $0,1\ \%$ mercaptoetanol e azul de bromofenol) foram aquecidas a 100°C por 5 minutos e aplicadas em gel de SDS-poliacrilamida $12\ \%$. A eletroforese foi efetuada a $190\ \text{V}$ fixos (fonte Bio-Rad, Power Pac200). Posteriormente, as proteínas foram transferidas do gel para membrana de nitrocelulose (Hybond-C Extra, Amersham Fife Science) utilizando um sistema de transferência semi-seco (Trans-Blot®SD, Bio-Rad) $15\ \text{V}$ por 1 hora (fonte Bio-Rad, Power Pac200). Após a transferência, as proteínas na membrana foram coradas com Ponceau.

A membrana com as proteínas foi lavada com TBST ($150\ \text{mM}$ de cloreto de sódio, $50\ \text{mM}$ de TRIS, $\text{pH}\ 7,5$ e $0,05\ \%$ Tween 20) ($1 \times 5\ \text{min}$), incubada com $5\ \%$ de leite desnatado em TBST por $1\ \frac{1}{2}$ hora, lavada com TBST ($3 \times 10\ \text{min}$), incubada com anticorpo primário de ovelha contra 3-nitrotirosina (OXIS, E.U.A.) ($1:2000$) por 1 hora, lavada com TBST ($3 \times 10\ \text{min}$), incubada com anticorpo secundário contra imunoglobulina de ovelha conjugado com peroxidase (Boehringer Mannheim, Alemanha) ($1:2500$) em TBST por 50 minutos, lavada com TBST ($3 \times 10\ \text{min}$) e revelada.

A revelação foi efetuada com o kit de ECL (Amersham Bioscience do Brasil) e exposição de filme de RX (Kodak brasileira).

A membrana corada com Ponceau e o filme de RX com as bandas reveladas foram digitalizadas (Scanner HP) e as imagens foram armazenadas em arquivos no formato “tiff”.

3.7.2. Dot blot

As proteínas das amostras e a albumina controle negativo e positivo foram fixadas em membrana de nitrocelulose (Hybond-C Extra, Amersham Life Science do Brasil), nas concentrações de $0,5$, $2,0$ e $4,0\ \mu\text{g}$, utilizando-se um sistema de filtração (The Conversible® Filtration Manifold System, Life Technologies).

A membrana foi corada com Ponceau para checar a fixação das proteínas e foi então lavada com TBST (TBS com 0,05 % Tween 20) (1 x 5 min), incubada com 5 % de leite desnatado em TBST por 1 ½ hora, lavada com TBST (3 x 10 min), incubada com anticorpo primário de ovelha contra 3-nitrotirosina (OXIS, E.U.A.) (1:1500) por 1 hora, lavada com TBST (3 x 10 min), incubada com anticorpo secundário contra imunoglobulina de ovelha conjugado com peroxidase (Boehringer Mannheim, Alemanha) (1:2000) em TBST por 50 minutos, lavada com TBST (3 x 10 min) e revelada. A revelação foi efetuada com o kit de ECL (Amersham Bioscience do Brasil) e exposição de filme de RX (Kodak brasileira).

A membrana corada com Ponceau e o filme de RX com as bandas reveladas foram digitalizadas (Scanner HP) e as imagens foram armazenadas em arquivos no formato “tiff”. Densitometria das proteínas coradas com Ponceau e das bandas reveladas no filme de RX foi realizada com o programa Lab Works 4.0 Image Acquisition and Analyses Software (UVP BioImaging Systems). Os valores foram normalizados em função da quantidade de proteína fixada na membrana, através da razão entre a densitometria das bandas reveladas no filme e a densitometria das bandas coradas com Ponceau na membrana.

3.8. Tratamento com tempol

Camundongos Balb/c (suscetíveis) e C57Bl/6 (resistentes) foram infectados com 2×10^6 amastigotas de *Leishmania amazonensis* conforme descrito em 3.1. A partir da infecção, 30 animais de cada linhagem tiveram acesso à água de beber contendo 2 mM de tempol. Os animais controle (30 de cada linhagem) receberam apenas água.

A distribuição do tempol nos animais foi acompanhada por RPE de um extrato de pata infectada em salina. Uma alíquota foi avaliada diretamente por RPE à temperatura ambiente e outra alíquota foi tratada com 1 mM de ferricianeto por 30 minutos antes de ser analisada.

O curso da infecção e a formação de NO foram monitorados através da medida da progressão da lesão como descrito acima.

A contagem dos parasitas na pata infectada (3 animais/ grupo/ tempo) foi realizada fazendo-se um homogenato de pata em 1 mL de salina, que foi filtrado através de um filtro de tecido fino (voal). O filtrado foi pressionado 5 vezes em seringa de insulina para soltar bem os parasitas. Os parasitas foram contados em câmara de Neubauer.

A extração de proteínas para análise de 3-nitrotirosina foi realizada das amostras submetidas a RPE, que sempre foram mantidas em nitrogênio líquido. A extração e dosagem de proteínas foram realizadas como descrito no item 3.7. O Dot Blot para 3-nitrotirosina foi realizado como descrito no item 3.7.2.

3.9. Atividade leishmanicida em culturas

3.9.1. Cultura de amastigotas axênicos

Promastigotas recentemente transformados de amastigotas derivados da lesão foram utilizados como população inicial para adaptação. Esses promastigotas, que estavam sendo cultivados em meio DME contendo 25 mM de Hepes, 25 mM de bicarbonato, pH 7.4, 100 mg/L de estreptomicina, 25 mg/L de penicilina e 20 % SFB à 26 °C, foram passados para o meio Schneider's *Drosophila* (Sigma, E.U.A.), 24 µg/mL de gentamicina, 20 % de SFB, pH 7.4 à 26 °C. Posteriormente, através de subpassagens semanais, o pH do meio foi sendo gradualmente diminuído até pH 4,6 e a temperatura foi sendo gradualmente aumentada até 32 °C. Populações estáveis de amastigotas axênicos foram mantidas a 32 °C, pH 4,6 (Hodgkinson e cols., 1996).

A infectividade desses amastigotas foi monitorada através da inoculação subcutânea, em patas de camundongos BALB/c. Esses parasitas causaram a lesão característica da infecção por *Leishmania amazonensis*.

3.9.2. Tratamento de amastigotas com doador de NO e peroxinitrito

Peroxinitrito foi sintetizado em nosso laboratório pela reação de 0,8 M de peróxido de hidrogênio (Fluka, Suíça) com 0,6 M de nitrito de sódio (Merck, Alemanha) em meio ácido, em um reator de fluxo (Beckman e cols., 1994). O excesso de peróxido de hidrogênio foi removido tratando-se com dióxido de manganês sólido (Sigma, E.U.A.). O peroxinitrito estabilizado em base foi mantido à -80 °C e no momento do uso, alíquotas foram retiradas por descongelamento fracionado. A concentração de peroxinitrito foi determinada por espectrofotometria em 0,1 N NaOH ($\epsilon_{302nm} = 1670 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$). Soluções estoques de peroxinitrito foram preparadas imediatamente antes do uso em água MilliQ tratada com chellex.

O doador de NO utilizado foi o NOC-5 (1-hidroxi-2-oxo-3-(3-aminopropil)-3-isopropil-1-triazeno) (Alexis, E.U.A.). Soluções estoques foram preparadas em NaOH 0,01 M e a concentração determinada por espectrofotometria ($\epsilon_{250nm} = 7440 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$).

Amastigotas foram lavados duas vezes em salina e ressuspensos em tampão fosfato 200 mM, pH 7,3. Em placas de 96 poços, os amastigotas foram distribuídos na densidade de 4×10^6 amastigotas/poço. Foram então tratados com diferentes concentrações de peroxinitrito por 10 minutos ou com diferentes concentrações de doador de NO por 30 minutos (volume final = 120 µL). Os tempos de tratamento foram selecionados para garantir mais do que 95 % de decomposição das concentrações usadas de peroxinitrito ($t_{1/2} < 1 \text{ s}$) e de NOC-5 ($t_{1/2} = 360 \text{ s}$).

