

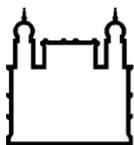
MINISTÉRIO DA SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

Análise comparativa de aspectos biológicos e moleculares de isolados
de *Leishmania infantum*

Taiana Ferreira Paes

Rio de Janeiro
2017



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

TAIANA FERREIRA PAES

Análise comparativa de aspectos biológicos e moleculares de isolados de
Leishmania infantum

Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biologia Celular e Molecular.

Orientadora: Dr^a. Leonor Laura Leon

RIO DE JANEIRO

2017

Paes, Taiana Ferreira.

Análise comparativa de aspectos biológicos e moleculares de isolados de *Leishmania infantum* / Taiana Ferreira Paes. - Rio de Janeiro, 2017.
xix, 74 f.; il.

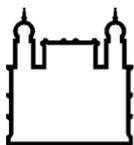
Dissertação (Mestrado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, 2017.

Orientadora: Leonor Laura Leon.

Bibliografia: f. 56-72

1. Isolados de *Leishmania infantum*. 2. Diferenças biológicas e moleculares. 3. Metabolismo da L-arginina. 4. Arginase. 5. Óxido nítrico sintase. I. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da Biblioteca de Manguinhos/ICICT com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

AUTORA: TAIANA FERREIRA PAES

**ANÁLISE COMPARATIVA DE ASPECTOS BIOLÓGICOS E MOLECULARES DE
ISOLADOS DE *Leishmania infantum***

ORIENTADORA: Dr^a. Leonor Laura Leon

Aprovada em: 27/07/2017

EXAMINADORES:

Prof. Dr^a. Solange Lisboa de Castro (IOC/FIOCRUZ) – Presidente/Revisora

Prof. Dr^a. Silvia Amaral Gonçalves da Silva (UERJ)

Prof. Dr. Carlos Roberto Alves (IOC/FIOCRUZ)

Prof. Dr^a. Aurea Echevarria (UFRRJ) ~~Karen dos Santos Charret (IOC/Fiocruz)~~
Suplente

Prof. Dr^a. Paula Mello De Luca (IOC/FIOCRUZ) ~~Wallace Pacienza Lima (UFRJ)~~
Suplente

Rio de Janeiro, 27 de julho de 2017.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz



Ministério da Saúde

Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz

DECLARAÇÃO

Declaramos que a defesa pública da dissertação de mestrado em Biologia Celular e Molecular, área de concentração: Biologia Celular e Molecular, de Taiana Ferreira Paes, realizou-se no vigésimo sétimo dia do mês de julho de dois mil e dezessete, às dez horas, no Auditório Emmanuel Dias/FIOCRUZ.

Título da dissertação de mestrado: “Análise comparativa de aspectos biológicos e moleculares de isolados de *Leishmania infantum*”.

Orientação: Dr^a. Leonor Laura Pinto Leon

Revisão: Dr^a. Solange Lisboa de Castro

Banca Examinadora: Dr^a. Solange Lisboa de Castro – IOC/FIOCRUZ(Presidente)

Dr^a. Silvia Amaral Gonçalves da Silva – UERJ/RJ (Membro titular)

Dr. Carlos Roberto Alves – IOC/FIOCRUZ (Membro titular)

Dr^a. Aurea Echevarria - UFRRJ/RJ (Suplente)

Dr^a. Paula Mello De Luca – IOC/FIOCRUZ(Suplente)

Informamos ainda que a referida aluna deve cumprir exigências previstas em regimento da Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular para a obtenção de seu título.

Rio de Janeiro, 27 de Julho de 2017


Leila de Mendonça Lima
Matriculada SIAPE 11919958

Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular
Instituto Oswaldo Cruz/Fiocruz

Documento registrado sob nº DCE-4871/16 no livro nº 1, folha 72v em 27/07/2017.

À minha mãe e à minha irmã, por todo o apoio e incentivo nessa jornada.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Maria Isabel e Genésio, e irmã Tatiana, pelo carinho e incentivo para seguir na vida acadêmica. Em especial a minha mãe, que sempre foi meu suporte durante essa caminhada e pela paciência durante minhas longas horas de estudo.

À minha orientadora Dr^a Leonor Laura Leon por todo o apoio, atenção e paciência durante o andamento deste projeto. Obrigada pela confiança em mim depositada e por todo o conhecimento fornecido.

À Dr^a Raquel Ferreira Rodrigues, por me acolher na iniciação científica e pelo auxílio nos diversos experimentos deste trabalho. E à Dr^a Karen dos Santos Charret por seu conhecimento e toda a ajuda no desenvolvimento das técnicas de biologia molecular.

À Dr^a Solange Lisboa de Castro, à Dr^a Silvia Amaral Gonçalves da Silva e Dr. Carlos Roberto Alves por aceitarem o convite para participar da banca de avaliação, em especial a Dr^a Solange pela revisão desta dissertação.

Às amigas científicas Gabriella Ozório e Luiza Gervazoni por aturarem todas as minhas loucuras diárias, por todo o apoio e por todos os momentos divertidos que me proporcionaram boas gargalhadas.

À aluna de iniciação científica Merienny Ribeiro pelo auxílio em alguns experimentos deste trabalho.

À toda equipe do Laboratório de Bioquímica de Tripanosomatídeos por toda a contribuição científica fornecida.

Aos meus amigos dos tempos do colégio Paloma e Victor

Hugo por todos esses anos de amizade, companheirismo e cumplicidade e também por todo o incentivo na minha busca por uma carreira científica.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) e Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) pelo suporte financeiro para a realização deste projeto.

“De tudo, ficaram três coisas:
A certeza de que estamos sempre começando...
A certeza de que precisamos continuar...
A certeza de que seremos interrompidos antes de terminar...
Portanto devemos:
Fazer da interrupção um caminho novo...
Da queda um passo de dança...
Do medo, uma escada...
Do sonho, uma ponte...
Da procura, um encontro...”

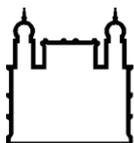
Fernando Pessoa

“Que os vossos esforços desafiem as impossibilidades, lembrai-vos de que as grandes coisas do homem foram conquistadas do que parecia impossível.”

Charles Chaplin

“O cientista não é o homem que fornece as verdadeiras respostas; é quem faz as verdadeiras perguntas.”

Claude Lévi-Strauss



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

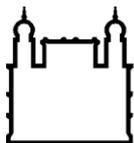
ANÁLISE COMPARATIVA DE ASPECTOS BIOLÓGICOS E MOLECULARES DE ISOLADOS DE *Leishmania infantum*

RESUMO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

Taiana Ferreira Paes

As leishmanioses são doenças que apresentam uma ampla variedade de manifestações clínicas, que dependem da espécie de *Leishmania* e do estado imunológico do hospedeiro. *Leishmania (infantum) infantum* (LII) é uma das espécies que causam a leishmaniose visceral (LV) e está presente no Velho Mundo (VM), já a *L. (i.) chagasi* (LIC), que está presente no Novo Mundo (NM), é responsável pela LV na América Latina sendo considerada idêntica à *L. (i.) infantum* do ponto de vista molecular. No entanto, poucos trabalhos abordam as diferenças biológicas, tais como o comportamento destes parasitos durante a infecção. Estes protozoários vivem no interior das células de seus hospedeiros, evadindo continuamente dos mecanismos microbicidas e modulando a resposta imune. Um dos mecanismos utilizados por estes protozoários envolve o metabolismo da L-arginina, uma vez que esse aminoácido é compartilhado por duas enzimas, a óxido nítrico sintase (NOS) e a arginase (ARG), que podem atuar na morte, através da produção de óxido nítrico (NO), ou na sobrevivência e multiplicação do parasito em macrófagos, através da produção de poliaminas. Dada a importância de se compreender as diferenças entre as espécies de *Leishmania*, assim como de se estabelecer um melhor modelo murino para o estudo da leishmaniose, o objetivo central deste trabalho foi: buscar diferenças biológicas e moleculares entre *L. (i.) infantum* (LII) e *L. (i.) chagasi* (LIC), bem como investigar o papel da arginase/NOS na relação parasito-hospedeiro. A LII mostrou-se mais infectiva que a LIC tanto *in vivo* quanto *in vitro*. Observou-se que camundongos BALB/c foram mais susceptíveis à infecção do que os *Swiss Webster*. Nas células do baço e fígado dos animais infectados por ambos os parasitos, ocorreu uma diferença na atividade da NOS e da ARG. *In vitro*, promastigotas de LII isoladas das duas linhagens de camundongos apresentaram maior atividade da ARG do que as de LIC, porém, não se observou diferença na produção de NO intracelular entre estes parasitos. As sequências do gene da ARG foram idênticas entre ambos os parasitos. Contudo, apesar desta identidade, as promastigotas apresentaram expressão diferente deste gene. Por fim, foi realizado com sucesso a clonagem do gene da ARG em sistema heterólogo. Com este trabalho, pode-se concluir que apesar da *L. (i.) chagasi* ser considerada idêntica a *L. (i.) infantum*, ambas apresentam diferenças nos comportamentos biológico e molecular.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

COMPARATIVE ANALYSIS OF BIOLOGICAL AND MOLECULAR ASPECTS OF *Leishmania infantum* ISOLATES

ABSTRACT

MASTER DISSERTATION IN MOLECULAR AND CELL BIOLOGY

Taiana Ferreira Paes

Leishmaniases are diseases with a wide variety of clinical manifestations, which are dependent on the *Leishmania* species and the host's immune status. *Leishmania (infantum) infantum* (LII) is one of the species that causes the visceral leishmaniasis (VL) and is present in the Old World (OW), while *L. (i.) chagasi* (LIC), that is present in the New World (NW), is responsible for VL in Latin America and is considered identical to *L. (i.) infantum* from the molecular point of view. However, few studies address the biological differences, as well as the behavior of these strains during infection. These parasites live inside the cells of their hosts, continuously evading the microbicidal mechanisms and modulating the immune response. One of the mechanisms used by these protozoa involves the L-arginine metabolism, since this amino acid is shared by two enzymes, nitric oxide synthase (NOS) and arginase (ARG), which can act directly on death, through nitric oxide (NO) production, or in the survival and multiplication of the parasite in macrophages, through the polyamines production. Given the importance of the understanding of differences between *Leishmania* species, as well as establishing a better murine model to study leishmaniases, the main objective of this work was to analyze the biological and molecular differences between *L. (i.) infantum* (LII) and *L. (i.) chagasi* (LIC), as well as to investigate the role of arginase/NOS in the parasite-host relationship. Therefore, the LII showed more infective than the LIC both in vivo and in vitro. In addition, BALB/c mice were more susceptible to infection than Swiss Webster mice. In the spleen and liver cells of the animals infected by both parasites, a difference in NOS and ARG activity occurred. In vitro, promastigotes of LII isolated from the two lineages of mice showed higher ARG activity than those LIC, however, no difference was observed in intracellular NO production between these parasites. The sequences of the ARG gene was identical between both parasites. However, despite the identity, the promastigotes showed different expression of this gene. Finally, the cloning of the ARG gene in a heterologous system was successfully performed. With this work, it can be concluded that although *L. (i.) chagasi* are considered identical to *L. (i.) infantum*, both have different biological and molecular behavior.

SUMÁRIO

<i>AUTORA: TAIANA FERREIRA PAES</i>	iv
Agradecimentos	viii
Índice de Figuras.....	xv
Lista de Siglas e Abreviaturas.....	xviii
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Parasitos do gênero <i>Leishmania</i>	1
1.1.1. Ciclo biológico.....	2
1.1.2. Formas clínicas da leishmaniose	4
1.1.3. Tratamento	7
1.1.4. <i>Leishmania infantum</i> versus <i>Leishmania chagasi</i>	9
1.2. Metabolismo da L-arginina	11
1.2.1. Óxido nítrico sintase	14
1.2.2. Arginase.....	15
1.3. Modelos animais para estudo das leishmanioses	16
2. JUSTIFICATIVA.....	18
3. OBJETIVOS.....	19
a. Objetivo Geral	19
b. Objetivos Específicos	19
4. MATERIAL E MÉTODOS	20
4.1. Manutenção dos parasitos	20
4.2. Animais	20
4.3. Infecção dos camundongos.....	20
4.4. Carga parasitária.....	21
4.5. Curva de crescimento dos parasitos	21
4.6. Análise da metaciclogênese dos parasitos	21
4.7. Obtenção e infecção de macrófagos peritoneais murinos.....	22

4.8.	Avaliação da produção de NO extracelular	22
4.9.	Dosagem de NO intracelular	23
4.10.	Determinação da atividade de arginase	24
4.11.	Extração de DNA.....	25
4.12.	Reação de Polimerase em Cadeia (PCR) convencional	25
4.13.	Sequenciamento do gene da arginase	25
4.14.	Avaliação da expressão da arginase por qRT-PCR	26
4.15.	Construção do plasmídeo com inserto	26
4.16.	Obtenção e seleção dos clones recombinantes	27
4.17.	Análise da expressão da proteína recombinante através de eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS (SDS- PAGE)	27
4.18.	Análise estatística	28
5.	RESULTADOS.....	29
5.1.	Infecção <i>in vivo</i>	29
5.1.1.	Peso dos órgãos	29
5.1.2.	Avaliação da carga parasitária.....	30
5.1.3.	Avaliação da atividade das enzimas NOS e arginase	31
5.1.3.1.	Avaliação da produção total da NO em células infectadas.....	32
5.1.3.2.	Avaliação da produção total de ureia em células infectadas ...	33
5.2.	Avaliações <i>in vitro</i>	35
5.2.1.	Perfil de proliferação dos parasitos de <i>L. infantum</i> isoladas das diferentes linhagens de camundongos.....	35
5.2.2.	Análise do percentual de formas metacíclicas nas culturas de <i>L. infantum</i>	36
5.2.3.	Infecção <i>in vitro</i>	36
5.2.4.	Avaliação indireta da atividade da NOS em promastigotas de <i>L.</i> <i>infantum</i>	38
5.2.5.	Avaliação da produção de ureia em promastigotas de <i>L. infantum</i>	41

5.3.	Análises moleculares	42
5.3.1.	Avaliação da expressão da arginase	42
5.3.2.	Sequenciamento do gene da arginase	43
5.3.3.	Clonagem do gene da arginase	45
6.	DISCUSSÃO	48
7.	CONCLUSÕES	55
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	56
9.	APÊNDICES E/OU ANEXOS	73

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1. Insetos vetores das leishmanioses	2
Figura 1.2. Formas biológicas de <i>Leishmania</i> spp.	3
Figura 1.3. Ciclo biológico de <i>Leishmania</i> spp.	4
Figura 1.4. Manifestações clínicas das leishmanioses	7
Figura 1.5. Resposta imune durante a infecção por <i>Leishmania</i>	11
Figura 1.6. Esquema do metabolismo da L-arginina na célula hospedeira	14
Figura 4.1. Representação da ação do indicador DAF-2DA na detecção de NO no interior de células vivas	25
Figura 5.1. Peso total do baço de camundongos infectados por diferentes cepas de <i>L. infantum</i>	30
Figura 5.2. (a) Carga parasitária no baço. (b) Carga parasitária no fígado	31-32
Figura 5.3. (a) Produção de NO nas células do baço. (b) Produção de NO nas células do fígado	33-34
Figura 5.4. (a) Produção de ureia nas células do baço. (b) Produção de ureia nas células do fígado	35
Figura 5.5. Curva de proliferação dos isolados de <i>L. infantum</i>	36
Figura 5.6. Avaliação da metaciclogênese dos isolados de <i>L. infantum</i>	37
Figura 5.7. Avaliação da produção de NO extracelular em culturas de promastigotas	40
Figura 5.8. Avaliação da produção de NO durante a infecção de macrófagos estimulados	40
Figura 5.9. Dosagem de NO intracelular em promastigotas de <i>L. infantum</i>	42
Figura 5.10. Avaliação da produção de ureia em promastigotas de <i>L. infantum</i>	43
Figura 5.11. Resultado da amplificação do gene da arginase	44
Figura 5.12. Comparação das sequências do gene da arginase	45
Figura 5.13. Expressão relativa da arginase dos isolados de	

<u> </u> - <i>L. infantum</i>	45
Figura 5.14. Resultado da digestão dos clones DH5 α -pET28-ARG em gel de agarose 1%	46
Figura 5.15. Transfecção do gene arginase de <i>L. infantum</i> em bactérias quimiocompetentes	47
Figura 5.16. Expressão do gene ARG em bactérias transfectadas	48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1. Espécies de <i>Leishmania</i> causadoras das leishmanioses humanas, formas clínicas e distribuição da doença	5
Tabela 4.1. Sequências dos <i>primers</i>	28
Tabela 5.1. Índice de infecção dos isolados de <i>L. infantum</i> em macrófagos murinos	38-39

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ARG	Arginase
bp	Pares de base
CAT	Transportador de aminoácido catiônico
cDNA	DNA complementar
cNOS	Óxido nítrico sintase constitutiva
DAF-2	3,4-diaminofluoresceína
DAF-2DA	Diacetato de 4,5-diaminofluoresceína
DAF-2T	Triazolo diaminofluoresceína
DEPC	Dietilpirocarbonato
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dpi	Pós-infecção
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
eNOS	Óxido nítrico sintase endotelial
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
GIPL	Glicoinositolfosfolípídeo
IF	Índice de infecção
IGF-I	Fator de crescimento semelhante à insulina I
IL-4	Interleucina 4
IL-10	Interleucina 10
IL-12	Interleucina 12
INF- γ	Interferon-gama
iNOS	Óxido nítrico sintase induzida
IPTG	Isopropil β -D-1-tiogalactopiranosídeo
kbp	Quilo pares de base
kDNA	DNA do cinetoplasto
LCD	Leishmaniose cutânea difusa
LCDis	Leishmaniose cutânea disseminada
LCL	Leishmaniose cutânea localizada
LdAAP3	Aminoácido permease de <i>Leishmania donovani</i>
LDPC	Leishmaniose dérmica pós-calazar
LIC	<i>Leishmania infantum chagasi</i>
LIC.B	<i>Leishmania infantum chagasi</i> isolada de BALB/c

LIC.S	<i>Leishmania infantum chagasi</i> isolada de Swiss Webster
LII	<i>Leishmania infantum infantum</i>
LII.B	<i>Leishmania infantum infantum</i> isolada de BALB/c
LII.S	<i>Leishmania infantum infantum</i> isolada de Swiss Webster
LMC	Leishmaniose mucocutânea
LPS	Lipopolissacarídeo
LT	Leishmaniose tegumentar
LV	Leishmaniose visceral
LVA	Leishmaniose visceral americana
MLEE	Eletroforese de enzima multilocus
MØ	Macrófago
mRNA	RNA mensageiro
NADPH	Fosfato de nicotinamida e adenina dinucleotídeo reduzido
NM	Novo Mundo
nNOS	Óxido nítrico sintase neuronal
NO	Óxido nítrico
NOHA	N ^ω -hidroxil-L-arginina
NOS	Óxido nítrico sintase
PBS	Tampão salino-fosfato
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PMSF	Fluoreto de fenilmetilsulfonila
qPCR	PCR quantitativa (PCR em tempo real)
RAPD	Amplificação ao acaso de DNA polimórfico
RNA	Ácido ribonucleico
RNAse	Ribonuclease
RNS	Espécies reativas nitrogenadas
ROS	Espécies reativas de oxigênio
RT-qPCR	PCR quantitativa com transcrição reversa
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida-dodecil sulfato de sódio
SFB	Soro fetal bovino
TBE	Solução tampão Tris/borato/EDTA
TGF-β	Fator de transformação do crescimento beta
Th1	Célula <i>T helper</i> do tipo 1
Th2	Célula <i>T helper</i> do tipo 2

TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
VM	Velho Mundo

1. INTRODUÇÃO

As leishmanioses são um conjunto de doenças infecciosas causadas por parasitos protozoários do gênero *Leishmania*. São consideradas doenças tropicais negligenciadas e estão entre as seis grandes endemias humanas desde a década de 90. Estão distribuídas em 98 países abrangendo os continentes europeu, asiático, africano e americano, no entanto, mais de 90% dos novos casos ocorrem em treze países: Afeganistão, Argélia, Bangladesh, Bolívia, Brasil, Colômbia, Etiópia, Índia, Irã, Peru, Síria, Sudão e Sudão do Sul (WHO 2010; Alvar *et al.* 2012).

Estima-se que 900 mil a 1,7 milhão de novos casos e 20 a 30 mil mortes por ano são atribuídas a essa doença, a qual pode manifestar-se em várias formas com sintomas diferentes, dependendo das espécies infectantes e da resposta imune do hospedeiro (WHO 2016).

1.1. Parasitos do gênero *Leishmania*

Os protozoários unicelulares da classe Kinetoplastida, ordem Trypanosomatida, família Trypanosomatidae, gênero *Leishmania* e subgêneros *Leishmania* ou *Viannia* (Lainson 2010) são parasitos flagelados que apresentam uma diversidade biológica, além de diferenças genéticas e bioquímicas, que influenciam diretamente na sua virulência e no tropismo no hospedeiro vertebrado. Estes parasitos apresentam uma estrutura chamada cinetoplasto, que são minicírculos de DNA mitocondrial localizados no interior de sua mitocôndria única.

São classificadas cerca de 20 espécies de *Leishmania* capazes de infectar o ser humano e que são responsáveis por causar as diferentes manifestações clínicas da leishmaniose (Cupolillo 2000). As principais formas da doença são a leishmaniose tegumentar (LT) e a leishmaniose visceral (LV), sendo esta última a forma mais letal (WHO 2010).

Estes parasitos apresentam um ciclo biológico heteroxênico (descrito no item 1.1.1), sendo necessária a passagem por dois hospedeiros distintos, um invertebrado e outro vertebrado. Os hospedeiros invertebrados ou vetores são pequenos insetos da subfamília Phlebotominae e de dois diferentes gêneros, *Phlebotomus* (Fig. 1.1a) e *Lutzomyia* (Fig. 1.1b). São descritas cerca de 98 espécies de flebotomíneos de ambos os gêneros capazes de transmitir as leishmanioses em

humanos, dentre as quais, 42 espécies do gênero *Phlebotomus*, encontradas no Velho Mundo, e 56 espécies do gênero *Lutzomyia*, encontradas no Novo Mundo (Sharma & Singh 2008; Maroli *et al.* 2013).

