

Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG  
Instituto de Ciências Biológicas – ICB  
Programa de Pós-Graduação em Parasitologia

**Estudo comparativo da arginase em *Leishmania (Leishmania)*  
*amazonensis*, *L. (Viannia) braziliensis* e *L. (L.) infantum***

Bárbara Beiral Esteves Santana

Belo Horizonte

2019

Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG  
Instituto de Ciências Biológicas – ICB  
Programa de Pós-Graduação em Parasitologia

**Estudo comparativo da arginase em *Leishmania (Leishmania)*  
*amazonensis*, *L. (Viannia) braziliensis* e *L. (L.) infantum***

Dissertação de mestrado apresentada ao programa de Pós-Graduação em Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito para obtenção do título de Mestre em Parasitologia.

Área de concentração: Protozoologia.

Orientadora: Prof. Dra. Héliida Monteiro de Andrade

Co-orientadora: Dra. Simone da Fonseca Pires

Belo Horizonte

2019

Dedico este trabalho aos meus pais, Ernane e Ceni e ao meu marido, Luan.

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes”. (Marthin Luther King)

## **Agradecimentos**

Antes de tudo agradeço a Deus. Pelo despertar de todas as manhãs, pela certeza de que está comigo em todos os momentos, pela paz verdadeira que me sustentou nas dificuldades, a Ele o reconhecimento maior!

Ao Luan, meu marido, companheiro de todas as horas, amor e amigo, pela paciência, pelo incentivo e compreensão. Suas palavras e sua companhia fazem os meus dias mais leves.

Aos meus pais, Ernane e Ceni, pelas orações a Deus em meu favor, por me ensinarem a ter coragem, a nunca desistir do que almejo e também por todo apoio e incentivo diário. Eu não conseguiria chegar até aqui sem vocês.

À minha irmã Sarah por estar sempre ao meu lado e sempre acreditar que sou capaz.

Aos meus queridos avós, tios e tias por serem meu ponto de apoio, por toda alegria que me proporcionam quando estamos juntos e por tanto carinho demonstrado quando estamos distantes.

À querida professora Héliida por abrir as portas do laboratório e também do seu coração a mim. Pelas longas conversas esclarecedoras, pelos ensinamentos não somente científicos como também sobre a vida. Sua vida me inspira. Obrigada por tudo!

À querida Simone pela co-orientação. Sua paciência, ajuda e conselhos assertivos nos momentos de dúvidas foram indispensáveis. Muito obrigada!

Aos meus colegas da turma de mestrado, em especial à Andreza, Flaviane, Isabela, Ludmila e Olívia! A amizade de vocês fez grande diferença em minha jornada.

Aos amigos que se fazem presentes no dia a dia, vocês me ajudam a crescer um pouco a cada dia.

A todos do laboratório de Leishmanioses que tanto contribuíram para o meu crescimento: Ivana, Jordanna, Ramon, Júnior, Angélica, Thaísa, Andreza, Flávia, Valéria, Heloíne, Elaine, Adriana, João Carlos.

Aos amigos do René Rachou que tanto me ajudaram no início da minha caminhada científica: Lu, New, Nath, Iago e Aline. Serei sempre grata a vocês.

Ao meu querido amigo Peter que por vezes atendeu as minhas dúvidas das mais simples as mais complexas.

À família Link, meus amigos de todas as horas.

Aos Drs. Leda Quercia Vieira, Lucile Maria Floeter-Winter e Rodrigo, P. Soares, por nos atenderem quando necessitamos.

Aos membros da banca pela disponibilidade em avaliarem o meu trabalho.

Ao programa de Pós-graduação.

Aos professores do Programa de Pós graduação em Parasitologia pelos ensinamentos.

Às secretárias Sumara e Sibebe, pela disposição em nos ajudar em tudo.

Aos colegas e funcionários do Departamento.

Às agências CAPES, CNPq e FAPEMIG pelo apoio financeiro.

## Resumo

No Brasil a leishmaniose tegumentar (LT) e a leishmaniose visceral (LV) são endêmicas e amplamente distribuídas, sendo a LT frequentemente associada com as espécies *Leishmania (Leishmania) amazonensis* e *L. (Viannia) braziliensis*, enquanto a forma visceral é causada por *L. (L.) infantum*. As formas clínicas são determinadas por fatores do parasito e do hospedeiro, dentre estes se destaca a resposta imune. A arginase e a óxido nítrico sintase induzível (iNOS) são enzimas que compartilham do mesmo substrato, a L-arginina, para produzir dentre outros compostos L-ornitina e óxido nítrico (NO), respectivamente. Além da sua função na formação de substratos importantes para a proliferação de células parasitárias e hospedeiras, a arginase se destaca por desempenhar um papel regulatório na disponibilidade de L-arginina nas células que a expressam, podendo contribuir para o estabelecimento da infecção por *Leishmania* spp. Nesse sentido, foi nosso objetivo avaliar a abundância e os níveis de atividade da arginase em *L. amazonensis*, *L. braziliensis*, *L. infantum*, e também em macrófagos infectados por estes parasitos, além de associar com a carga parasitária. Inicialmente, a abundância e a atividade da arginase foi determinada em cada espécie nas formas promastigotas. Foi observado que *L. amazonensis* apresentou 2,6 vezes maior abundância de arginase quando comparada às espécies *L. braziliensis* e *L. infantum*. Além disso, os níveis de atividade da arginase também foram maiores em promastigotas procíclicas e metacíclicas de *L. amazonensis* quando comparadas com *L. braziliensis* e *L. infantum*. Em seguida, mensuramos a atividade de arginase, produção de NO e carga parasitária em macrófagos infectados pelas espécies estudadas. Não foi observada diferença significativa entre os níveis de atividade enzimática da arginase, de produção de NO ou no índice de infecção entre macrófagos infectados pelas três espécies estudadas. Nossos dados demonstram que maior abundância e atividade de arginase em promastigotas de *L. amazonensis* não influencia na infecção de macrófagos “*in vitro*”.

## Abstract

In Brazil, tegumentary leishmaniasis (LT) and visceral leishmaniasis (LV) are endemic and widely distributed, and LT is frequently associated with the species *Leishmania (Leishmania) amazonensis* and *L. (Viannia) braziliensis*, whereas the visceral form is caused by *L. (L.) Infantum*. Clinical forms are determined by parasite and host factors, among which the immune response is highlighted. Arginase and inducible nitric oxide synthase (iNOS) are enzymes that share the same substrate, L-arginine, to produce among other compounds L-ornithine and nitric oxide (NO), respectively. In addition to its role in the formation of important substrates for the proliferation of parasite and host cells, arginase plays a key role in the availability of L-arginine in the cells expressing it, and may contribute to the establishment of *Leishmania* spp. In this sense, it was our objective to evaluate the abundance and levels of arginase activity in *L. amazonensis*, *L. braziliensis*, *L. infantum*, and also in macrophages infected by these parasites, in addition to correlating with the parasite load. Initially, abundance and arginase activity was determined in each species in promastigote forms. It was observed that *L. amazonensis* presented 2.6 times greater abundance of arginase when compared to *L. braziliensis* and *L. infantum* species. Furthermore, arginase activity levels were also higher in procyclic and metacyclic promastigotes of *L. amazonensis* when compared to *L. braziliensis* and *L. infantum*. Next, we measured arginase activity, NO production and parasite load between macrophages infected by the species studied. No significant difference was observed between levels of enzymatic activity of arginase, NO production or infection rate among macrophages infected by the three species studied. Our data demonstrate that increased abundance and arginase activity in *L. amazonensis* promastigotes does not influence *in vitro* macrophage infection.

## Lista de tabelas e figuras

Tabela 1: Alinhamento de sequências de Arginase de *Leishmania spp.* retiradas do GenBank em nível de DNA e peptídeos.

Figura 1: Esquema de metabolização da L-arginina pelas vias enzimáticas de arginase e iNOS.

Figura 2: Curvas de crescimento para *L. amazonensis*, *L. braziliensis* e *L. infantum*.

Figura 3: Abundância proteica da arginase em promastigotas.

Figura 4: Atividade da arginase em promastigotas.

Figura 5: Análise de carga parasitária em macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c.

Figura 6: Abundância proteica da arginase em macrófagos infectados.

Figura 7: Atividade da arginase em macrófagos peritoneais de camundongos infectados.

Figura 8: Atividade da arginase em macrófagos peritoneais de camundongos infectados com estímulo de IL-4.

Figura 9: Atividade da arginase e produção de NO em macrófagos peritoneais de camundongos infectados com estímulo de IFN- $\gamma$

### Lista de abreviaturas e siglas

ARG	Arginase
CHAPS	Dimethyl[3-( propyl]. azaniumyl}propane-1-sulfonate
DDT	Ditiotreitol
ECL	Enhaced chemiluminescence
INF- $\gamma$	Interferon gama
iNOS	Óxido Nítrico Sintase induzível
ISPF	Isonitrosopropiofenone
LD	Leishmaniose difusa
LIT	Liver infusion tryptose
LC	Leishmaniose cutânea
LMC	Leishmaniose mucocutânea
LPG	Lipofosfoglicano
LPS	Lipopolissacarídeo
LT	Leishmaniose tegumentar
LV	Leishmaniose visceral
NADPH	Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato
NCBI	National Center of Biotechnology Information
NO	Óxido Nítrico
OMS	Organização Mundial da Saúde
PBS	Tampão fosfato-salino
RPMI	Roswell Park Memorial Institute medium
SFB	Soro fetal bovino
SMF	Sistema mononuclear fagocitário
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
T.A.	Temperatura ambiente
Th1	Célula T auxiliar tipo 1
Th2	Célula T auxiliar tipo 2
TRIS	Trisaminometano

## Lista de símbolos de unidades de medida

°C	Graus Celsius
g	gramas
kb	kilobases
kDa	kilodaltons
M	molar
mA	miliamperagem
Min	minutos
Ng	nanogramas
nm	nanômetro
Pb	pares de bases
Rpm	rotações por minuto
V	Volts
μmol	Micromol

## Sumário

1. Introdução .....	13
1.1 <i>Leishmania</i> e Leishmanioses .....	13
1.2 Macrófagos, arginase e iNOS na leishmaniose .....	15
2. Justificativa .....	20
3. Objetivos .....	22
3.1 Objetivo geral .....	22
3.2 Objetivos específicos .....	22
4. Metodologia .....	23
4.1 Alinhamento de nucleotídeos e sequências de aminoácidos que codificam para a arginase em <i>Leishmania</i> spp. ....	23
4.2 Parasitos .....	23
4.3 Infecção de Macrófagos .....	24
4.4 Avaliação da abundância da arginase .....	25
4.4.1 Preparação de extrato proteico .....	25
4.4.2 Western Blotting .....	26
4.5 Atividade da arginase .....	26
4.6 Análise de carga parasitária por contagem de amastigotas .....	27
4.7 Dosagem de óxido nítrico .....	28
4.8 Análise estatística .....	28
5. Resultados .....	29
5.1 Análise das sequências de DNA e aminoácidos que codificam para a arginase .....	29
5.2 Curvas de crescimento .....	30
5.3 Arginase em promastigotas de <i>L. amazonensis</i> , <i>L. braziliensis</i> e <i>L. infantum</i> .....	31
5.3.1 Abundância proteica .....	31
5.3.2 Atividade de arginase em promastigotas .....	33
5.4 Macrófagos infectados com <i>L. amazonensis</i> , <i>L. braziliensis</i> e <i>L. infantum</i> .....	34
5.4.1 Determinação da carga parasitária .....	34
5.4.2 Abundância e atividade da arginase e produção de óxido nítrico .....	35
6. Discussão .....	41
7. Conclusões .....	47
8. Referências .....	48

## 1. Introdução

### 1.1 *Leishmania* e Leishmanioses

As leishmanioses compreendem um grupo de doenças causadas por protozoários do gênero *Leishmania* (kinetoplastidae: Trypanosomatidae) (Ross, 1903) e são consideradas pela organização mundial da saúde (OMS) uma das doenças negligenciadas mais importantes do mundo. São amplamente distribuídas em países tropicais e subtropicais em ciclos zoonóticos e antroponóticos. No Brasil, devido sua ampla distribuição geográfica e a gravidade das formas clínicas, a relevância das leishmanioses se destaca no âmbito da economia bem como nos contextos sanitário e social.

Este parasito é transmitido para seus hospedeiros vertebrados através da picada das fêmeas dos flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) dos gêneros *Phlebotomus* (no Velho Mundo) e *Lutzomyia* (no Novo Mundo) (Young & Duncan, 1994). Sendo um organismo digenético, o protozoário dispõe de uma forma flagelada chamada promastigota encontrada no inseto vetor e a forma arredondada e intracelular chamada amastigota que é encontrada nos hospedeiros vertebrados (Lainson & Shaw 1987; Grimaldi & Tesh, 1993;) que podem ser canídeos, roedores, edentados, marsupiais, procionídeos, ungulados primitivos e primatas incluindo o homem.