Uma vez que as soluções estoques de peroxinitrito e doador de NO continham NaOH, as concentrações de NaOH foram equalizadas em todos os tratamentos, incluindo os controles. Para avaliar a participação de produtos de decomposição do peroxinitrito e do NOC-5 nos efeitos observados, foram realizados experimentos de adição reversa. Nesses, os amastigotas foram tratados com os reagentes (2 mM) previamente decompostos em tampão. Após os respectivos tempos de tratamento, adicionou-se a cada poço 200 µL de DME contendo 20 % SFB, pH 7,4 e os parasitas foram incubados a 26 °C.

A viabilidade celular foi determinada por contagem das células em câmara de Neubauer, utilizando-se eritrosina-B (0,4 % em PBS) (Sigma, E.U.A.). Parasitas corados com a eritrosina-B foram considerados não viáveis (Lemestre e cols., 1997). Os experimentos foram realizados duas vezes separadamente e em duplicata. Os resultados foram expressos como porcentagem em relação ao tratamento controle, tomado como 100 % no tempo zero.

4. Resultados

4.1. Curso da infecção por *Leishmania amazonensis* em camundongos BALB/c e C57BL/6

Em nossos estudos, camundongos BALB/c e C57BL/6 infectados com 2×10^6 amastigotas de *Leishmania amazonensis* apresentaram os padrões descritos de suscetibilidade e resistência (Figs. 5-8) (Andrade e cols., 1984; McElrath e cols., 1987). Assim, a infecção levou ao desenvolvimento da lesão cutânea nos camundongos suscetíveis (Fig. 5 e Fig. 6●) até ulceração, a qual ocorreu, no geral, após a 7ª semana de infecção. Nenhum sinal de recuperação foi observado e após a 15ª semana de infecção, ocorreram lesões cutâneas metastáticas na cauda e focinho. Em contraste, o desenvolvimento da lesão permaneceu controlado nos camundongos resistentes (Fig. 5 e Fig. 6●) e, embora não tenha ocorrido cura parasitológica da doença, os camundongos apresentaram sobrevivência semelhante a de animais controles não infectados (Fig. 7●), enquanto todos os camundongos suscetíveis haviam morrido na 23ª semana de infecção (Fig. 7●).

A carga parasitária na lesão da pata também apresentou um perfil diferenciado para os camundongos suscetíveis e resistentes. Camundongos suscetíveis apresentaram uma contínua proliferação dos parasitas na lesão (Fig. 8●), enquanto que os camundongos resistentes apresentaram um número máximo de parasitas ao redor da 6ª semana de infecção (Fig. 8●).

Figura 5: Camundongos BALB/c e C57Bl/6 infectados com *Leishmania amazonensis* na pata direita, após 9 semanas de infecção.

Figura 6: Curso da infecção por *Leishmania amazonensis* em camundongos suscetíveis (●) e resistentes (●) monitorado pela medida da lesão da pata. Os animais (10 por grupo) foram infectados com 2×10^6 amastigotas e as medidas realizadas como descrito em materiais e métodos. Os dados representam a média $\pm$ erro padrão das medidas.

Figura 7: Sobrevida dos camundongos suscetíveis (●) e resistentes (●) durante o curso da infecção por *Leishmania amazonensis*. Os animais (10 por grupo) foram infectados com 2×10^6 amastigotas como descrito em materiais e métodos.

Figura 8: Parasitemia nos camundongos suscetíveis (●) e resistentes (●) durante o curso da infecção por *Leishmania amazonensis*. Os animais foram infectados com 2×10^6 amastigotas e nas 2^a, 6^a e 13^a semanas de infecção, o número de parasitas na lesão da pata foi determinado em 2 animais de cada grupo como descrito em materiais e métodos.

4.2. Produção de óxido nítrico durante a infecção por *Leishmania amazonensis*

A formação de NO durante o curso da infecção foi acompanhada pela detecção de complexos de NO no sangue (Fig. 9 e Fig. 10) e patas (Fig. 11 e Fig. 12) dos camundongos infectados.

Os níveis de HbNO detectados no sangue dos camundongos infectados (Fig. 10) demonstraram que a produção de NO durante o curso da infecção tem perfil diferente para camundongos suscetíveis e resistentes. De modo interessante, esse perfil se correlacionou com a taxa de parasitas nas lesões (Fig. 8). Nos camundongos resistentes, os níveis máximos detectados de HbNO ocorreram na 6ª semana de infecção (Fig. 10●) justamente quando o número de parasitas nas lesões era também máximo (Fig. 8●). Posteriormente, na 13ª semana de infecção, tanto os níveis de HbNO quanto a parasitemia diminuíram. Em contraste, nos camundongos suscetíveis os níveis de HbNO no sangue cresceram pouco nos estágios iniciais da infecção, mas aumentaram bastante nos estágios tardios (Fig. 10●). A taxa de parasitas na lesão destes camundongos continuou aumentando durante todo o curso da infecção (Fig. 8●). O sangue de camundongos não infectados não apresentou níveis de HbNO detectáveis por RPE.

Os níveis de HbNO no sangue dos camundongos infectados por *Leishmania amazonensis* foram reduzidos em *c.a.* 60 % após a administração de N^G-monomethyl-L-arginina, um inibidor da enzima óxido nítrico sintase, refletindo a produção enzimática de NO (Fig. 9).

Além do complexo de HbNO no sangue, também detectamos complexos de NO nas lesões das patas de ambos os camundongos (Fig. 11 e Fig. 12). A quantificação dos complexos detectados nas lesões (Fig. 12) apresentou um perfil semelhante ao observado no sangue (Fig. 10). Os camundongos resistentes apresentando uma produção maior de NO na 6ª semana de infecção (Fig. 12●) e o camundongo suscetível, somente no final da infecção (Fig. 12●).

Além do fato da máxima produção de NO nos camundongos suscetíveis e resistentes ocorrer em tempos diferentes, também foi interessante notar que os complexos de NO detectados nas lesões das patas eram diferentes para ambos camundongos (Fig. 11). Complexos de NO detectados nas lesões das patas dos camundongos resistentes (Fig. 11B) apresentaram espectro dominado por um sinal axial ($g_x \approx 2,04$ e $g_z \approx 2,01$) característico de complexos de NO com centros ferro-enxofre, como o complexo dinitrosil-ditiol-ferro, $[\text{Fe}(\text{RS})_2(\text{NO})_2]$ (Bastian e cols., 1994; Drapier e cols., 1991; Lancaster e Hibbs, 1990; Woolum e cols., 1968). Nos camundongos suscetíveis (Fig. 11A) o espectro foi dominado por um sinal característico de nitrosil-heme penta e hexacoordenado (Kosaka e cols., 1994), semelhante ao espectro de HbNO detectado no sangue, embora a presença de um pico em $g \approx 2,04$ atribuível a complexo dinitrosil-ditiol-ferro também

pudesse ser observado. Essa marcante diferença observada nos espectros de RPE poderia ser atribuída à diferente arquitetura tecidual na lesão da pata dos camundongos suscetíveis e resistentes (McElrath e cols., 1987) e mais adiante voltaremos a discutir tal observação em conjunto com outros resultados.

A presença de nitrosil-complexos em outros órgãos alvos do parasita, tais como fígado e baço, também foi examinada. Esses tecidos perfundidos não apresentaram níveis detectáveis de nitrosil-complexos e o espectro de RPE observado no fígado de camundongos infectados (Fig. 13A) apresentou sinais característicos de hepatócitos normais (Fig. 13B) (Chamulitrat e cols., 1995).

Tomados conjuntamente, os resultados confirmam que a produção enzimática de NO é importante para o controle da infecção (Bogdan e cols., 1996; Clark e cols., 1996; MacMicking e cols., 1997). Mostraram também, que o camundongo BALB/c sintetizava NO em épocas tardias da infecção, sugerindo que a síntese não deveria ser uma resposta à *Leishmania* mas, talvez, a uma infecção secundária.