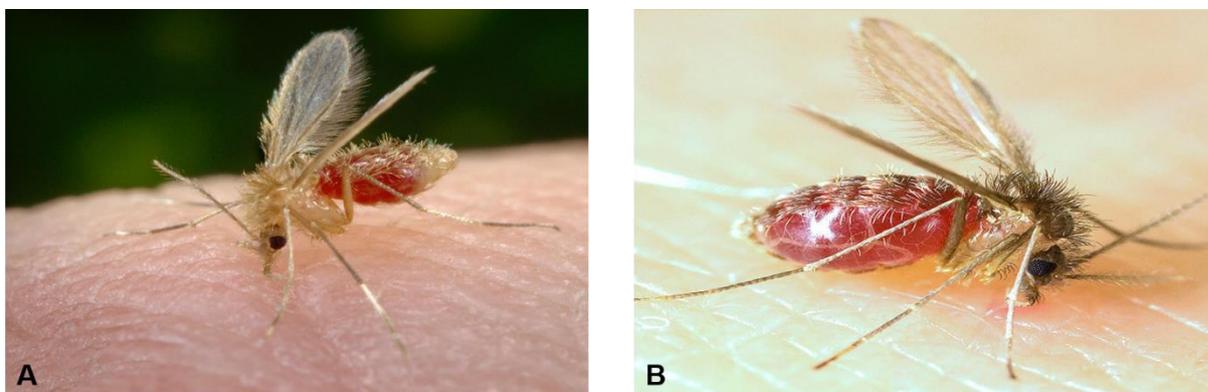


Figura 1.1. Insetos vetores das leishmanioses: (a) *Phlebotomus papatasi*; (b) *Lutzomyia longipalpis* (Center for Diseases Control and Prevention 2006; Ray Wilson 2009)

1.1.1. Ciclo biológico

A *Leishmania* apresenta duas formas biológicas durante o seu ciclo de vida: a forma promastigota (Fig. 1.2a), que se desenvolve no interior do tubo digestivo do inseto vetor, e a forma amastigota (Fig. 1.2b) que reside no interior de células fagocíticas do hospedeiro vertebrado. As promastigotas possuem corpo fusiforme e alongado de 1-4 μm , um núcleo central e cinetoplasto localizado na região terminal do corpo, além de um flagelo livre medindo de 14-20 μm de comprimento. As amastigotas possuem corpo arredondado de 2-5 μm de diâmetro, um cinetoplasto próximo ao núcleo e um flagelo rudimentar interno (Vannier-Santos *et al.* 2002). Sob esta forma, a *Leishmania* demonstra grande capacidade de sobrevivência, uma vez que elas se multiplicam no interior do fagolisossomo de células do sistema fagocítico mononuclear, que consiste em um ambiente inóspito com pH variando entre 4,5 e 5,0.

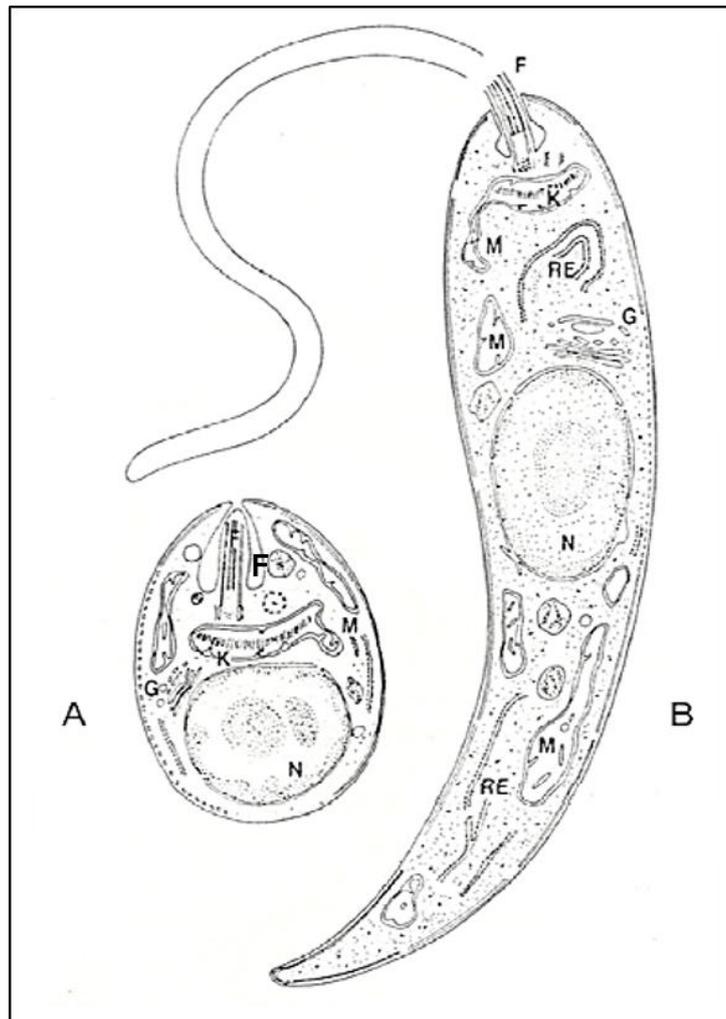


Figura 1.2. Formas biológicas de *Leishmania* spp. (a) Forma amastigota. (b) Forma promastigota. F: flagelo; G: complexo de Golgi; K: cinetoplasto; M: mitocôndria; N: núcleo; RE: retículo endoplasmático (adaptada de Rey 1992).

O ciclo biológico destes parasitos inicia-se quando o inseto vetor infectado realiza o repasto sanguíneo e regurgita formas promastigotas metacíclicas (forma infectante) no hospedeiro vertebrado (Warburg & Schlein 1986), sendo então fagocitadas por macrófagos. No interior dos macrófagos, estes parasitos passam a habitar nos fagolisossomos, também chamados de vacúolos parasitóforos, diferenciam-se em formas amastigotas e multiplicam-se por divisão binária até o rompimento da célula hospedeira (Russell & Talamas-Rohana 1989). As amastigotas livres são fagocitadas pelas células adjacentes mantendo assim a infecção. Seguindo o ciclo, um novo flebotomíneo realiza seu repasto sanguíneo e ingere células infectadas com as amastigotas. No intestino destes insetos, as células hospedeiras são lisadas, liberando assim as amastigotas que, posteriormente, transformam-se em

promastigotas procíclicas (forma não infectante) e multiplicam-se de forma logarítmica. Ao atingirem a fase de crescimento estacionária, sofrem novo processo de diferenciação, denominado metaciclogênese, transformando-se em promastigotas metacíclicas e migram para a probóscide do flebotomíneo até serem regurgitadas no hospedeiro vertebrado, em novo repasto sanguíneo, reiniciando o ciclo (Fig. 1.3) (Chappuis *et al.* 2007).

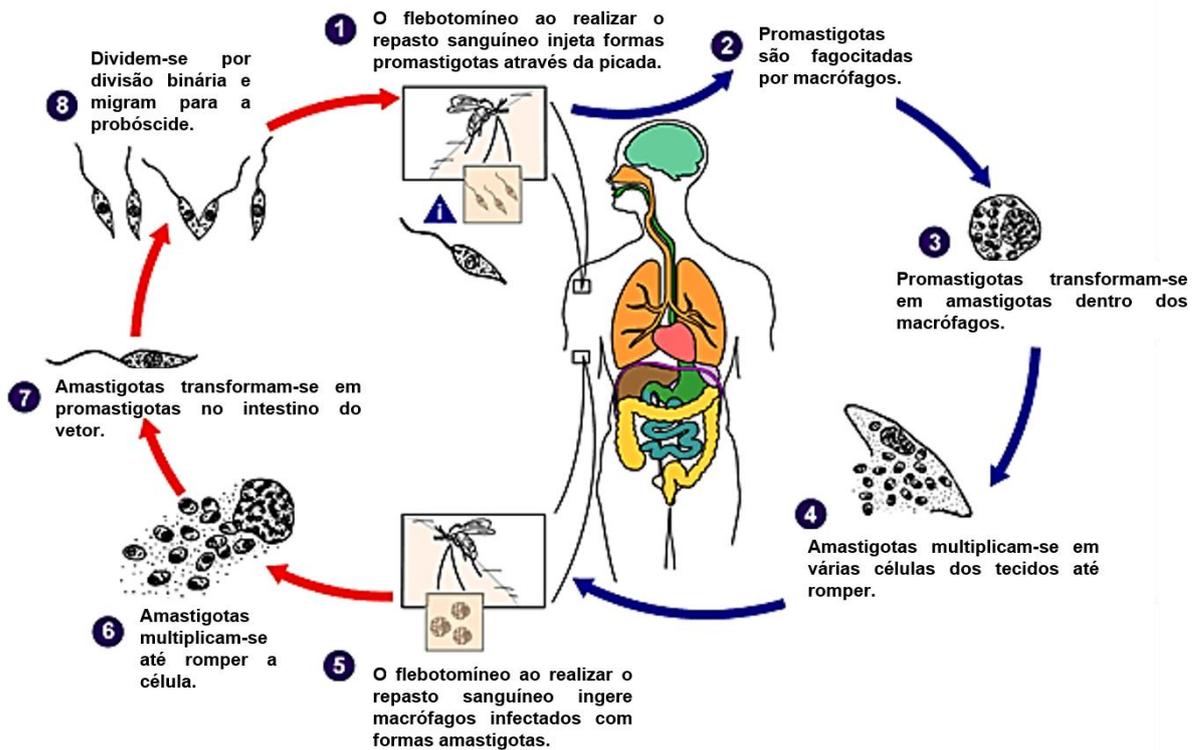


Figura 1.3. Ciclo biológico de *Leishmania* spp. (adaptado de *Center for Diseases Control and Prevention* 2013).

1.1.2. Formas clínicas da leishmaniose

As leishmanioses são doenças que causam uma ampla variedade de manifestações clínicas, as quais são dependentes da espécie de *Leishmania* e do estado imunológico do hospedeiro (Tabela 1.1). Estas doenças podem acometer a pele e as mucosas, sendo denominada leishmaniose tegumentar (LT), ou as vísceras, sendo denominada leishmaniose visceral (LV). A LT ainda pode ser dividida em outras quatro formas dependendo da localização e da forma em que se apresentam as

lesões: leishmaniose cutânea localizada (LCL), cutânea difusa (LCD), cutânea disseminada (LCDis), mucocutânea (LMC) e pós-calazar (LDPC).

Tabela 1.1. Principais espécies de *Leishmania* causadoras das leishmanioses humanas, formas clínicas e distribuição da doença

Subgênero	Espécie	Velho/Novo Mundo	Forma clínica	Distribuição
<i>Leishmania</i>	<i>L. aethiopica</i>	VM	LCL, LCD	Leste da África (Etiópia, Quênia)
	<i>L. amazonensis</i>	NM	LCL, LCD, LMC	América do Sul (Brasil, Venezuela, Bolívia)
	<i>L. donovani</i>	VM	LV, LDPC	África Central, Sul da Ásia, Oriente Médio, Índia, China
	<i>L. infantum</i> (syn. <i>L. chagasi</i>)	VM, NM	LV, LC	Região do Mediterrâneo (Norte da África, Europa), Sudeste da Europa, Oriente Médio, Ásia Central, Américas do Norte, Central e Sul (México, Venezuela, Brasil, Bolívia)
	<i>L. major</i>	VM	LC	África do Norte e Central, Oriente Médio, Ásia Central
	<i>L. mexicana</i> (syn. <i>L. pifanoi</i>)	NM	LCL, LCD	EUA, Equador, Venezuela, Peru
	<i>L. tropica</i>	VM	LCL, LV	Norte e Central da África, Oriente Médio, Ásia Central, Índia
	<i>L. venezuelensis</i>	NM	LVL	Norte da América do Sul, Venezuela
	<i>L. waltoni</i>	NM	LCD	República Dominicana
	<i>Viannia</i>	<i>L. braziliensis</i>	NM	LCL, LMC
<i>L. guyanensis</i>		NM	LCL, LMC	Norte da América do Sul (Guiana Francesa, Suriname, Brasil, Bolívia)
<i>L. lainsoni</i>		NM	LCL	Brasil, Bolívia, Peru
<i>L. lindenbergi</i>		NM	LCL	Brasil
<i>L. naiffi</i>		NM	LCL	Brasil, Guiana Francesa
<i>L. panamensis</i>		NM	LCL, LMC	Américas Central e Sul (Panamá, Colômbia, Venezuela, Brasil)
<i>L. peruviana</i>		NM	LCL, LMC	Peru, Bolívia
<i>L. shawi</i>		NM	LCL	Brasil

Adaptada de Steverding 2017.

Leishmaniose cutânea localizada (LCL): é a forma mais comum das leishmanioses, ocorrendo de 700.000 a 1,3 milhão de novos casos por ano em todo o mundo (Alvar *et al.* 2012). A LCL é caracterizada por uma lesão única na pele, com formação de úlceras ou não e geralmente encontradas em áreas expostas do corpo como braços, pernas e rosto (Fig. 1.4a).

Leishmaniose cutânea difusa (LCD): é uma forma menos comum da LT caracterizada pelo surgimento de nódulos não ulcerativos que disseminam progressivamente para diversas partes do corpo (Fig. 1.4b) (Costa & Costa 2009).

Leishmaniose cutânea disseminada (LCDis): é uma forma grave da LT caracterizada por múltiplas lesões papulares, acneiformes e ulcerativas que se localizam nas extremidades, peito, abdômen e rosto (Fig. 1.4c) (Machado *et al.* 2015).

Leishmaniose mucocutânea (LMC): é uma forma secundária da LC caracterizada por lesões crônicas e destrutivas que se espalham pela mucosa do nariz, boca e garganta. Essas lesões ulcerativas conseqüentemente podem levar à destruição parcial ou total de todo o tecido mucoso atingido, levando a desfiguração facial do hospedeiro (Fig. 1.4d) (Goto & Lindoso 2010; WHO 2017).

Leishmaniose visceral (LV) ou calazar: é a manifestação clínica mais severa uma vez leva o indivíduo acometido a óbito caso não seja tratada adequadamente. Esta patologia caracteriza-se por comprometer órgãos como baço, fígado, medula óssea e linfonodos (Fig. 1.4e). Estima-se que 200.000 a 400.000 novos casos de LV ocorrem anualmente em todo mundo e que de 20 a 30 mil mortes são atribuídas a essa forma da doença (Alvar *et al.* 2012).

Leishmaniose dérmica pós-calazar (LDPC): é uma manifestação clínica que normalmente se desenvolve como recidiva após a cura aparente da LV e costuma ocorrer em áreas endêmicas da *L. donovani*. Caracteriza-se por erupções nodulares e maculopapulares que podem ou não curar de forma espontânea (Fig. 1.4f). (Ganguly *et al.* 2010; Mukhopadhyay *et al.* 2014).

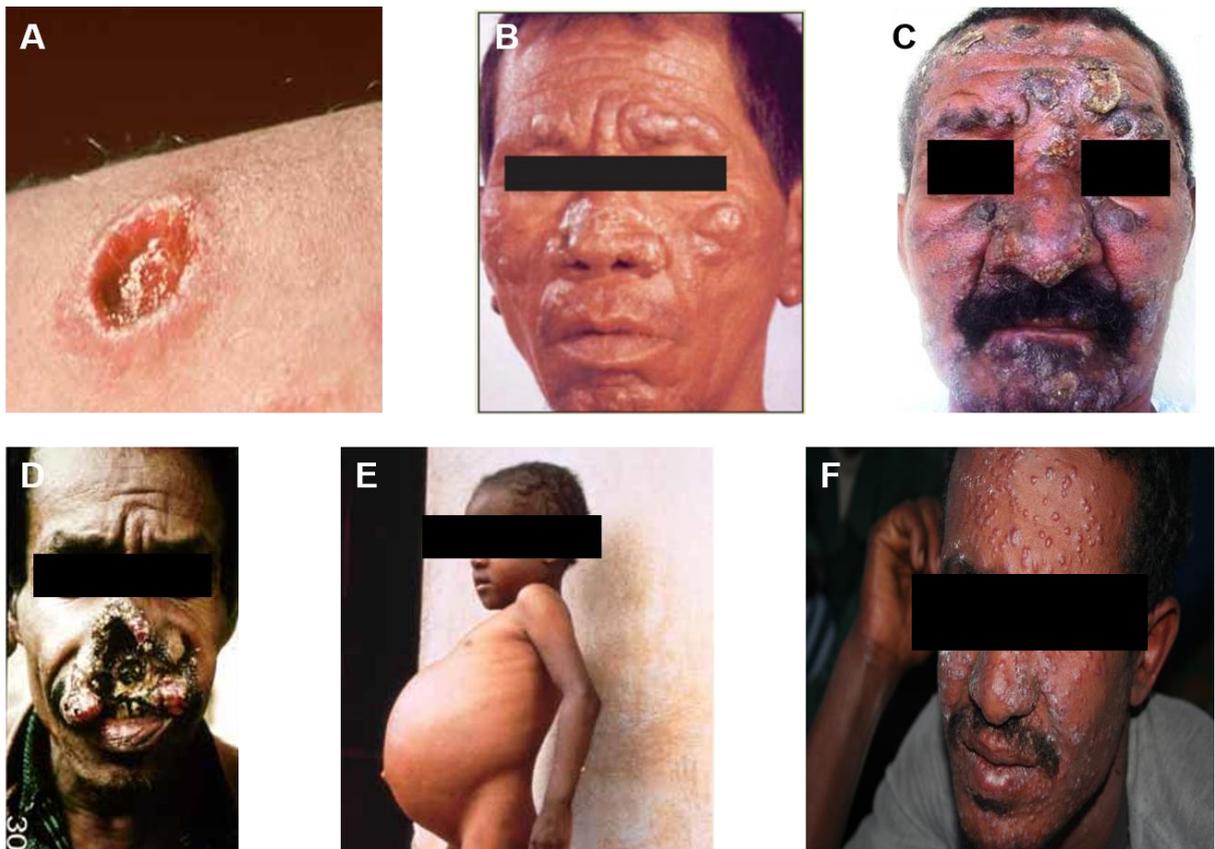


Figura 1.4. Manifestações clínicas das leishmanioses. (A) Leishmaniose cutânea localizada. (B) Leishmaniose cutânea difusa. (C) Leishmaniose cutânea disseminada (D) Leishmaniose mucocutânea. (E) Leishmaniose visceral. (F) Leishmaniose dérmica pós-calazar. (WHO 2017; Machado *et al.* 2015)

1.1.3. Tratamento

Não existem vacinas disponíveis para a prevenção das leishmanioses em humanos e a quimioterapia é a única alternativa no combate à doença. Infelizmente, o atual arsenal de medicamentos usados para tratar estas doenças não é considerado o ideal, principalmente devido à toxicidade e ausência de resposta terapêutica em muitos casos.

O principal tratamento das leishmanioses ainda é baseado nos antimoniais pentavalentes. O primeiro uso dos antimoniais para o tratamento da LT e LV foi relatado nos primeiros anos do século passado, ainda sob a forma trivalente (Vianna 1912). A partir década de 20, com o intuito de reduzir os efeitos tóxicos, foram desenvolvidos os antimoniais pentavalentes, que ainda são utilizados como primeira escolha em muitos países até os dias atuais, incluindo o Brasil. Em 1945, o

estibogluconato de sódio (Pentostan®) foi sintetizado e pouco tempo depois, surgiu o antimoniato de meglumina (Glucantime®), que juntamente com o primeiro, são utilizados para o tratamento de todas as manifestações clínicas da leishmaniose, que são administrados tanto por via intramuscular quanto por via endovenosa.

Devido à meia vida curta dos antimoniais e ao longo período de tratamento, o uso destes medicamentos causa diversos efeitos tóxicos e colaterais como: dores abdominais, náuseas, pancreatite, hepatite, mialgia e arritmia cardíaca, que muitas vezes resultam no abandono do tratamento, limitando assim o seu uso (Gasser *et al.* 1994; Sundar *et al.* 1998; Croft & Yardley 2002). Além disso, ocorrem também casos de resistência e falha terapêutica (Thakur *et al.* 1991; Croft & Coombs 2003; Ouellette *et al.* 2004)

A anfotericina B é um antifúngico polivalente comumente utilizado como segunda escolha para o tratamento da leishmaniose quando há caso de resistência ou falha terapêutica aos antimoniais. Porém, este medicamento causa alta toxicidade e diversos efeitos colaterais devido às altas concentrações plasmáticas, limitando assim seu uso (Yardley & Croft 2000). Sua atividade leishmanicida foi demonstrada nos anos 60 sendo utilizada para o tratamento da LMC (Furtado *et al.* 1960). A atividade antifúngica e anti-*Leishmania* da anfotericina B deve-se à sua alta seletividade a esteróis 24-substituídos, como o ergosterol, encontrados na membrana plasmática tanto em fungos quanto em tripanosomatídeos, enquanto em mamíferos encontra-se o colesterol.

Para reduzir os efeitos colaterais destes fármacos, formulações lipídicas têm sido utilizadas na clínica, como a anfotericina B lipossomal (AmBisome®), porém no Brasil o uso deste medicamento tem-se limitado ao tratamento da LV (Anvisa 2005; Ministério da Saúde 2011).

A pentamidina, um fármaco derivado das amidinas, é utilizado como segunda escolha e apresenta atividade tripanosomicida, antibacteriana e antifúngica (Bell *et al.* 1990). Este medicamento é administrado por via intramuscular e apresenta um mecanismo de ação ainda pouco esclarecido. Acredita-se que ele atue em múltiplos alvos, como a inibição da biossíntese de poliaminas (Basselin *et al.* 1997; Reguera *et al.* 2005), bem como o desencadeamento de processos apoptóticos pela inibição da topoisomerase II (Singh & Dey 2007). Assim como outros fármacos, a pentamidina possui uso limitado, uma vez que desenvolve efeitos colaterais como mialgia,

náuseas, tontura, cefaleia, vômitos, períodos de hipo e hiperglicemia, taquicardia e nefrotoxicidade (Berman 1997).

Outro fármaco com atividade anti-*Leishmania* é a paromomicina, que é um aminoglicosídeo que teve sua atividade demonstrada na década de 60 (Kellina 1961; Neal 1968). No entanto, já foram relatados casos de resistência com seu uso e a eficácia reduzida em pacientes com LT (Wiwanitkit 2012). Outras formulações em forma de pomada da paromomicina foram desenvolvidas a fim de aumentar a concentração do composto no local da lesão.

A miltefosina, que inicialmente foi desenvolvida para o tratamento de câncer, é uma fosfocolina utilizada como primeiro fármaco de uso oral para as leishmanioses. Sua atividade leishmanicida foi demonstrada em diversos modelos experimentais (Croft *et al.* 1987; Croft & Coombs 2003) e após estudos clínicos desenvolvidos na Índia, em 2002 passou a ser licenciada para o uso por via oral para a LV (Engel 2002). A miltefosina apresenta poucas reações adversas, como teratogenicidade em mulheres grávidas e efeitos tóxicos reversíveis (Croft & Yardley 2002), apesar disso, já foram relatados casos de falha terapêutica quanto a seu uso (Castro *et al.* 2017).

Atualmente este medicamento é licenciado para o tratamento das leishmanioses em diversos países como Índia, Nepal, Argentina, Bangladesh, Bolívia, Colômbia, Equador, Alemanha, Guatemala, Honduras, México, Paquistão, Paraguai e Peru (Paladin Labs Inc. 2010), além de ter seu uso liberado pelo *Food and Drug Administration* (FDA) nos Estados Unidos (FDA 2014). No entanto, no Brasil, a miltefosina ainda não foi licenciada para o uso humano, porém já foi aprovada para o tratamento da LV canina (Ministério da Agricultura 2016).

Apesar dos recentes avanços da segurança, resistência e do custo de produção dos diversos fármacos para o tratamento das leishmanioses, existe ainda a necessidade de um esforço contínuo para melhor identificar os fármacos com potencial anti-*Leishmania*.

1.1.4. *Leishmania infantum* versus *Leishmania chagasi*

A LV é causada por parasitos das espécies *L. donovani*, *L. infantum* (encontradas no Velho Mundo) e *L. chagasi* (encontrada no Novo Mundo). A *L. infantum* está presente em toda a bacia mediterrânea. Contudo, existem focos também no Oriente Médio e no sul asiático, além de casos esporádicos muito

dispersos na China. A *L. chagasi*, com cepas circulantes no Novo Mundo, é responsável pela LV na América Latina (Alvar *et al.* 2004).