O ciclo de transmissão ocorre quando as fêmeas de flebotomíneo ao realizar o repasto sanguíneo em um animal infectado ingere formas amastigotas internalizadas por células do sistema mononuclear fagocitário (SMF) presentes na massa formada pela sua picada telmofágica. No trato intestinal do inseto, as amastigotas envoltas pela matriz peritrófica se diferenciam em promastigotas que se ancoram via flagelo às microvilosidades do epitélio intestinal evitando a expulsão durante a liberação do bolo fecal. As promastigotas pró-cíclicas se convertem em promastigotas metacíclicas, a forma infectante, por um processo denominado metaciclogênese. Nesse processo a *Leishmania* passa por vários estágios não infecciosos sendo: promastigotas pró-cíclicas, nectomonas, leptomonas, haptomonas e, quando ocorrer uma alimentação sanguínea não infectante, as promastigotas metacíclicas podem se desdiferenciar gerando as formas retrolepdomonadas

(Serafim *et al.*, 2018). Coletivamente, essas formas bloqueiam o intestino anterior do vetor modificando o seu comportamento alimentar. As promastigotas secretam o PSG (gel secretado por promastigotas), que faz com que o flebotomíneo regurgite os parasitos nos hospedeiros vertebrados durante a alimentação sanguínea (Bates, 2007). Nestes hospedeiros, as formas móveis são fagocitadas pelas células do SMF e internalizadas em vacúolos parasitóforos que tem por objetivo a destruição do parasito. Entretanto, mecanismos capazes de superar a ação microbicida destas células favorecem a instalação da *Leishmania* no organismo do vertebrado e ela se diferencia na forma amastigota.

Uma vez que o parasito atingiu o hospedeiro vertebrado, este poderá desencadear diversas manifestações clínicas que vão desde as lesões na pele típicas da Leishmaniose tegumentar (LT) até levar a óbito como é o caso de Leishmaniose Visceral (LV), o que atribui as leishmanioses um grande problema de saúde pública. As formas clínicas dependem de diversos fatores que envolvem tanto a espécie do parasito quanto a resposta imune do hospedeiro. Dentre eles podemos ressaltar a virulência e a infectividade do parasito bem como a resposta imune e susceptibilidade do hospedeiro (Andrade-Narváez, et al, 2001).

No que diz respeito às espécies do parasito, é sabido que mais de 20 delas são transmitidas ao homem. Estas se diferenciam entre si por diversos aspectos como o potencial de crescimento em meios de cultura, virulência e local de desenvolvimento no hospedeiro invertebrado, o que levou a subdivisão de subgêneros. No subgênero *Leishmania* (*Leishmania*) os parasitos possuem considerável potencial de crescimento em meio de cultivo, são mais virulentos em infecção experimental em animais de laboratório e se desenvolvem no intestino médio e anterior do inseto (desenvolvimento Suprapilaria). Em contrapartida no subgênero *Leishmania* (*Viannia*) os parasitos possuem baixa virulência, menor crescimento em meios de cultivo e seu desenvolvimento ocorre no intestino posterior do vetor (desenvolvimento peripilaria) (Lainson e Shaw 1987). Recentemente, foi proposto um novo subgênero, *Leishmania* (*Mundinia*), que abriga espécies previamente classificadas no “complexo de *L. enriettii*”. Assim como nos primeiros subgêneros, *Leishmania* *Mundinia*

inclui espécies causadoras da LV e da LT em humanos e outros vertebrados (Espinosa *et al.*, 2016).

A *L. amazonensis* e *L. braziliensis* são consideradas duas das espécies causadoras da LT de maior importância no Brasil. Esta enfermidade faz referência às afecções que acometem pele e mucosas e é primariamente considerada uma doença zoonótica, afetando animais silvestres podendo atingir o ser humano de forma secundária ou acidental. Dentre as diversas subdivisões desta forma clínica as mais comuns são as formas Cutânea (Leishmaniose cutânea - LC) caracterizada por lesão iniciada no ponto da picada do inseto vetor e a forma mucosa (Leishmaniose mucocutânea - LMC) que pode surgir secundariamente à lesão cutânea quando esta ainda esteja em atividade, ou anos após sua cicatrização, principalmente quando causada por *L. braziliensis*. Existe ainda uma forma de LT chamada de difusa (LD), nesta o paciente não apresenta úlceras e sim nódulos ricos em parasitos. Esta forma é associada a *L. amazonensis* e pacientes anérgicos aos seus antígenos (Gontijo & Carvalho, 2003, Silveira *et al.*, 2004).

A infecção pela *L. infantum* provoca a Leishmaniose visceral (LV), que é a forma mais grave da doença em humanos. Esta é uma doença sistêmica que tem como sintomas: febre, perda de peso, esplenomegalia e hepatomegalia, linfadenopatia, hiperglobulinemia dentre outros. É uma doença de notificação compulsória e de grave evolução, devendo ser diagnosticada precocemente. (Ministério da Saúde, 2006). A ausência de tratamento adequado da doença pode levar a morte, podendo a letalidade alcançar o índice de 10%, nos locais em que esse quadro se instaurar (Gontijo & Melo, 2004). Apesar do grande número de casos humanos, os casos caninos têm sido mais recorrentes. Além do mais, o cão (*Canis familiaris*) desempenha grande importância na epidemiologia da LV em áreas endêmicas, por ser o único reservatório doméstico da doença.

## **1.2 Macrófagos, arginase e iNOS na leishmaniose**

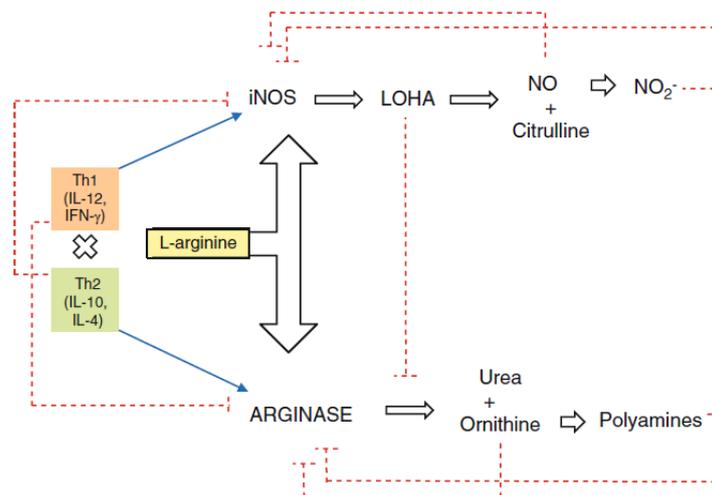
Como já mencionado, a resposta imune do hospedeiro além de outros fatores se relaciona diretamente com a manifestação clínica da doença. Uma

das primeiras e mais frequentes células do sistema imune em resposta a infecção por *Leishmania* são macrófagos. Estes por sua vez, são as principais células constituintes do SMF, e possuem diversas estratégias para combater seus invasores. Uma delas é o “burst” oxidativo que é induzido ao fagocitar os microrganismos. Isto acontece pelo fato da NADPH ser fosforilada formando diversas moléculas oxidativas como peróxidos de hidrogênio e superóxidos que interagem com a membrana dos patógenos (Cunningham 2002). Outro mecanismo utilizado pelos macrófagos é a ativação da enzima iNOS (Óxido Nítrico Sintase induzível). Esta enzima oxida a L-arginina para a produção de citrulina e NO (Óxido Nítrico), sendo este último uma molécula altamente reativa e efetora no combate de microrganismos invasores (Qadoumi, Becker *et al.* 2002). Assim, os parasitos do gênero *Leishmania* ao habitar os fagolisossomos, resistem às enzimas do lisossomo e ao pH ácido da célula por diversos mecanismos de escape, além de escapar da resposta humoral.

As promastigotas metacíclicas de *Leishmania* spp se desenvolvem dentro do inseto vetor a partir de promastigotas pró-cíclicas, que são transformadas em amastigotas ao serem fagocitadas pelos macrófagos dos vertebrados. A metaciclogênese também pode ocorrer em culturas axênicas de parasitos da fase logarítmica à estacionária de crescimento (SACKS, 1989). A metaciclogênese é acompanhada por alterações na morfologia, incluindo tamanho, forma e comprimento do flagelo, assim como modificações qualitativas e quantitativas na expressão de moléculas de superfície, como LPG e proteínas (Silva Jr. *et al.*, 2015). É sabido que, em primeiro lugar, as formas metacíclicas do parasito são resistentes a lise mediada pelo sistema do complemento, principalmente pela presença de longas moléculas de lipofosfoglicano (LPG) em sua superfície (Sacks, Pimenta *et al.*, 1995). Esta molécula também é relevante para os parasitos internalizados resistirem às enzimas lisossomais (Descoteaux & Turco 1999). Outro importante fator que ajuda no escape, é que estes parasitos possuem mecanismos para a diminuição da atividade da enzima iNOS diminuindo assim a produção de NO, e a arginase se mostra uma enzima importante neste processo.

Posto isto, vemos que ao atingir o organismo do hospedeiro vertebrado, o destino da infecção por *Leishmania* tem se mostrado dependente de um

desequilíbrio entre a resposta Th1 e Th2. Na resposta Th1, macrófagos são ativados pela via clássica e induzem a síntese da enzima iNOS que utiliza L-arginina para a produção de NO impedindo a sobrevivência do parasito. Sabe-se também que na resposta Th1 o IFN- $\gamma$  é produzido e atua induzindo a expressão de iNOS, enquanto que na resposta Th2, as citocinas IL-4 e IL-10 são produzidas a fim de induzir a expressão de arginase (Corraliza *et al.*, 1995). A síntese de poliaminas induzidas nesse processo favorece a replicação dos parasitos no macrófago e diminui a quantidade de arginina disponível para a síntese de NO, situação em que a infecção é estabelecida (Iniesta Carcelen *et al.*, 2005) (Figura 1).



**Figura 1:** Regulação cruzada das respostas imunes Th1 e Th2 e a indução de iNOS e arginase. A ativação clássica de macrófagos com citocinas Th1 (IL-12 e INF $\gamma$ ) induz o metabolismo por L-arginina por iNOS. Por outro lado, a ativação de macrófagos com citocinas Th2 (IL-10 e IL-4) induzem o metabolismo por arginase. Os produtos da arginase e iNOS regulam reciprocamente a atividade de cada enzima. Rotas estimulantes são representadas por setas contínuas em azul e rotas inibitórias por setas tracejadas em vermelho. LOHA, N  $\omega$ -hidroxi-L-arginina (Fonte: da Silva & Floeter-Winter, 2014).

A L-arginina é um dos aminoácidos mais versáteis metabolicamente, sendo utilizada como um precursor tanto para síntese de proteínas, como também para a síntese de NO, uréia, ornitina, citrulina, creatinina, agmatina, glutamato, prolina e poliaminas (Wu & Morris, 1998).

A arginina foi descrita pela primeira vez em 1886 a partir de sementes de lupulus e cerca de 10 anos mais tarde foi detectada sendo componente de proteínas. Kossel e Darkin em 1904 constataram a enzima que hidrolisa

arginina, a arginase, que produz ornitina e ureia no fígado. Entretanto, apenas em 1932 ao descobrirem o ciclo da ureia que relevantes papéis metabólicos da arginina foram elucidados (da Silva & Floeter-Winter, 2014).

A arginase é uma metaloenzima trimérica que necessita para sua atividade completa, de dois átomos de manganês por subunidade (Di Costanzo *et al.*, 2005; da Silva *et al.*, 2008). Sua importância consiste na capacidade de regular a disponibilidade de arginina nas células que a expressam modulando a produção de ornitina, e conseqüentemente a síntese de poliaminas, que são moléculas essenciais para replicação celular (Wu & Morris, 1998, Muxel *et al.*, 2017).

Os mamíferos possuem duas isoformas da enzima que são denominadas arginase tipo I e arginase tipo II. Elas são semelhantes em suas propriedades enzimáticas, mas se diferem por sua localização celular, distribuição tecidual, padrões de expressão e reatividades imunológicas. A arginase I se localiza no citosol e é bastante expressa nos hepatócitos enquanto que a arginase II é mitocondrial e é expressa nas células do cérebro, rins, glândulas mamárias, intestinos e macrófagos. Já algumas células como os macrófagos murinos expressam ambas as isoformas (Muxel *et al.*, 2018).

A arginase é expressa em uma única forma em determinados tripanosomatídeos, incluindo *Leishmania* spp, *Leptomonas* spp. e *Crithidia* spp, mas curiosamente não é expressa em *Trypanosoma* spp (da Silva *et al.*, 2014, Camargo *et al.*, 1978) sendo que os gêneros de tripanossomatídeos que expressam arginase formam um grupo monofilético (Briones *et al.*, 1992).