Figura 9: (A) Espectro de RPE representativo do sangue de camundongos resistentes na 6^a semana de infecção por *Leishmania amazonensis*. (B) mesmo que (A), porém 3h após a administração de N^G-monometil-L-arginina (50 mg/Kg), inibidor de iNOS. Os espectros foram varridos à 77 °K. Condições instrumentais: 10 mW de potência; 0,5 mT de amplitude de modulação; 10×10^5 de ganho; 1 s de constante de tempo e 0,12 mT/s de velocidade de varredura.

Figura 10: Síntese de óxido nítrico monitorado como níveis de nitrosil-hemoglobina no sangue de camundongos suscetíveis (●) e resistentes (●) detectados por RPE à baixa temperatura (77 °K) durante o curso da infecção por *Leishmania amazonensis*. Os dados representam a média $\pm$ erro padrão das medidas de 4 a 10 animais por grupo a cada tempo.

Figura 11: Espectro de RPE à baixa temperatura (77 °K) representativo da lesão da pata de camundongos suscetíveis (A) e resistentes (B) após infecção por *Leishmania amazonensis*, nos tempos de máxima produção de NO, 18ª semana para suscetível e 6ª semana para resistente. Condições instrumentais: 10mW de potência; 0,5 mT de amplitude de modulação; $6,3 \times 10^5$ (A) ou $4,0 \times 10^5$ (B) de ganho; 1 s de constante de tempo e 0,12 mT/s de velocidade de varredura.

Figura 12: Níveis de nitrosil-complexos nas lesões de camundongos suscetíveis (●) e resistentes (●) detectados por RPE à baixa temperatura (77 °K) durante o curso da infecção por *Leishmania amazonensis*. Os dados representam a média $\pm$ erro padrão das medidas de pelo menos 3 animais por grupo a cada tempo.

Figura 13: Espectro de RPE à baixa temperatura (77 °K) representativo do fígado de camundongo C57Bl/6 com 6 semanas de infecção por *Leishmania amazonensis* (A) e do fígado de camundongo C57Bl/6 não infectado (B). Condições instrumentais: 10 mW de potência; 0,5 mT de amplitude de modulação; 10×10^5 de ganho; 2 s de constante de tempo e 0,1 mT/s de velocidade de varredura.

4.3. Infecção secundária e atividade peroxidásica

Para avaliar uma possível infecção secundária à leishmaniose, material coletado assepticamente das lesões de camundongos suscetíveis e resistentes, em diferentes tempos de infecção, foi analisado por microscopia ótica, após ser corado pela coloração de Gram. Os resultados demonstraram a presença de bactérias Gram-positivas nas lesões dos camundongos suscetíveis nos estágios finais da infecção (Fig. 14), quando ocorreu um aumento nos níveis de NO no sangue (Fig. 10●) e patas (Fig. 12●) desses camundongos. Em contraste, bactérias não foram detectáveis nas lesões de camundongos resistentes.

Além de bactérias, células polimorfonucleares também foram observadas mais freqüentemente nas lesões dos camundongos suscetíveis (Fig. 15). Para quantificar estimativamente essas células, dosou-se a atividade de peroxidase nas patas dos camundongos suscetíveis e resistentes. O método utilizado é amplamente utilizado em modelos de inflamação aguda como medida da atividade de mieloperoxidase (Bradley e cols., 1982), embora não seja específico para essa peroxidase. Os resultados obtidos mostraram uma maior atividade peroxidase nos camundongos suscetíveis do que nos resistentes (Fig. 16).

Como a mieloperoxidase é uma hemoproteína muito abundante em neutrófilos, é possível que o espectro de nitrosil-heme detectado na lesão dos camundongos suscetíveis (Fig. 11A), seja devido ao complexo de NO com a mieloperoxidase. Notar a diferença com o espectro obtido para o camundongo resistente que é característico de complexos de NO com centros ferro-enxofre (Fig. 11B) e de macrófagos expressando iNOS (Lancaster e Hibbs, 1990).

Figura 14: Fotomicrografia representativa de esfregaço da área necrótica central da lesão de camundongo suscetível na 22ª semana de infecção por *Leishmania amazonensis*. As flechas (↑) e (→) apontam bactérias e amastigotas, respectivamente.

Figura 15: Fotomicrografia representativa de esfregaço da área necrótica central da lesão de camundongo suscetível na 22^a semana de infecção por *Leishmania amazonensis*. (Bc) bactéria, (PMN) célula polimorfonuclear e (L) *Leishmania*.

Figura 16: Variação da atividade de peroxidase nas lesões dos camundongos suscetíveis (■) e resistentes (■), com o tempo de infecção por *Leishmania amazonensis*.

4.4. Presença de proteínas nitradas nas lesões

Para investigar a participação de oxidantes derivados do NO no controle da infecção, cortes histológicos das lesões foram analisados quanto a presença da isoforma induzível de óxido nítrico sintase (iNOS) e quanto a presença de resíduos de 3-nitrotirosina em proteínas por microscopia confocal. Marcação para 3-nitrotirosina, iNOS e núcleos, foi revelada em vermelho, verde e azul, respectivamente (Figs. 17-22). Como resultados, na 6^a semana de infecção, a lesão de camundongos resistentes (Fig. 17) apresentou intensa expressão de iNOS (em verde) acompanhada por extensa marcação de proteínas nitradas (em vermelho) no sítio inflamatório, sendo possível, inclusive, visualizar parasitas nitrados dentro dos fagolisossomos dos macrófagos (Fig. 18). Também foi interessante notar que a iNOS está localizada ao redor dos fagolisossomos, indicando que o NO está sendo produzido próximo aos parasitas. Na 13^a semana de infecção, a lesão dos camundongos resistentes (Fig. 19) apresentou marcação para iNOS diminuída e restrita aos remanescentes sítios de infiltrados de macrófagos parasitados. Em contraste, a lesão de camundongos suscetíveis, na 6^a semana de infecção (Fig. 20), apresentou expressão de iNOS (em verde) e marcação para 3-nitrotirosina (em vermelho) bem menos intensa do que a lesão do resistente (comparar Fig. 20 com Fig. 17). Em um aumento maior (Fig. 21), os parasitas dentro dos fagolisossomos, na lesão dos suscetíveis, apresentaram-se praticamente sem marcação para 3-nitrotirosina. A lesão dos camundongos suscetíveis apresentou marcação evidente para iNOS e 3-nitrotirosina, somente nos estágios tardios da infecção (Fig. 22).

Para obter possíveis informações de proteínas-alvos de nitração nas lesões, experimentos de western blot foram realizados. Todavia, não obtivemos resultados consistentes. Alguns experimentos não mostraram marcação, outros mostraram marcação de todas as proteínas, inclusive as dos animais não infectados controles e outros ainda, mostraram marcação difusa (smear). Uma vez que 3-nitrotirosina na presença de agentes redutores, como mercaptoetanol e ditiotreitól, poderia estar sendo reduzida em uma reação catalisada por metais e dessa forma perdendo o sítio de reconhecimento pelo anticorpo (Balabanli e cols., 1999), foram realizados experimentos em condições não redutoras. Porém, os resultados permaneceram variáveis.

Outra possibilidade para explicar a não marcação seria a degradação das proteínas nitradas. Para avaliar esta hipótese, albumina nitrada foi adicionada aos extratos protéicos das lesões. De fato, observou-se degradação da albumina nitrada adicionada aos extratos de pata dos camundongos resistentes com 6 e 13 semanas de infecção (Fig. 23, linhas 6 e 7). A degradação parece ocorrer em sítios específicos, pois foi possível observar duas bandas definidas de peso molecular menor do que o da albumina. A albumina nitrada adicionada ao extrato de pata não

infectada não foi degradada (Fig. 23, linha 5). Como a lesão contém muitas células inflamatórias e parasitas, é provável a degradação mediada por proteases presentes em altas concentrações nessas células. As proteases de origem protozoária provavelmente não estariam sendo inibidas pelo coquetel de inibidores utilizado.