Durante anos, uma grande discussão tem sido mantida a respeito da classificação do agente causador da leishmaniose visceral americana (LVA). A *L. chagasi* foi descrita com uma nova espécie de *Leishmania* por Cunha e Chagas (1937), sendo considerada diferente da *L. infantum*, anteriormente descrita por Nicole (1908), devido a tentativas malsucedidas de infecção em cães com este parasito. No entanto, após realizar um estudo comparativo entre cepas de *L. chagasi* e de *L. infantum* através da técnica de amplificação ao acaso de DNA polimórfico (RAPD), Mauricio e colaboradores (1999) concluíram que ambos os parasitos eram idênticos, devendo a *L. chagasi* ser referida como *L. infantum* (syn. *L. chagasi*) (Silveira & Corbett 2010).

Entretanto, baseados em estudos anteriores onde foram demonstradas diferenças nos perfis de fragmentos do kDNA (Decker-Jackson *et al.* 1977, 1980) e em comparações por radiorrespirometria (Jackson *et al.* 1982; 1984) dos parasitos de ambos os continentes, alguns autores passaram a defender a classificação da *L. chagasi* a nível de subespécie. Além disso, também foram consideradas outras características relacionadas a *L. chagasi*, como o *habitat* de seu vetor *Lutzomyia longipalpis* (Lainson *et al.* 1990) e seu hospedeiro natural, a raposa *Cerdocyon thous* nativa no Brasil, que coexiste com o parasito sem apresentar qualquer sintoma ou característica de leishmaniose (Silveira *et al.* 1982). Dessa forma, as cepas circulantes no Velho Mundo deveriam fazer parte da subespécie *L. (infantum) infantum*, assim como as cepas do Novo Mundo deveriam ser denominadas *L. (infantum) chagasi* (Shaw 2002; Lainson & Rangel 2003; Cox 2005; Lainson & Shaw 2005).

Outra questão amplamente discutida na literatura é a origem da LV na América Latina. Alguns autores defendem que a *L. infantum* originou-se na Europa e que teria sido importada para o Novo Mundo durante a sua colonização (Killick-Kendrick 1984; Rioux *et al.* 1990). Já os autores que defendem a manutenção da *L. chagasi* como espécie, acreditam que estes parasitos se originaram no continente americano e que teriam migrado para Europa via ponte terrestre de Bering (Shaw 2002; Lainson & Rangel 2003; Cox 2005; Lainson & Shaw 2005; Lainson 2010).

1.2. Metabolismo da L-arginina

Na leishmaniose, a resposta imunológica do hospedeiro desempenha um importante papel no curso e desenvolvimento da doença, uma vez que fatores do mesmo, como células e moléculas, podem determinar o sucesso ou a falha do controle da infecção. Um tipo de resposta imunológica mediada por diferentes populações de linfócitos T CD4⁺ (Th1 e Th2) tem sido associada a resistência ou susceptibilidade à infecção causada por *Leishmania* spp. (Fig. 1.5).

Em estudos de infecção experimental por *L. major* em modelo murino foi possível investigar os mecanismos envolvidos na resposta imune Th1/Th2 (Locksley *et al.* 1987; Murray *et al.* 2005). A resistência à infecção por *Leishmania* tem sido associada à ativação de linfócitos T CD4⁺ Th1 e à produção de citocinas pró-inflamatórias INF- γ , IL-12 e TNF- α , que por sua vez ativam os macrófagos para produzir óxido nítrico (NO) através da óxido nítrico sintase induzida (iNOS), supostamente levando à morte do parasito (Scott *et al.* 1988). Por outro lado, a susceptibilidade à infecção foi associada à ativação de linfócitos T CD4⁺ Th2 com liberação das citocinas IL-4, IL-10 e TGF- β , que levam os macrófagos a produzirem ornitina através da arginase, gerando poliaminas que são essenciais para a sobrevivência e multiplicação do parasito no interior da célula hospedeira (Mosser & Edwards 2008).

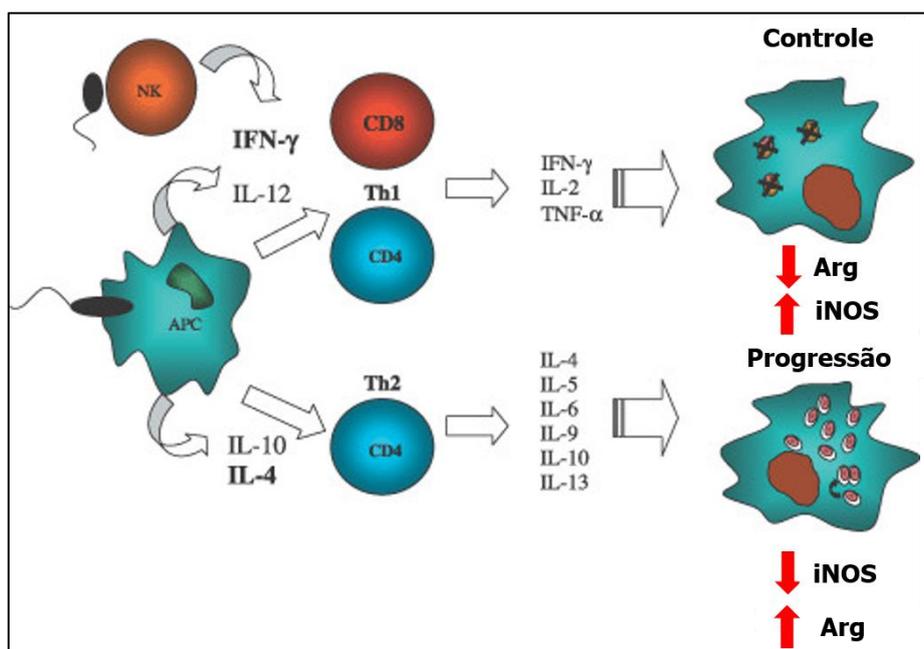


Figura 1.5. Resposta imune durante a infecção por *Leishmania*. Esquema representativo da resposta imunológica do hospedeiro em modelo de infecção por *L. major* (adaptado de Ruiz & Becker 2007).

Durante o início da infecção dos macrófagos, ocorre a liberação de produtos tóxicos, que incluem as espécies reativas oxigenadas (ROS) e nitrogenadas (RNS), as quais supostamente deveriam matar o parasito. Entretanto, os tripanosomatídeos têm um sistema de defesa muito bem desenvolvido que permite sua sobrevivência dentro da célula hospedeira. Este sistema envolve predominantemente a via metabólica da L-arginina.

A L-arginina é um aminoácido polar básico que é compartilhado como substrato principalmente pelas enzimas óxido nítrico sintase (NOS) - que leva a produção de NO e L-citrulina - e a arginase - que leva a produção de ureia e de ornitina sendo esta essencial na via de síntese das poliaminas (Wu & Morris 1998). As poliaminas são cátions orgânicos encontrados em praticamente todas as células eucarióticas e desempenham um papel central nos processos celulares como o crescimento, diferenciação e biossíntese de macromoléculas nos parasitos (Igarashi & Kashiwagi 2000).

Apesar de ser sintetizado endogenamente pelo organismo, L-arginina é considerada condicionalmente essencial, visto que em alguns processos fisiológicos, como gravidez, bem como processos patológicos, como sepse e trauma, há um aumento no seu consumo que ultrapassa a capacidade da síntese endógena, havendo a necessidade da obtenção deste aminoácido através da alimentação (Bernard *et al.* 2001; Luiking *et al.* 2004).

A via metabólica da L-arginina nos macrófagos pode determinar a morte do parasito ou sua proliferação, na dependência da disponibilidade de L-arginina intracelular. Assim como a célula hospedeira, os tripanosomatídeos tem sua própria via da L-arginina, sendo um aminoácido essencial para os mesmos (Krassner & Flory 1971). Como consequência, ambos, parasito e macrófago tem mecanismos distintos de captação deste aminoácido. Nos macrófagos esta captação é feita através de transportadores de aminoácidos catiônicos (CAT) (Closs *et al.* 2004), enquanto que em tripanosomatídeos este processo é realizado através de uma aminoácido permease, descrita pela primeira vez em *L. donovani* (LdAAP3) (Shaked-Mishan *et al.* 2006). Os CAT não são específicos para L-arginina, enquanto que os LdAAP3 transportam exclusivamente este aminoácido. Esta habilidade única dos parasitos faz dos LdAAP3 um fator chave que pode interromper o metabolismo da L-arginina para os parasitos. As funções e interações das enzimas NOS e arginase no metabolismo do parasito podem se relacionar com a infectividade e virulência de determinadas

espécies de *Leishmania*, ou com a própria susceptibilidade do parasito a diferentes fármacos e radicais livres.

A participação e influência da resposta imunológica na atividade das enzimas do metabolismo da L-arginina têm sido bastante discutidas (Fig. 1.6). Em modelos experimentais com *L. major*, a NOS tem sua atividade induzida por citocinas relacionadas ao perfil de resposta imunológica do tipo Th1 (principalmente IFN- γ), que leva a morte do parasito pela produção de ROS e RNS pela célula hospedeira (Fig. 1.6 à esquerda). Por outro lado, citocinas do perfil de resposta do tipo Th2 (principalmente a IL-10) inibem a síntese de NO, favorecendo o crescimento parasitário através da geração de poliaminas (Fig. 1.6 à direita). Assim citocinas do perfil Th1 e Th2 podem regular o metabolismo da L-arginina a partir da indução da atividade da NOS/arginase (Vincendeau *et al.* 2003).

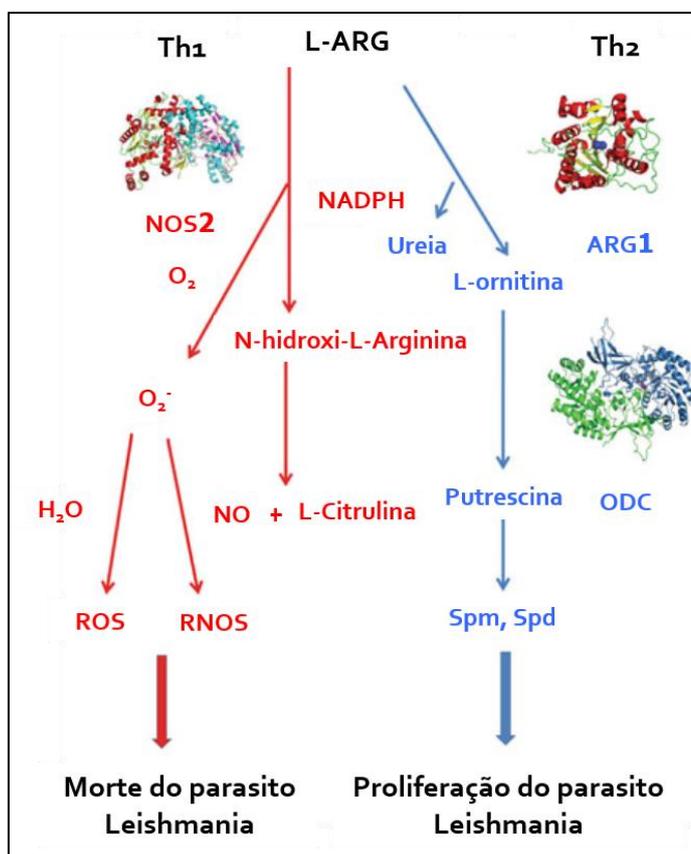


Figura 1.6. Esquema do metabolismo da L-arginina na célula hospedeira. Em vermelho, a via da óxido nítrico sintase induzida (NOS2); Em azul, a via da arginase (ARG1). L-ARG: L-arginina; ROS: espécies reativas de oxigênio; RNOS: espécies reativas nitrogenadas; ODC: ornitina descarboxilase; Spm: espermina; Spd: espermidina (adaptada de Colotti & Ilari 2011).

1.2.1. Óxido nítrico sintase

Como uma das responsáveis pelo catabolismo da L-arginina está a família de enzimas NOS, que são dímeros e que necessitam de oxigênio e cofatores, como NADPH, flavinas e biopterinas, para exercerem suas funções. Em mamíferos, são descritas três isoformas de NOS (Stueher 1999), sendo duas delas constitutivas (NOSc) e dependentes de Ca^{2+} , uma expressa em certas células neuronais (nNOS ou NOS I) e outra expressa em células endoteliais (eNOS ou NOS III), que contrastam com a isoforma induzível (iNOS ou NOS II), expressa preferencialmente em macrófagos residentes e independente de Ca^{2+} .

O NO é um radical livre que possui diversas funções e é encontrado em diferentes organismos vivos. Este radical é biossintetizado a partir da hidrólise da L-arginina realizada pela NOS, numa reação que compreende duas etapas de oxidação, sendo formados os produtos L-citrulina e o NO, este último com uma vida extremamente curta (em torno de 10 segundos), sendo rapidamente oxidado em nitrato e nitrito (Stamler *et al.* 1992; Flora-Filho & Zilberstein 2000).

Numerosos trabalhos demonstraram que a citotoxicidade *in vitro* para *Leishmania* spp. intracelulares está associada à produção de NO (Green *et al.* 1990a; Mauel 1996). Em *L. major*, foi demonstrado que um glicoinositolfosfolípido (GIPL) inibe marcadamente a produção de NO do macrófago e aumenta a sobrevivência intracelular do parasito (Proudfoot *et al.* 1995).

A primeira demonstração da existência da via do NO em um eucariota unicelular, foi feita em 1995 por Paveto e colaboradores, em *Trypanosoma cruzi*. A dependência de cofatores assim como a susceptibilidade à ativadores/inibidores, demonstraram a semelhança da enzima com aquela que participa na transdução neuronal em mamíferos. O sistema de cNOS também foi evidenciado em *L. donovani*, mas o significado biológico, assim como a relação com a via existente no macrófago (iNOS - que é potencialmente nociva para *Leishmania*) (Basu *et al.* 1997), continua a ser investigada.

Alguns trabalhos do nosso grupo demonstraram a caracterização de uma cNOS e a produção de NO em promastigotas de *L. amazonensis*, *L. braziliensis* e *L. infantum* (Geigel 2000; Geigel & Leon 2003; Genestra *et al.* 2003a), além do efeito de diferentes inibidores e de um agente quelante de Ca^{2+} na produção deste radical em diferentes espécies de *Leishmania* (Genestra *et al.* 2003b). Formas amastigotas de *L. amazonensis* produziram quantidade maiores deste radical que promastigotas

(Genestra *et al.* 2006a). A importância da produção de NO por diferentes espécies de *Leishmania* ainda é pouco conhecida, mas existem evidências da sua participação na infectividade e virulência destes parasitos (Genestra *et al.* 2006b).

1.2.2. Arginase

Arginase faz parte de uma família de metaloenzimas dependentes de Mn^{2+} , está presente em diversos organismos biológicos e possui como substrato a L-arginina. Duas isoformas de arginase (arginase I e II) foram identificadas em células de mamífero e possuem alta conservação e homologias estruturais e cinéticas em diferentes sistemas biológicos, porém são diferentes na localização subcelular, distribuição, regulação da expressão e reatividade imunológica (Jenkinson *et al.* 1996; Ash 2004). A arginase I é uma enzima citosólica que funciona principalmente no ciclo da ureia, enquanto que a arginase II é uma proteína mitocondrial, potencialmente envolvida na síntese de prolina, glutamato e poliaminas.

A expressão de arginase em *Leishmania* foi sugerida pela primeira vez através de suas atividades enzimáticas em extratos do parasito (Camargo *et al.* 1978). O gene que codifica a arginase foi identificado em *L. major* e *L. amazonensis* (da Silva *et al.* 2002) e foi clonado a partir de promastigotas de *L. mexicana*.

Parasitos do gênero *Leishmania* contêm um único gene da arginase (*ARG*), cujas propriedades bioquímicas e expressão têm sido estudadas em *L. amazonensis*, *L. mexicana* e *L. major* (da Silva *et al.* 2002; Roberts *et al.* 2004; Reguera *et al.* 2009). Estudos em *L. mexicana* mutante sem expressão de *ARG*, mostraram que estes parasitos eram incapazes de sintetizar poliaminas, fato também observado em estudo com *L. major* (Reguera *et al.* 2009). A arginase de *L. mexicana* e *L. amazonensis* foi encontrada compartimentalizada nos glicossomos, embora esta localização não seja considerada essencial para o seu papel na síntese de poliaminas (Roberts *et al.* 2004; da Silva *et al.* 2008). Outros estudos mostraram que a *L. mexicana* mutante manteve a infectividade em camundongos, embora um pouco reduzida. Esta redução foi atribuída, em parte, pela maior produção de NO, provavelmente devido ao aumento da disponibilidade de L-arginina para a utilização pela NOS (Gaur *et al.* 2007).

Há evidências de que parasitos podem escapar da toxicidade do NO, através da depleção de L-arginina, fato que é mediado por um aumento da atividade da arginase, que por sua vez pode ser modulada pelo parasito. Estudos *in vitro* com

meios de cultura contendo diferentes concentrações de L-arginina, mostraram que a sua concentração é crucial para produção do NO e na morte do parasito (Genestra *et al.* 2003b).

Curiosamente, a expressão de arginase em *Leishmania* pode ser influenciada diretamente por proteínas do hospedeiro. Como sugerido por Vendrame e colaboradores (2007), o tratamento de parasitos com *insulin-like growth factor-I* (IGF-I) pode aumentar significativamente a expressão da arginase em *Leishmania* sugerindo que esta enzima desempenhe um papel fundamental em sua multiplicação *in vivo*.

N^ω-hidroxi-L-arginina (NOHA), intermediário da síntese de NO, é um potente inibidor da arginase, que pode interferir no crescimento do parasito *in vitro* (Iniesta *et al.* 2001) e *in vivo* (Kropf *et al.* 2005).

Enquanto a inibição da arginase do parasito controla a infecção por *Leishmania*, o estímulo de iNOS pode levar a morte do parasito. A indução da iNOS é considerada por alguns autores uma abordagem atraente na busca por alvos terapêuticos, pois esta indução é conhecida por estar correlacionada com a eficácia terapêutica de alguns compostos anti-*Leishmania*.

1.3. Modelos animais para estudo das leishmanioses

Em estudos experimentais visando o entendimento de processos patológicos e a busca por tratamentos de doenças, a escolha de um bom modelo animal é uma questão de grande importância. Estudos desenvolvidos em modelos animais são, em parte, responsáveis por boa parte dos conhecimentos a respeito da imunopatologia e patogenia, bem como da relação parasito-hospedeiro durante as leishmanioses (Porrozzi *et al.* 2014).

Um bom modelo animal é aquele que apresenta os fenômenos biológicos mais próximos aos observados nos seres humanos (Fagundes & Taha 2004). Existem fatores que contribuem para as diferenças vistas em modelos experimentais para LV em relação a doença humana, como a cepa do parasito, a quantidade e a via de inoculação, o tecido atingido, bem como a linhagem e fatores genéticos do hospedeiro (Porrozzi *et al.* 2014; Dutra & Da Silva 2017). Hamsters têm sido utilizados como modelos para LV e para LT e possuem a capacidade de mimetizar as características da doença em humanos. No entanto, o uso destes animais ainda se mantém limitado,

devido aos altos custos de manutenção e dificuldades no manuseio, assim como os escassos reagentes específicos, como marcadores celulares, para ensaios imunológicos (Rodrigues 2007; Mears *et al.* 2015).

Camundongos são os modelos mais comumente utilizados em pesquisas científicas principalmente devido ao fácil manuseio e a sua similaridade com o genoma humano, com alinhamento superior a 40% e homologia em torno de 99% (Waterston *et al.* 2002). Possuindo linhagens diferentes, camundongos demonstram susceptibilidades variadas que podem ser usadas para imitar as manifestações das leishmanioses observadas em seres humanos (Yardley & Croft 1999). Essas linhagens podem ser divididas em dois antecedentes genéticos: isogênicos (*inbred* – 99% de similaridade genética) e heterogênicos (*outbred* – geneticamente diferente). Animais *inbred* são homogeneamente homozigóticos obtidos após endocruzamentos (cruzamento de camundongos da mesma geração) realizados por no mínimo 20 gerações (98,6% de consanguinidade). Já os animais *outbred* possuem ampla variedade genética e são obtidos de cruzamentos ao acaso, evitando o cruzamento com parentes de gerações próximas (Chorolli *et al.* 2007; Pinto 2014).

Camundongos BALB/c (*inbred*) são animais altamente susceptíveis à infecção por *Leishmania* spp., tornando-se um modelo não ideal para pesquisas quimioterápicas, uma vez que apresentam resposta imune do tipo de Th2 e desenvolvem doença crônica algumas semanas após a infecção. Contudo, durante a infecção por *L. braziliensis*, estes camundongos mostram-se altamente resistentes, desenvolvendo lesões auto resolutivas poucas semanas pós-infecção. Devido à variação genética das populações humanas, as infecções são bastante heterogêneas, o que torna difícil traçar semelhanças com as infecções em camundongos isogênicos (Natale *et al.* 2016).

2. JUSTIFICATIVA

Para o estudo das leishmanioses, conhecer as particularidades das diversas espécies de *Leishmania* mostra-se extremamente importante. Poucos trabalhos vêm demonstrando diferenças biológicas entre parasitos de *L. (i.) infantum* e *L. (i.) chagasi*, bem como as diferenças de interação destes com a célula hospedeira. Devido às informações controversas na literatura a respeito dos agentes etiológicos da LV no Velho e no Novo Mundo, estudos comparativos entre ambos os parasitos são importantes e amplamente necessários.

Outra questão considerável para a pesquisa destas doenças é a relação parasito-hospedeiro. Uma via metabólica que fornece respostas sobre a interação da *Leishmania* e seu hospedeiro é o metabolismo da L-arginina. Esta pode ter um papel versátil durante a infecção, pelo fato de que células do sistema imunológico tipicamente podem sintetizar NOS ou arginase, mas, geralmente, não ambas ao mesmo tempo, podendo assim participar na defesa do hospedeiro ou no desenvolvimento da patologia (Wanasen & Soong 2008). Sobreposta a esta dinâmica metabólica, está o fato de que muitos patógenos podem adquirir L-arginina da célula hospedeira e a partir da atividade da arginase obter L-ornitina. Enquanto o papel da arginase de células hospedeiras tem recebido um número considerável de estudos, na leishmaniose (Iniesta *et al.* 2001; Wanasen & Soong 2008), pouca atenção tem sido dada aos papéis desta enzima no parasito. Estudos com *L. amazonensis* e *L. mexicana* têm indicado que a atividade da arginase parece estar associada a muitas atividades metabólicas além da via das poliaminas (da Silva *et al.* 2008) com funções que podem interferir ou não na atividade da NOS dependendo da espécie do parasito (Kropf *et al.* 2005; Reguera *et al.* 2009).