Além de ser um substrato para a formação de ureia e poliaminas, em 1987 foi descoberto que a arginina também é precursora na síntese de nitrito, nitrato e Óxido Nítrico (NO) em mamíferos (Hibbs, Taintor *et al.*, 1987). Atualmente se sabe que NO desempenha diversos papéis em processos como a resposta imune (Bredt & Snyder 1994; Moncada & Higgs 1995).

Apesar de três isoenzimas de óxido nítrico sintase (NOS) terem sido descritas (nNOS tipo I, NOS induzíveis ou iNOS, tipo II e NOS endoteliais ou eNOS, tipo III), em macrófagos a iNOS é altamente induzível por citocinas inflamatórias (Muxel *et al.*, 2018), e o NO é indicado como uma das principais moléculas microbicidas produzida pelos macrófagos contra parasitas como *Leishmania* (Boucher, Moali *et al.*, 1999).

Para entender melhor o papel da arginase em *Leishmania* estudos recentes têm sido realizados com *Leishmania* spp deficientes em arginase. Como resultado desses trabalhos foi observado que em *L. amazonensis* (da Silva *et al.*, 2012 ; Muxel *et al.*, 2017) e *L. mexicana* (Gaur *et al.*, 2007) a ausência de atividade de arginase reduz a infectividade via superprodução de NO por macrófagos hospedeiros. Estes estudos têm afirmado a relevante função da arginase na regulação da atividade de iNOS de macrófagos modulando a concentração de L-arginina.

Outros estudos mostraram ainda que as variadas espécies de *Leishmania* expressam a arginase de maneira distinta se comparadas umas às outras. Badirzadeh, *et al.* (2017) mostraram que a expressão gênica e a atividade da enzima é maior em *L. major* e *L. tropica* quando comparada a espécie não patogênica *L. tarentolae* sugerindo que a arginase pode estar relacionada a patogenicidade da espécie. Nosso grupo de pesquisa, ao comparar o perfil proteômico entre as espécies *L. amazonensis*, *L. braziliensis* e *L. infantum*, mostrou que a enzima arginase é mais abundante em *L. amazonensis* quando comparada às outras duas espécies (Lima 2017).

Tendo em vista os achados descritos por Lima (2017), somados ao papel da arginase na produção de poliaminas e ainda os trabalhos que relatam uma multiplicação elevada dos parasitos em macrófagos infectados por *L. (L) amazonensis* (Mukbel *et al.*, 2007), acreditamos que o estudo e a comparação da arginase nas espécies de *Leishmania* de maior ocorrência no Brasil se fazem profundamente relevantes para contribuir com dados sobre a biologia dessas espécies.

## 2. Justificativa

Segundo a OMS, o Brasil está entre os 7 países com maior número de casos de LV e dentre os 9 países com grande número de casos de LT, sendo a única nação que apresenta uma alta incidência de ambas as formas clínicas. (WHO, 2017). Além disso, nos últimos anos houve um significativo aumento do número de casos de leishmaniose, bem como expansão da área geográfica em todo o mundo. Isto confere a doença um grande problema de saúde pública em vários países onde incide.

O gênero *Leishmania* compreende cerca de 20 espécies capazes de infectar o homem provocando uma grande diversidade clínica da enfermidade. Dentre elas, no Brasil destacamos *L. amazonensis* e *L. braziliensis*, que além de amplamente distribuídas, são consideradas as principais causadoras da leishmaniose tegumentar (LT) (Ministério da Saúde 2007), e a *L. (Leishmania) infantum* que é o agente etiológico da leishmaniose visceral (LV) (Ministério da Saúde 2006). Devido a ampla distribuição destes parasitos no país, torna-se importante o desenvolvimento de pesquisas que contribuam com o entendimento da sua biologia e interação com seus hospedeiros, aspectos fundamentais para a criação de novas estratégias de controle da doença, terapêutica e até mesmo vacinação.

Muitas das diferenças entre as espécies de *Leishmania* como a virulência, susceptibilidade, bem como a determinação das formas clínicas podem estar associadas às proteínas, como já demonstrado em diversos trabalhos (Pires *et al.*, 2014; Matlashewski *et al.*, 2001, Yao *et al.*, 2007). Dentre essas proteínas, foi demonstrado que a arginase é uma enzima vital aos parasitos, além de contribuir para o estabelecimento da infecção nos hospedeiros vertebrados e invertebrados, uma vez que esta proteína está envolvida na via alternativa de ativação de macrófagos e na replicação do parasito no inseto e no mamífero (Das *et al.*, 2010; da Silva & Floeter-Winter, 2014).

Recentemente, nosso grupo identificou proteínas que se apresentavam diferencialmente abundantes entre as espécies mais frequentes no Brasil (*L. amazonensis*, *L. braziliensis* e *L. infantum*), e a arginase foi umas das proteínas que apresentou aumento de abundância apenas em *L. (L.) amazonensis* em

relação as outras duas espécies. Foi discutido então que arginase é uma proteína que está envolvida na regulação da resposta oxidativa de macrófagos, através da competição com iNOS, pela arginina. Essa competição pode favorecer o sucesso da infecção e elucidar a multiplicação elevada dos parasitos em macrófagos infectados por *L. amazonensis* (Mukbel *et al.*, 2007; Castilho-Martins *et al.*, 2015).

Dessa forma, acreditamos que o estudo da abundância da arginase bem como da sua atividade em diferentes espécies de *Leishmania* pode fornecer novas perspectivas e direcionar para uma melhor compreensão das interações entre o hospedeiro e o parasito.

### 3. Objetivos

#### 3.1 Objetivo geral

Avaliar a abundância e a atividade da arginase em promastigotas de *L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) infantum* e em macrófagos infectados por estas espécies.

#### 3.2 Objetivos específicos

- Comparar as sequências de nucleotídeos e aminoácidos da arginase das espécies: *L. amazonensis*, *L. braziliensis* e *L. infantum*;
- Determinar a abundância e atividade da arginase em formas promastigotas de *L. amazonensis*, *L. braziliensis* e *L. infantum*;
- Comparar a carga parasitária de macrófagos infectados por *L. amazonensis*, *L. braziliensis* e *L. infantum*;
- Determinar a abundância e atividade da arginase em macrófagos infectados por *L. amazonensis*, *L. braziliensis* e *L. infantum*;
- Averiguar a produção de óxido nítrico em macrófagos infectados por *L. amazonensis*, *L. braziliensis* e *L. infantum*.

## 4. Metodologia

### 4.1 Alinhamento de nucleotídeos e sequências de aminoácidos que codificam para a arginase em *Leishmania* spp.

As sequências de nucleotídeos e de aminoácidos da arginase de *L. amazonensis*, *L. braziliensis* e *L. infantum* depositadas no banco de dados GenBank, foram alinhadas usando a ferramenta BLAST da mesma plataforma (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>). O número de aminoácidos, de nucleotídeos bem como a porcentagem de semelhança estrutural entre cada espécie foi obtido e os dados apresentados em forma de tabela.

### 4.2 Parasitos

Foram utilizadas cepas de referência da organização mundial da saúde de três espécies de *Leishmania*: IFLA/BR/1967/**PH8** de *L. amazonensis*, MHOM/BR/1975/**M2903** de *L. braziliensis* e MCAN/BR/2000/**BH400** de *L. infantum*. Inicialmente, formas promastigotas das três espécies de *Leishmania* foram isoladas de tecidos de animais experimentalmente infectados, mantidas em meio de cultura LIT (*Liver Infusion Triptose*) suplementado com 10% de SFB (soro fetal bovino), 100 U/mL de penicilina e 100 mg/mL de estreptomicina, em estufa BOD a 26°C, procedendo-se repiques semanais até o 6<sup>o</sup> repique, quando foram criopreservadas.

Para este trabalho, as amostras foram retiradas da criopreservação, e cultivadas em meio LIT suplementado conforme já descrito. O volume de cada cepa foi expandido por meio de repiques semanais realizados em iguais condições para todas as cepas, garantindo-se a padronização das amostras quanto a fase do ciclo e o tempo de manutenção em cultura.

Além disso, o crescimento das formas promastigotas das espécies propostas neste trabalho foi monitorado a fim de delimitar os períodos de crescimento logarítmico e estacionário das culturas, os quais foram relevantes para as demais etapas do estudo. O número de parasitos por mL foi determinado diariamente, utilizando a câmara de *Neubauer*, até que o aumento do número de parasitos não foi mais observado. A contagem de parasitos na

câmara estima o número de células/mL através da contagem de 5 áreas do quadrante central da câmara, multiplicado pelo inverso da diluição da amostra e por  $10^4$  (fator de correção da câmara). Finalmente uma curva de crescimento foi construída, utilizando os valores obtidos.

### 4.3 Infecção de Macrófagos

O presente estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFMG) sob o protocolo: 269/2018. Todos os procedimentos realizados com os camundongos estiveram em acordo com os protocolos éticos da referida comissão.

Foram utilizados camundongos da linhagem BALB/c fêmeas de 4 a 8 semanas provenientes do Centro de Bioterismo (CEBIO) do ICB/UFMG. Estes animais foram mantidos no Biotério do Departamento de Parasitologia do ICB-UFMG sob condições de manejo adequadas.

Os Camundongos BALB/c foram submetidos à injeção intraperitoneal de 2 mL de tioglicolato (HiMedia Laboratories Pvt, Mumbai, Índia) 3 % para a indução de uma resposta inflamatória e a incitação de macrófagos. Após um período de quatro dias, os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical e um lavado da cavidade peritoneal foi obtido com injeção de 10 mL de PBS (NaCl 137 mM, Fosfato 10 mM, KCl 2.7 mM,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  2 mM, pH 7.4).

O líquido composto por PBS e células foi centrifugado a 2500 rpm por 10 minutos a 4 °C e após descartar o sobrenadante, o “pellet” foi solubilizado em 2 mL de meio RPMI 1640 suplementado com 10 % SFB, estreptomicina (100 mg/mL) e penicilina (100 U/mL) para a contagem de células.

Os macrófagos viáveis foram contabilizados em câmara de *Neubauer* e o total de  $5 \times 10^5$  macrófagos no volume de 1 mL de Meio RPMI foi distribuído em cada poço da placa de 24 poços. Em seguida, as placas foram incubadas em estufa com atmosfera de 5 %  $\text{CO}_2$  a 37 °C por 24 horas para a aderência das células aos poços. Após o período de incubação as células foram infectadas.

Culturas de promastigotas de *L. amazonensis*, *L. braziliensis* e *L. infantum* em fase estacionária (sexto dia do crescimento) foram utilizadas para a infecção dos macrófagos. A contagem dos parasitos foi realizada através do

uso da câmara de *Neubauer* e o número de parasitos foi ajustado para  $5 \times 10^6$  parasitos em um volume de 100  $\mu\text{L}$  de RPMI 1640 suplementado com 10 % de SFB, 100 U/mL de penicilina e 100 mg/mL de estreptomicina. Em seguida, os parasitos foram distribuídos, em uma MOI (multiplicidade de infecção) de 1:10 (macrófagos/parasitos), a cada poço das placas contendo macrófagos aderidos. Após 72 horas de incubação em estufa com atmosfera de 5 %  $\text{CO}_2$  a 37 °C, as amostras foram submetidas a ensaios de análise de carga parasitária, dosagem de atividade de arginase e de produção de óxido nítrico.

Os ensaios de atividade enzimática em macrófagos, foram realizados com células cultivadas na presença ou ausência de  $\text{IFN-}\gamma$  (10 ng/mL) + LPS (100 ng/mL) ou IL-4 (40 U/mL).

#### **4.4 Avaliação da abundância da arginase**

##### **4.4.1 Preparação de extrato proteico**

Para a obtenção do extrato proteico de promastigotas ( $1 \times 10^9$  parasitos) e de macrófagos infectados com as diferentes espécies de *Leishmania* ( $5 \times 10^5$  macrófagos infectados com  $5 \times 10^6$  parasitos), foi adicionado às amostras 300  $\mu\text{L}$  de tampão de lise contendo 8 M uréia, 2 M thiourea, 4 % CHAPS, 65 mM dithiothreitol (DTT), 40 mM Tris base e 1% de “MIX” de inibidor de protease (GE Healthcare, San Francisco, CA) seguido de agitação por 2 horas a T.A (temperatura ambiente). Em seguida, as células passaram por um processo de lise mecânica utilizando seringa com agulha 26 G, posteriormente, as amostras foram centrifugadas por 30 min a 14.000 rpm. Finalmente, o sobrenadante contendo o extrato proteico foi recuperado, aliquotado em tubos de 0,6  $\mu\text{L}$  e armazenados a -80 °C.

A determinação da concentração proteica foi realizada pelo método de Bradford modificado (Weekes, et al 1999) e a visualização do perfil proteico por eletroforese em gel SDS-PAGE 12 % corado por Comassie Brilliant blue G250.