As dificuldades para a detecção de proteínas nitradas por Western blot, nos levaram a examiná-las por Dot blot (Fig. 24). Nesse caso, foi possível uma quantificação comparativa entre as amostras, que apresentou um maior conteúdo de proteínas nitradas na 6^a semana de infecção dos camundongos resistentes (Fig. 24).

Figura 17: Microscopia confocal imuno-histoquímica da lesão da pata de camundongo resistente com 6 semanas de infecção por *Leishmania amazonensis*.
(1) Imagem da marcação para 3-nitrotirosina (vermelho) e iNOS (verde); em azul (corado por DAPI) podem ser observados os núcleos das células do hospedeiro, bem como dos parasitas dentro dos fagolisossomos.
(2) Imagem do mesmo corte em contraste de interferência diferencial Nomarski.

Figura 18: Microscopia confocal imuno-histoquímica da lesão da pata de camundongo resistente com 6 semanas de infecção por *Leishmania amazonensis*.

(1) Imagem da marcação para 3-nitrotirosina (vermelho) e iNOS (verde); em azul (corado por DAPI) podem ser observados os núcleos das células do hospedeiro, bem como dos parasitas dentro dos fagolisossomos.

(2) Imagem do mesmo corte em contraste de interferência diferencial Nomarski.

Figura 19: Microscopia confocal imuno-histoquímica da lesão da pata de camundongo resistente com 13 semanas de infecção por *Leishmania amazonensis*.
(1) Imagem da marcação para 3-nitrotirosina (vermelho) e iNOS (verde); em azul (corado por DAPI) podem ser observados os núcleos das células do hospedeiro, bem como dos parasitas dentro dos fagolisossomos.
(2) Imagem do mesmo corte em contraste de interferência diferencial Nomarski.

Figura 20: Microscopia confocal imuno-histoquímica da lesão da pata de camundongo suscetível com 6 semanas de infecção por *Leishmania amazonensis*.
(1) Imagem da marcação para 3-nitrotirosina (vermelho) e iNOS (verde); em azul (corado por DAPI) podem ser observados os núcleos das células do hospedeiro, bem como dos parasitas dentro dos fagolisossomos.
(2) Imagem do mesmo corte em contraste de interferência diferencial Nomarski.

Suscetível 1
6ª semana de infecção

3-nitrotirosina

iNOS

núcleos

↑
parasitas nos
fagolisossomos

2

Figura 21: Microscopia confocal imuno-histoquímica da lesão da pata de camundongo suscetível com 6 semanas de infecção por *Leishmania amazonensis*.

(1) Imagem da marcação para 3-nitrotirosina (vermelho) e iNOS (verde); em azul (corado por DAPI) podem ser observados os núcleos das células do hospedeiro, bem como dos parasitas dentro dos fagolisossomos.

(2) Imagem do mesmo corte em contraste de interferência diferencial Nomarski.

Suscetível 1
13ª semana de infecção

3-nitrotirosina
iNOS
núcleos

2

Figura 22: Microscopia confocal imuno-histoquímica da lesão de pata de camundongo suscetível com 13 semanas de infecção por *Leishmania amazonensis*.
(1) Imagem da marcação para 3-nitrotirosina (vermelho) e iNOS (verde); em azul (corado por DAPI) podem ser observados os núcleos das células do hospedeiro, bem como dos parasitas dentro dos fagolisossomos.
(2) Imagem do mesmo corte em contraste de interferência diferencial Nomarski.

Figura 23: Western blot de albumina nitrada adicionada ou não a extratos protéicos das patas de camundongos resistentes infectados por *Leishmania amazonensis*. As linhas 1 e 2 correspondem a 0,25 µg de albumina nitrada e 0,6 µg de albumina, como controles. As linhas 3 e 4 correspondem a 20 µg de extratos protéicos das patas de camundongos na 13ª e 6ª semana de infecção, respectivamente. As linhas 5, 6 e 7 correspondem a 0,25 µg de albumina nitrada adicionada a 20 µg de extratos protéicos de patas de camundongo não infectado, de camundongo resistente na 6ª e 13ª semana de infecção, respectivamente. (A) Proteínas coradas com Ponceau e (B) Western blot para nitro-tirosina.

Figura 24: Níveis de proteínas nitradas na lesão das patas de camundongos suscetíveis e resistentes, na 6ª e 13ª semanas de infecção por *Leishmania amazonensis*. Os valores expressos são a razão entre a densitometria da marcação para nitrotirosina e a quantidade de proteínas coradas com Ponceau, dots de ~4 ug de proteínas.

4.5. Presença de proteínas hidroxiladas nas lesões

Os resultados anteriores demonstram que houve uma coincidência temporal entre o número máximo de parasitas nas lesões dos camundongos resistentes (Fig. 8I) e suas nitrações (Fig. 18 e Fig. 19). Sugerem assim, que agentes nitrantes têm importante papel no controle da infecção. Vários mecanismos biológicos podem levar à produção de dióxido de nitrogênio, um importante agente nitrante de resíduos de tirosina em proteínas (Fig. 25). Anteriormente, propusemos que a produção paralela de proteínas nitradas e hidroxiladas poderia ser uma ferramenta para diferenciar o peroxinitrito de outras espécies nitrantes (Fig. 25) (Santos e cols., 2000). Conseqüentemente, analisou-se por HPLC a presença de 3-hidroxitirosina (DOPA) nos hidrolisados protéicos das lesões dos camundongos infectados (Fig. 26) (Santos, 2002). A presença de níveis maiores de 3-hidroxitirosina nos hidrolisados protéicos dos camundongos resistentes (Fig. 26), levou o grupo a investir na obtenção de um anticorpo contra proteínas hidroxiladas, em colaboração com a professora Maria Júlia Manso Alves do Instituto de Química da USP. O anticorpo obtido foi utilizado para microscopia confocal imuno-histoquímica (Fig. 27).

Como mostrado na figura 27, o camundongo suscetível não apresentou marcação significativa para 3-hidroxitirosina (Fig. 27E), diferentemente do camundongo resistente que apresentou intensa marcação (Fig. 27B). Como observado anteriormente (Fig. 18) e aqui confirmado (Fig. 27A), houve extensa marcação para 3-nitrotirosina nas lesões dos camundongos resistentes na 6ª semana de infecção. De modo interessante, foi possível observar proteínas hidroxiladas e nitradas co-localizadas no sítio inflamatório (Fig. 27C). Esses resultados são fortes evidências para a produção de peroxinitrito nos fagolisossomos dos macrófagos dos camundongos resistentes e para um importante papel do oxidante no controle da infecção.

Figura 25: Representação esquemática dos sistemas e mecanismos que podem nitrar e hidroxilar resíduos de tirosina em proteínas *in vivo*.

Figura 26: Níveis de 3-hidroxitirosina (A) determinados nas lesões de pata dos camundongos resistentes (■) e suscetíveis (■) na 6ª semana de infecção por *Leishmania amazonensis*. Cromatograma de HPLC (B) representativo da determinação de 3-hidroxitirosina nos hidrolisados das proteínas da lesão dos camundongos infectados, apresentando a presença de 3-hidroxitirosina com detecção a 0,24 V (50 nA) e tirosina com detecção a 0,65 V (500 nA). Os níveis de 3-hidroxitirosina em camundongos não infectados foram marginais (< 1 mmol/mol de tirosina). Os dados representam a média $\pm$ erro padrão das medidas de pelo menos 3 animais por grupo. (Figura reproduzida de Santos, 2002).

Figura 27: Microscopia confocal, imuno-histoquímica para proteínas nitradas (■), hidroxiladas (■) e co-localização de proteínas nitradas e hidroxiladas (■) nas lesões de camundongos resistente e suscetível com 6 semanas de infecção por *Leishmania amazonensis*. Em azul (corado por DAPI) podem ser observados os núcleos das células do hospedeiro, bem como dos parasitas dentro dos fagolisossomos. (Figura reproduzida de Santos, 2002).