3. OBJETIVOS

a. Objetivo Geral

Buscar diferenças biológicas e moleculares entre *L. (i.) infantum* (LII) e *L. (i.) chagasi* (LIC), bem como compreender o papel da arginase/NOS na relação parasito-hospedeiro, investigando o metabolismo da L-arginina nestes tripanosomatídeos.

b. Objetivos Específicos

1. Avaliar a capacidade infectiva *in vivo* e *in vitro* da *L. (i.) infantum* e *L. (i.) chagasi*;
2. Avaliar susceptibilidade de camundongos com diferentes *backgrounds* genéticos (*inbred* e *outbred*) à infecção por estes parasitos;
3. Analisar, de forma indireta, a atividade da arginase e da NOS em culturas de células de baço e fígado de camundongos infectados;
4. Analisar, de forma indireta, a atividade da arginase em promastigotas de LII e LIC isoladas de diferentes camundongos (BALB/c e *Swiss Webster*) durante o crescimento parasitário;
5. Analisar, de forma indireta, a atividade de NOS através da produção de NO intracelular e extracelular de promastigotas de *L. infantum*;
6. Buscar diferenças no sequenciamento genético do gene da arginase em ambas os parasitos;
7. Analisar a expressão da arginase dos parasitos de *L. infantum* através de qRT-PCR;
8. Realizar a clonagem e expressão da arginase dos parasitos de *L. infantum*.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Manutenção dos parasitos

Neste estudo foram utilizados parasitos de *L. (i.) infantum* (MHOM/MA/67/ITMAP263) provenientes do Marrocos, agora chamados de LII, e parasitos de *L. (i.) chagasi* (MCAN/BR/97/P142) provenientes do Brasil, agora chamados de LIC. Nos protocolos *in vivo*, foram utilizadas amostras infectantes, recém-isoladas de animais infectados (camundongos BALB/c). Nos protocolos *in vitro*, foram utilizadas amostras recém-isoladas de camundongos BALB/c e *Swiss Webster*. As formas promastigotas foram cultivadas a 26°C, em meio Schneider (Schneider's Insect Medium – Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EUA), suplementados com 20% soro fetal bovino (SFB), 100 U/mL penicilina G potássica e 100 µg/mL estreptomicina.

4.2. Animais

Em todos os ensaios foram utilizados camundongos fêmeas com 6 a 8 semanas de idade, com diferentes *backgrounds* genéticos, sendo camundongos BALB/c e *Swiss Webster*. Estes animais foram fornecidos pelo Instituto de Ciência e Tecnologia em Biomodelos da Fundação Oswaldo Cruz (ICTB/FIOCRUZ) e sua utilização seguiu as normas previstas no estatuto da Comissão de Ética da FIOCRUZ (CEUA L-026/2015).

4.3. Infecção dos camundongos

Os camundongos BALB/c e *Swiss Webster* foram divididos em grupos de 5 animais. Estes grupos foram ou não infectados com 2×10^7 promastigotas de *L. infantum* por via intraperitoneal (i.p.), em volume final de 100 µL PBS estéril. Foram mantidos os seguintes grupos experimentais:

- Grupo 1: camundongos BALB/c sem infecção (controle);
- Grupo 2: camundongos BALB/c infectados com LII;
- Grupo 3: camundongos BALB/c infectados com LIC;
- Grupo 4: camundongos *Swiss Webster* sem infecção (controle);
- Grupo 5: camundongos *Swiss Webster* infectados com LII;
- Grupo 6: camundongos *Swiss Webster* infectados com LIC.

Estes grupos foram mantidos por 30 e 60 dias após a infecção, quando foram submetidos à eutanásia e os órgãos (baço e fígado) removidos para testes posteriores.

4.4. Carga parasitária

A quantificação parasitária foi realizada a partir de células do baço e do fígado através do ensaio de diluição limitante (LDA). Os animais foram submetidos à eutanásia em câmara de CO₂ após 30 e 60 dias de infecção e os órgãos foram assepticamente removidos e pesados em balança digital. Estes órgãos foram macerados e homogeneizados em meio Schneider contendo 20% SFB e as células foram centrifugadas a 1.500 rpm/10 min em centrífuga refrigerada para a retirada do tecido ainda íntegro. A seguir, as células foram adicionadas a placas de 96 poços em um volume final de 200 µL de meio e realizadas 8 diluições seriadas de 1:10 do material. Durante 7 dias, as placas foram mantidas em estufa a 26 °C e os poços examinados diariamente em microscópio invertido para determinar a positividade de cada poço e assim estimar a carga parasitária. O número de parasitos/g de tecido foi estimado baseado no peso total do tecido removido e a carga parasitária nas diluições seriadas, segundo método descrito por Taswell (1981, 1984).

4.5. Curva de crescimento dos parasitos

Promastigotas de *L. infantum* foram isoladas de camundongos BALB/c e *Swiss Webster* e cultivadas em meio de cultura a fim de avaliar-se o perfil de proliferação *in vitro*. A curva foi iniciada com um inóculo de 5x10⁵ parasitos/mL em volume final de 10 mL meio Schneider contendo 20% SFB. Os parasitos foram mantidos a 26°C e contados em câmara de Neubauer diariamente por até 7 dias. A cada dia, as células e o sobrenadante eram coletados para posterior utilização em outros experimentos.

4.6. Análise da metaciclogênese dos parasitos

Para determinar a porcentagem de parasitos metacíclicos durante a curva de crescimento parasitário realizou-se teste de lise pelo complemento. Durante a curva de proliferação (48, 72 e 96 h) os parasitos (até a quinta passagem) foram coletados

e lavados com PBS por centrifugação a 5.000 rpm/10 min. As células foram ressuspensas, ajustadas a 3×10^6 parasitos em 1 mL PBS e incubadas com 20% de complemento humano (Sigma-Aldrich) por 30 min a 26°C. Após esse tempo, foi realizada a contagem em câmara de Neubauer para avaliação da porcentagem de parasitos resistentes à lise.

4.7. Obtenção e infecção de macrófagos peritoneais murinos

Macrófagos peritoneais (MØ) foram obtidos de camundongos BALB/c e *Swiss Webster* para avaliar a infectividade *in vitro* dos parasitos de *L. infantum*. Em um ambiente estéril, foi realizada a lavagem da cavidade peritoneal utilizando meio RPMI 1640 (Sigma-Aldrich) estéril, suplementado com 2 mM L-glutamina, 15 mM HEPES (Sigma-Aldrich), penicilina e estreptomicina e 10% SFB. As células foram contadas, ajustadas a 2×10^5 células/poço e incubadas em placas Lab-Tek em um volume final de 200 μ L/poço. Após o período de 1 hora para aderência dos macrófagos, foi feita a lavagem da placa para remoção de células não aderentes e a cultura foi ou não estimulada por IFN- γ (10 ng/mL) e LPS (100 μ g/mL) por 24 h, até o momento em que os parasitos foram adicionados à cultura numa proporção de 5:1 parasitos/macrófago. A infecção foi mantida *overnight* e a seguir, a cultura foi lavada por 5 vezes para remoção máxima dos parasitos que estavam no sobrenadante. A cultura foi mantida em RPMI com 10% SFB por 24 e 72 h a 37°C e 5% de CO₂. Foram coletados os sobrenadantes das culturas e as lâminas com as células foram coradas pelo *Kit* Panótico Rápido (Laborclin, Pinhais, PR, Brasil). Os resultados foram expressos como o índice de infecção, obtidos pela seguinte fórmula:

$$IF = \frac{\% \text{ de MØ infectados} \times N^{\circ} \text{ amastigotas}}{N^{\circ} \text{ MØ totais}}$$

4.8. Avaliação da produção de NO extracelular

Sendo a meia-vida do NO muito curta, é difícil quantificar diretamente a molécula, uma vez que ela reage rapidamente com água e oxigênio, formando nitrito (NO₂⁻) e nitrato (NO₃⁻), sendo estes estáveis e quantificáveis. Assim, a concentração de NO₂⁻ em solução aquosa ou meio de cultura pode ser tomado como uma medida da produção de NO. Com isso, os sobrenadantes coletados nos ensaios (itens 3.4,

3.5 e 3.7) foram utilizados para a dosagem de nitrito pelo método de Green (1982). Em resumo: 100 µL sobrenadante foram misturados com igual volume do reagente de Griess (0,1 % N-1-naftil-dihidrocloridrato de etilenodiamina em 5% de ácido fosfórico e 1 % de sulfanilamida). Após 10 min, à temperatura ambiente, a reação foi monitorada por leitura em espectrofotômetro a 540 nm. Foi utilizado nitrito de sódio (NaNO₂) em meio de cultura para o preparo de uma curva padrão com faixa de concentração variando de 0,78 a 200 µM.

4.9. Dosagem de NO intracelular

Para avaliar a produção de NO gerado dentro dos parasitos, foi utilizado o indicador diacetato de 4,5-diaminofluoresceína (DAF-2DA) (*Kit Fluorimetric System for NOS Detection*, Sigma-Aldrich). Este indicador tem sido empregado como um marcador específico e sensível ao NO em cultura de células (Chatton & Broillet 2002; Zhou & He 2011). O DAF-2DA é permeável à membrana plasmática e uma vez no interior das células, é clivado em 3,4-diaminofluoresceína (DAF-2) por meio da ação de esterases plasmáticas. Como o DAF-2 é uma molécula não-permeável à membrana, esta fica retido na célula e reage com o NO na presença de oxigênio. Esta reação produz o triazolo diaminofluoresceína (DAF-2T), um produto altamente fluorescente, que quando excitado, emite uma fluorescência que permite quantificar a formação de NO em tempo real (Fig. 3.1). Para este ensaio, os parasitos em terceiro dia de crescimento (2×10^6) foram incubados com 200 µL de uma solução de L-arginina contendo 5 µM DAF-2DA por 2 h à temperatura ambiente, seguindo as instruções do fabricante. A fluorescência foi medida utilizando um fluorímetro com emissão a 485 nm e excitação a 530 nm. Como controle positivo para o teste, foram utilizados macrófagos de linhagem RAW 264.7.

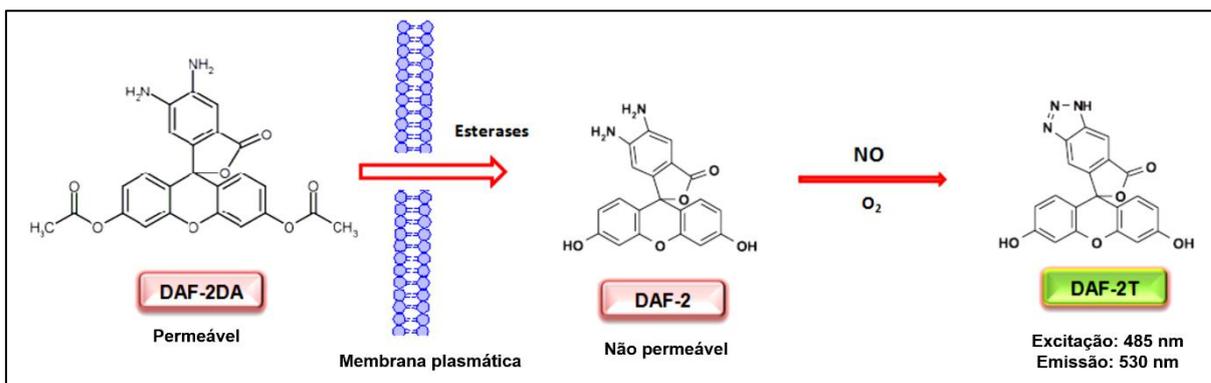


Figura 4.1. Representação da ação do indicador DAF-2DA na detecção de NO no interior de células vivas. Adaptado de Maciel 2013.

4.10. Determinação da atividade de arginase

A atividade de arginase foi avaliada como previamente descrito por Corraliza e colaboradores (1994), com algumas modificações. Resumidamente, 1×10^7 células (do baço, do fígado e/ou parasitos) foram previamente lavadas em solução de sacarose (0,25 M) e KCl (5 mM), e adicionadas a 500 μ L Triton X-100 a 0,1% em tampão antiproteolítico constituído de 0,1 mM fluoreto de fenilmetilsulfonila (PMSF); 0,01% (p/v) leupeptina; 0,2 mg/mL inibidor de tripsina e 1 mM solução de benzamidina em sacarose (0,25 M) e KCl (5 mM). A mistura foi agitada por 30 min à temperatura ambiente. Depois da lise das células, 500 μ L Tris-HCl (25 mM) contendo $MnCl_2$ (5 mM) em pH 7,4 foi adicionado e a enzima foi ativada por 10 min a 56°C. Para iniciar a hidrólise da L-arginina, 50 μ L do lisado previamente ativado foi incubado com 50 μ L L-arginina (0,5 M) em pH 9,7. As amostras foram incubadas a 37°C por 60 min e a reação foi interrompida pela adição de 500 μ L de uma mistura ácida contendo H_2SO_4 , H_3PO_4 e H_2O (1:3:7). A quantidade de ureia produzida foi avaliada através da adição de 25 μ L solução etanólica a 9% de α -isonitrosopropiofenona e aquecimento subsequente a 100°C por 45 min. Após 10 min no escuro à temperatura ambiente, as amostras foram plaqueadas num volume final de 200 μ L e a ureia produzida foi determinada a 540 nm em espectrofotômetro. Uma curva padrão foi preparada com quantidades crescentes de ureia em concentrações variando entre 1,5 a 30 μ g/mL.

4.11. Extração de DNA

A extração de DNA total das promastigotas de *L. infantum* foi realizada usando o *kit* PureLink® Genomic DNA (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA). Os parasitos em meio de cultura foram centrifugados a 1.200 g a 4°C por 10 min e o *pellet* formado foi tratado conforme as instruções do fabricante. O DNA obtido foi eluído em H₂O livre de RNase e estocado a -20°C. A pureza e a concentração do DNA extraído foram determinadas através de leitura em aparelho Nanodrop 2000c (Thermo Fisher Scientific).

4.12. Reação de Polimerase em Cadeia (PCR) convencional

A PCR foi realizada com o *kit* Taq DNA Polymerase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) e os oligonucleotídeos iniciadores (Tabela 4.1) foram desenhados manualmente a partir das sequências obtidas na plataforma *online* TriTrypdb (TriTrypdb.org.br). Foram adicionados a estas sequências, sítios de restrição para as enzimas NdeI e BamHI nas respectivas extremidades 5' e 3'. A amplificação foi realizada em um termociclador (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, EUA) com o seguinte protocolo de amplificação: 1 ciclo de 95°C (5 min); 30 ciclos de: 25 s a 95°C, 30 s a 50°C, 45 s a 72°C; e um ciclo de 5 min a 72°C em tampão TBE (Tris-EDTA). Os produtos da PCR foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 1% em tampão TBE e a coloração foi feita com GelRed (Biotium, Hayward, CA, USA) na proporção de 1:1000 em cuba horizontal a 100 V por 90 min. O resultante foi visualizado através do transiluminador UV e fotografado digitalmente.

4.13. Sequenciamento do gene da arginase

Com o intuito de buscar diferenças moleculares no gene da arginase, foi realizada uma comparação das sequências de DNA dos parasitos de *L. infantum*. O gene da arginase foi amplificado por PCR convencional. O resultante da amplificação foi submetido a eletroforese em gel de agarose 1%. A banda correspondente foi extraída e purificada pelo *kit* Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, Fitchburg, Wisconsin, EUA) e enviado para a Plataforma de Sequenciamento de DNA do Instituto Oswaldo Cruz (RPT01A/IOC – FIOCRUZ/RJ). A análise foi realizada pelo software BioEdit (Ibis Biosciences, Carlsbad, CA, EUA) e pela plataforma online

Clustal Omega (EMBL-EBI, Cambridge, CAM, RU - www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2), onde foi realizado um BLAST DNA para comparar a identidade das sequências das cepas aqui estudadas e da sequência depositada no banco de dados TriTrypdb (<http://tritrypdb.org>).

4.14. Avaliação da expressão da arginase por qRT-PCR

O RNA total de promastigotas no terceiro dia de crescimento (1×10^7) foi extraído dos parasitos com o reagente Trizol (Thermo Fisher Scientific), ressuspenso em água tratada com 2% dietilpirocarbonato (DEPC), quantificado em aparelho Nanodrop 2000c e avaliado quanto a sua integridade em eletroforese de gel de agarose 1,4%. Posteriormente, 2 µg RNA foram submetidos a reação de transcrição reversa (RT-PCR) com o uso do *kit* GoScript™ Reverse Transcription System (Promega) utilizando oligos (dT) e seguindo as recomendações do fabricante. O cDNA resultante foi então amplificado por PCR convencional e o produto da reação foi submetido a uma eletroforese em gel de agarose 1% acrescido de 2 µL corante não mutagênico Safer (Laborchemiker, Curitiba, PR, Brasil) a 90 V por 1 h. A PCR em tempo real (qPCR) foi realizada usando o *kit* GoTaq® qPCR Master Mix com BRYT Green® dye (Promega) com os oligonucleotídeos iniciadores (Tabela 4.1) para o gene da arginase de *L. infantum* e de α -tubulina como controle endógeno, seguindo as condições da PCR conforme relatado por Gobert e colaboradores (2002). Os produtos da qPCR foram detectados com o aparelho ViiA™ 7 Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific). Um ciclo da qPCR se constitui de: 94°C por 30 s, 60°C por 30 s e 72°C por 45 s. A expressão relativa do mRNA foi calculada pelo QuantStudio™ Software V1.2 (Applied Biosystems).

4.15. Construção do plasmídeo com inserto

Para realizar a clonagem do gene da arginase, o produto da amplificação por PCR e o plasmídeo de interesse (pET28a – GenScript Inc, Piscataway, NJ, EUA) foram digeridos *overnight* à 37°C com as enzimas de restrição (NdeI, BamHI) correspondentes aos sítios de clonagem. O material foi purificado e quantificado como descrito anteriormente. O inserto (ARG) e o plasmídeo digeridos foram submetidos a uma reação de ligação com 1 µL T4 ligase e 5 µL do seu respectivo tampão 2x, numa

proporção de 3:1 *overnight* à 16°C, formando o plasmídeo pET28-ARG contendo gene de resistência para canamicina. O plasmídeo contendo o gene foi inserido em bactérias quimiocompetentes DH5 α e a seleção das bactérias DH5 α -pET28-ARG se deu pelo uso de antibiótico (canamicina) e foi realizado o sequenciamento pela plataforma do IOC (Sanger *et al.* 1974).

4.16. Obtenção e seleção dos clones recombinantes

O plasmídeo pET28-ARG foi purificado e inserido em bactérias quimiocompetentes BL21 através de transformação por choque térmico (40 min a 0°C, seguido de incubação por 2 min a 42°C). O material foi transferido para placas de Petri contendo meio agar LB e mantido a 37°C por 24 h. As colônias foram isoladas das placas de forma aleatória em meio LB líquido contendo canamicina e submetidas à análise por PCR. Nos cultivos de clones que mostraram amplificação do produto com tamanho esperado para o gene da arginase (clones recombinantes BL21-pET28-ARG), foram adicionados 5% de DMSO, então aliquotados e mantidos a -80°C até o momento do uso.

4.17. Análise da expressão da proteína recombinante através de eletroforese em gel de poliácridamida na presença de SDS (SDS-PAGE)

As bactérias com o gene recombinante foram crescidas em meio LB a 37°C até atingirem a densidade de óptica de 0,6 (leitura a 600 nm em espectrofotômetro). Posteriormente, as bactérias foram induzidas com isopropil β -D-1-tiogalactopiranosídeo (IPTG) e mantidas por 2 h a 28°C. As amostras foram então submetidas à eletroforese em gel de poliácridamida 12,5% sob condições desnaturantes aplicando-se uma corrente de 80 V para o gel de empilhamento e 120V para o gel de fracionamento. Após a corrida, o gel foi corado com 0,2% Coomassie blue R-250, 50% metanol e 10% ácido acético.

Tabela 4.1. Sequências dos primers

Técnica	Gene	Sequências dos primers
PCR convencional/ sequenciamento	ARG	*PF – 5' CGCATATGATGGAGCACGTGCA 3'
		*PR – 5' CGGGATCCCTACAGTTTGGCG 3'
RT-qPCR/ sequenciamento	ARG	PF – 5' GTGTGGTACGGTCTCCGGTA 3'
		PR – 5' GTGTGGTACGGTCTCCGGTA 3'
	Alfa tubulina	PF – 5' CAGGTGGTGTCTCTCTGAC 3'
		PR – 5' TAGCTCGTCAGCACGAAGTG 3'

***Sítios de restrição:** NdeI, BamHI

4.18. Análise estatística

Os resultados foram analisados, quando apropriado, com estudos estatísticos através do teste ANOVA (GraphPad Prism; GraphPad Software, La Jolla, CA, USA). Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

5. RESULTADOS

5.1. Infecção *in vivo*

5.1.1. Peso dos órgãos

Inicialmente, camundongos BALB/c e *Swiss Webster* foram infectados (i.p.) com 2×10^7 promastigotas de *L. infantum* (LII e LIC). Após a eutanásia, o peso total do baço dos camundongos controles e infectados foi avaliado. No caso de camundongos BALB/c, o peso do órgão não foi significativamente alterado pela infecção, independentemente do tempo e do parasito utilizado. No entanto, para camundongos *Swiss Webster* foi observado um aumento significativo no peso do baço 60 dias pós-infecção (dpi) por ambas os parasitos de *L. infantum* quando comparados com o respectivo controle não infectado (Fig. 5.1).

Em relação ao fígado, não foram observadas diferenças significativas no peso em relação ao grupo controle sem infecção em ambas as linhagens de camundongo e cepas do parasito (dados não mostrados).

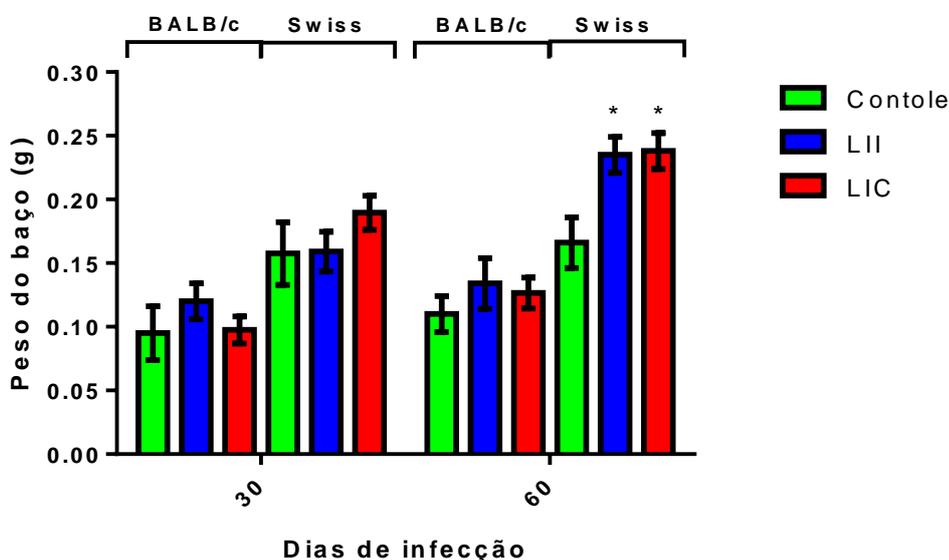


Figura 5.1. Peso total do baço de camundongos infectados por diferentes parasitos de *L. infantum*. Em 30 e 60 dpi, o baço de camundongos BALB/c e *Swiss Webster* foram retirados e pesados em balança digital. (* $p \leq 0,05$)

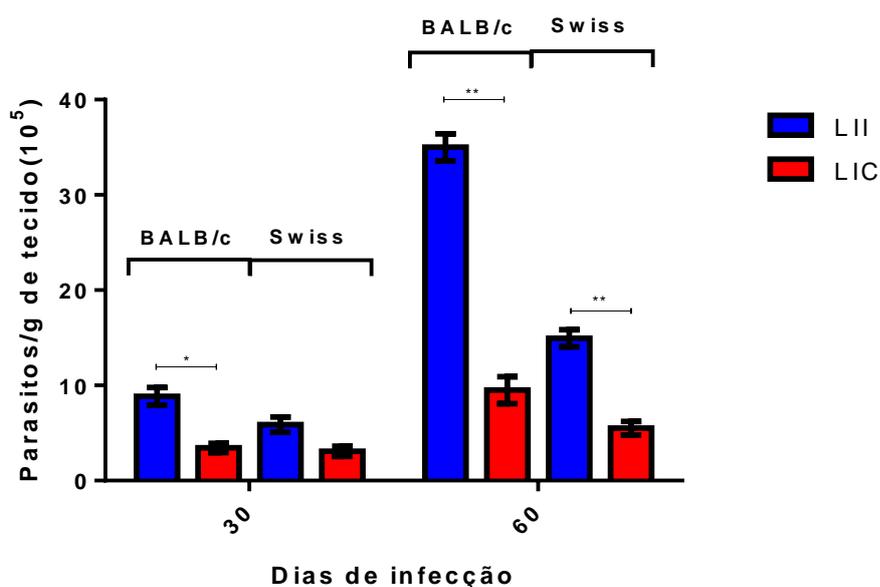
5.1.2. Avaliação da carga parasitária

Para analisar a capacidade infectiva *in vivo* dos parasitos de *L. infantum* foi realizado o ensaio de diluição limitante. A análise da LDA do baço e fígado dos camundongos infectados mostrou uma diferença significativa entre as cargas parasitárias nos diferentes grupos experimentais.