#### 4.4.2 Western Blotting

Extratos proteicos foram fracionados em gel SDS-PAGE a 12 % e transferidos para a membrana de nitrocelulose (Amersham Protan 0.45 µm) com miliamperagem programada a 45 mA por 45 min. A fim de bloquear as interações inespecíficas foi aplicada à membrana a solução de bloqueio composta de 5 % de leite em pó integral e 0,1 % de Tween-20 em PBS 1x por um período de 1 hora. Posteriormente, a membrana foi incubada com o anticorpo policlonal anti-arginase produzido a partir de coelho, gentilmente cedido pela Dr. Lucile M. Floeter-Winter do Laboratório de Fisiologia do Instituto de Biociências, USP. O anticorpo foi diluído na proporção de 1:100 em PBS contendo 5 % de leite desnatado, sendo que o tempo de incubação foi de 1 hora. Em seguida a membrana foi lavada com PBS-Tween20 0,1 % e incubada com o anticorpo secundário conjugado com peroxidase (Anti-IgG de coelho Sigma) diluído na proporção de 1:1000 em PBS com 5 % de leite durante 1 hora. Finalmente, a ligação específica foi revelada com o reagente de detecção quimioluminescente ECL (GE Healthcare Life Sciences) seguindo as recomendações do fabricante. As intensidades das bandas foram observadas utilizando o aparelho analisador de imagem LAS 500 (GE Healthcare Life Sciences). Para quantificar a intensidade das bandas reveladas, foi utilizado o Software ImageJ 1.41 (NIH, USA).

O controle de carregamento do gel se deu pela contagem de parasitos submetidos a extração de proteínas, pela dosagem do extrato protéico, seguido pela aplicação da mesma quantidade de proteínas em cada canaleta, e pela quantificação de bandas do gel SDS-PAGE 12 % corado por Coomassie Brilliant blue G250 (Bass *et al.* 2017).

#### 4.5 Atividade da arginase

A atividade enzimática da arginase foi mensurada utilizando as formas promastigotas nas fases logarítmica e estacionária bem como em lisados de macrófagos infectados “*in vitro*” com os parasitos das 3 espécies estudadas. A dosagem da atividade da enzima foi determinada medindo a conversão de L-

arginina em L-ornitina e ureia usando o método descrito por Corraliza (Corraliza *et al.*, 1994), com algumas modificações (Kropf *et al.*, 2005).

Os experimentos foram realizados em triplicatas e para cada teste foram realizados dois experimentos. Em cada replicata experimental, um total de  $1 \times 10^8$  promastigotas de cada espécie assim como  $5 \times 10^5$  macrófagos infectados foram lisados com 50  $\mu$ L de Triton X-100 a 0,1 % por 30 minutos em agitação. Em seguida, foram adicionados aos lisados celulares 50  $\mu$ L de  $MnCl_2$  10 mM e 50  $\mu$ L de Tris HCl 50 mM (pH 7,5) elementos estes que participam como cofatores para a ativação da enzima. Após a incubação em banho seco na temperatura de 55 °C por 10 minutos, 50  $\mu$ L das amostras foram transferidas para tubos de 1mL juntamente com 50  $\mu$ L de L-arginina (0,5 mM - pH 9,7) e foram incubadas em estufa seca a 37 °C por 60 minutos. Para cessar a reação, 400  $\mu$ L de solução ácida ( $H_2SO_4$ - $H_3PO_4$ - $H_2O$ ) na proporção de: 1:3:7 foi adicionada em cada amostra.

A concentração de ureia foi determinada após a adição de 20  $\mu$ L de  $\alpha$ -isonitrosopropiofenone (ISPF, dissolvido em etanol P.A) seguido de aquecimento de 95 °C por 45 minutos. A curva padrão foi construída por meio de diluições sucessivas de uréia 1 mg/mL na proporção de 1:2 e a absorbância foi mensurada usando um espectrofotômetro com a leitura na faixa de 540 nm. Uma unidade de atividade da enzima arginase é definida como a quantidade de enzima que catalisou a formação de 1  $\mu$ mol de ureia por minuto.

#### **4.6 Análise de carga parasitária por contagem de amastigotas**

Para este item, também foram realizados experimentos em triplicatas e para cada teste foram realizados três experimentos. Placas de cultura de 24 poços contendo uma lamínula circular no fundo e  $5 \times 10^5$  macrófagos infectados com  $5 \times 10^6$  parasitos das 3 espécies foram incubadas em estufa a 37 °C com atmosfera de 5 % de  $CO_2$  por 72 horas. Após o período de incubação, as lamínulas foram retiradas dos poços, coradas utilizando os reagentes de Panótico rápido (Laborclin, Pinhais, Paraná, Brasil) e montadas em lâminas permanentes com Entellan (Merck). As lâminas foram analisadas em microscópio ótico com objetiva de imersão (1000X).

Foi realizada uma contagem de 300 macrófagos por lamínula de cada triplicata, na qual foi determinado o número de macrófagos infectados e o número médio de amastigotas encontradas (Pires, *et al.*, 2014). Com esses dados também obtivemos o índice de infecção, que é a porcentagem de macrófagos infectados multiplicada pelo número médio de amastigotas por macrófago.

#### **4.7 Dosagem de óxido nítrico**

A fim de analisar a produção do óxido nítrico pelos macrófagos infectados pelas 3 espécies estudadas, o nitrito, um produto final do catabolismo de L-arginina por iNOS, foi dosado no sobrenadante das células após 72 h de infecção pelo método de Griess (Green *et al.* (1992). O total de 50 µl do sobrenadante da cultura de macrófagos infectados foram misturados com um volume de 100 µl de reagente de Griess [0,1 N (1-naftil) etilenodiamina dihidroclorato, 1 % de sulfanil amida em 5 % H<sub>3</sub> PO<sub>4</sub>]. A absorvância do complexo foi mensurada a 540 nm pelo espectrofotômetro, após incubação por 10 minutos. A concentração de NO de cada amostra foi obtida com base na curva padrão plotada com diluições sucessivas de NaNO<sub>2</sub> na proporção de 1:2 em meio RPMI, cobrindo uma faixa de concentração de 1-300 µM (Ding *et al.*,1998). Foram realizados dois experimentos em triplicata.

#### **4.8 Análise estatística**

Para a análise estatística dos ensaios de atividade da arginase, bem como de dosagem de NO e carga parasitária, foi aplicado o teste One-Way ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni para determinar diferenças entre as espécies avaliadas. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando os valores p foram inferiores a 0,05 (valor de  $p < 0,05$ ). Todas as análises estatísticas foram realizadas por meio do programa GraphPad Prism versão 5.00 para Windows.

## 5. Resultados

### 5.1 Análise das sequências de DNA e aminoácidos que codificam para a arginase

Inicialmente, foram analisadas as sequências de nucleotídeos que codificam a arginase em *L. amazonensis*, *L. braziliensis* e *L. infantum* bem como as sequências de aminoácidos que constituem proteína a fim de obtermos o grau de semelhança entre as espécies estudadas. As sequências de nucleotídeos usadas na análise estão depositadas no banco de dados GenBank sob os números de acesso AF038409.2 para *L. amazonensis* (IFLA/BR/1967/PH8), XM\_001568200.1 para *L. braziliensis* (MHOM/BR/75/M2904) e KU641751.1 para *L. infantum* (MCAN/BR/2000/BH400). A análise foi realizada utilizando a ferramenta BLAST disponível em [www.blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi](http://www.blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi).

A análise da sequência de DNA de arginase das espécies de *L. amazonensis*, *L. braziliensis*, e *L. infantum* revelou uma janela aberta de leitura (ORF) constituída por 990, 993 e 990 nucleotídeos, respectivamente, que codificam 329, 330 e 329 aminoácidos respectivamente. A sequência de DNA varia de 88 % a 94 % de similaridade entre as espécies, e já a sequência de aminoácidos revela semelhança de 87 a 95 % (Tabela 1).

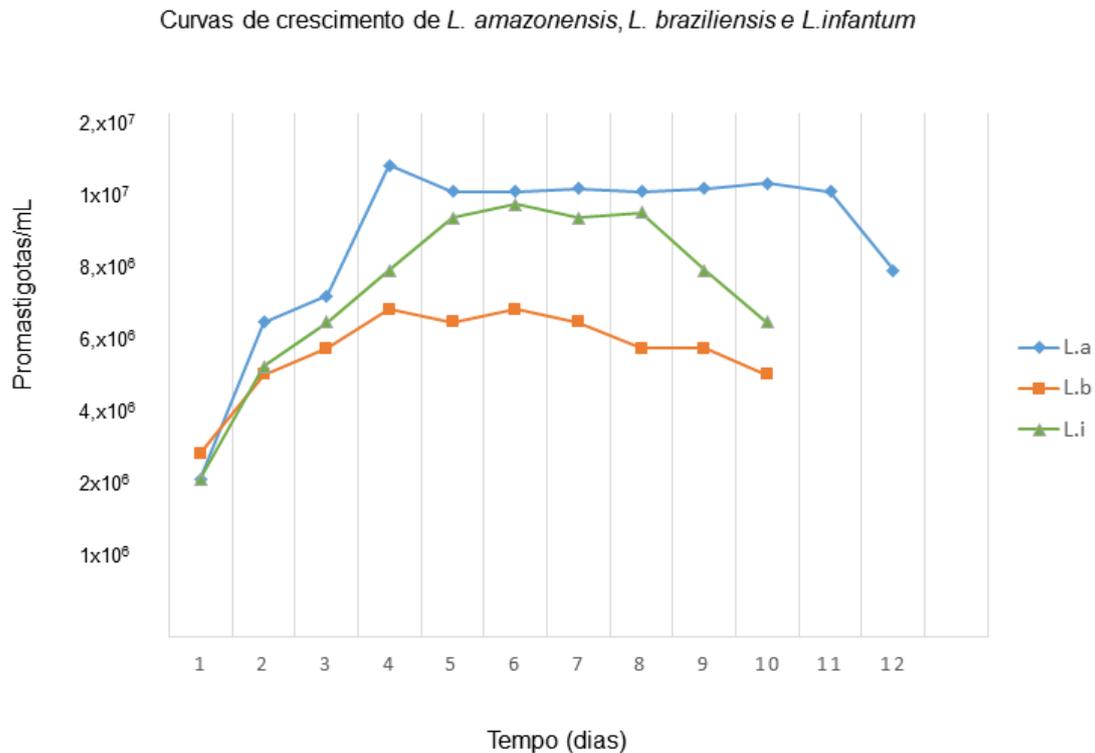
**Tabela 1:** Alinhamento de sequências de DNA e peptídeos da arginase em *Leishmania spp* retiradas do GenBank

Espécies	Similaridade DNA (%)			Similaridade Aminoácidos (%)		
	<i>L. amazonensis</i>	<i>L. braziliensis</i>	<i>L. (L.) infantum</i>	<i>L. amazonensis</i>	<i>L. braziliensis</i>	<i>L. (L.) infantum</i>
<b><i>L. amazonensis</i></b>	100%	89%	94%	100%	87%	95%
<b><i>L. braziliensis</i></b>	89%	100%	88%	87%	100%	89%
<b><i>L. (L.) infantum</i></b>	94%	88%	100%	95%	89%	100%

## 5.2 Curvas de crescimento

As formas promastigotas de *L. amazonensis*, *L. braziliensis* e *L. infantum* foram cultivadas como descrito no item 4.2. Para a realização da curva de crescimento foram utilizadas cultura na oitava passagem em meio LIT, desde o isolamento em hamsters (*Mesocricetus auratus*) experimentalmente infectados.

Nas três espécies de *Leishmania* foi observado um grande aumento do número de parasitos na fase logarítmica, até o quarto dia de incubação, estabilizando-se a partir do quinto dia (Figuras 2).



**Figura 2:** Curvas de crescimento das espécies *L. amazonensis* (La), *L. braziliensis* (Lb) e *L. infantum* (Li) em meio LIT completo.