4.6. Tratamento com tempol

Procurando mais evidências para o papel do peroxinitrito no controle da infecção, os camundongos suscetíveis e resistentes foram tratados com tempol. Esse composto é um eficiente inibidor das reações de nitração mediadas por peroxinitrito (Carrol e cols., 2000; Bonini e cols., 2002; Augusto e cols., 2002a).

Tempol é um nitróxido estável em solução e à temperatura ambiente, e pôde ser colocado na água de beber dos camundongos. A sua distribuição *in vivo* foi avaliada pelo exame do homogenato da pata de camundongos infectados (Fig. 28). O extrato apresentou um discreto sinal de tempol e um claro sinal de ascorbila (Fig. 28A). Após a adição de um oxidante fraco (1mM ferricianeto), o sinal do radical ascorbila desapareceu e o sinal do tempol aumentou (Fig. 28B). Isso indica que a maior parte do tempol estava reduzida à hidroxilamina nos extratos, como esperado (Sentjurg e Mason, 1992). Em síntese, os resultados mostrados na figura 28 indicam que o tempol administrado na água de beber dos camundongos se distribui nos tecidos e atinge o local da infecção.

No tratamento dos camundongos com tempol não verificamos nenhuma diferença no desenvolvimento da lesão dos camundongos suscetíveis (Fig. 29A), mas verificamos um discreto aumento da lesão dos camundongos resistentes (Fig. 29B). Tal aumento ocorreu por volta do tempo em que a infecção é controlada, a 6^a semana de infecção quando ocorre um aumento na produção de NO. O tratamento com tempol não interferiu, contudo, nos níveis de NO detectáveis por RPE nas lesões dos camundongos resistentes (Fig. 30). Além disso, o espectro de RPE foi igual aos dos camundongos não tratados com tempol (Fig. 30).

Os níveis de proteínas nitradas nas lesões dos camundongos resistentes foram alterados pelo tratamento com tempol (Fig. 31). Analisando a nitração de proteínas por dot blot, após densitometria, verificamos uma diminuição da nitração para os camundongos tratados com tempol (Fig. 31). Relevantemente, um menor nível de proteínas nitradas foi acompanhado por uma maior taxa de parasitas nas lesões (Fig. 32). De fato, demonstramos recentemente que o tempol redireciona a reatividade do peroxinitrito de intermediários nitrantes para intermediários nitrosantes/nitrosilantes (Bonini e cols., 2002). Não detectamos aumento nos níveis de proteínas nitrosiladas nas patas dos camundongos tratados com tempol (Fig. 30), mas ainda não medimos as proteínas nitrosadas. Tais experimentos serão realizados brevemente.

Figura 28: Espectro de RPE de homogenatos da pata de camundongo resistente infectado por *Leishmania amazonensis* e tratado com 2 mM de tempol na água de beber. (A) extrato e (B) extrato tratado com 1 mM de ferricianeto. Os espectros dos radicais ascorbila (O) e tempol (•) estão marcados para facilitar a visualização. Condições instrumentais: 10 mW de potência, 0,1 mT de amplitude de modulação, 327 ms de constante de tempo e 0,03 mT/s de velocidade de varredura.

Figura 29: Curso da infecção por *Leishmania amazonensis* em camundongos suscetíveis (A) e resistentes (B), tratados (●) ou não (●) com 2 mM de tempol na água de beber. Os animais (30 por grupo) foram infectados com 2×10^6 amastigotas como descrito em materiais e métodos. Os dados representam a média $\pm$ erro padrão das medidas.

Figura 30: Espectro de RPE à baixa temperatura (77 °K) da lesão de pata de camundongos suscetíveis com 6 semanas de infecção por *Leishmania amazonensis*, tratados (B) ou não (A) com 2 mM tempol na água de beber. Os espectros são correspondentes à média de três espectros por grupo. Condições instrumentais: 10 mW de potência; 0,5 mT de amplitude de modulação; 10×10^5 de ganho; 1 s de constante de tempo e 0,12 mT/s de velocidade de varredura.

Figura 31: Níveis de proteínas nitradas na lesão das patas de camundongos resistentes na 6ª semana de infecção por *Leishmania amazonensis* tratados (■ T1 e T2) ou não (■ H1 e H2) com 2 mM tempol na água de beber. Albumina nitrada (AN) e Albumina (A) foram usadas como controles. Os valores expressos são a razão entre a densitometria da marcação para nitrotirosina e a quantidade de proteínas coradas com Ponceau, dots de ~4 ug de proteína. As barras largas são os valores médios entre as duas amostras para cada grupo. Representativo de dois experimentos realizados independentemente.

Figura 32: Avaliação da parasitemia nas lesões de pata de camundongos resistentes com 6 e 13 semanas de infecção por *Leishmania amazonensis* tratados (■) ou não (■) com 2 mM tempol na água de beber. Os resultados são as médias $\pm$ erro padrão das medidas de 3 amostras por grupo, por tempo.

4.7. Atividade leishmanicida de peroxinitrito e NO em culturas

A atividade leishmanicida do peroxinitrito sobre a forma promastigota de *Leishmania amazonensis* havia sido investigada em nosso laboratório anteriormente (Gatti e cols., 1995). Agora, investigamos a atividade leishmanicida do peroxinitrito e do NO sobre as formas amastigotas do parasita, a forma que vive dentro dos fagolisossomos dos macrófagos no hospedeiro mamífero. Em cultura, essas formas podem ser mantidas axenicamente, ou seja, sem a presença de macrófagos, por um processo de diferenciação e adaptação dos parasitas (Fig. 23), conforme descrito em materiais e métodos (item 3.9.1) (Hodgkinson e cols., 1996). Desse modo, amastigotas axênicos mantidos em cultura foram tratados com peroxinitrito ou doador de NO e a viabilidade dos parasitas foi acompanhada no tempo.

Os parasitas tratados com peroxinitrito tiveram sua viabilidade afetada de modo concentração-dependente logo na 1ª hora após o tratamento (Fig. 34A). Após 24 horas, os parasitas que sobreviveram começaram a proliferar (Fig. 34A). Em contraste, os parasitas tratados com um doador de NO tiveram sua viabilidade apenas marginalmente afetada na 1ª hora após o tratamento (Fig. 34B) mas suas proliferações foram retardadas (Fig. 34B). A viabilidade dos parasitas não foi afetada pelos produtos de decomposição de peroxinitrito e de NOC-5 (experimentos de adição reversa).

O efeito citotóxico do peroxinitrito comparado ao efeito citostático do NO em culturas de parasitas sugere, mais uma vez, que o peroxinitrito é um importante agente para a eliminação dos parasitas nos camundongos resistentes.

Figura 33: Parasitas de uma cultura de promastigotas em processo de diferenciação a amastigotas axênicos. Material corado com Giemsa.

Figura 34: Efeito de peroxinitriro (A) e de NO liberado de NOC-5 (B) na viabilidade de amastigotas de *Leishmania amazonensis* em cultura. As concentrações usadas foram de: 0 (■); 0,5 mM (●); 1 mM (▲) e 2 mM (◆). Os resultados foram expressos como porcentagem em relação ao tratamento controle, tomado como 100 % no tempo zero. Cada ponto corresponde ao valor médio de dois experimentos em paralelo.

5. Discussão

Espécies reativas derivadas de oxigênio e nitrogênio desempenham um papel proeminente na imunidade de mamíferos, embora suas reações e interações sejam bastante indiscriminadas em comparação à especificidade das interações de moléculas chave do sistema imune como aquelas dos receptores das células B e T (Nathan e Shiloh, 2000). A produção de altas taxas de espécies reativas de oxigênio, em particular do ânion radical superóxido, é uma característica das células fagocíticas de mamíferos. Os maiores produtores são as células polimorfonucleares, sendo que macrófagos ativados atingem de 30 a 50 % da produção dessas (Nathan e Shiloh, 2000). Macrófagos ativados podem produzir o ânion radical superóxido e o óxido nítrico, abrindo a possibilidade de formação de peroxinitrito (Fig. 2). Embora a importância de espécies reativas derivadas de oxigênio e nitrogênio na interação hospedeiro mamífero-patógeno não seja mais discutida, os mecanismos de atuação dessas espécies na eliminação/controle de infecções permanecem em ativa investigação. Mesmo o mecanismo oxidativo microbicida de neutrófilos, por muitos anos atribuído à produção de ácido hipocloroso por mieloperoxidase, foi contestado recentemente (Reeves e cols., 2002). Da mesma forma, vem sendo colocado um papel para a mieloperoxidase nos mecanismos microbicidas de macrófagos (Pfeifer e cols., 2001a, b; Hurst, 2002), embora esteja longe de ser comprovado como aqui discutido.