No baço, a carga parasitária aumentou significativamente em 60 dpi em relação a 30 dpi, com exceção dos camundongos *Swiss Webster* infectados por LIC. De um modo geral, a LII mostrou-se mais infectiva que a LIC, especialmente em camundongos BALB/c, demonstrando as maiores cargas parasitárias tanto em 30 quanto em 60 dpi (Fig. 5.2a).

No fígado, a LII novamente mostrou-se mais infectiva em camundongos BALB/c, uma vez que as cargas parasitárias foram maiores em 30 e 60 dpi (Fig. 5.2b).

(a)



(b)

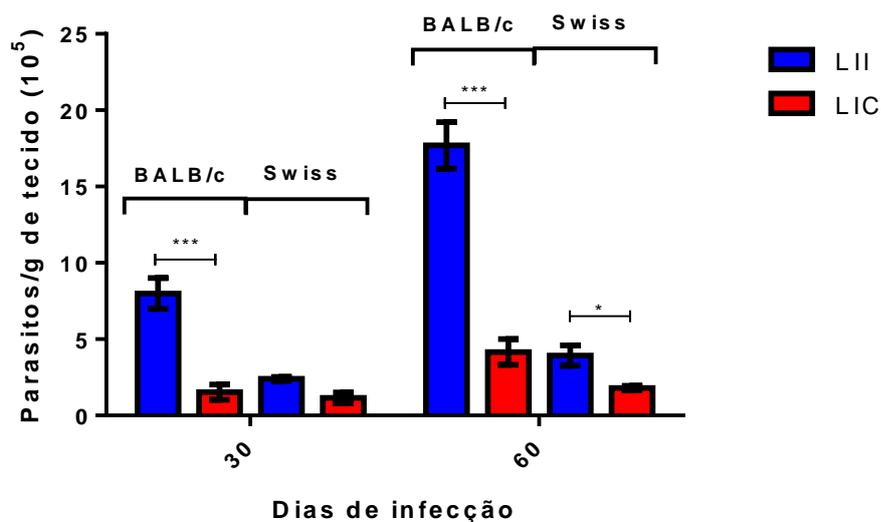


Figura 5.2. (a) Carga parasitária no baço. (b) Carga parasitária no fígado. A quantificação dos parasitos foi determinada através do ensaio de diluição limitante. O número de parasitos/grama de tecido foi estimado baseado no peso total do tecido removido e carga parasitária na diluição seriada (* $p \leq 0,01$; ** $p \leq 0,001$; *** $p \leq 0,0001$).

Em geral, esses dados indicam que a *L. (i.) infantum* é mais infectiva que a *L. (i.) chagasi* para ambas as linhagens de camundongo avaliadas. Considerando a infecção entre as diferentes linhagens de camundongos, estes dados sugerem que estes modelos murinos apresentam diferenças de susceptibilidade, confirmando assim que os camundongos BALB/c são mais sensíveis à infecção que *Swiss Webster*.

5.1.3. Avaliação da atividade das enzimas NOS e arginase

Uma vez que NOS e arginase são reguladas por citocinas do perfil de resposta imunológica do tipo Th1 e Th2, respectivamente, a atividade destas enzimas pode ser usada como indicador de susceptibilidade ou resistência à infecção em modelos murinos. Sendo assim, foram avaliadas de forma indireta a atividade da NOS pela produção de nitrito, assim como a atividade da arginase pela produção de ureia.

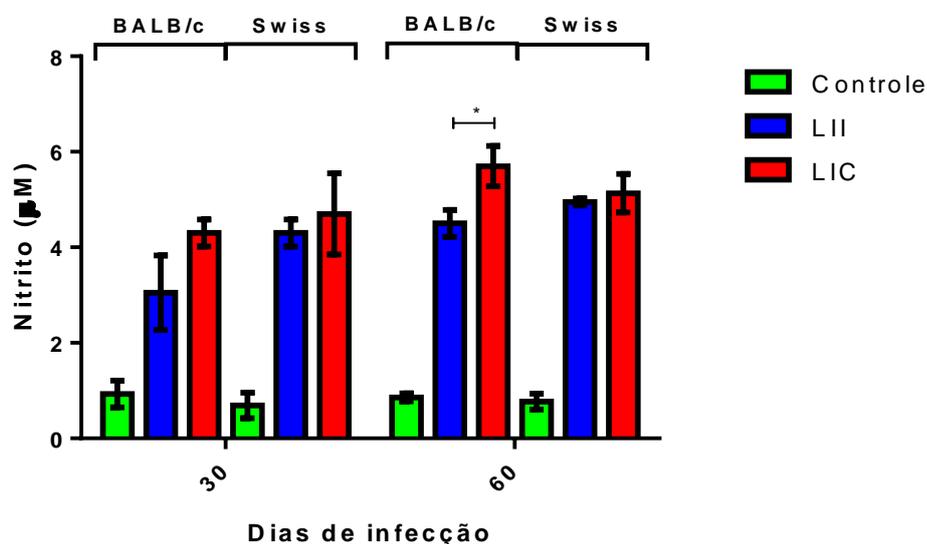
5.1.3.1. Avaliação da produção total da NO em células infectadas

Para a avaliação da produção de NO, as células do baço e do fígado dos animais infectados foram mantidas em cultura durante 48h e o sobrenadante foi utilizado para a dosagem de nitrito pelo método de Green (1982).

A cultura de células do baço de camundongos das duas linhagens infectados pelos parasitos de *L. infantum* mostrou um aumento significativo nos níveis de NO em 30 e 60 dpi quando comparados com os respectivos controles não infectados. Em camundongos BALB/c, as células do baço de animais infectados com LIC apresentaram níveis de NO mais elevados do que no caso de LII nos tempos de infecção, sendo a diferença significativa apenas em 60 dpi (Fig. 5.3a).

Em relação à cultura de células do fígado, os níveis de NO foram menores do que os observados nas células do baço. No entanto, células obtidas de camundongos BALB/c infectados com LIC apresentaram níveis de NO significativamente elevados em 30 e 60 dpi em relação as culturas provenientes de animais infectados com LII (Fig. 5.3b). Em camundongos *Swiss Webster*, não houve aumento significativo nos níveis de NO nas células do fígado em 30 dpi, porém, em 60 dpi as células infectadas por LIC mostraram maior produção de NO.

(a)



(b)

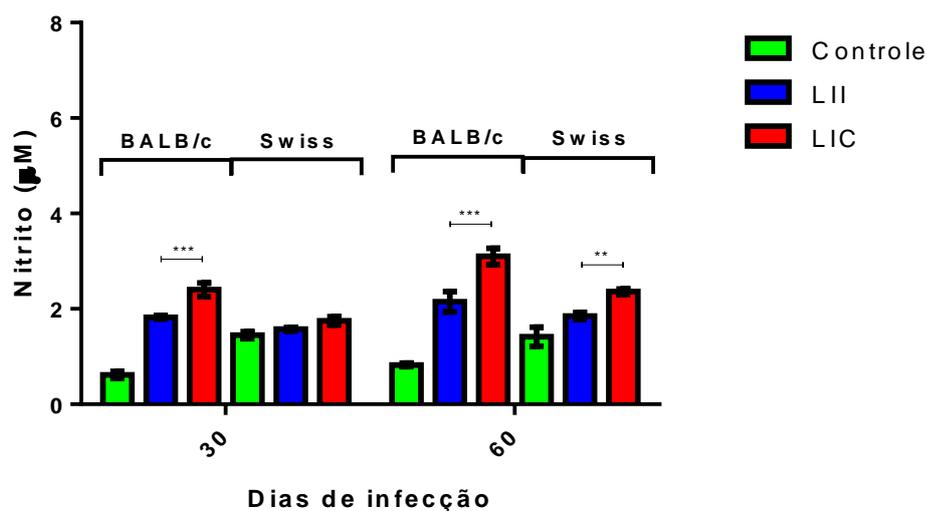


Figura 5.3. (a) Produção de NO extracelular nas células do baço. (b) Produção de NO extracelular nas células do fígado. O nitrito presente no sobrenadante das culturas foi avaliado através do método de Green e quantificado por espectrofotometria a 540 nm. (* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,0001$)

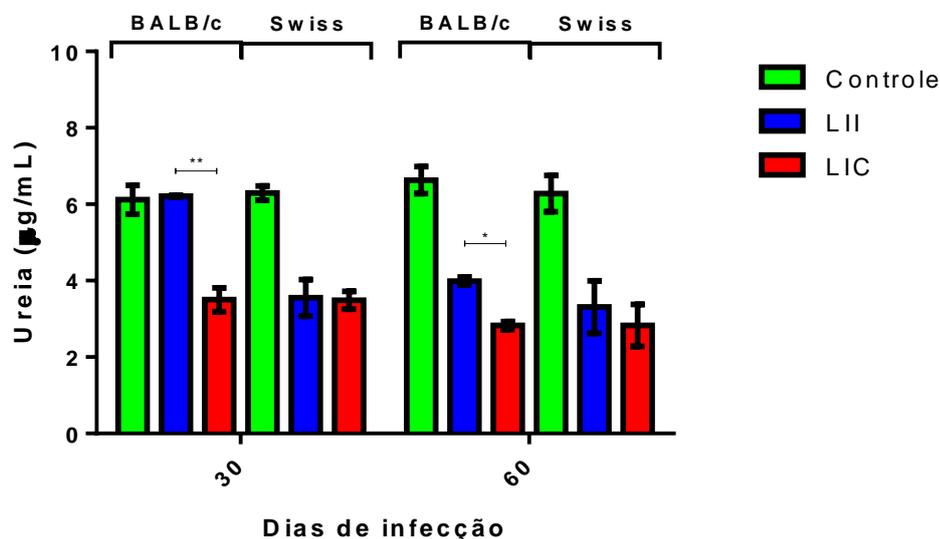
5.1.3.2. Avaliação da produção total de ureia em células infectadas

Além do NO, também foi avaliada indiretamente a atividade da arginase pela produção de ureia das mesmas culturas de baço e fígado, sendo observada redução na atividade enzimática em todos os grupos infectados. Em 30 dpi, em células de baço de camundongos BALB/c infectados com LIC houve uma diminuição significativa da atividade de arginase em relação ao grupo infectado por LII, que apresentou níveis semelhantes ao grupo controle não infectado (Fig. 5.4a). No entanto, em 60 dpi, ambos os grupos BALB/c infectados apresentaram produção de ureia reduzida em relação ao controle não infectado, havendo ainda uma redução significativa nas células infectadas por LIC quando comparado com a infecção por LII. Em camundongos *Swiss Webster*, tanto em 30 quanto em 60 dpi, a atividade da arginase em células baço de animais infectados foi significativamente menor que a do controle não infectado, e não foram observadas diferenças entre os grupos infectados por LII e LIC.

A análise das culturas de células fígado de animais BALB/c e *Swiss Webster* infectados com LII e LIC mostrou uma diminuição significativa da atividade de arginase

em relação aos respectivos controles não infectados em 30 e 60 dpi. A comparação entre os quatro grupos infectados não mostrou diferenças na produção de ureia nestes dois tempos de análise (Fig. 5.4b).

(a)



(b)

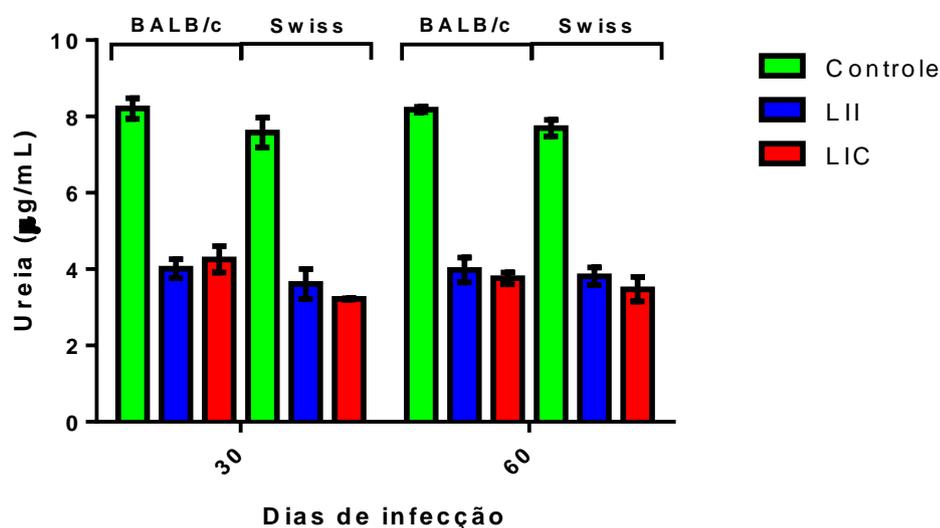


Figura 5.4. (a) Produção de ureia nas células do baço. (b) Produção de ureia nas células do fígado. A quantificação foi por espectrofotometria a 540 nm. (* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,0001$)

5.2. Avaliações *in vitro*

5.2.1. Perfil de proliferação dos parasitos de *L. infantum* isoladas das diferentes linhagens de camundongos

Tendo em vista que os parasitos de *L. infantum* apresentaram diferenças de infectividade *in vivo*, a etapa seguinte foi avaliar o seu comportamento biológico *in vitro*, bem como a possível influência que o hospedeiro pode exercer sobre o mesmo. Para isso, promastigotas de LII e LIC foram isoladas dos camundongos BALB/c e *Swiss Webster*. De modo a facilitar o entendimento, foram utilizadas as seguintes denominações: LII.B e LIC.B quando isoladas de BALB/c e LII.S e LIC.S, isoladas de *Swiss Webster*.

Primeiramente, uma curva de proliferação foi realizada para avaliar o perfil dos parasitos de *L. infantum* (LII e LIC) (Fig. 5.5). De forma geral, o crescimento da LII foi maior que o crescimento da LIC com diferenças significativas a partir do segundo até o quinto dia de cultivo, porém ambas apresentam a fase estacionária entre o terceiro e quarto dia, demonstrando o mesmo perfil da curva de proliferação.

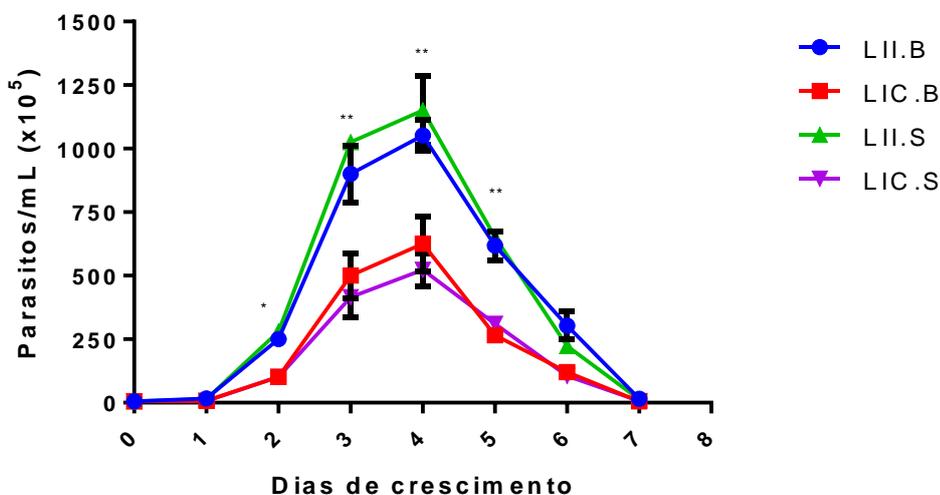


Figura 5.5. Curva de proliferação dos isolados de *L. infantum*: A curva foi iniciada com um inóculo de 5×10^5 parasitos/mL num volume total de 10 mL de meio e os parasitos foram contados durante 7 dias em câmara de Neubauer. (* $p \leq 0,01$; ** $p \leq 0,0001$).

5.2.2. Análise do percentual de formas metacíclicas nas culturas de *L. infantum*

Visto que, apesar das cepas de *L. infantum* apresentarem o mesmo perfil (Fig. 5.5), as taxas de proliferação são diferentes. Para avaliar se estes parasitos apresentam diferenças na infectividade, a porcentagem de formas metacíclicas na cultura foi determinada pelo ensaio de lise pelo complemento.

Como observado na Figura 5.6, o percentual de células resistentes à lise pelo complemento foi significativamente maior nos isolados de LII em todos os tempos avaliados. Essa maior porcentagem de formas metacíclicas foi observada nos mesmos dias em que as culturas de LII apresentavam mais parasitos do que as culturas de LIC. Além disso, no terceiro de cultivo, observou-se a maior quantidade de parasitos metacíclicos, sendo este o dia em que as culturas estavam chegando na fase de crescimento estacionário. Estes dados sugerem que LII é mais infectiva que LIC.

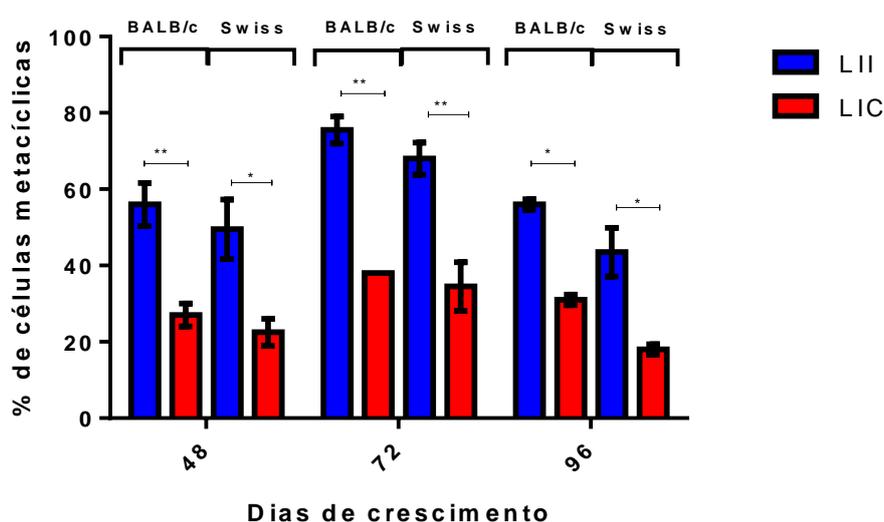


Figura 5.6. Avaliação da metaciclogênese dos isolados de *L. infantum*: O percentual de células resistentes à lise pela atividade do complemento humano foi avaliado após 48, 72 e 96 h de proliferação. (* $p \leq 0,001$; ** $p \leq 0,0001$).

5.2.3. Infecção *in vitro*

Para confirmar a hipótese de que parasitos de *L. (i.) infantum* são mais infectivos que os de *L. (i.) chagasi* e com base nas avaliações da curva de proliferação e da metaciclogênese, o terceiro dia foi escolhido para realizar a infecção de macrófagos peritoneais (MØ) *in vitro* para determinar o índice de infecção pelos

parasitos de *L. infantum*. Além disso, neste ensaio foi avaliado ainda a susceptibilidade das células dos hospedeiros à infecção. Para isso, foram utilizados macrófagos peritoneais provenientes dos camundongos BALB/c e *Swiss Webster*.

Como pode-se observar na Tabela 5.1, LII e LIC infectaram macrófagos das duas linhagens de camundongos, com valores de percentagem de infecção após 24 h na faixa de 55-75% para MØ obtidos de BALB/c (Tabela 5.1a) e 35-53%, para *Swiss Webster* (Tabela 5.1b). Pela análise do índice de infecção podemos observar em 24 e 72 h, valores sempre superiores no caso da utilização de parasitos de LII (principalmente isolados de BALB/c – LII.B), mostrando que estes são mais infectivos que os parasitos de LIC. A comparação em relação às linhagens murinas, mostrou que macrófagos de camundongos BALB/c foram mais susceptíveis à infecção por ambos os parasitos, sendo a porcentagem de macrófagos infectados, em média, quase 1,4x superior à observada em camundongos *Swiss Webster*. Estes dados corroboram com os vistos na metaciclogênese, onde os isolados de *L. (i.) infantum* apresentaram a maior porcentagem de parasitos metacíclicos, bem como aos resultados vistos na infecção *in vivo*, onde os camundongos BALB/c mostraram-se mais susceptíveis à infecção.

Tabela 5.1. Índice de infecção dos isolados de *L. infantum* em macrófagos murinos: a) Macrófagos de camundongos BALB/c; b) Macrófagos de camundongos *Swiss Webster*. O índice de infecção foi avaliado através do cálculo: % MØ infectados x nº de amastigotas/MØ totais. (*p ≤ 0,05; **p ≤ 0,01)

a)

MØ BALB/c		% MØ infectados infecção	Nº de amastigotas/ MØ totais	Índice de infecção
24 horas	LII.B	75 ± 6,1**	5 ± 2,3	375
	LIC.B	60 ± 5,5	3 ± 1,5	180
	LII.S	70 ± 4,2*	5 ± 1,7	350
	LIC.S	55 ± 3,5	4 ± 1,5	220
72 horas	LII.B	90 ± 4,1**	9 ± 2,3	810
	LIC.B	75 ± 6,5	6 ± 1,2	450
	LII.S	82 ± 7,2*	6 ± 2,1	492
	LIC.S	70 ± 5,5	7 ± 1,4	490

b)

MØ Swiss Webster		% MØ infectados/infecção	Nº de amastigotas/ MØ totais	Índice de infecção
24 horas	LII.B	53 ± 4,4*	3 ± 2,3	159*
	LIC.B	42 ± 6,3	2 ± 1,5	84
	LII.S	52 ± 4,1*	3 ± 2,7	156
	LIC.S	35 ± 6,5	3 ± 2,5	105
72 horas	LII.B	62 ± 7,2	6 ± 4,6	372*
	LIC.B	52 ± 4,5	5 ± 6,2	260
	LII.S	56 ± 8,2	6 ± 5,4	336*
	LIC.S	50 ± 10,2	4 ± 3,2	200

5.2.4. Avaliação indireta da atividade da NOS em promastigotas de *L. infantum*

A fim de se avaliar a atividade da NOS de formas promastigota de ambos os parasitos de *L. infantum*, alíquotas do sobrenadante foram coletadas em diferentes dias de cultivo (48-120 h) e o NO extracelular foi determinado pela quantidade de nitrito presente no meio de cultura. No entanto, não foram observadas diferenças entre os diferentes grupos experimentais e os níveis de NO mostraram-se muito baixos (Fig. 5.7), em especial no caso de parasitos provenientes de camundongos *Swiss Webster*, onde não foi possível detectar a produção de NO.