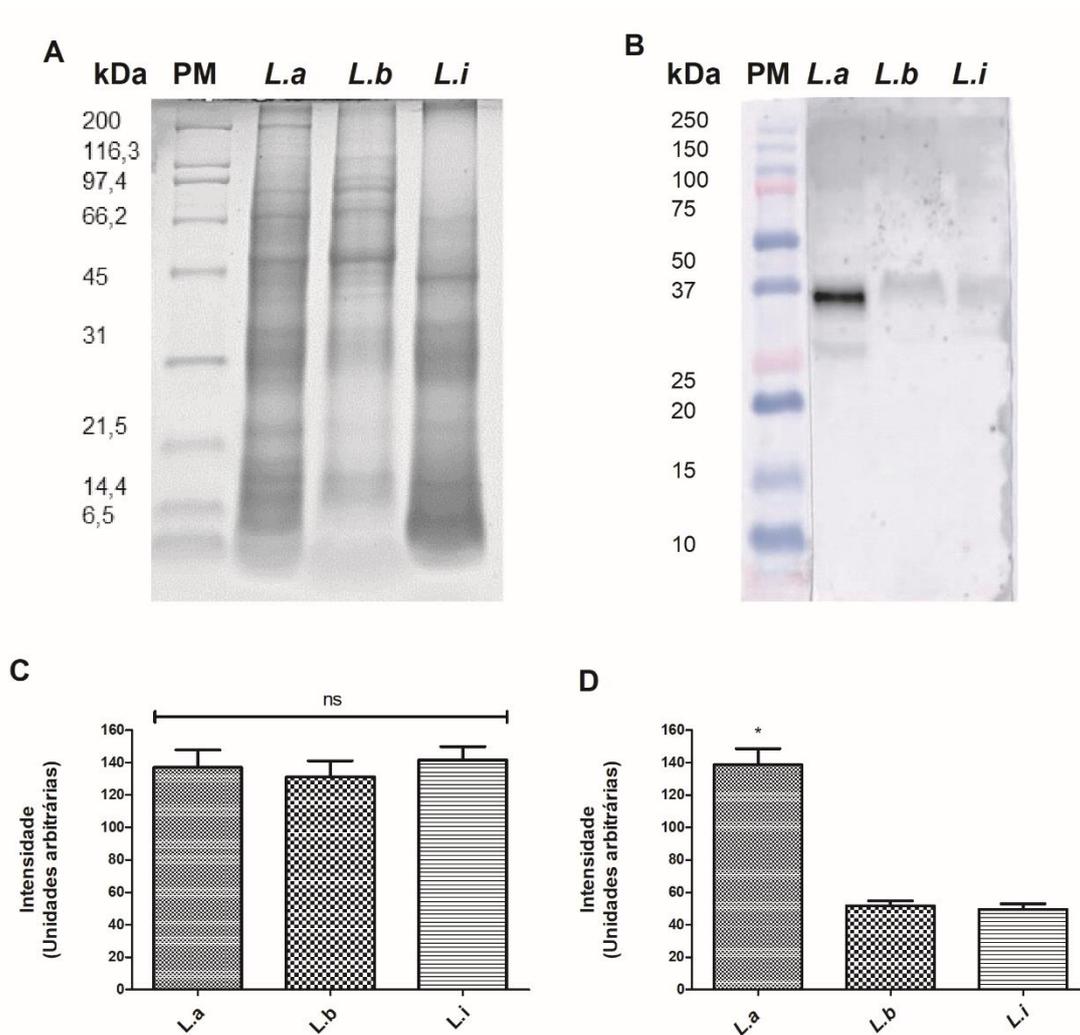
### 5.3 Arginase em promastigotas de *L. amazonensis*, *L. braziliensis* e *L. infantum*

#### 5.3.1 Abundância proteica

Para determinar a abundância proteica da arginase nas três espécies estudadas, um ensaio de imunodeteção por *Western Blotting* foi realizado. Os extratos proteicos foram obtidos conforme descrito no item 4.4.1. Os parasitos estavam no terceiro dia de crescimento e na 15<sup>a</sup> passagem em LIT desde o isolamento.

Nas análises do *Western Blotting* foi possível observar que a abundância da arginase nos extratos proteicos das promastigotas de *L. amazonensis* (131,5 U) é aproximadamente 2,6 vezes maior quando comparados aos extratos de promastigotas de *L. braziliensis* e *L. infantum* (Figura 3. B e D). Não houve diferença estatística entre os valores de intensidade encontrados para *L. braziliensis* (49,2 U) e *L. infantum* (47,3 U).

Como controle de carregamento do gel, além da contagem de parasitos ( $1 \times 10^9$  parasitos) para a obtenção do extrato proteico e da dosagem de proteínas em cada amostra (30  $\mu$ g de proteína/well), também quantificamos as bandas encontradas após a eletroforese em gel SDS-PAGE 12 % (Figura 3A). Dessa maneira atestamos que foi analisada a mesma quantidade de proteínas nas três espécies propostas (Figura 3C).



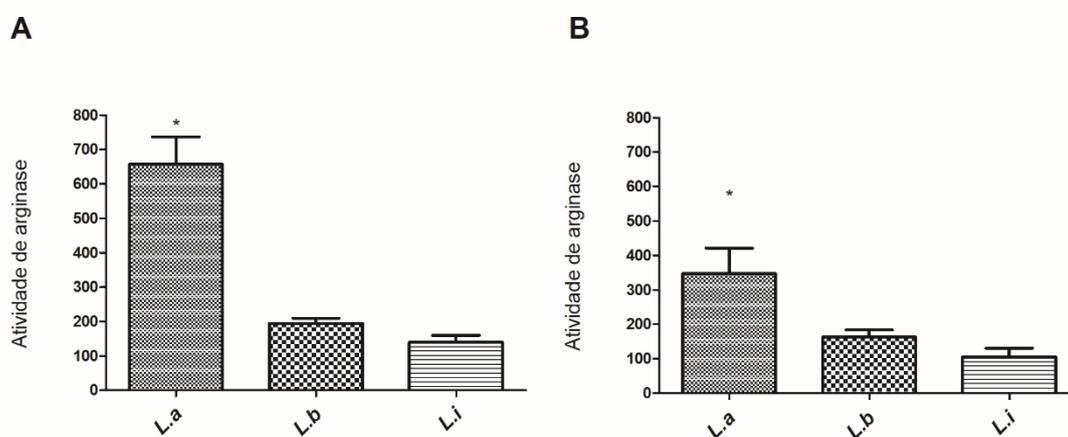
**Figura 3: Abundância proteica da arginase em promastigotas** A- Gel SDS-PAGE a 12 % com 30  $\mu$ g de extratos de *L.a*, *L.b* e *L.i* (Controle quantitativo). B- *Western Blotting* realizado a partir do 30  $\mu$ g de extrato proteico de promastigotas de *L. amazonensis* (*L.a*), *L. braziliensis* (*L.b*) e *L. infantum* (*L.i*) e anticorpo anti-arginase, revelados com ECL. C- Intensidade das bandas do extrato proteico bruto separadas por eletroforese em Gel SDS PAGE 12%. D- Intensidade das bandas referentes a arginase ( $\pm 35$  kDa) encontradas após revelação do *Western Blotting*. Legenda: PM = padrão de massa molecular em kDa; \* = diferença significativa ( $p < 0,05$ ); ns = diferença não significativa.

### 5.3.2 Atividade de arginase em promastigotas

Além da abundância proteica, também medimos a atividade enzimática da arginase nas promastigotas das três espécies estudadas nas fases de crescimento logarítmica e estacionária.

Nossos experimentos revelaram uma diferença significativa ( $p < 0,05$ ) de atividade enzimática da arginase em promastigotas de *L. amazonensis* comparadas às outras duas espécies, em ambos os períodos de crescimento. (Figura 4).

Como mostrado nesta figura, a atividade de arginase na fase logarítmica (Figura 4A) de *L. amazonensis* é aproximadamente duas vezes mais elevada do que na fase estacionária (Figura 4B). Os valores médios de atividade de arginase na fase logarítmica foram 657,0 U; 193,8 U e 139,1 U para *L. amazonenses*, *L. braziliensis* e *L. infantum*, respectivamente. Já na fase estacionária os valores encontrados foram 346,6 U; 162,7 U e 104,4 U para *L. amazonensis*, *L. braziliensis* e *L. infantum*, respectivamente.



**Figura 4. Atividades da arginase em promastigotas de *Leishmania*.** Promastigotas em fase de crescimento estacionária (A) e logarítmica (B) foram obtidas de culturas de parasitos ( $10^8$  parasitos). Foram realizados dois experimentos independentes em triplicatas. \* indica diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) pelo teste One-Way ANOVA.

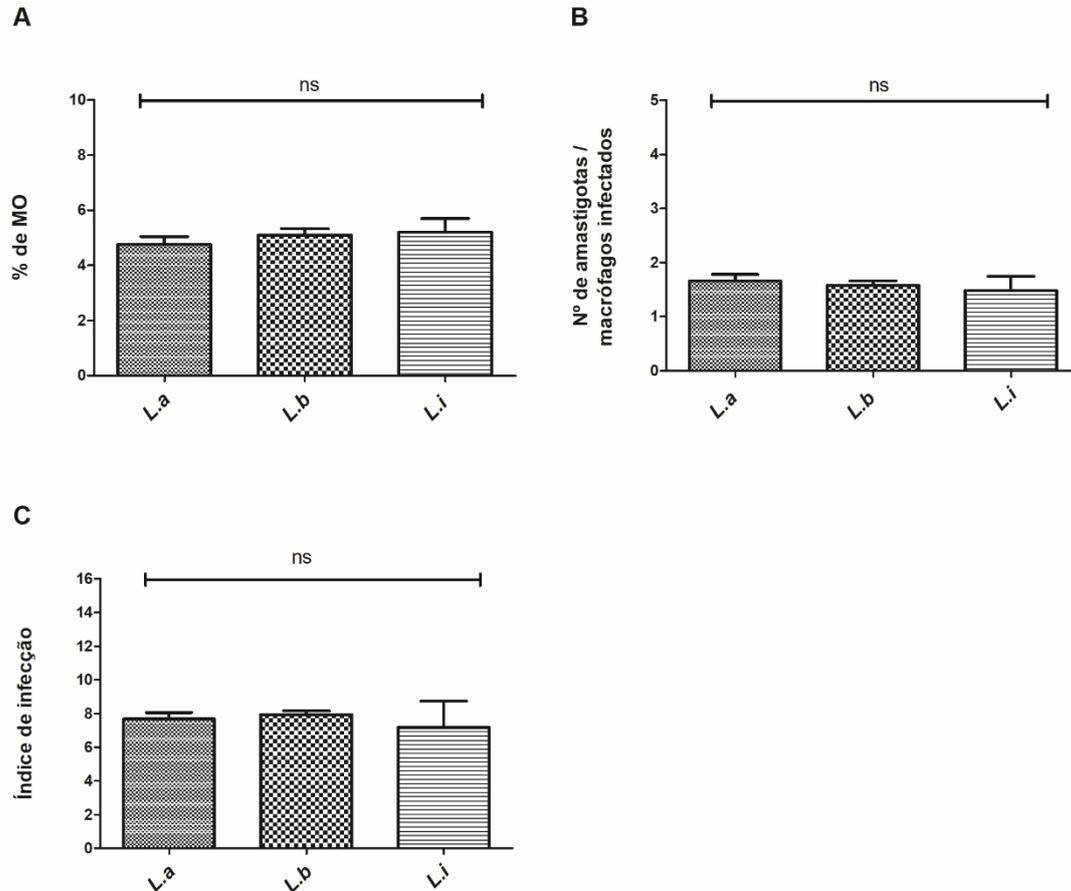
## **5.4 Macrófagos infectados com *L. amazonensis*, *L. braziliensis* e *L. infantum***

### **5.4.1 Determinação da carga parasitária**

Uma vez que as formas promastigotas de *L. amazonensis* apresentaram maior abundância e maiores níveis de atividade da enzima arginase, analisamos a habilidade de infecção das três espécies estudadas em culturas de macrófagos peritoneais de camundongo.

Para cumprir tal objetivo, macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c foram infectados por formas metacíclicas dos parasitos (MOI 1:10 macrófago/parasitos). Após 72 h da infecção, foi determinado o número de macrófagos infectados, bem como o número de amastigotas por macrófago, em um total de 300 macrófagos. Além disso o índice de infecção também foi estimado.

Não houve diferença estatística entre o número de macrófagos infectados pelas três espécies estudadas. De igual maneira foram semelhantes o número médio de amastigotas por célula e índice de infecção (Figura 5).



**Figura 5. Análise de carga parasitária em macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c.** Porcentagem de macrófagos infectados (A), número médio de amastigotas por macrófago (B) e índice de infecção (C). Os experimentos foram realizados em triplicatas e os dados apresentados são de três experimentos com resultados semelhantes. ns = diferença estatisticamente não significativa ( $p > 0,05$ ) pelo teste One-Way ANOVA.