De fato, nesse ambiente efervescente, nosso trabalho se propôs a estudar os mecanismos microbicidas de macrófagos *in vivo*. Modelos murinos de infecção foram selecionados porque possuem todos os fatores, conhecidos e ainda desconhecidos, cujas inter-relações levam ao resultado final, controle ou não da infecção. Em particular, os modelos murinos de infecção por *Leishmania amazonensis* foram considerados apropriados porque esse parasita vive obrigatoriamente em macrófagos e existem camundongos naturalmente resistentes e suscetíveis a ele (Figs. 5-8) (Andrade e cols., 1984; McElrath e cols., 1987). Além disso, em ambos modelos murinos, as lesões cutâneas são constituídas por um infiltrado de macrófagos infectados (Fig. 18 e Fig. 21), tornando experimentalmente factível estudar parâmetros de infecção e a produção de intermediários reativos nas próprias lesões. Como muitos dos métodos para detectar a produção de intermediários reativos são indiretos e pressupõem manipulação das amostras de formas que podem gerar produtos oxidados (Halliwell & Gutteridge, 1999), foi essencial comparar os resultados obtidos com os camundongos resistentes e os suscetíveis.

Os resultados obtidos com o camundongo suscetível a partir da 13^a semana de infecção foram, de uma certa forma, complicadores. Demonstramos que esse camundongo podia produzir óxido nítrico mesmo infectado com *Leishmania amazonensis* (Fig. 11) e esse fato não era

reconhecido na literatura (Evans e cols., 1993). Esclarecemos a contradição, demonstrando que a expressão de iNOS e a produção de óxido nítrico são processos tardios (Fig. 12 e Fig. 22) e dependentes de infecção secundária por bactérias (Fig. 14). Também, demonstramos que ocorre uma considerável migração de células polimorfonucleares para as lesões nos tempos tardios da infecção por *Leishmania amazonensis* (Fig. 15). Conseqüentemente, demonstramos que nesses tempos tardios, outros processos/infecções acontecem no camundongo suscetível. Tais processos, embora interessantes, não fornecem respostas para a principal questão desta tese.

Para a compreensão dos mecanismos microbicidas de macrófagos *in vivo*, deve-se analisar os resultados obtidos com os camundongos resistentes ao longo da infecção e com os suscetíveis nos estágios iniciais da mesma. Esses resultados mostraram claramente que o controle da infecção pelos camundongos resistentes é dependente da ativação de macrófagos da lesão no início do processo, e esse processo não ocorre no caso dos camundongos suscetíveis. A ativação leva à expressão da óxido nítrico sintase induzível, à síntese de óxido nítrico e a uma extensa nitração (Fig. 18) e hidroxilação (Fig. 27B) dos parasitas presentes nos fagolisossomos dos macrófagos. Esses processos atingem níveis máximos na 6ª semana de infecção, quando o número de parasitas nas lesões dos camundongos resistentes é, também, máximo (Fig. 8■). A partir desse ponto, o número de parasitas nas lesões decresce drasticamente, indicando que a nitração e hidroxilação das proteínas dos parasitas estão direta, ou indiretamente, relacionadas à eliminação da maioria deles. Como o peroxinitrito é um intermediário reativo cuja formação depende de óxido nítrico (Fig. 2), é capaz de eliminar parasitas em cultura (Fig. 34) e é um oxidante capaz de nitrar e hidroxilar proteínas (Fig. 25), é razoável supor que ele seja o agente leishmanicida produzido por macrófagos *in vivo*.

A visualização por microscopia confocal da iNOS perto dos limites dos fagolisossomos foi importante para racionalizar a produção e os efeitos do peroxinitrito nas lesões dos camundongos resistentes. Nesse caso, o oxidante e seus radicais derivados podem ser produzidos próximo aos parasitas. De fato, a NADPH oxidase, responsável pela produção do ânion radical superóxido cuja reação com óxido nítrico produz peroxinitrito, é uma proteína ativa na membrana dos fagolisossomos (Babior, 1999). Por sua vez, a produção de peroxinitrito nos fagolisossomos, ambientes de pH baixo (Antoine e cols., 1990), levará à produção de dióxido de nitrogênio e radical hidroxila que poderão hidroxilar e nitrar proteínas de parasitas próximos (Fig. 35). A reação do peroxinitrito com o dióxido de carbono é também possível (Fig. 3), levando principalmente à nitração de proteínas de parasitas próximos (Fig. 35). Como esperado, essas espécies reativas também nitram e hidroxilam proteínas do hospedeiro.

Um importante papel para o peroxinitrito no controle da infecção pelos camundongos resistentes foi também indicado pelos experimentos de tratamento com tempol. O composto diminuiu a nitração das proteínas das lesões (parasita e hospedeiro) (Fig. 31) e, concomitantemente, protegeu parcialmente os parasitas de eliminação (Fig. 32). Recentemente, o grupo demonstrou que o tempol é um eficiente seqüestrador de radicais derivados do peroxinitrito, inibindo suas reações de nitração e aumentando as reações de nitrosação/nitrosilação (Bonini e cols., 2002). Assim, para demonstrar inequivocamente a participação do peroxinitrito na eliminação dos parasitas *in vivo*, teremos que demonstrar um aumento de proteínas nitrosadas nas lesões. Esses experimentos estão planejados. Da mesma forma, apesar da co-localização de proteínas nitradas e hidroxiladas nas lesões (Fig. 27C) nos parecer uma forte indicação do papel do peroxinitrito na eliminação dos parasitas pelo camundongo resistente (Santos e cols., 2000; Santos, 2002), os resultados da hidroxilação precisam ser confirmados. O anticorpo já obtido perdeu sua atividade e novos lotes estão sendo produzidos a partir dos clones congelados.

Em conclusão, nossos estudos comparativos sobre a infecção de camundongos resistentes e suscetíveis por *Leishmania amazonensis* indicam que a ativação de macrófagos e conseqüente produção de peroxinitrito e radicais dele derivados nos tempos iniciais da infecção, pode eliminar a maioria dos parasitas mantendo a infecção sob controle do hospedeiro. Embora os mecanismos microbicidas de células do sistema imune possam variar com as características dos patógenos (Nathan e Shiloh, 2000), nossos resultados indicam que o peroxinitrito e os radicais dele derivados seriam importantes citotoxinas geradas por macrófagos *in vivo*. Acreditamos que esses estudos ampliam a compreensão dos papéis de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio na resposta imune (Nathan e Shiloh, 2000). Também, fortalecem a idéia de que o peroxinitrito pode ser produzido *in vivo*, um fato ainda não demonstrado inequivocamente (Augusto e cols., 2002a).

Figura 35: Representação esquemática das citotoxinas produzidas por macrófagos, relevantes no controle da infecção por *Leishmania*.