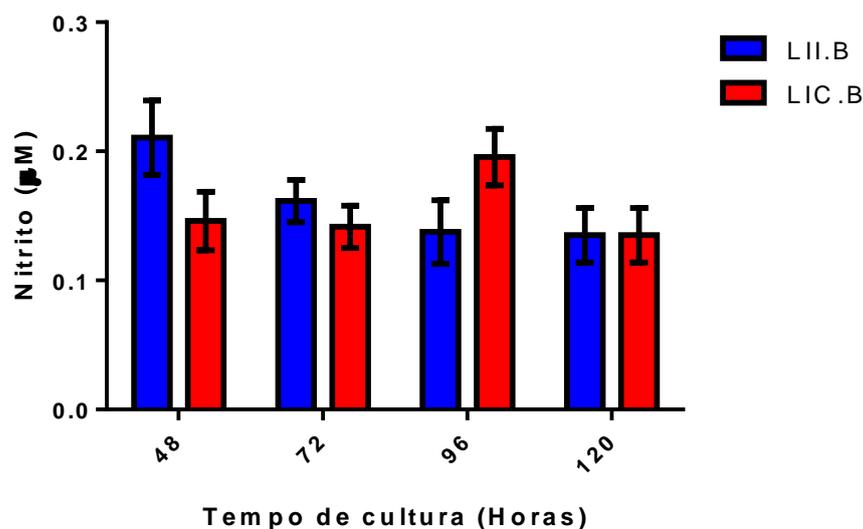


Figura 5.7. Avaliação da produção de NO extracelular em culturas de promastigotas: O sobrenadante das culturas de *Leishmania* foi coletado diariamente e a quantidade de nitrito foi avaliada pelo método de Green a 540 nm em espectrofotômetro. Os níveis de NO em promastigotas provenientes de camundongos *Swiss Webster* foram indetectáveis, por essa razão, esses pontos foram excluídos do gráfico.

Devido à baixa produção de NO pelas promastigotas de *L. infantum*, foi dosada a quantidade total desta molécula durante a infecção de macrófagos de camundongos BALB/c estimulados com LPS e INF- γ . Como observado na Figura 5.8, sem estimulação, macrófagos infectados ou não, mostraram níveis de NO muito baixos; níveis significativamente mais altos só foram observados após estímulo com LPS e INF- γ , inclusive no caso de macrófagos infectados. Estes dados sugerem que macrófagos sozinhos produzem quantidades muito baixas de NO, e que a infecção por si só não foi capaz de estimular macrófagos a produzirem altos níveis de NO. Somando os dados de produção de NO *in vitro*, constatou-se que o método de Green não foi sensível o suficiente para esta avaliação, então a padronização de uma outra metodologia para quantificação de NO fez-se necessária.

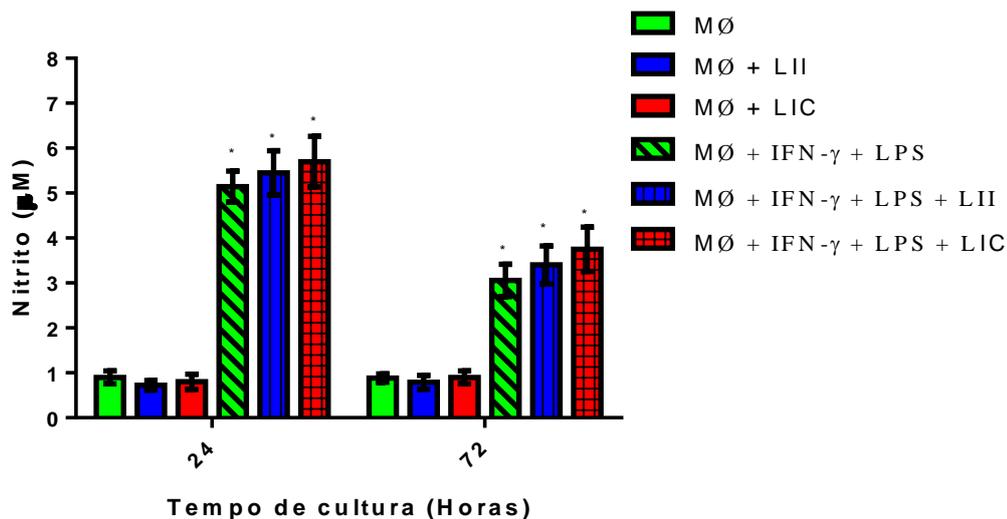


Figura 5.8. Avaliação da produção de NO durante a infecção de macrófagos estimulados: Macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c foram estimulados por LPS e INF- γ e infectados pelos parasitos de *L. infantum*. O sobrenadante das culturas foi coletado e a quantidade de nitrito foi avaliada pelo método de Green a 540 nm em espectrofotômetro. (* $p \leq 0,0001$)

Diante disso, para avaliar a produção de NO gerado dentro de formas promastigotas de *L. infantum*, foi utilizado o indicador diacetato de 4,5-diaminofluoresceína (DAF-2DA), que possui a capacidade de entrar nas células e, após sofrer modificações, fluoresce quando em contato com o NO. Devido à pouca diferença nas produções de NO durante a curva de proliferação do parasito, o terceiro dia foi escolhido para a dosagem de NO, visto que este é o dia em que as culturas apresentam as maiores porcentagem de formas metacíclicas. Como resultado, pode-se observar que através do uso de marcador DAF-2DA, foi possível quantificar o NO (em níveis basais) produzido pelos parasitos, demonstrando assim que este método é válido e adequado. Interessantemente, não foram observadas diferenças significativas entre as promastigotas de *L. infantum* aqui estudados (Fig. 5.9), sugerindo que estes parasitos possivelmente produzem níveis basais de NO de forma semelhante.

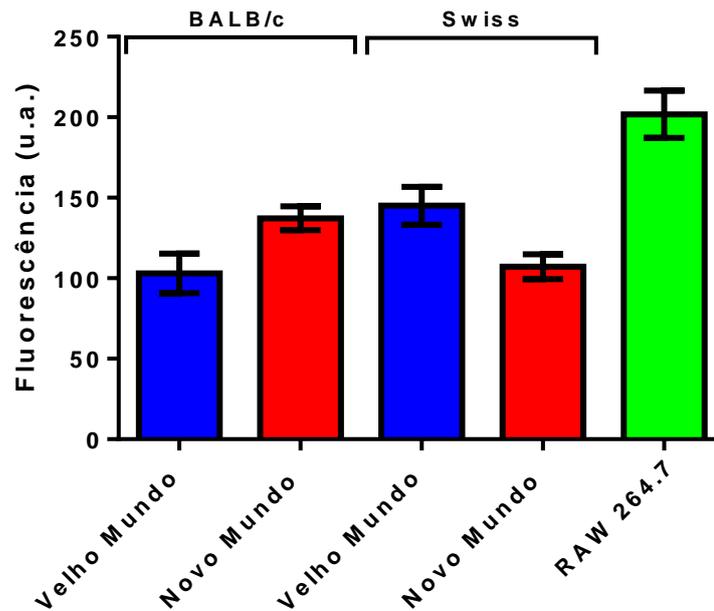


Figura 5.9. Dosagem de NO intracelular em promastigotas de *L. infantum*: A produção de NO intracelular em promastigotas foi avaliada por marcação com DAF-2DA através do *kit Fluorimetric System for NOS Detection*. Macrófagos de linhagem RAW 264.7 foram utilizados como controle positivo.

5.2.5. Avaliação da produção de ureia em promastigotas de *L. infantum*

A atividade da arginase foi avaliada através da dosagem de ureia também durante a curva de proliferação dos parasitos. Níveis de ureia mais elevados foram encontrados em 72h tanto em LII quanto em LIC, isoladas de BALB/c ou de *Swiss Webster*. Após 48-96h de cultura, LII isolada de ambos os camundongos, apresentou níveis mais elevados de ureia em relação a LIC. Interessantemente, isto ocorreu ao mesmo tempo em que os parasitos de LII apresentaram maior percentual de formas metacíclicas (Fig. 5.10).

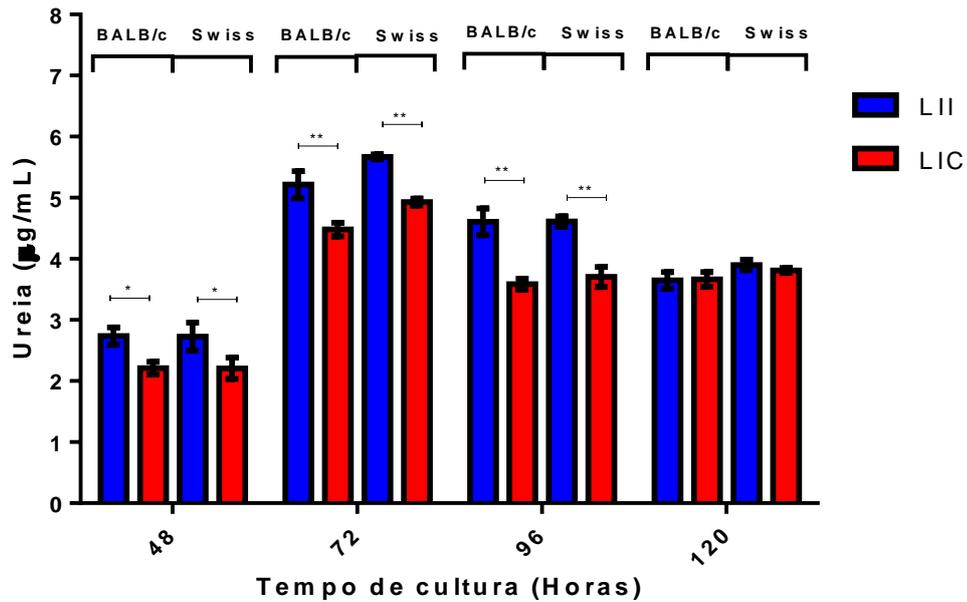


Figura 5.10. Avaliação da produção de ureia em promastigotas de *L. infantum*: A quantidade de ureia produzida foi avaliada durante a curva de proliferação por espectrofotometria a 540 nm. (* $p \leq 0,001$; ** $p \leq 0,0001$)

5.3. Análises moleculares

5.3.1. Avaliação da expressão da arginase

Uma vez que parasitos de ambos os isolados de *L. infantum* demonstraram diferenças na atividade da arginase, foi avaliado a expressão desta enzima através de qRT-PCR em promastigotas no terceiro dia de cultivo isoladas das duas linhagens de animais. Como visto na Fig 5.11, LII isolada de *Swiss Webster* demonstrou uma maior expressão da arginase quando comparada com os outros isolados, com diferenças significativas quando comparada a LII.B (* $p \leq 0,05$) e LIC.S (** $p \leq 0,01$).

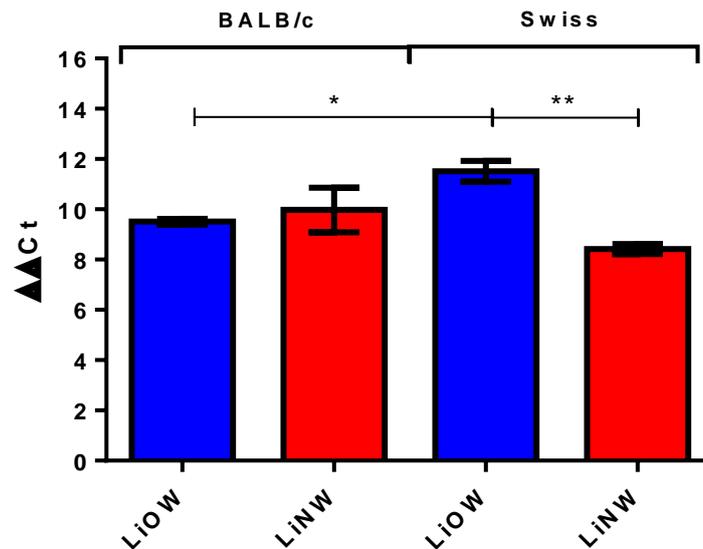


Figura 5.11. Expressão relativa da arginase dos isolados de *L. infantum*: O RNA total das promastigotas em 3^o dia de cultivo foi extraído e transcrito de forma reversa. O cDNA resultante foi quantificado por PCR em tempo real. O gene da proteína α -tubulina foi utilizada como referência. (* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$)

5.3.2. Sequenciamento do gene da arginase

A fim de entender se a diferença de expressão observada no resultado anterior poderia estar relacionada diferenças genéticas, foi realizada uma comparação das sequências de DNA dos parasitos de *L. infantum*. Inicialmente, o DNA total de promastigotas foi extraído e o gene da arginase foi amplificado por PCR convencional. A confirmação da amplificação foi feita em gel de agarose a 1% onde observou-se uma banda de aproximadamente 990 pares de base (bps) correspondente ao gene da arginase (Fig. 5.12).

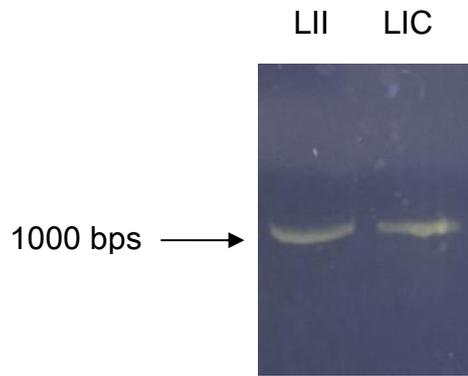


Figura 5.12. Resultado da amplificação do gene da arginase: O DNA total das promastigotas de *L. infantum* foi extraído e o gene da arginase foi amplificado por PCR. Os produtos da amplificação foram confirmados em gel de agarose a 1%.

Em seguida, as sequências obtidas foram enviadas para a plataforma de sequenciamento da FIOCRUZ. Após as análises, não foram encontradas diferenças entre as sequências gênicas de LII e LIC, sendo idênticas à sequência depositada no banco de dados (Fig. 5.13). Com isso, é possível afirmar que os parasitos são molecularmente iguais entre si (em relação ao gene da arginase) e idênticos a sequência de *L. infantum* depositada no banco de dados TriTrypDB.

LinfantumNM	GACGGCAAGGCTGTTGAGGCTCGCAAGGCCAGCGATAATGGCGACAGGATCGGTCGCGTC
LinfantumVM	GACGGCAAGGCTGTTGAGGCTCGCAAGGCCAGCGATAATGGCGACAGGATCGGTCGCGTC
Linfantumdb	GACGGCAAGGCTGTTGAGGCTCGCAAGGCCAGCGATAATGGCGACAGGATCGGTCGCGTC

LinfantumNM	AAGCGCCCAGGCTGACGGCGGAGTGCACGGAGAAGATCTACAAGTGTGTGCGCAGGGTG
LinfantumVM	AAGCGCCCAGGCTGACGGCGGAGTGCACGGAGAAGATCTACAAGTGTGTGCGCAGGGTG
Linfantumdb	AAGCGCCCAGGCTGACGGCGGAGTGCACGGAGAAGATCTACAAGTGTGTGCGCAGGGTG

LinfantumNM	GCCGAGCAGGGCCGCTTTCCTCTCACTATCGGCGGCGATCACTCCATCGCCCTGGCAGG
LinfantumVM	GCCGAGCAGGGCCGCTTTCCTCTCACTATCGGCGGCGATCACTCCATCGCCCTGGCAGG
Linfantumdb	GCCGAGCAGGGCCGCTTTCCTCTCACTATCGGCGGCGATCACTCCATCGCCCTGGCAGG

LinfantumNM	GTGGCCGGCGTGTGACCGTTTACCCGGATGCCGGCGTGATTTGGGTGGACGCCACGCG
LinfantumVM	GTGGCCGGCGTGTGACCGTTTACCCGGATGCCGGCGTGATTTGGGTGGACGCCACGCG
Linfantumdb	GTGGCCGGCGTGTGACCGTTTACCCGGATGCCGGCGTGATTTGGGTGGACGCCACGCG

LinfantumNM	GACATCAACACTATGTCTGGTACGGTCTCCGGTAACTTGCACGGGTGCCCTTATCGATC
LinfantumVM	GACATCAACACTATGTCTGGTACGGTCTCCGGTAACTTGCACGGGTGCCCTTATCGATC
Linfantumdb	GACATCAACACTATGTCTGGTACGGTCTCCGGTAACTTGCACGGGTGCCCTTATCGATC

LinfantumNM	CTGCTGGGGCTTGATCGCAAGAACATTCGAGTGCTTTTCGTGGGTACCGCAGGTGCTG
LinfantumVM	CTGCTGGGGCTTGATCGCAAGAACATTCGAGTGCTTTTCGTGGGTACCGCAGGTGCTG
Linfantumdb	CTGCTGGGGCTTGATCGCAAGAACATTCGAGTGCTTTTCGTGGGTACCGCAGGTGCTG

Figura 5.13. Comparação das sequências do gene da arginase: Imagem representativa das sequências do gene da arginase dos parasitos de *L. infantum* e da sequência depositada no banco de dados TriTrypDB.org.

Tomados em conjunto, estes dados sugerem que, apesar dos parasitos de *L. infantum* apresentarem sequência do gene da arginase idênticas, a expressão deste gene é diferente, podendo indicar que as diferenças vistas na atividade da arginase podem estar relacionadas à expressão genética.

5.3.3. Clonagem do gene da arginase

Na intenção de determinar a importância da arginase dos parasitos, foi iniciado um processo de clonagem deste gene. O gene ARG foi amplificado e inserido no vetor pET28a, gerando o plasmídeo pET28-ARG. Para aumentar a estabilidade e o número de cópias do vetor, este foi mantido em bactérias DH5 α . A inserção foi confirmada por digestão com enzimas restrição, onde o inserto com o tamanho esperado foi liberado (Fig. 5.14).

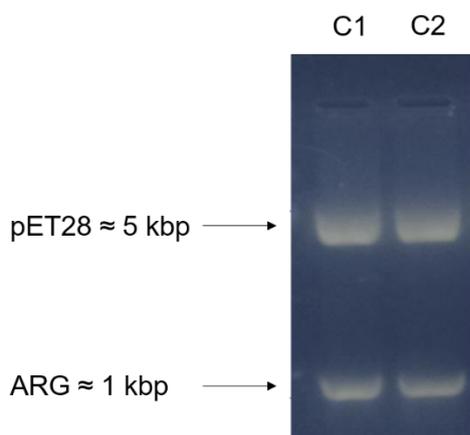


Figura 5.14. Resultado da digestão dos clones DH5 α -pET28-ARG em gel de agarose 1%: Digestão dos clones 1 e 2 com as enzimas de restrição NdeI e BamHI.

Uma vez obtido o plasmídeo pET28-ARG, este foi transfectado em células quimiocompetentes BL21, gerando diversos clones recombinantes (Fig. 5.15a), que foram selecionados por pressão de antibiótico e a transfecção confirmada por PCR (Fig. 5.15b).

(a)



(b)

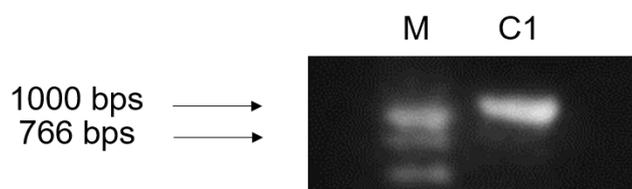


Figura 5.15. Transfecção do gene arginase de *L. infantum* em bactérias quimiocompetentes. (a) Colônias de bactérias BL21-pET28-ARG. (b) Confirmação da transfecção por eletroforese. Clones BL21-pET28-ARG selecionados em meio agar LB com canamicina. Foi realizado PCR para confirmar a transfecção que foi analisado em gel de agarose 1%. M: marcador de peso molecular; C1: clone BL21-pET28-ARG.

Por fim, após a confirmação da transfecção, foram realizados testes de indução da expressão do gene com IPTG e a análise dessa expressão foi realizada por gel de poliacrilamida. Como apresentado na Figura 5.16, nas bactérias que foram induzidas foi observada uma banda, de aproximadamente 40 kDa, correspondente a expressão do gene ARG, mostrando que a clonagem foi bem-sucedida.

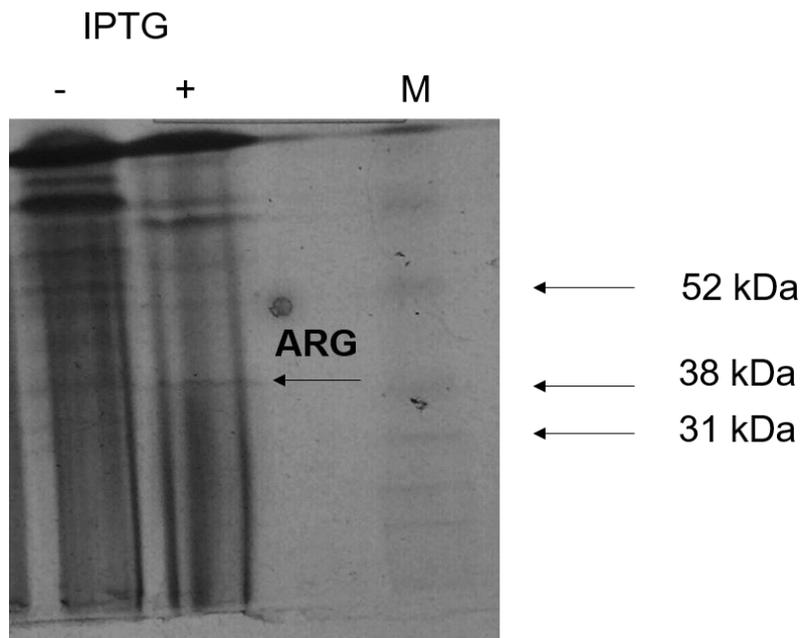


Figura 5.16. Expressão do gene ARG em bactérias transfectadas. Bactérias BL21-pET28-ARG foram incubadas com IPTG e induzidas à expressão. M: marcador de peso molecular.

6. DISCUSSÃO

Sendo a leishmaniose visceral (LV) uma grave doença que acomete milhões de pessoas todos os anos e que pode levar à morte parte das pessoas atingidas (WHO 2010), estudar sua patologia, bem como entender as características de seus agentes etiológicos, são de suma importância. Como relatado anteriormente, a classificação do parasito responsável pela leishmaniose visceral americana (LVA) ainda é muito controversa na literatura. Seja *L. (i.) chagasi* uma espécie diferente, ou sinónimoia da espécie *L. (i.) infantum*, é necessário considerar que ambos os parasitos apresentam diferenças entre si, como comportamento biológico, bioquímico e patogênico (Silveira & Corbett 2010).