#### 5.4.2 Abundância e atividade da arginase e produção de óxido nítrico

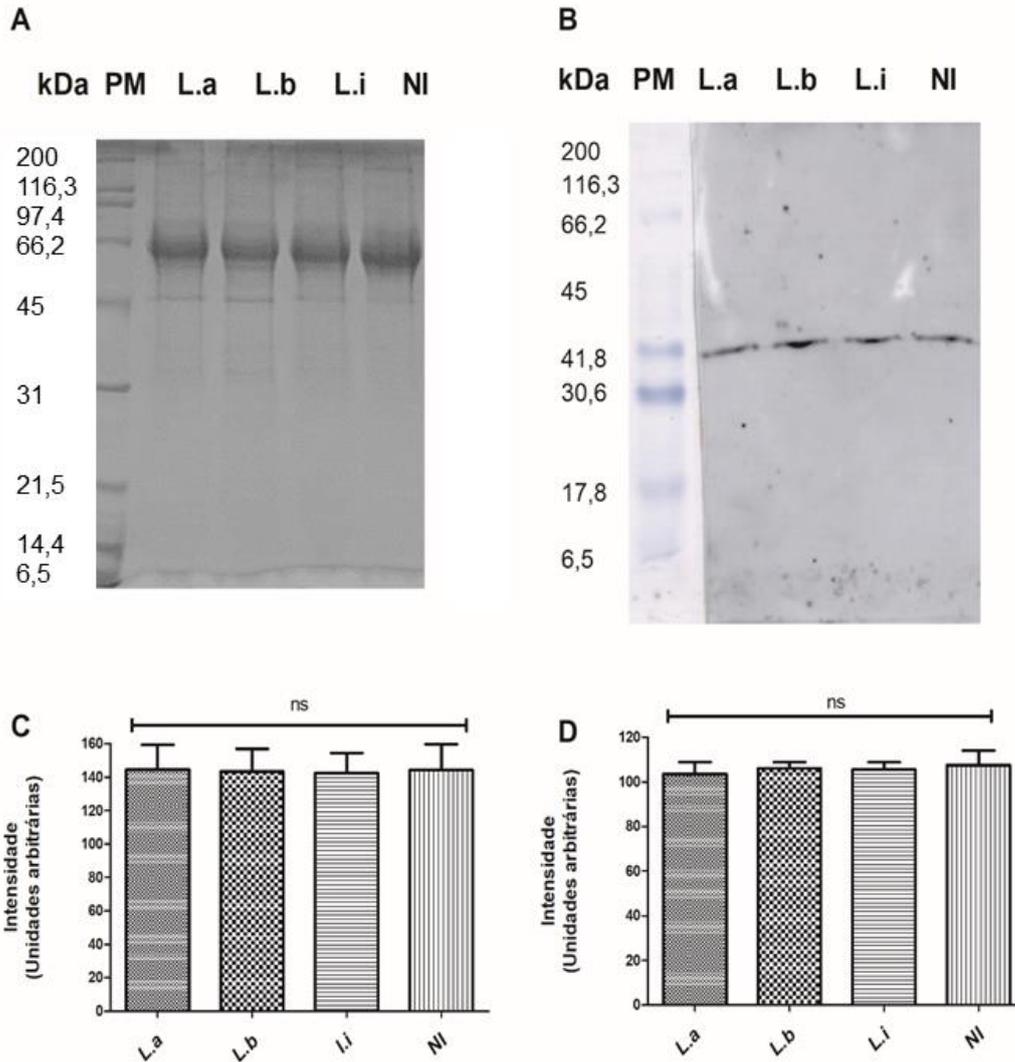
Uma vez que o perfil de infecção de macrófagos após 72 h de infecção pelas três espécies de *Leishmania* estudadas é semelhante, avaliamos a abundância e atividade da arginase e a produção de óxido nítrico (NO) nesses tipos celulares infectados. A L-arginina é o substrato comum da Óxido Nítrico Sintase induzível (iNOS) e da arginase e, portanto, o produto da reação catalisada pelas duas enzimas foi dosado.

Nossos dados mostraram que, ao contrário do observado nas formas promastigotas, os níveis de abundância proteica de arginase (Figura 6) bem como de atividade da enzima (Figura 7) em macrófagos peritoneais de

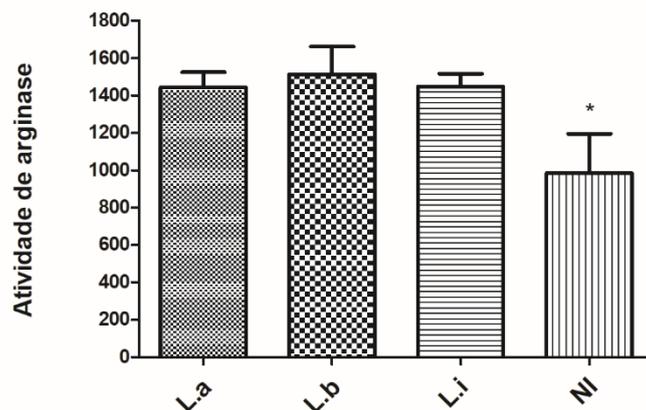
camundongos BALB/c infectados por *L. amazonensis*, *L. braziliensis* e *L. infantum* não foram diferentemente significativos. Entretanto, a atividade de arginase dos macrófagos infectados é maior quando comparadas às células não infectadas ( $p < 0,05$ ) (Figura 7).

Como controle de carregamento do gel, a obtenção do extrato protéico foi feita a partir da mesma quantidade de células, macrófagos e parasitos ( $5 \times 10^5$  macrófagos infectados com  $5 \times 10^6$  parasitos), também foi aplicado no gel a mesma quantidade de proteínas por amostra (20  $\mu\text{g}$  de proteína/well), e ainda quantificamos as bandas encontradas após a eletroforese em gel SDS PAGE 12% (Figura 6A). Dessa maneira atestamos que foi analisada a mesma quantidade de proteínas totais nas três espécies propostas (Figura 6C).

Nessas condições foi dosada também a produção de óxido nítrico como descrito no item 4.7. Não foi detectado nenhum valor significativo de NO nos macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c infectados pelas três espécies ou sem infecção.

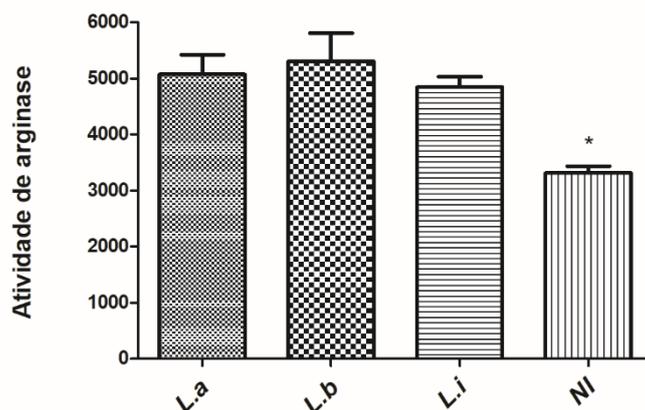


**Figura 6: Abundância proteica da arginase em macrófagos infectados** **A-** Gel SDS-PAGE a 12 % com os extratos proteicos de macrófagos infectados de *L.a*, *L.b* e *L.i* e não infectados (NI) (Controle quantitativo). **B-** *Western Blotting* realizado a partir do extrato proteico de macrófagos infectados por *L. amazonensis* (*L.i*), *L. braziliensis* (*L.b*) e *L. infantum* (*L.i*) e macrófagos não infectados (NI). **C-** Intensidade das bandas do extrato proteico separadas por eletroforese em SDS PAGE 12 %. **D-** Intensidade das bandas referentes a arginase ( $\pm 35$  kDa) encontradas após revelação do *Western Blotting*. Legenda: PM = padrão de massa molecular em kDa; ns = diferença não significativa.



**Figura 7: Atividade da arginase em macrófagos peritoneais de camundongos infectados.** Macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c foram infectadas com promastigotas em fase estacionária de crescimento (6<sup>o</sup> dia,  $5 \times 10^6$  parasitas / ml) com o MOI de 1:10 (macrófago/parasito) e após 72 h pós-infecção a atividade da arginase foi determinada. Os dados relatados foram obtidos a partir de dois experimentos independentes em triplicadas. \* indica diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) pelo teste One-Way ANOVA.

Como já referido na introdução, relatos anteriores indicam que o nível de arginase celular no hospedeiro é regulado por citocinas derivadas de células T, particularmente IL-4. Consistente com estes relatos, a adição de IL-4 nas culturas de macrófagos levou a um aumento dos níveis de arginase em macrófagos infectados e não infectados com *Leishmania* spp (Figura 8). Assim como observado nas amostras de macrófagos sem estímulo, não houve diferença significativa ( $p < 0,05$ ) da atividade de arginase nos macrófagos infectados pelas três espécies estudadas, porém a atividade permanece aumentada em macrófagos infectados quando comparados com macrófagos sem infecção. A produção de óxido nítrico também foi dosada nesta condição, no entanto, nenhum valor foi observado.

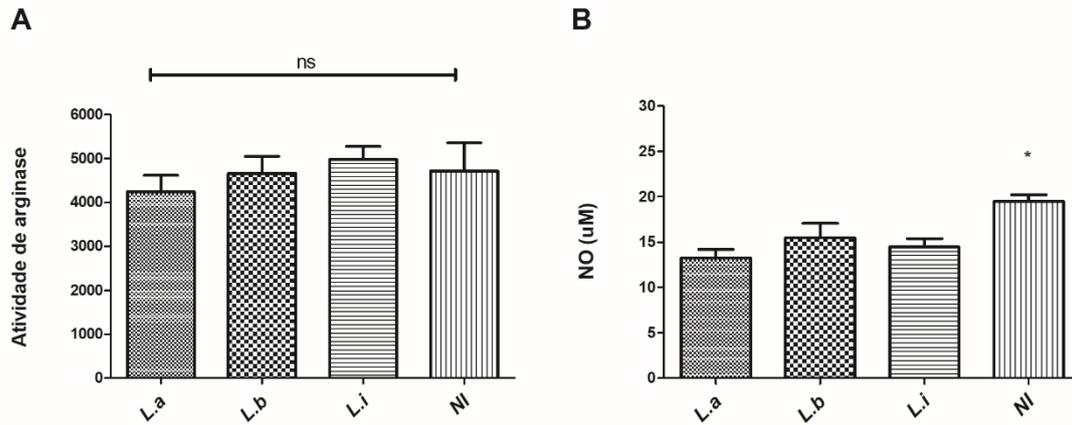


**Figura 8: Atividade da arginase em macrófagos peritoneais de camundongos infectados com estímulo de IL-4.** Macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c foram estimulados com IL-4 (40 U/mL) e infectados com promastigotas em fase estacionária de crescimento (6<sup>o</sup> dia, 5x10<sup>6</sup> parasitas / ml) com um MOI de 1:10 (macrófago/parasitos) e 72 horas pós-infecção a atividade de arginase foi dosada. Os dados relatados são referentes a dois experimentos independentes, realizados em triplicatas. \* indica diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) pelo teste One-Way ANOVA.

Citocinas pró-inflamatórias, como o IFN- $\gamma$  ou o TNF $\alpha$ , ou endotoxinas, como o LPS, induzem a ativação da iNOS, e como consequência a produção de NO (Corraliza *et al.*, 1995; Diefenbach *et al.*, 1998). Por esta razão, também avaliamos a atividade da arginase e produção de óxido nítrico em macrófagos infectados pelas três espécies de *Leishmania* cultivados na presença de IFN- $\gamma$  (10 ng/mL) e LPS (100 ng/mL).

Os níveis de atividade enzimática da arginase nessas condições, diferentemente dos dados das demais condições testadas, foram semelhantes entre macrófagos infectados por *L. amazonensis*, *L. braziliensis* e *L. infantum* como também por macrófagos não infectados (Figura 9 A).

Também por meio desse experimento, foi possível verificar a produção de NO. Nossos dados revelaram que macrófagos infectados por *Leishmania* produziram níveis mais baixos de NO quando comparados com macrófagos sem infecção. Os níveis de produção de óxido nítrico entre as diferentes espécies não foram estatisticamente significativos (Figura 9 B)



**Figura 9: Atividade da arginase e produção de NO em macrófagos peritoneais de camundongos infectados com estímulo de IFN- $\gamma$ .** Macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c foram estimulados com IFN- $\gamma$  (10 ng/mL) e LPS (100 ng/mL) e infectados com promastigotas em fase estacionária de crescimento (6<sup>o</sup> dia,  $5 \times 10^6$  parasitas/ml) com um MOI de 1:10 (macrófago/parasitos) e após 72 horas pós-infecção a atividade de arginase (A) e produção de NO (B) foi dosada. Os dados relatados são referentes a dois experimentos independentes, realizados em triplicatas. \* indica diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) e ns diferença não significativa pelo teste One-Way ANOVA.

## 6. Discussão

As leishmanioses consistem em um amplo espectro de doenças causadas por protozoários pertencentes ao gênero *Leishmania* e consideradas pela OMS como um importante problema de saúde pública e uma doença tropical negligenciada.

Devido ao aumento do número de casos das leishmanioses nos últimos anos e a gravidade das formas clínicas, o estudo da biologia do parasito bem como a sua interação com seus hospedeiros se torna altamente relevante. Estudar a atividade de uma determinada enzima em diferentes espécies, estágios e fases do ciclo do parasito pode permitir o entendimento dos fatores associados à patogenicidade, virulência, mecanismos de infecção e sobrevivência no hospedeiro, além de possibilitar a identificação de alvos para drogas, entre outras aplicações.