6. Referências Bibliográficas

- Andrade Z.A., Reed S.G., Roters S.B., Sadigursky M. (1984). Immunopathology of experimental cutaneous leishmaniasis. *Am. J. Pathol.* **114**: 137-148.
- Antoine J.C., Prina E., Jouanne C., Bongrand P. (1990). Parasitophorous vacuoles of *Leishmania amazonensis*-infected macrophages maintain an acidic pH. *Infect. Immun.* **58**: 779-787.
- Aslund F., Beckwith J. (1990). Bridge over troubled waters: sensing stress by disulfide bond formation. *Cell* **96**: 751-753.
- Augusto O., Bonini M.G., Amanso A.M., Linares E., Santos C.C.X., de Menezes, S.L. (2002a). Nitrogen dioxide and carbonate radical anion: Two emerging radicals in Biology. *Free Radical Biol. Med.* **32**: 841-859.
- Augusto O., Bonini M.G., Fernandes D.C., Linares E., Santos C.X.C. (2002b). Peroxynitrite, carbon dioxide, and free radical production.
<http://www.medicine.uiowa.edu/FRRB/VirtualSchool/Augusto-peroxynitrite.pdf>
- Babior B.M. (1999). NADPH oxidase: an update. *Blood* **93**: 1464-1476.
- Balabanli B., Kamisaki Y., Martin E., Murad F. (1999). Requirements for heme and thiols for the non enzymatic modification of nitrotyrosine. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**: 13136-13141.
- Barbiéri C.L., Giorgio S., Merjan A. J. C. & Figueiredo E. N. (1993). Glycosphingolipid antigens of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* amastigotes identified by use of monoclonal antibody. *Infect. Immun.* **61**: 2131-2137.
- Bastian N.R., Yim C.Y., Hibbs J.B.Jr., Samlowski W.E. (1994). Induction of iron-derived EPR signals in murine cancers by nitric oxide. *J. Biol. Chem.* **269**: 5127-5131.
- Beckman J.S., Beckman T.W., Chen J., Marshall P.M., Freeman, B. (1990). Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**: 1620-1624.
- Beckman J. S., Chen J., Ischiropoulos H., Crow J. P. (1994). Oxidative Chemistry of

Peroxynitrite. *Methods in Enzymology* **233**: 229-240.

Bogdan C., Gessner A., Solbach W., Röllinghoff M. (1996). Invasion, control and persistence of *Leishmania* parasites. *Curr. Opin. Immunol.* **8**: 571-625.

Bonini M.G., Mason R.P., Augusto O. (2002). The mechanism by which 4-hydroxy-2,2,6,6-tetramethylpiperidine-1-oxyl (tempol) diverts peroxynitrite decomposition from nitrating to nitrosating species. *Chem. Res. Toxicol.* **15**: 506-511.

Bradley P.P., Priebat D.A., Christensen R.D., Rothstein G. (1982). Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker. *J. Invest. Dermatol.* **78**: 206-209.

Carroll R.T., Galatsis P., Borosky S., Kopec K.K., Kumar V., Althaus J.S., Hall E.D. (2000). 4-Hydroxy-2,2,6,6-tetramethylpiperidine-1-oxyl (Tempol) inhibits peroxynitrite-mediated phenol nitration. *Chem. Res. Toxicol.* **13**: 294-300.

Chamulitrat W., Jordan S.J., Mason R.P., Litton A.L., Wilson J.G., Wood E.R., Wolberg G., Vedia L.M. (1995). Targets of nitric oxide in a mouse model of liver inflammation by *Corynebacterium parvum*. *Arch. Biochem. Biophys.* **316**: 30-37.

Clark I.A., Rockett K.A. (1996). Nitric oxide and parasitic disease. *Adv. Parasitol.* **37**: 1-56.

Darley-USmar V., Wiseman H., Halliwell B. (1995). Nitric oxide and oxygen radicals: a question of balance. *FEBS Lett.* **369**: 131-135.

Drapier J.C., Pellat C., Henry Y. (1991). Generation of EPR-detectable nitrosyl-iron complexes in tumor target cells co-cultured with activated macrophages. *J. Biol. Chem.* **266**: 10162-10167.

Evans T.G., Thai L., Granger D.L., Hibbs J.B. Jr. (1993). Effect of in vivo inhibition of nitric oxide production in murine leishmaniasis. *J. Immunol.* **151**: 907-915.

Finkel T., Holbrook N.J. (2000). Oxidants, oxidative stress and the biology of aging. *Nature* **408**: 239-247.

Gatti R.M., Augusto O., Kwee J.K., Giorgio S. (1995). Leishmanicidal activity of peroxynitrite. *Redox Report* **1**: 261-265.

Gilbert D.L., Colton C.A. (1999). *Reactive Oxygen Species in Biological Systems*. 1st. ed.,

Kluwer, Academic/Plenum Publishers.

Green S.J., Meltzer M.S., Hibbs J.B. Jr., Nacy C.A. (1990). Activated macrophages destroy intracellular *Leishmania major* amastigotes by an L-arginine-dependent killing mechanism. *J. Immunol.* **144**: 278-283.

Grimaldi G. Jr., Tesh R.B., McMahon-Pratt D. (1989). A review of the geographic distribution and epidemiology of leishmaniasis in the New World. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **41**: 687-725.

Halliwel B. & Gutteridge J.M.C. (1998). *Free Radicals in Biology and Medicine*, 3^a ed.. Oxford University Press Inc., New York.

Henry Y.A., Guissani A., Ducastel B. (1997). *Nitric Oxide Research from Chemistry and Biology: EPR Spectroscopy of Nitrosylated Compounds*. Springer-Verlag, Heidelberg, Germany.

Hodgkinson V. H., Soong L., Duboise S. M., McMahon-Pratt D. (1996). *Leishmania amazonensis*: cultivation and characterization of axenic amastigote-like organisms. *Exp. Parasitol.* **83**: 94-105.

Hurst J.K. (2002). Whence nitrotyrosine? *J. Clin. Invest.* **109**: 1287-1289.

Ignarro L.J. (1990). Biosynthesis and metabolism of endothelium-derived nitric oxide. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **30**: 535-560.

Knowles P.F., Marsh D., Rattle H.W.E. (1976). *Magnetic Resonance of Biomolecules: An Introduction to the Theory and Practice of NMR and ESR in Biological Systems*. John Wiley & Sons, Ltd, New York.

Kosaka H., Sawai Y., Sakaguchi H., Kumura E., Harada N., Watanabe M., Shiga T. (1994). ESR spectral transition by arteriovenous cycle in nitric oxide hemoglobin of cytokine-treated rats. *Am. J. Physiol.* **266**: C1400-1405.

Lancaster J.R., Hibbs J.B. Jr. (1990). EPR demonstration of iron-nitrosyl complex formation by cytotoxic activated macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**: 1223-1227.

Lemesre J.L., Sereno D., Daulouède S., Veyret B., Brajon N., Vincendeau, P. (1997). *Leishmania spp.*: nitric oxide-mediated metabolic inhibition of promastigote and axenically

grown amastigote forms. *Exp. Parasitol.* **86**: 58-68.

Liew F.Y., Millott S., Parkinson C., Palmer R.M., Moncada S. (1990). Macrophage killing of Leishmania parasite in vivo is mediated by nitric oxide from L-arginine. *J. Immunol.* **144**: 4794-4797.

MacMicking J., Xie Q., Nathan C. (1997). Nitric oxide and macrophage function. *Annu. Rev. Immunol.* **15**: 323-350.

Martins A.R., Dias M.M., Vasconcelos T.M., Caldo H., Costa M.C.R., Chimelli L., Larson R.E. (1999). Microwave-stimulated recovery of myosin-V immunoreactivity from formalin-fixed, paraffin-embedded human CNS. *J. Neurosci. Methods* **92**: 25-29.

McCord J.M., Keele B.B. Jr., Fridovich I. (1971). An enzyme-based theory of obligate anaerobiosis: The physiological function of superoxide dismutase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **68**: 1024-1027.

McElrath M.J., Kaplan G., Nusrat A., Cohn Z.A. (1987). Cutaneous leishmaniasis. The defect in T cell influx in BALB/c mice. *J. Exp. Med.* **165**: 546-559.

Moncada S., Palmer R.M., Higgs E.A. (1991). Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol. Rev.* **43**: 109-142.

Mortara R.A., da Silva S., Patricio F.R., Higuchi M.L., Lopes E.R., Gabbai A.A., Carnevale P., Rocha A., Ferreira M.S., Souza M.M., de Franco M.F., Turcato G.Jr., Ferraz Neto B.H. (1999). Imaging *Trypanosoma cruzi* within tissues from chagasic patients using confocal microscopy with monoclonal antibodies. *Parasitol. Res.* **85**: 800-808.