Na literatura existem diversos trabalhos demonstrando as variedades genéticas e moleculares entre diferentes isolados de *L. infantum* oriundos de diversas regiões geográficas (Baptista-Fernandes *et al.* 2007; Kuhls *et al.* 2011; Alvarenga *et al.* 2012), no entanto, são poucos os trabalhos relatando as diferenças de infectividade e capacidade de sobrevivência de diferentes cepas no hospedeiro vertebrado (Marques *et al.* 2015).

Um método que tem sido utilizado nos últimos anos para identificação e caracterização de diferentes isolados de *Leishmania* é a eletroforese de enzima multilocus (MLEE), que possibilita a determinação de similaridades e diferenças de enzimas (isoenzimas) entre diferentes parasitos (Lima 2010). As isoenzimas são enzimas que apresentam diferentes formas moleculares (derivadas de diferenças genéticas) mas que catalisam basicamente a mesma reação (Market & Moller 1959). Neste tipo de eletroforese, cepas de *Leishmania* são agrupadas em grupos com padrões enzimáticos idênticos (perfis eletroforéticos) denominados zimodemas. O método de Montpellier (MON) é bastante utilizado e caracteriza-se na análise de 15 sistemas enzimáticos (Rioux *et al.* 1990). Isolados de *L. infantum* são comumente agrupados no zimodema MON-1 (Kuhls *et al.* 2011). Esta e outras técnicas similares são eficazes para demonstrar variações intraespecíficas de diferentes parasitos e são muito utilizados por autores em discussões acerca de classificação taxonômica e quanto a origem da *L. (i.) chagasi* no Novo Mundo (Silveira & Corbett 2010). Contudo, apesar do importante avanço na área de biologia molecular para caracterizações genéticas de *Leishmania* spp., caracterizações relacionadas a biologia dos parasitos são igualmente necessárias.

Os dados apresentados neste trabalho demonstraram que parasitos de *L. (i.) infantum* e de *L. (i.) chagasi* possuem diferenças entre si com relação aos aspectos biológicos e patogênicos. Como visto inicialmente, parasitos de *L. infantum* apresentaram diferentes graus de infectividade durante a infecção experimental *in vivo* em diferentes modelos murinos. LII demonstrou-se mais infectiva tanto em 30 quanto em 60 dpi. Outro ponto importante que deve ser ressaltado dentre os resultados obtidos é que animais com diferentes *backgrounds* genéticos apresentaram diferentes sensibilidades à infecção, sendo camundongos BALB/c mais susceptíveis. Com isso, demonstra-se que a escolha racional de um modelo animal para ensaios *in vivo* ou *in vitro* é de grande relevância por interferir diretamente nos resultados de testes com agentes quimioterápicos, nas respostas imunológicas e farmacológicas.

Uma questão de grande importância durante uma infecção por *Leishmania* spp. é o tropismo de cada espécie deste parasito no hospedeiro vertebrado, pois além dos fatores parasitários também participam fatores do próprio hospedeiro. Já é bem descrito na literatura científica que a participação de células e moléculas da resposta imunológica do hospedeiro influenciam diretamente no curso e no desenvolvimento da doença. Neste sentido, o estudo da interação parasito-hospedeiro é extremamente importante, uma vez que são os elementos provenientes desta interação que vão determinar o sucesso ou a falha terapêutica (Basselin *et al.* 1997; Nieto *et al.* 1999; Chrusciak-Talhari *et al.* 2009).

É sabido que a resposta imune mediada por células T-*helper* desempenha um papel fundamental no controle da infecção por parasitos do gênero *Leishmania*. Este tipo de resposta é claramente polarizado em infecções experimentais em modelo murino, uma vez que animais resistentes à infecção apresentam produção mais acentuada de INF- γ , enquanto que animais susceptíveis apresentam maior produção de IL-4 (Heinzl *et al.* 1989). Segundo Romagnani (2000), a polarização Th1 e Th2 é determinada por fatores ambientais e genéticos, o que explica as diferentes susceptibilidades à infecção observadas em camundongos com diferentes *backgrounds* genéticos.

Contudo, parasitos do gênero *Leishmania* possuem a capacidade de modular a resposta imune do hospedeiro infectado para aumentar suas chances de sobrevivência no interior das células (Cecilio *et al.* 2014). Dentre os mecanismos utilizados por estes parasitos está a captação de L-arginina, substrato utilizado pela enzima iNOS, suprimindo a produção de NO do hospedeiro e inibindo a liberação de

citocinas pró-inflamatórias (Liew *et al.* 1991; Moll *et al.* 1995; Wanasen & Soong 2008). Este processo leva a um aumento da atividade da arginase, que por sua vez pode ser modulada pelo parasito. Estudos *in vitro* com meios de cultura contendo diferentes concentrações de L-arginina, mostraram que a concentração deste aminoácido é crucial no efeito do NO e assim na morte do parasito (Genestra *et al.* 2003b).

Os dados aqui obtidos demonstraram que células do baço e fígado infectadas pelos parasitos de *L. infantum* produziram diferentes níveis de NO, sendo os maiores níveis vistos nas células de BALB/c infectadas por LIC. Curiosamente, apesar das células de baço infectadas terem produzido mais NO do que as células não infectadas, os parasitos de ambas as cepas ainda foram capazes de sobreviver e até multiplicar no interior dos hospedeiros, visto que as cargas parasitárias aumentaram após 60 dpi, principalmente em células infectadas pela LII. No trabalho publicado por Marques e colaboradores (2015), parasitos da *L. (i.) infantum* aqui utilizada, foram capazes de sobreviver a altas quantidades de NO presente em meio de cultura, demonstrando uma maior resistência a toxicidade causada pelo NO, podendo explicar o fato da LII ter resistido bem à infecção.

Em relação à atividade da arginase, observou-se uma baixa produção geral de ureia tanto no baço como no fígado dos animais infectados em comparação com os animais controle. Contudo, células do baço de camundongos BALB/c infectadas pela LII mostraram maiores produções de ureia em relação as outras células infectadas. Esta maior produção pode estar relacionada com as maiores cargas parasitárias observadas nestas células. Tomados em conjunto, os resultados das atividades da NOS e da arginase indicam que parasitos de *L. infantum* podem influenciar no metabolismo da L-arginina do hospedeiro infectado. No entanto, outros ensaios avaliando a atividade destas enzimas nos parasitos e nas células hospedeiras, de forma diferencial, durante a infecção são necessários, como por exemplo, ensaios de inibição ou das enzimas do parasito ou da célula hospedeira infectada.

De modo geral, observou-se que camundongos BALB/c foram mais susceptíveis à infecção por *Leishmania* do que camundongos *Swiss Webster*, principalmente quando o parasito era mais infectivo, como no caso da LII. Como descrito por Pereira & Alves (2008), fatores genéticos dependentes da linhagem murina interferem no sucesso da infecção experimental, levando a diferenças na progressão e desenvolvimento da doença. No entanto, além da capacidade do hospedeiro em responder à infecção, deve-se considerar ainda as diferenças

biológicas da cepa e da espécie do parasito, uma vez que trabalhos publicados já demonstraram que isolados de *L. infantum* pertencentes ao mesmo zimodema ou até mesmo parasitos de um mesmo isolado podem apresentar diferentes sensibilidades à resposta imune do hospedeiro, o que pode estar relacionado com fatores de virulência (Garin *et al.* 2001; Baptista-Fernandes *et al.* 2007).

Alguns autores buscaram identificar diferenças de infectividade em macrófagos e outros marcadores de virulência entre isolados de *L. infantum*, porém sem sucesso (Campos-Ponce *et al.* 2005; Meddeb-Garnaoui *et al.* 2009). Entretanto, há trabalhos indicando diferenças de infectividade entre cepas de *L. infantum* e modulação, por parte dos parasitos, da expressão das enzimas do metabolismo da L-arginina durante a infecção de camundongos (Marques *et al.* 2015). Apesar disso, ainda existe a necessidade de se produzir estudos relatando estas diferenças entre parasitos provenientes de regiões geográficas distintas.

Diante disso, no presente estudo buscou-se avaliar as características biológicas e moleculares de diferentes parasitos de *L. infantum* e o comportamento deles quando isolados de diferentes hospedeiros (camundongos BALB/c e *Swiss Webster*). Com isso, observou-se que a *L. (i.) infantum*, seja isolada de camundongos BALB/c ou *Swiss Webster*, apresenta uma maior taxa de crescimento que a *L. (i.) chagasi*, no entanto, ambas possuem o mesmo perfil de crescimento. Foi avaliada ainda a capacidade infectiva e o comportamento dos diferentes parasitos durante a infecção de macrófagos dos mesmos hospedeiros de onde foram isoladas. Assim como os resultados *in vivo*, a *L. (i.) infantum* mostrou-se mais infectiva tanto pela quantidade de formas metacíclicas, em cultura, resistentes ao complemento presente no soro, bem como pelo índice de infecção nos macrófagos murinos. Além disso, macrófagos de camundongos com diferentes *backgrounds* genéticos também apresentaram diferentes susceptibilidades à infecção *in vitro*, reforçando a importância da busca por melhores modelos murinos para a infecção experimental. Os dados de metaciclogênese e infectividade *in vitro* aqui apresentados confrontam com os resultados vistos por Campo-Ponce e colaboradores (2005), onde isolados de *L. infantum* e *L. major* não demonstraram diferenças tanto na sensibilidade a soro (resistência a lise pelo complemento) quanto na infectividade sobre macrófagos de camundongos BALB/c.

Parasitos do gênero *Leishmania* quando se estabelecem dentro dos macrófagos, demonstram uma habilidade em sobreviver num ambiente considerado

“hostil” e precisam modular as funções da resposta imunológica da célula hospedeira. O metabolismo da L-arginina está intimamente associado ao sucesso ou a falha do estabelecimento da infecção *Leishmania* spp., pois é esta via que pode determinar tanto a morte quanto a sobrevivência dos parasitos (Wanassen & Soong 2008).

Neste sentido, já foi demonstrada a diminuição de produção de NO em macrófagos infectados por *Leishmania* pela inibição da enzima iNOS (Balestieri *et al.* 2002). Outros estudos com *L. donovani* tem demonstrado a capacidade destes parasitos em modular a atividade de arginase em células do baço de animais infectados, favorecendo o estabelecimento da infecção pelo aumento da expressão da enzima (Rodrigues *et al.* 2015). Consequentemente, é de grande interesse estabelecer uma relação entre os níveis de indução e inibição das enzimas NOS e arginase nos parasitos intracelulares, assim como da própria célula hospedeira infectada. Entretanto, poucos são os trabalhos relatando as diferenças de atividade das enzimas do metabolismo da L-arginina, muito menos comparando promastigotas de diferentes cepas de *L. infantum*.

Considerando a relevância do NO na leishmaniose, sua avaliação no parasito é de grande importância científica para a compreensão geral do metabolismo da L-arginina no parasito e sua participação na infectividade/virulência. A detecção deste radical livre é um desafio, que pode ser atribuído à sua curta meia-vida e à sua baixa concentração. Os métodos diretos ou indiretos de detecção de NO, como quimioluminescência, dosagem de nitrito ou a expressão de mRNA de NOS e outros, são ainda métodos considerados limitados pela incapacidade de definir populações de interesse e detectar eventos intracelulares a nível unicelular (Chatton & Broillet 2002; Failli *et al.* 2002).

Para demonstrar a produção de NO, através da formação de nitrito em promastigotas de *L. infantum*, utilizou-se o método de Green (1892). Contudo, devido as baixas quantidades de nitrito presente nos sobrenadantes das culturas, esta técnica mostrou-se insensível para estes testes. Não foi possível detectar a produção de NO nem mesmo quando macrófagos foram infectados pelas mesmas promastigotas. A produção de NO só pode ser observada quando foram utilizados estímulos para ativar a iNOS de macrófagos murinos. Diante da baixa sensibilidade do reagente de Griess, a padronização e aplicação de uma outra técnica altamente sensível de detecção de NO com um indicador fluorescente intracelular foi realizada. O marcador utilizado neste trabalho foi o diacetato de 4,5-diaminofluoresceína (DAF-

2DA) que tem sido amplamente utilizado em modelos biológicos variados. Contudo, o uso deste marcador na avaliação de NO em *Leishmania* é mais recente e algumas pesquisas já demonstraram a eficácia do uso deste marcador em cultura de macrófagos infectados (Sarkar *et al.* 2011). Nesse sentido, ao utilizar este indicador fluorescente foi possível detectar a produção basal de NO no interior das promastigotas de *L. infantum* que, no entanto, não apresentaram alterações significativas entre os diferentes isolados.

Como demonstrado por Balestieri e colaboradores (2002), em macrófagos infectados por *Leishmania* ocorreu inibição da atividade da iNOS, seguida da redução da produção de NO, indicando a habilidade da *Leishmania* em evadir dos mecanismos de defesa da célula hospedeira. Apesar do NO ser uma importante molécula responsável por diversos processos de sinalização celular e ser considerada por alguns autores como uma das peças chave na resposta imune do hospedeiro (Green *et al.* 1990a; 1990b; Evans *et al.* 1993; Murray & Nathan 1999; Awasthi *et al.* 2004), a arginase mostra-se igualmente importante, uma vez que ela é uma enzima essencial na via de geração de poliaminas. Contudo, poucos trabalhos na literatura relatam a importância da inibição da arginase dos parasitos e a produção de NO pelos macrófagos infectados (Rodrigues *et al.*, 2015), muito menos a atividade e expressão destas enzimas em diferentes cepas de *Leishmania*.

Já foram descritas a existência de uma NOS em *Leishmania* spp. (Genestra *et al.* 2003a), bem como em *Trypanosoma cruzi* (Paveto *et al.*, 1995). Porém, são escassos na literatura e em bancos de dados genômicos, a identificação do gene responsável pela codificação desta enzima em tripanosomatídeos (Silva 2010), dificultando assim a busca por diferenças moleculares da NOS entre cepas de *Leishmania*. Contudo, o gene da arginase já é bem descrito, permitindo assim a realização de diversas análises.

Observou-se neste trabalho que diferentes isolados de *L. infantum* apresentam atividade da arginase diferente entre si durante sua proliferação. No entanto, ambos isolados demonstraram maior atividade da enzima no terceiro dia de cultivo, quando os parasitos estão chegando na fase estacionária. Para buscar as possíveis causas dessas diferenças de atividade, realizou-se o sequenciamento do gene ARG e a expressão relativa da enzima. Como resultado, constatou-se que este gene é idêntico entre os isolados de *L. infantum* e idêntico à sequência depositada no banco de dados online TriTryp. Apesar disso, os isolados apresentaram expressão relativa do mRNA

diferenciada entre si, o que pode explicar os resultados vistos no ensaio de atividade. Para confirmar estes dados, mais estudos sobre expressão da enzima (como ensaios de *Western blot*) são necessários.

Devido aos poucos estudos demonstrando a importância da arginase dos parasitos sobre sua capacidade infectiva, iniciou-se um processo de clonagem desta enzima para posteriores ensaios de super-expressão nos diferentes parasitos de *L. infantum*, bem como análises do comportamento destes frente a esta situação. Foram realizados com sucesso a subclonagem em vetores de expressão (pET28-ARG) e a clonagem em bactérias quimiocompetentes BL21 (BL21-pET28-ARG). Dando continuidade a estes ensaios, estão sendo realizadas a expressão e purificação da arginase em sistema heterólogo como parte do subprojeto desenvolvido por outros membros do nosso grupo de pesquisa. Como isso será possível realizar outros testes para melhor entendimento do papel da arginase no metabolismo da L-arginina de parasitos do gênero *Leishmania*.

7. CONCLUSÕES

Os dados apresentados neste trabalho indicam que a *L. (i.) infantum* e a *L. (i.) chagasi* apresentam comportamento biológico e molecular diferentes, apesar de serem consideradas idênticas entre si. A *L. (i.) infantum* mostrou-se mais infectiva que a *L. (i.) chagasi* tanto *in vivo* quanto *in vitro*, demonstrando as maiores cargas parasitárias e índices de infecção, maiores taxas crescimento biológico e de formas metacíclicas em cultura, o que reflete no seu grau de virulência.

Observou-se também que durante a infecção *in vivo* por estes parasitos houve diferenças na atividade das enzimas NOS e arginase, enzimas que podem determinar a morte ou a sobrevivência de *Leishmania* spp., indicando que estes parasitos podem influenciar no metabolismo da L-arginina do hospedeiro infectado. Contudo, mais estudos são necessários para confirmar este dado.

In vitro, não foram observadas diferenças significativas na produção de NO intracelular entre promastigotas de *L. infantum* isoladas de animais com diferentes *backgrounds* genéticos. Entretanto, em relação a enzima arginase, apesar dos parasitos apresentarem o gene ARG idêntico entre si, a *L. (i.) infantum* demonstra maior atividade e expressão relativa desta enzima, que é de extrema importância para a manutenção destes protozoários no interior da célula hospedeira.

Por fim, concluiu-se também que camundongos com diferentes *backgrounds* genéticos apresentam diferentes susceptibilidades à infecção quando infectados por diferentes parasitos de *Leishmania*, tanto *in vivo* quanto *in vitro*, reforçando a importância da busca por melhores modelos animais para o estudo da fisiopatologia das leishmanioses.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alvar J, Canavate C, Molina R, Moreno J, Nieto J. Canine leishmaniasis. *Adv Parasitol* 57: 1-88, 2004.
- Alvar J, Vélez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P, Cano J *et al.* WHO Leishmaniasis Control Team Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PLoS One*, 7, e35671, 2012.
- Alvarenga JSC, Ligeiro CM, Gontijo CMF, Cortes S, Campino L *et al.* kDNA Genetic Signatures Obtained by LSSP-PCR Analysis of *Leishmania (Leishmania) infantum* Isolated from the New and the Old World. *PLoS One* 7(8): e43363, 2012.
- Anvisa. Como a Anvisa vê o uso off label de medicamentos [Internet]. 2005 [citado em 27/01/2015]. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/medicamentos/registro/registro_offlabel.htm
- Ash DE. Structure and function of arginases. *J Nutr.* 134(10 Suppl): 2760S-2764S; discussion 2765S-2767S, 2004.
- Aswathi A, Mathur RK, Saha B. Immune response to *Leishmania* infection. *Indian J. Med. Res.* 119, 238-258, 2004.
- Balestieri FM, Queiroz AR, Savone C, Costa VM, Barral-Netto M, Abrahamsohn IA. *Leishmania (L.) amazonensis*-induced inhibition of nitric oxide synthesis in host macrophages. *Microbes Infect.* 4: 23-89, 2002.
- Baptista-Fernandes T Marques C, Roos Rodrigues O, Santos-Gomes GM. Intra-specific variability of virulence in *Leishmania infantum* zymodeme MON-1 strains. *Comp Immunol, Microbiol and Infect Dis*, 30(1): 41-53, 2007.
- Basselin M, Badet-Denisot MA, Lawrence F, Robert-Gero M. Effects of pentamidine on polyamine level and biosynthesis in wild-type pentamidine treated and pentamidine-resistant *Leishmania*. *Exp Parasitol*, 85: 274-282, 1997.

- Basu NK, Kole L, Ghosh A, Das PK. Isolation of a nitric oxide synthase from the protozoan parasite *Leishmania donovani*. *FEMS Microbiol Lett.* 156:43–47, 1997.
- Bell CA, Hall JE, Kyle DE, Grogil M, Ohemeng KA, Allen MA, Tidwell RR. Structure-activity relationships of analogs of pentamidine against *Plasmodium falciparum* and *Leishmania mexicana amazonensis*. *Antimicrob Agents Chemother.* 34:1381-1386, 1990.
- Berman JD. Human Leishmaniasis: clinical, diagnostic, and chemotherapeutic developments in the last 10 years. *Clin Infect Dis.* 24:684-703, 1997.
- Bernard AC, Mistry SK, Morris SM, O'Brien WE, Tsuei BJ, Maley ME *et al.* Alterations in arginine metabolic enzymes in trauma. *Shock* 15, 215–219, 2001.
- Brandonisio O, Panaro MA, Sisto M, Acquafredda A, Fumarola L, Leogrande D, Mitolo V. Nitric oxide production by *Leishmania*-infected macrophages and modulation by cytokines and prostaglandins. *Parassitologia* 43 Suppl 1: 1–6, 2001.
- Camargo EP, Coelho JA, Moraes G, Figueiredo EN. *Trypanosoma* spp., *Leishmania* spp. and *Leptomonas* spp.: enzymes of ornithine-arginine metabolism. *Exp Parasitol.* 46(2):141-144, 1978
- Campos-Ponce M, Ponce C, Ponce E, Maingon RD. *Leishmania chagasi/infantum*: further investigations on *Leishmania* tropisms in atypical cutaneous and visceral leishmaniasis foci in Central America. *Exp Parasitol.*109(4):209–219, 2005.
- Castro MDM, Cossio A, Velasco C, Osorio L. Risk factors for therapeutic failure to meglumine antimoniate and miltefosine in adults and children with cutaneous leishmaniasis in Colombia: A cohort study. *PLoS Negl Trop Dis* 11 (4): e0005515, 2017.

- Cecilio O, Pérez-Cabezas B, Santarém N, Maciel J, Rodrigues V, Silva AC. Deception and manipulation: the arms of *Leishmania*, a successful parasite. *Frontiers in Immunology*, 5: e480, 2014.
- Center for Diseases Control and Prevention. 2013. Biology – Life cycle. Disponível em: <https://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/biology.html> Acessado em: 25 de junho de 2016.
- Chappuis F, Sundar S, Hailu A, Ghalib H, Rijal S, Peeling RW, *et al.* Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? *Nat Rev Microbiol*, 5(11):873-882, 2007.
- Chatton JY, Broillet MC. Detection of nitric oxide production by fluorescent indicators. *Meth Enzymol*, 359: 134-148, 2002.
- Chorilli M, Michelin DC, Salgado HRN. Animais de laboratório: o camundongo. *Revista de ciências em farmacologia básica aplicada*, v. 28, n.1, p11-23, 2007.
- Chrusciak-Talhari A, Ribeiro-Rodrigues R, Talhari C, Silva RM Jr, Ferreira LC, Botileiro SF, Santos LO, Dietze R, Talhari S. *Am. J. Trop. Med. Hyg*, 81: 559-564, 2009.
- Closs EI, Simon A, Vekony N, Rotmann A. Plasma membrane transporters for arginine. *J Nutr*, 134:2752S–9S, 2004.
- Colotti G, Ilari A. Polyamine metabolism in *Leishmania*: from arginine to trypanothione. *Amino Acids*. 40(2):269-285, 2011.
- Corraliza IM, Campo ML, Soler G, Modolell M. Determination of arginase activity in macrophages: a micromethod. *J Immunol Methods*.; 174:231–235, 1994.
- Costa J, Costa A. Leishmaniose cutânea difusa (LCD) no Brasil após 60 anos de sua primeira descrição. *Gaz Médica da Bahia*, 2009.