A arginase tem surgido como uma importante enzima em processos biológicos e mesmo como alvo de drogas. Exemplo disso, é que nos últimos anos, a arginase foi a primeira enzima na via das poliaminas que se tornou um alvo promissor na luta contra a infecção por *Leishmania* spp (Maquiaveli *et al.*, 2017). Já foi demonstrado que a privação do substrato da arginase, a L-arginina, induz a apoptose mediada pelo estresse oxidativo em promastigotas de *L. donovani* e é acompanhada por um menor nível de tiol (Mandal *et al.*, 2016).

Conforme citado anteriormente, além do seu papel na replicação celular, participando na via de poliaminas, a arginase de *L. amazonensis* tem mostrado uma importante função durante a infecção em seus hospedeiros vertebrados. Tal função compreende modular a quantidade de L-arginina disponível nas células infectadas. Ao consumir esse aminoácido a arginase desloca o equilíbrio ARG/iNOS diminuindo a molécula anti proliferativa, o NO, e aumentando a disponibilidade de poliaminas que favorece a replicação dos parasitos (da Silva & Floeter-Winter, 2014).

Alguns estudos têm relatado o papel da arginase produzindo formas promastigotas do parasito deficientes da enzima e dosando a sua atividade. Robersts *et al* (2004) ao desenvolver formas promastigotas de *L. mexicana* deficiente em arginase mostrou que esses parasitos não expressaram atividade

da arginase, não possuíam pool de ornitina intracelular e eram auxotróficos para ornitina ou poliaminas. Reguera *et al.* (2009) testaram o papel da arginase em *L. major*. Este estudo mostrou que o parasito mutante apresentou deficiência em atividade de arginase e requereu o fornecimento nutricional de poliaminas ou L-eritina para seu crescimento. Além disso demonstraram o curso da infecção por estes parasitos em camundongos BALB/c. Os parasitos deficientes mantiveram a capacidade de se diferenciar normalmente em relação ao estágio metacíclico infeccioso, e foram capazes de induzir doença progressiva após a inoculação nos camundongos, embora de forma menos eficiente que os parasitos WT. Estes dados sugerem que a forma amastigota de *Leishmania*, pode sobreviver “*in vivo*” por meio do resgate de poliaminas hospedeiras.

Em nosso trabalho procuramos associar a diferença de atividade enzimática da arginase em três espécies de *Leishmania* com seu perfil de infecção, assim verificando se esta enzima está diretamente ligada à infectividade da espécie.

A fim de verificarmos os níveis de similaridade entre a arginase nas distintas espécies, iniciamos nosso estudo realizando as análises “*in silico*” das sequências gênicas, bem como das sequências de aminoácidos que constituem a arginase em *L. amazonensis*, *L. braziliensis* e *L. infantum*. Em nossa análise pudemos observar alto nível de similaridade entre as espécies. A *L. braziliensis* apresentou a menor porcentagem de similaridade em relação às outras duas espécies. No que se refere à sequência gênica, *L. braziliensis* apresentou 89 % em relação a *L. amazonensis* e 88 % em relação a *L. infantum*. Quanto às sequências de aminoácidos *L. braziliensis* apresentou similaridade de 87 % e 89% em relação a *L. amazonensis* e *L. infantum* respectivamente. Este fato pode ser explicado devido a *L. braziliensis* pertencer ao subgênero *Viannia*, ao contrário de *L. amazonensis* e *L. infantum* pertencentes ao subgênero *Leishmania*. Acreditamos que este alto nível de similaridade nas sequências estudadas pode indicar também a similaridade em termos de função da arginase nas variadas espécies de *Leishmania* sp.

A proximidade de sequências gênicas entre espécies de mesmo subgênero tem sido relatado em outros trabalhos. Llanes *et al.* (2015) em uma análise comparativa do genoma de *L. (V.) panamensis* comparada as

sequências genicas de *L. (V.) braziliensis*, *L. (L) mexicana* e *L. infantum* revela alta similaridade entre espécies do mesmo subgênero se comparado às espécies pertencentes a subgêneros diferentes. Nesse trabalho foram encontrados 61 grupos de genes ortólogos entre espécies do Subgênero *Leishmania Viannia*: *L. (V.) panamensis* e *L. (V.) braziliensis*, enquanto apenas 1 grupo de genes ortólogos entre *L. (V.) panamensis* e *L. (L) mexicana*.

Após a análise das sequências de arginase, determinamos os níveis de abundância da enzima por *Western Blotting* e seus níveis de atividade nas formas promastigotas das três espécies estudadas. Nossos resultados mostraram que as formas promastigotas de *L. amazonensis* possuem 2,6 vezes maior abundância da arginase do que *L. braziliensis* e *L. infantum*. Estes dados corroboraram com os achados de Lima (2017) que aponta a arginase como uma proteína diferencialmente abundante em *L. amazonensis* em comparação com *L. infantum* e *L. braziliensis*.

Também encontramos que nas três espécies estudadas a atividade da arginase na fase de crescimento logarítmica dos parasitos é maior do que na fase estacionária, sendo que a *L. amazonensis* se destaca em ambas as fases com maior nível de atividade. Os mecanismos exatos de maior atividade de arginase na fase de crescimento logarítmico são desconhecidos, entretanto, observamos que o maior crescimento dos parasitos coincide com o papel de uns dos principais metabolitos sintetizados, as poliaminas, culminando em proliferação celular. Além disso na fase estacionária de crescimento, o parasito está pronto para infectar as células hospedeiras e assim, pode precisar de menos nutrientes em comparação com a fase logarítmica. Nesse sentido, é relevante caracterizar as principais vias metabólicas e imunológicas do parasito em ambos os estágios de crescimento.

A partir do trabalho de Lima (2017), ao detectar arginase aumentada em promastigotas de *L. amazonensis* em relação a *L. braziliensis* e *L. infantum*, e considerando que arginase está envolvida na regulação da resposta oxidativa de macrófagos, por meio da competição com iNOS, pela arginina, ficamos estimulados a verificar como estariam os níveis de arginase em macrófagos infectados por estas três espécies. Além disso, a competição ARG/iNOS pode favorecer o sucesso da infecção e elucidar a multiplicação elevada dos parasitos em macrófagos infectados por *L. amazonensis* (Mukbel *et al.*, 2007;

Castilho-Martins *et al.*, 2015). Obtivemos como resultado os valores de índice de infecção de 7.7, 7.9 e 7.2 para *L. amazonensis*, *L. braziliensis* e *L. infantum* respectivamente e níveis de atividade de arginase de 1443 U, 1513 U e 1447 U *L. amazonensis*, *L. braziliensis* e *L. infantum* respectivamente. Dessa maneira observamos que os macrófagos infectados pelas três espécies estudadas não apresentaram carga parasitária e níveis de atividade de arginase diferenciados. Assim, pensamos que os níveis de arginase nas promastigotas, formas extracelulares, não estão diretamente relacionados com a situação em formas intracelulares. Dados semelhantes foram relatados por Badirzadeh *et al.* (2017) em estudo com *L. tropica*, *L. major* e *L. tarentolae*, no qual promastigotas de *L. tropica* apresentaram maior atividade de arginase, mas nas células infectadas a diferença de atividade de arginase não foi observada. Isso sugere que a arginase é importante, de igual forma, para todas as espécies de *Leishmania* e que elas precisam da arginase para sobreviver e multiplicarem-se dentro das células do hospedeiro (Silva & Floeter-Winter, 2014, Camargo *et al.*, 1978). Além disso, foi demonstrado em *L. donovani* que a arginase é essencial para a proliferação de promastigotas, mas não de amastigotas intracelulares (Boitz *et al.*, 2017).

No entanto, observamos que a atividade da arginase foi aumentada em células infectadas em relação às não infectadas, uma vez que foi observado o valor de 984 U de atividade da arginase células sem infecção. Estes dados revelaram que a infecção parasitária regulou indiretamente e positivamente a atividade de arginase em condições “*in vitro*”. Aliás, é sabido que a infecção por *Leishmania* pode ativar parcialmente a arginase das células hospedeiras (Wanassen & Soong, 2008). Muleme *et al.*, (2004) mostraram em um estudo que a proliferação de *L. major* dentro de macrófagos foi notavelmente diminuída na ausência da arginase proveniente da *Leishmania* e, além disso, os parasitas deficientes nesta enzima foram incapazes de induzir a arginase hospedeira.

Por fim, a atividade de arginase foi maior em macrófagos infectados com as três espécies estudadas do que em macrófagos não infectados, sem estímulo ou quando estimulados com IL- 4. Porém quando estimulados com IFN- $\gamma$ , não houve diferença na atividade de arginase entre infectados e não infectados. Este achado deve-se pelo fato de IL-4 ser uma das citocinas

produzidas na resposta TH2 que aumenta a expressão da arginase (Corraliza *et al.* 1995).

Não foi detectado nenhum valor significativo de NO nos macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c infectados pelas três espécies ou sem infecção. Esse resultado era esperado já que camundongos desta espécie são conhecidos por produzirem uma resposta Th2 caracterizada por altos níveis de IL-4, IL-13 e IL-10 (Gaur *et al.*, 2007, Rath *et al.*).

Somente foi possível observar a produção de NO em células ativadas por IFN- $\gamma$ . Nestes macrófagos foi observada uma maior produção de NO nas células não infectadas em relação às infectadas, mostrando que a infecção por *Leishmania* spp regulou negativamente a produção de NO. Como já mencionado, os parasitos podem ativar parcialmente a arginase e inativar a produção de NO pelas células do hospedeiro via depleção local do substrato em comum de arginase e iNOS, a L-arginina (Wanassen & Soong, 2008).

Entretanto, já foi demonstrado que diferentes espécies de *Leishmania* se diferenciam na eficiência em modular a capacidade de macrófagos em produzir NO. Maksouri *et al.* (2017) mostraram que a porcentagem de macrófagos infectados e o número médio de parasitos por macrófago infectados por *L. major* e *L. tropica* foram similares. Contudo, *L. tropica* inibiu significativamente a produção de NO induzido pela estimulação de LPS e IFN- $\gamma$  em macrófagos J774, enquanto que *L. major* não a afetou.

Em suma, nossos resultados contribuem para o conhecimento acerca da arginase em diferentes espécies de *Leishmania*. Observamos que uma mesma espécie do parasito apresenta diferentes níveis de atividade da enzima arginase de acordo com sua fase de crescimento e forma evolutiva. Observamos também que alta atividade de arginase nas formas promastigotas não resultou no aumento de carga parasitaria em macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c. Finalmente nossos dados apontaram iguais níveis de atividade de arginase e carga parasitaria para as formas intracelulares das três espécies estudadas. Portanto, os achados nesse estudo permitiram conclusões importantes acerca da fisiologia do parasito e sua interação com o macrófago. Além disso, combinando os nossos resultados com o conhecimento de outros trabalhos, acreditamos que podem ser desenvolvidas ferramentas para o

tratamento das leishmanioses utilizando a arginase como um alvo de drogas agindo de igual maneira em infecções pelas variadas espécies de *Leishmania*.

## 7. Conclusões

Com base nos dados encontrados nesse trabalho foi possível concluir que:

- A análise dos dados de sequências de nucleotídeos e aminoácidos mostraram alto nível de similaridade das sequências da arginase entre as espécies estudadas. Sendo que *L. (L.) infantum* se aproxima de *L. amazonensis*, enquanto está mais distante de *L. braziliensis*.
- Arginase é mais abundante e tem maior atividade em formas promastigotas de *L. amazonensis* quando comparada com *L. braziliensis* e *L. infantum*; sendo mais ativa nas promastigotas de fase logarítmica do que de fase estacionária;
- Macrófagos infectados por *L. amazonensis*, *L. braziliensis* e *L. infantum* apresentam semelhantes níveis de atividade da arginase e carga parasitária.
- Macrófagos estimulados por IFN- $\gamma$  infectados por *L. amazonensis*, *L. braziliensis* e *L. infantum* produzem níveis semelhantes de NO entre si, sendo inferiores aos níveis de NO produzidos por macrófagos sem infecção.

## 8. Referências

ANDRADE-NARVÁEZ, F.J., VARGAS-GONZÁLEZ A., CANTO-LARA S.B., *et al.* Clinical Picture of cutaneous leishmaniases due to *Leishmania (Leishmania) mexicana* in the Yucatan peninsula, Mexico. Mem Inst Oswaldo Cruz; 96(2): 163–7. 2001.

BADIRZADEH, A., TAHERI, T., TASLIMI, Y., *et al.* Arginase activity in pathogenic and non-pathogenic species of *Leishmania* parasites. PLoS Negl Trop Dis.;11 (7) e0005774. 7. 2017.

BASS, J. J., WILKINSON D. J., RANKIN, D., PHILLIPS, B. E., SZEWCZYK, N. J., SMITH, K., *et al.* An overview of technical considerations for Western blotting applications to physiological research. Scand. J. Med. Sci. Sports 27 4–25. 10.1111/sms.12702. 2017.