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

Pfeiffer S., Lass A., Schmidt K., Mayer B. (2001a). Protein tyrosine nitration in cytokine-activated murine macrophages. Involvement of a peroxidase/nitrite pathway rather than peroxynitrite. *J. Biol. Chem.* **276**: 34051-34508.

Pfeiffer S., Lass A., Schmidt K., Mayer B. (2001b). Protein tyrosine nitration in mouse peritoneal macrophages activated in vitro and in vivo: evidence against an essential role of peroxynitrite. *FASEB J.* **15**: 2355-2364.

- Radi R., Denicola A., Alvarez B., Ferrer-Sueta G., Rubbo H. (2000). *The biological chemistry of peroxynitrite*. In: Ignarro L.J., ed. Nitric oxide: biology and pathobiology. New York: Academic Press; 57-89.
- Reeves E.P., Lu H., Jacobs H.L., Messina C.G.M., Bolsover, S., Gabella G., Potma E.O., Warley A., Roes J., Segal A.W. (2002). Killing activity of neutrophils is mediated through activation of proteases by K⁺ flux. *Nature* **416**: 291-297.
- Santos C.X., Bonini M.G., Augusto O. (2000). Role of the carbonate radical anion in tyrosine nitration and hydroxylation by peroxynitrite. *Arch. Biochem. Biophys.* **377**: 146-152.
- Santos C.X.C. (2002). Oxidação de urato e tirosina por peroxinitrito. Implicações para o desenvolvimento de sequestradores e biomarcadores de peroxinitrito. Tese de Doutorado, Instituto de Química, USP.
- Sentjurs M., Mason R.P. (1992). Inhibition of radical adduct reduction and reoxidation of the corresponding hydroxylamines in in vivo spin trapping of carbon tetrachloride-derived radicals. *Free Radic. Biol. Med.* **13**:151-60.
- Sies H. (1986). Biology of oxidative stress. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **25**: 1058-1071.
- Solbach W., Laskay T. (2000). The host response to *Leishmania* infection. *Adv. Immunol.* **74**: 275-317.
- Stenger S., Thuring H., Rollinghoff M., Bogdan C. (1994). Tissue expression of inducible nitric oxide synthase is closely associated with resistance to *Leishmania major*. *J. Exp. Med.* **180**: 783-793.
- Taswell C. (1981). Limiting dilution assays for determination of immunocompetent cell frequencies. I. Data analysis. *J. Immunol.* **126**: 1614-1619.
- Titus R. G., Marchand M., Boon T. & Louis J. A. (1985). A limiting dilution assay for quantifying *Leishmania major* in tissues of infected mice. *Parasite Immunol.* **7**: 545-555.
- Wei X.Q., Charles I.G., Smith A., Ure J., Feng G.J., Huang F.P., Xu D., Muller W., Moncada S., Liew F.Y. (1995). Altered immune responses in mice lacking inducible nitric oxide synthase. *Nature* **375**: 408-411.
- Weissbach H., Etienne F., Hoshi T., Heinemann S. H., Lowther W.T., Matthews B., St. John G.,

Nathan C., Brot N. (2002). Peptide methionine sulfoxide reductase: structure, mechanism of action, and biological function. *Arch. Biochem. Biophys.* **397**: 172-178.

Woo H.A., Chae H.Z., Hwang S.C., Yang K-S., Kang S.W., Rhee S.G. (2003). Reversing the inactivation of peroxiredoxins caused by cysteine sulfinic acid formation. *Science* **300**: 653-656.

Wood Z.A., Poole L.B., Karplus P.A. (2003). Peroxiredoxin evolution and the regulation of hydrogen peroxide signaling. *Science* **300**: 650-653.

Woolum J.C., Tiezzi E., Commoner B. (1968). Electron spin resonance of iron-nitric oxide complexes with amino acids, peptides and proteins. *Biochim. Biophys. Acta* **160**: 311-320.

Curriculum Vitae

Edlaine Linares

- Data de nascimento: 30/10/1967
- Local de nascimento: São Caetano do Sul – SP

Formação

- Primeiro Grau: E.E.P.S.G. “Coronel Bonifácio de Carvalho”, São Caetano do Sul-SP, 1981.
- Técnico em Contabilidade: C.I.M. “Profa. Alcina Dantas Feijão”, São Caetano do Sul-SP, 1984.
- Farmácia e Bioquímica – Análises Clínicas e Toxicológicas. Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, São Paulo-SP, 1994.

Ocupação

- Técnica de Nível Superior no Departamento de Bioquímica do Instituto de Química da Universidade de São Paulo, desde 1994.

Publicações

- Linares E., Nakao L.S., Augusto O., Kadiiska M. B. (2003). EPR studies of in vivo radical production by lipopolysaccharide. Potential role of iron mobilized from iron-nitrosyl complexes. *Free Radical Biol. Med.* **34**: 766-773.
- Aliaga C., Lissi E.A., Augusto O., Linares E. (2003). Kinetics and mechanism of the reaction of a nitroxide radical (tempol) with a phenolic antioxidant. *Free Radic. Res.* **37**: 225-230.
- Augusto, O., Menezes S. L., Linares E., Romero N., Radi R., Denicola A. (2002). EPR detection of glutathyl and hemoglobin-cysteinyl radicals during the interaction of peroxynitrite with human erythrocytes. *Biochemistry* **41**:14323-14328.
- Augusto, O., Bonini M. G., Amanso A. M., Linares E., Santos C. X. C., and Menezes S. L. (2002). Nitrogen dioxide and carbonate radical anion: Two emerging radicals in biology. *Free Radical Biol. Med.* **32**: 841-859.
- Augusto O., Bonini M.G., Fernandes D.C., Linares E., Santos C.X.C. (2002). Peroxynitrite, carbon dioxide, and free radical production.

<http://www.medicine.uiowa.edu/FRRB/VirtualSchool/Augusto-peroxynitrite.pdf>

- Linares E., Giorgio S., Mortara R. A., Santos C. X. C., Yamada A., Augusto O. (2001). Role of peroxynitrite in macrophage microbicidal mechanisms in vivo revealed by parallel protein nitration and hydroxylation. *Free Radical Biol. Med.* **30**: 1234-1242.
- Linares E., Augusto O., Barão S. C., Giorgio S. (2000). *Leishmania amazonensis* infection does not inhibit systemic nitric oxide levels elicited by lipopolysaccharide *in vivo*. *J. Parasitol.* **86**: 78-82.
- Giorgio S., Linares E., Ischiropoulos H., Zuben F. J. V., Yamada A., Augusto O. (1998). *In vivo* formation of electron paramagnetic resonance-detectable nitric oxide and of nitrotyrosine is not impaired during murine leishmaniasis. *Infect. Immun.* **66**: 807-814.
- Giorgio S., Linares E., Capurro M. L., Bianchi A. G., Augusto O. (1996). Formation of nitrosyl hemoglobin and nitrotyrosine during murine leishmaniasis. *Photochem. Photobiol.* **63**: 750-754.
- Augusto, O., Linares E., Giorgio S. (1996). Possible roles of nitric oxide and peroxynitrite in murine leishmaniasis. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **29**: 853-862.

Prêmios

- Young Investigator Award concedido pela comissão organizadora do 7th International Symposium on Spin Trapping, Chapel Hill, NC, USA.
Linares E., Nakao L. S., Augusto O., Kadiiska M. B. (2002). EPR studies of in vivo radical production by lipopolysaccharide. Potential role of iron mobilized from iron-nitrosyl complexes.
- Poster premiado no Sixth International Symposium on Orthomolecular Medicine, São Paulo - SP.
Linares, E., Giorgio S., Ischiropoulos H., Augusto O. (1997). Nitrosyl hemoglobin and nitrotyrosine are produced during murine leishmaniasis in both susceptible and resistant mice.