BATES, P. Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotas by phlebotomine sand flies. International Journal for Parasitology 37 :1097–1106. 2007.

BOUCHER, J.L., MOALI, C., TENU, J.P. Nitric oxide biosynthesis, nitric oxide synthase inhibitors and arginase competition for L-arginine utilization. Cell Mol Life Sci 55(8–9):1015–1028. 1999,

BRETT, D. S. AND S. H. SNYDER. "Nitric oxide: a physiologic Messenger molecule." Annu Rev Biochem 63: 175-195. 1994

BRIONES, M.R, NELSON, K, BEVERLEY, S.M. *et al.* *Leishmania tarentolae* taxonomic relatedness inferred from phylogenetic analysis of the small subunit ribosomal RNA gene. Mol Biochem Parasitol 53(1–2):121–127. 1992

CAMARGO, E.P., COELHO, J.A., MORAES, G. *et al.* *Trypanosoma* spp., *Leishmania* spp. And *Leptomonas* spp.: enzymes of ornithine-arginine metabolism. Exp Parasitol 46(2):141–144. 1978.

CORRALIZA, I. M., CAMPO, M.L., SOLER, G., MODOLELL, M. Determination of arginase activity in macrophages: a micromethod. *J.Immunol.Methods*, v. 174, n. 1-2, p. 231-235. 1994.

CORRALIZA, I. M., SOLER, G., EICHMANN, K. *et al.* Arginase induction by suppressors of nitric oxide synthesis (IL-4, IL-10 and PGE2) in murine bone-marrow-derived macrophages. *Biochem Biophys Res Commun* 206(2):667–673. 1995.

CUNNINGHAM, A.C. "Parasitic adaptive mechanisms in infection by *Leishmania*." *Exp Mol Pathol* 72(2): 132-141. 2002.

DAS, P., LAHIRI, A., LAHIRI, A., CHAKRAVORTTY, D. Modulation of the arginase pathway in the context of microbial pathogenesis: a metabolic enzyme moonlighting as an immune modulator. *PLoS Pathog.* 17;6(6). 2010.

DA SILVA, E. R., DA SILVA, M. F., FISCHER, H. *et al.* Biochemical and biophysical properties of a highly active recombinant arginase from *Leishmania (Leishmania) amazonensis* and subcellular localization of native enzyme. *Mol Biochem Parasitol* 159(2):104–111. 2008.

DA SILVA Jr, I. A., MORATO, C. I., QUIXABEIRA, V. B. L., PEREIRA, L. I. A., DORTA, M. L., DE OLIVEIRA, M. A. P., *et al.* *In Vitro* Metacyclogenesis of *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *Leishmania (Leishmania) amazonensis* clinical field isolates, as evaluated by morphology, complement resistance, and infectivity to human macrophages. *Bio Med Res Int.*;2015:15. 2015.

DA SILVA, M. F. L., ZAMPIERI, R. A., MUXEL, S. M., BEVERLEY, S. M., FLOETER-WINTER LM. *Leishmania amazonensis* Arginase Compartmentalization in the Glycosome Is Important for Parasite Infectivity. *PLoS ONE* 7(3): e34022. 2012

DA SILVA, M. F. L. & FLOETER-WINTER, L. M. Arginase in *Leishmania*. *Subcell Biochem.* 74:103-17. 2014.

DI COSTANZO, L., SABIO, G., MORA, A. Crystal structure of human arginase I at 1.29-Å resolution and exploration of inhibition in the immune response. *Proc Natl Acad Sci USA* 102(37):13058–13063. 2005.

DIEFENBACH A., SCHINDLER H., DONHAUSER N, LORENZ E., LASKAY T., J. MACMICKING, RÖLLINGHOFF M., GRESSER I., BOGDAN C,. Type 1 interferon (IFN $\alpha$ /beta) and type 2 nitric oxide synthase regulate the innate immune response to a protozoan parasite. *J. Immunol.* 8: 77 - 87. 1998.

DING, A.H., NATHAN, C.F., STUEHR, D.J. Release of active nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages comparison of activating cytokines and evidence for independent production. *J. Immunol.* 141:2407-2412. 1998.

ESPINOSA, O. A. , SERRANO, M. G., CAMARGO, P. E., TEIXEIRA, M. M. G., SHAW, J. J. An appraisal of the taxonomy and nomenclature of trypanosomatids presently classified as *Leishmania* and *Endotrypanum*. *Parasitology*;15:430–442. 2016.

GAUR, U., S. C. ROBERTS, *et al.* "An effect of parasite-encoded arginase on the outcome of murine cutaneous leishmaniasis." *J Immunol* 179(12): 8446-8453. 2007.

GRIMALDI, G., TESH, R.B., Leishmaniases of the new world: current concepts and implications for future research. *Clinical Microbiology Reviews.* p. 230-250 vol. 6, no. 3. 1993.

GONTIJO, B., CARVALHO, M. L. R. Leishmaniose tegumentar americana. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* vol.36, n.1, pp.71-80. 2003.

GONTIJO, C.M.F, MELO, M.N. Leishmaniose Visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. Rev. Bras. Epidemiol. Vol. 7, Nº 3, p. 338-349. 2004.

GREEN, L.C, WAGNER, D.A., GLOGOWSKI, J., SKIPPER, P.L, WISHNOK, J.S., TANNENBAUM, S.R. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N] nitrate in biological fluids. Anal Biochem;126:131-138. 1982.

HIBBS, J.B. Jr, TAINTOR, R. R., VAVRIN, Z. Macrophage cytotoxicity: role for L-arginine deiminase and imino nitrogen oxidation to nitrite. Science 235(4787):473–476. 1987.

INIESTA, V., CARCELEN. J., MOLANO, I. Arginase I induction during *Leishmania major* infection mediates the development of disease. Infect Immun 73(9):6085–6090. 2005.

KROPF, P., FUENTES, J. M, FAHRNICH, E, ARPA, L, HERATH, S, WEBER V, SOLER G, CELADA, A, MODOLELL M, MULLER I. Arginase and polyamine synthesis are key factors in the regulation of experimental leishmaniasis *in vivo*. FASEB J., v. 19, n. 8, p. 1000-1002. 2005.

LAINSON, R., SHAW, J.J. Evolution, classification and geographical distribution. In: Peters Killick-Kendrick, ed.-The leishmaniasis in biology and Medicine. London Academic Press, v-1:1-128. 1987.

LLANES, A., RESTREPO, C. M., VECCHIO, D. V., ANGUIZOLA, F. J. & LLEONART, R. The genome of *Leishmania panamensis*: insights into genomics of the L. (*Viannia*) subgenus. Scientific Reports v.5, Article number: 8550. 2015.

LIMA, B. S. S. *Identificação de proteínas imunogênicas e diferencialmente abundantes em Leishmania (Leishmania) amazonensis, L. (Viannia) braziliensis e L. infantum*. 2017. 130f. Tese de doutorado - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

MAKSOURI, H., DANG, P. M., RODRIGUES, V., ESTAQUIER, J., RIYAD, M., AKARID, K. Moroccan strains of *Leishmania major* and *Leishmania tropica* differentially impact on nitric oxide production by macrophages. *Parasites & Vectors*.10:506. 2017.

MANDAL, A., DAS S., ROY S., GHOSH A.K., SARDAR A.H., VERMA S., SAINI S., SINGH R., ABHISHEK K., KUMAR A., MANDAL C., DAS P. Deprivation of L-arginine induces oxidative stress mediated apoptosis in *Leishmania donovani* promastigotes: contribution of the polyamine pathway. *PLoS Negl. Trop. Dis.*, 10 (1) p. e0004373). 2016.

MAQUIAVELI, C. D. C., ROCHETTI, A. L., FUKUMASU, H., VIEIRA, P. C., DA SILVA, E. R. Antileishmanial activity of verbascoside: Selective arginase inhibition of intracellular amastigotes of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* with resistance induced by LPS plus IFN- $\gamma$ . *Biochem Pharmacol*.127:28-33. 2017.

MATLASHEWSKI, G. *Leishmania* infection and virulence. *Medical Microbiology and Immunology*, v.190, p.37-42. 2001.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral. Brasília, Ministério da Saúde. 2006.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar americana. Brasília, Ministério da Saúde. 2007.

MUKBEL, R. M., PATTEN, C. Jr, GIBSON, K., GHOSH, M., PETERSEN, C., JONES, D. E. Macrophage killing of *Leishmania amazonensis* amastigotes requires both nitric oxide and superoxide. *Am J Trop Med Hyg.* 76(4):669-75. 2007.

MULEME, H. M., REGUERA, R. M., BERARD, A., AZINWI, R., JIA, P., OKWOR, I. B., BEVERLEY, S., AND UZONNA, J. E. Infection with arginase-

deficient *Leishmania major* reveals a parasite number-dependent and cytokine-independent regulation of host cellular arginase activity and disease pathogenesis. *J. Immunol.* 183, 8068–8076. 2009.

MUXEL, S. M., AOKI, J. I., FERNANDES, J. C. R. , LARANJEIRA-SILVA, M. F., ZAMPIERI, R. A., ACUÑA, S. M., *et al.* . Arginine and polyamines fate in leishmania infection. *Front Microbiol.* 8:2682. 10.3389/fmicb.2017.02682. 2017.

PIRES, S. F., FIALHO, L.C. Jr, SILVA, S. O., MELO, M. N., SOUZA, C. C., TAFURI, W. L, BRUNA-ROMERO, O., ANDRADE, H. M. Identification of Virulence Factors in *Leishmania infantum* Strains by a Proteomic Approach. *J Proteome Res.* 13(4):1860-72. 2014.

RATH, M., MULLER, I., KROPF, P., CLOSS, E. I., AND MUNDER, M. Metabolism via arginase or Nitric Oxide synthase: two competing arginine pathways in macrophages. *Front. Immunol.* 5:532. 2014.

REGUERA, R. M., R. BALANA-FOUCE, *et al.* "*Leishmania major* lacking arginase (ARG) are auxotrophic for polyamines but retain infectivity to susceptible BALB/c mice." *Mol Biochem Parasitol* 165(1): 48-56. 2009.

ROBERTS, S. C., M. J. TANCER, *et al.* "Arginase plays a pivotal role in polyamine precursor metabolism in *Leishmania*. Characterization of gene deletion mutants." *J Biol Chem* 279(22): 23668-23678. 2004.

SACKS, D. L. Metacyclogenesis in *Leishmania* promastigotes. *Experimental Parasitology.* 69(1):100–103. 1989.

SACKS, D. L., PIMENTA, P. F., MCCONVILLE, M. J., SCHNEIDER, P., TURCO SJ. Stage-specific binding of *Leishmania donovani* to the sand fly vector midgut is regulated by conformational changes in the abundant surface lipophosphoglycan. *J Exp Med* 181(2):685–697.1995.

SERAFIM, T. D., COUTINHO-ABREU L. V., OLIVEIRA F., MENESES C., KAMHAWI S., VALENZUELA, J. G. Sequential blood meals promote *Leishmania* replication and reverse metacyclogenesis augmenting vector infectivity. *Nature Microbiology*, vol 3, may 2018. 548–555. 2018.

SILVEIRA, F. T.; LAINSON, R.; CORBETT, C. E. P. Clinical and immunopathological spectrum of American cutaneous leishmaniasis with reference to the disease in Amazonian Brazil- A Review. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 99 (3): 239-251. 2004.

DESCOTEAUX, A., TURCO, S. J, Glycoconjugates in *Leishmania* infectivity. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, Vol 1455, Issues 2–3, p. 341-352.1999.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Leishmaniasis / Epidemiological situation. Disponível em: <http://www.who.int/leishmaniasis/burden/en/>.

WANASEN, N. AND L. SOONG. "L-arginine metabolism and its impact on host immunity against *Leishmania* infection." *Immunol Res* 41(1): 15-25. 2008.

WEEKES, J., WHEELER, C. H., YAN, J. X.; WEIL, J.; ESCHENHAGEN, T.; SCHOLTYSIK, G.; DUNN, M. J. Bovine dilated cardiomyopathy: proteomic analysis of an animal model of human dilated cardiomyopathy. *Electrophoresis*, 20, 898–906. 1999.

WU, G., MORRIS, S. M. Jr. Arginine metabolism: nitric oxide and beyond. *Biochem J* 336(Pt 1):1–17 1998.

YAO, C.; DONELSON, J. E. Internal and Surface-Localized Major Surface Proteases of *Leishmania* spp. and Their Differential Release from Promastigote. *Eukaryotic Cell*, v.6, p.1905–1912. 2007.

YOUNG, D.G. & M.A. DUNCAN. Guide to the identification and geographic distribution of *Lutzomyia* sand flies in the Mexico, the West Indies, Central and

the South America (Diptera:Psychodidae). Mem. Am. Entomol. Inst. 54, 881p.  
1994.