- Cox FE. Classification and introduction to the parasitic protozoa. In: Cox FE, Wakelin D, Gillespie SH, Despommier DD, editors. *Topley & Wilson's Microbiology and Microbial Infections, Parasitology*. 10th ed. London: Hodder Arnold Press; p. 186-199, 2005.
- Croft S, Yardley V. Chemotherapy of leishmaniasis. *Curr Pharm Design*. 8:319-342, 2002.
- Croft SL, Coombs GH. Leishmaniasis-current chemotherapy and recent advances in the search for novel drugs. *Trends Parasitol*. 19:502-508, 2003.
- Croft SL, Neal RA, Pendergast W, Chan JH. The activity of alkyl phosphorylcholines and related derivatives against *Leishmania donovani*. *Biochem. Pharmacol*. 36:2633–2636,1987.
- Cunha AM, Chagas E. Nova espécie de protozoário do gênero *Leishmania* patogênico para o homem. *Leishmania chagasi* n.sp. Nota prévia. Hospital (Rio de Janeiro),11:3-9,1937.
- Cupolillo E, Medina-Acosta E, Noyes H, Momen H, Grimaldi G Jr. A revised classification for *Leishmania* and *Endotrypanum*. *Parasitol. Today*.; 16: 142-144, 2000.
- da Silva ER, Castilho TM, Pioker FC, de Paula Silva T, Carlos H, Floeter-Winter LM. Genomic organisation and transcription characterisation of the gene encoding *Leishmania (Leishmania) amazonensis* arginase and its protein structure prediction. *Int J Parasitol*. 32(6):727-737, 2002.
- da Silva ER, da Silva MF, Fischer H, Mortara RA, Mayer MG, Framesqui K, Silber AM, Floeter- Winter LM. Biochemical and biophysical properties of a highly active recombinant arginase from *Leishmania (Leishmania) amazonensis* and subcellular localization of native enzyme. *Mol. Biochem. Parasitol*.; 159: 104-111, 2008.

- Decker-Jackson JE, Schrot JR, Levin GV. Identification of *Leishmania* spp by radiorespirometry. *J Protozool.* 24(3):463-470, 1977.
- Decker-Jackson JE, Tang DB. Identification of *Leishmania* spp by radiorespirometry. II. A statistical method of data analysis to evaluate the reproductibility and sensitivity of the technique. In: Chance ML, Walton BC, editors. Biochemical Characterization of *Leishmania*. Proceedings of a Workshop Pan Am Health Organization; 1980 Dec 1-9; Washington (DC): Switzerland.UNDP/World Bank/WHO Special Programme for Research. Training in Tropical Diseases; p. 205-245, 1980.
- Dutra PML & Da Silva SAG. Experimental Models of Trypanosomatid Infections. In: Different Aspects of Chemotherapy of Trypanosomatids. Leon & Torres-Santos Eds. Nova Science Publishers, Inc. New York. p39-57, 2017.
- Engel J. Miltefodine, the story of a successful partnership: disease endemic country - TDR - pharmaceutical industry (Zentaris). *TDR News*; (68):5, 2002.
- Evans TG, Thai L, Granger DL, Hibbs JB, Jr. Effects of in vivo inhibition of nitric oxide production in murine leishmaniasis. *J. Immunol.* 151: 907-915, 1993.
- Fagundes DJ, Taha MO. Modelo animal de doença: critérios de escolha e espécies de animais de uso corrente. *Acta Cir Bras* [serial online]; 19(1), 2004. Disponível em URL: <http://www.scielo.br/acb>.
- Failli V, Bachy I, Retaux S. Expression of the LIM-homeodomain gene *Lmx1a* (dreher) during development of the mouse nervous system. *Mech Dev.* 118:225–228, 2002.
- Flora Filho R & Zilberstein B. Óxido nítrico: o simples mensageiro percorrendo a complexidade. Metabolismo, síntese e funções. *Rev Ass Med Brasil*; 46(3): 265-271, 2000.

Food and Drug Administration. Approval letter, 2014. Disponível em: https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2014/204684Orig1s000Approv.pdf. Acessado em: 20 de junho de 2017.

Furtado TA, Cisalpino EO, Santos UM. In vitro studies of the effect of Amphotericin B on *Leishmania braziliensis*. *Antibiotics & Chemother* 10, 692-669,1960.

Ganguly S, Das NK, Barbhuiya JN, Chatterjee M. Post-kala-azar dermal leishmaniasis—an overview. *Int. J. Dermatol.* 49(8):921–931, 2010.

Garin YJF, Sulahian A, Pratlong F, Meneceur P, Gangneux JP, Prina E *et al.* Virulence of *Leishmania infantum* is expressed as a clonal and dominant phenotype in experimental infections. *Infect Immun*, 69(12): 7365-7373, 2001.

Gasser RA, Magill AJ, Oster CN, Franke ED, Grögl M, Berman JD. Pancreatitis induced by pentavalent antimonial agents during treatment of leishmaniasis. *Clin. Infect. Dis.* 18:83–90, 1994.

Gaur U, Roberts SC, Dalvi RP, Corraliza I, Ullman B, Wilson ME. An effect of parasite-encoded arginase on the outcome of murine cutaneous leishmaniasis. *J Immunol.* 179(12):8446-8453, 2007

Geigel FL. A via do óxido nítrico em *Leishmania amazonensis*. Dissertação de Mestrado. Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, 2000.

Géigel LF, Leon LL Cyclic 3'-5' guanosine monophosphate-dependent activity in *Leishmania amazonensis*. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 98(4):499-500, 2003.

Genestra M, Souza WJ, Cysne-Finkelstein L, Leon LL. Comparative analysis of the nitric oxide production by *Leishmania* sp. *Med. Microbiol. Immunol.*; 192(4): 217-223, 2003a.

- Genestra M, Cysne-Finkelstein L, Guedes-Silva D, Leon LL. Effect of L-arginine analogs and a calcium chelator on nitric oxide (NO) production by *Leishmania* sp. *J Enz Inhib Med Chem.*; 18(5):445-452, 2003b.
- Genestra M, Souza WJ, Guedes-Silva D, Machado GMC, Cysne-Finkelstein L, Soares-Bezerra RJ, Monteiro F, Leon LL. Nitric oxide (NO) biosynthesis by *Leishmania amazonensis* promastigotes containing a high percentage of metacyclic forms. *Arch Med.* 185 (5): 348-354, 2006b.
- Gobert AP, Mersey BD, Cheng Y, Blumberg R, Newton C, Wilson KT. Cutting edge: urease release by *Helicobacter pylori* stimulates macrophage inducible nitric oxide synthase. *J. Immunol.*; 168: 6002-6006, 2002.
- Goto H, Lindoso JA. Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Expert Rev Anti-Infective Ther*, 8:419–433, 2010.
- Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS. Analysis of nitrate, nitrite, and [¹⁵N] nitrate in biological fluids. *Anal Biochem.*; 126: 131-138, 1982.
- Green SJ, Crawford RM, Hockmeyer JT, Meltzer MS, Nacy CA. *Leishmania major* amastigotes initiate the L-arginine-dependent killing mechanism in IFN-gamma-stimulated macrophages by induction of tumor necrosis factor-alpha. *J. Immunol.* 145, 4290-4297, 1990a.
- Green SJ, Meltzer MS, Hibbs JB, Jr., Nacy CA. Activated macrophages destroy intracellular *Leishmania major* amastigotes by an L-arginine-dependent killing mechanism. *J. Immunol.* 144, 278-283, 1990b.
- Heinzel FP, Sadick MD, Holaday BJ, Coffman RL, Locksley RM. Reciprocal expression. Of interferon gamma or interleukin 4 during the resolution or progression of murine leishmaniasis. Evidence for expansion of distinct helper T cell subsets. *J Exp Med*, 169(1): 59-72, 1989.

- Igarashi K & Kashiwagi K. Polyamines: mysterious modulators of cellular functions. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 271: 559-564, 2000.
- Iniesta VLC, Gomez-Nieto I, Corraliza IM. The inhibition of arginase by N(omega)-hydroxy-L-arginine controls the growth of *Leishmania* inside macrophages. *J. Exp. Med.* 193: 777-784, 2001.
- Jackson PD, Stiteler JM, Wohlhieter JA, Reed SG, Badaró R, Inverso J, *et al.* Characterization of *Leishmania* responsible for visceral disease in Brazil by restriction endonuclease digestion and hybridization of kinetoplastic DNA. In: 11th International Congress of Tropical Medicine and Malaria; Calgary, Canada. p. 68, 1984.
- Jackson PD, Wohlhieter JA, Hockmeyer WT. *Leishmania* characterization by restriction endonuclease digestion of kinetoplastic DNA [abstracts]. In: 5th International Congress of Parasitology; 1982 Aug 7-14; Toronto, Canada, p. 342, 1982.
- Jenkinson CP, Grody WW, Cederbaum SD. Comparative properties of arginases. A review. *Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.* 114 (!): 107-132, 1996.
- Kellina O. A study of experimental cutaneous leishmaniasis in white mice. *Med. Parazitol. (Mosk)*. 30:684–691, 1961.
- Killick-Kendrick R, Lainson R, Rioux J-A, Saf'janova VM. The taxonomy of *Leishmania*-like parasites of reptiles. In: Rioux J-A, editor. *Leishmania*, Taxonomie et phylogenèse: applications éco-épidémiologiques. Colloque International CNRS/INSERM; 1984 Jul 2-6; Montpellier, Montpellie:IMEE 1984; France. p.143-148.
- Krassner SM, Flory B. Essential amino acids in the culture of *Leishmania tarentolae*. *Exp. Parasitol.* 57:917-920. 1971.

- Kropf P, Fuentes JM, Fähnrich E, Arpa L, Herath S, Weber V, Soler G, Celada A, Modolell M, Müller I. Arginase and polyamine synthesis are key factors in the regulation of experimental leishmaniasis in vivo. *FASEB J.*; 19: 1000-1002, 2005.
- Kuhls K, Alam MZ, Cupolillo E, Ferreira GEM, Maurício IL, *et al.* Comparative microsatellite typing of New World *Leishmania infantum* reveals low heterogeneity among populations and its recent Old World origin. *Plos Negl Trop Dis.* 5: e1155. 2011.
- Lainson R, Dye C, Shaw JJ, MacDonald DW, Courtenay O, Souza AAA, *et al.* Amazonian visceral leishmaniasis – distribution of the vector *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva) in relation to the fox *Cerdocyon thous* (Linn.) and the efficiency of this reservoir host as a source of infection. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 85(1):135-137, 1990.
- Lainson R, Rangel EF. Ecologia das leishmanioses: *Lutzomyia longipalpis* e a eco-epidemiologia da leishmaniose visceral americana (LVA) no Brasil. In: Rangel EF, Lainson R, editors. *Flebotomíneos do Brasil*. Rio de Janeiro: Fiocruz; p. 311-336 2003.
- Lainson R, Shaw JJ. New World Leishmaniasis. In: Cox FEG, Wakelin D, Gillespie SH, Despommier DD, editors. *Topley & Wilson's Microbiology and Microbial Infections: parasitology*. 10th ed. London: Hodder Arnold ASM Press; p. 313-349, 2005.
- Lainson R. The Neotropical *Leishmania* species: a brief historical review of their discovery, ecology and taxonomy. *Rev. Pan-Amazônica Saúde.* 1(2):13–32, 2010.
- Liew FY, Li Y, Yang DM, Severn A, Cox FE. TNF-alfa reverses the disease-exacerbating effect of subcutaneous immunization against murine cutaneous leishmaniasis. *Immunology*, 74 (2): 304-309, 1991.
- Lima ACVMR. Estudo da Variabilidade Genética de *Leishmania (Viannia) braziliensis* Vianna, 1911 de Diferentes Regiões do Brasil. Tese de doutorado. Universidade Federal de Minas Gerais, 2010.

Locksley RM, Heinzl FP, Sadick MD, Holaday BS, Gardner KD Jr. Murine cutaneous leishmaniasis: susceptibility correlates with differential expansion of helper T-cell subsets. *Ann Inst Immunol.* 138: 744-749, 1987.

Luiking, Y. C., Poeze, M., Dejong, C. H., Ramsay, G. & Deutz, N. E. Sepsis: an arginine deficiency state? *Crit. Care Med.* 32, 2135–2145, 2004.

Machado PRL, Rosa MEA, Guimarães LH, Prates FVO, Queiroz A, Schriefer A, Carvalho EM. Treatment of Disseminated Leishmaniasis With Liposomal Amphotericin B. *Clin Infect Dis* 61:945–949, 2015.

Maciel, Priscilla Maria Pereira. Padronização da determinação da presença de óxido nítrico em plaquetas humanas por Citometria de fluxo. Monografia de graduação em Farmácia, 2013.

Market, C.L. & Moller, F. Multiple forms of enzymes: Tissue, ontogenic, and species specific patterns. *Biochemistry.* 45:753-763, 1959.

Maroli M, Feliciangeli MD, Bichaud L, Charrel RN, Gradoni L. Phlebotomine sandflies and the spreading of leishmaniasis and other diseases of public health concern. *Med. Vet. Entomol.* 27(2):123-147, 2013.

Marques F, Vale-Costa S, Cruz T, Marques JM, Silva T, Neves JV *et al.* Studies in the mouse model identify strain variability as a major determinant of disease outcome in *Leishmania infantum* infection. *Parasites & Vectors.* 8:644. Published online 2015 Dec 18. doi: 10.1186/s13071-015-1259-6

Mauel J. Intracellular survival of protozoan parasites with special reference to *Leishmania* spp., *Toxoplasma Gondii* and *Trypanosoma Cruzi*. *Adv. Parasitol.* 38: 1-35, 1996.

Maurício IL, Stothard JR, Miles MA. The Strange Case of *Leishmania chagasi* *Parasitol. Today*, 16: 188-189, 2000.

- Mauricio L, Howard MK, Stothard JR, Miles MA. Genomic diversity in the *Leishmania donovani* complex. *Parasitology*, 119, 237±246, 1999.
- Mears ER, Modabber F, Don R, Johnson GE. A Review. The current in vivo models for the discovery and utility of new anti-leishmanial drugs targeting cutaneous leishmaniasis. *Plos Neg Trop Dis*. 9 (9): e0003889, 2015.
- Meddeb-Garnaoui A, Zrelli H, Dellagi K. Effects of tropism and virulence of *Leishmania* parasites on cytokine production by infected human monocytes. *Clin Exp Immunol*; 155(2):199–206, 2009.
- Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2016. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-pecuarios/produtos-veterinarios/arquivos-comunicacoes-e-instrucoes-tecnicas/atos-cpv-2015-2016.pdf/view>. Acessado em Abril de 2017.
- Ministério da Saúde. Manual de recomendações para diagnóstico, tratamento e acompanhamento da co-infecção *Leishmania*-HIV. 1ª edição. Brasília: Ministério da Saúde; 2011. p. 1–106.
- Moll H, Flohe S & Rollinghoff M. Dendritic cells in *Leishmania major*-immune mice harbor persistent and mediate an antigen-specific T cell immune response. *Eur J Immunol*, 25: 693-699, 1995.
- Morri M, Morris SMJr. Regulation of nitric oxide production by arginine metabolic enzymes. *Biochem. Biophys. Res. Commun*; 275: 715-719, 2000.
- Mosser DM, Edwards JP. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol*. 8(12):958-969, 2008.
- Mukhopadhyay D, Dalton JE, Kaye PM, Chatterjee M. Post kala-azar dermal leishmaniasis: an unresolved mystery. *Trends Parasitol*. 30(2):65–74, 2014.

- Murray HM, Nathan CF. Macrophage microbicidal mechanism in vivo: reactive nitrogen versus oxygen intermediates in the killing of intracellular visceral *Leishmania donovani*. *J. Exp. Med.* 189, 741-746, 1999.
- Murray HW, Berman JD, Davies CR, Saravia NG. Advances in Leishmaniasis. *Lancet*; 366:1561-1577, 2005.
- Natale CC, Seixas PM, Almeida DM. A importância dos modelos murinos na caracterização das respostas imunológicas às leishmanioses: uma revisão. *Atas de Ciências da Saúde*, São Paulo, Vol.4, N°.3, pág. 35-59, 2016.
- Neal RA. The effect of antibiotics of the neomycin group on experimental cutaneous leishmaniasis. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 62(1): 54-62, 1968.
- Nicolle CJ. Sur trois cas d'infection splénique infantile à corps de Leishman observés en Tunisie. *Arch Inst Pasteur Tunis* 3: 1-26, 1908.
- Nieto CG, García-Alonso M, Requena JM, Mirón C, Soto M, Alonso C, Navarrete I. *Vet. Immunol. Immunopath.*; 67: 117-130, 1999.
- Ouellette M, Drummelsmith J, Papadopoulou B. Leishmaniasis: drugs in the clinic, resistance and new developments. *Drug Resist. Updat.* 7(4-5): 257–266, 2004.
- Paladin Labs Inc. Application for Inclusion of Miltefosine on WHO Model List of Essential medicines. 2010.
- Paveto C, Pereira C, Espinosa J, Montagna AE, Farber M, Esteva M, Flawiá MM, Torres HN. The nitric oxide transduction pathway in *Trypanosoma cruzi*. *J Biol Chem.* 270(28):16576-16579, 1995.
- Pereira BAS & Alves CR. Immunological characteristics of experimental murine infection with *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. *Vet Parasitol*, 158(4): 239-255, 2008.

- Pinto CEC. Classificação genética dos animais de laboratório. Universidade federal fluminense, 2014. Disponível em: <http://www.uff.br/animaislab/ap6.doc>. Acesso em: 27 de junho de 2017.
- Porrozzi R, Cavalcanti AS & Cupollilo E. Modelos Experimentais na Leishmaniose Visceral. In: Leishmanioses do Continente Americano. Conceição-Silva F & Alves CR Eds. Editora Fiocruz, Brasil. p277-292, 2014.
- Proudfoot L, O'Donnell CA, and Liew FY. Glycoinositolphospholipids of *Leishmania major* inhibit nitric oxide synthesis and reduce leishmanicidal activity in murine macrophages. *Eur. J. Immunol.* 25,745-750,1995.
- Ray Wilson, *Liverpool School of Tropical Medicine*. Issue Image|Vol 5(8): ev05.i08, 2009.
- Reguera RM, Balana-Fouce R, Showalter M, Hickerson S, Beverley SM. *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.
- Reguera RM, Tekwani BL, Balaña-Fouce R. Polyamine transport in parasites: a potential target for new antiparasitic drug development. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 140(2): 151-164, 2005.
- Rey L. Bases da parasitologia médica. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan. 1992.
- Rioux JA, Lanotte G, Serres E, Pratlong F, Bastien P, Perieres J. Taxonomy of *Leishmania*. Use of isoenzymes. Suggestions for a new classification. *Ann Parasitol Hum Comp*; 65(3):111-125, 1990.
- Roberts SCM, Tancer MR, Polinsky KM, Gibson O, Ullman B. Arginase plays a pivotal role in polyamine precursor metabolism in *Leishmania*. Characterization of gene deletion mutants. *J. Biol. Chem.*; 279: 23668-23678, 2004.

- Rodrigues RF, Eficácia terapêutica dos compostos mesoiônicos no modelo experimental murino de infecção por *Leishmania (L.) amazonensis*. Rio de Janeiro, IOC-Fiocruz, 2007. Dissertação de mestrado.
- Rodrigues RF, Fabrino DL & Leon LL. L-arginine Metabolism in the Pathogenic Trypanosomatids *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania* sp. In: Nitric Oxide: Emerging Developments, Therapeutic Role in Disease States and Health Effects. Evans DM Eds. Nova Science Publishers, Inc. New York. v.01, p75-94, 2015.
- Romagnani S. T-cell subsets (Th1 versus Th2). *Annals of Allergy. Asthma & Immunology*, 85(1): 9-18, 2000.
- Ruiz JH, Becker I. CD8 cytotoxic T cells in cutaneous leishmaniasis. *Parasite Immunol.* 29(12):671-678, 2007.
- Russell DG, Talamas-Rohana P. *Leishmania* and the macrophage: a marriage of inconvenience. *Immunol. Today*. 10:328–333, 1989.
- Sarkar S, Han J, Sinsimer KS, Liao B, Foster RL, Brewer G, Pestka S; RNA-binding protein AUF1 regulates lipopolysaccharide-induced IL10 expression by activating I κ B kinase complex in monocytes. *Mol Cell Biol.* 31(4):602-615, 2011.
- Scott P, Natovitz P, Coffman RL, Pearce E, Sher A. Immunoregulation of cutaneous leishmaniasis. T cell lines that transfer protective immunity or exacerbation belong to different T helper subsets and respond to distinct parasite antigens. *J Exp Med.* 168(5):1675-1684, 1988.
- Shaked-Mishan P, Suter-Grotemeyer M, Yoel-Almagor T, Holland N, Zilberstein D, Rentsch D. A novel high-affinity arginine transporter from the human parasitic protozoan *Leishmania donovani*. *Mol. Microbiol.*; 60: 30-38, 2006.
- Sharma U, Singh S. Insect vectors of *Leishmania*: distribution, physiology and their control. *J. Vector Borne Dis.* 45(4):255–272, 2008.

- Shaw JJ. New World leishmaniasis: the ecology of leishmaniasis and the diversity of leishmanial species in Central and South America. In: J Farrell, editors. *World Class Parasites*. London: Kluwer Academic Publishers Boston; p. 11-31. 2002.
- Silva, FS. Caracterização do Sintase do Óxido Nítrico de *Leishmania infantum*. Universidade de Lisboa. Dissertação de Mestrado, 2010.
- Silveira FT, Lainson R, Shaw JJ, Póvoa MM. Leishmaniasis in Brazil: XVIII. Further evidence incriminating the fox *Cerdocyon thous* (L) as a reservoir of Amazonian visceral leishmaniasis. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg*. 76(6):830-832, 1982.
- Singh G, Dey CS. Induction of apoptosis-like cell death by pentamidine and doxorubicin through differential inhibition of topoisomerase II in arsenite-resistant *L. donovani*. *Acta Trop*. 103(3):172–185, 2007.
- Stamler JS, Simon DI, Osborne JA, Mullins ME, Jaraki O, Michel T, Singel DJ, Loscalzo J. S-nitrosylation of proteins with nitric oxide: synthesis and characterization of biologically active compounds. *Proc Nat Acad Sci, USA* 89, 444–448, 1992.
- Steverding D. The history of leishmaniasis. *Parasites & Vectors*. 15;10(1):82, 2017. Published online. doi: 10.1186/s13071-017-2028-5
- Stueher, D.J. Mammalian nitric oxide synthases. *Biochem. Biophys. Acta*. 1411: 217-230, 1999.
- Sundar S, Sinha PR, Agrawal NK, Srivastava R, Rainey PM, Berman JD, *et al*. A cluster of cases of severe cardiotoxicity among kala-azar patients treated with a high-osmolarity lot of sodium antimony gluconate. *Am. J. Trop. Med. Hyg*. 59:139–143, 1998.
- Taswell C. Limiting dilution assays for the determination of immunocompetent cell frequencies. I. Data analysis. *J. Immunol*. 126(4):1614–1619, 1981.

- Taswell C. Limiting dilution assays for the determination of immunocompetent cell frequencies. III. Validity tests for the single-hit Poisson model. *J. Immunol. Methods* 72(1):29–40, 1984.
- Thakur CP, Kumar M, Pandey AK. Comparison of regimens of treatment of antimony-resistant kala-azar patients: a randomized study. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 45: 435-441, 1991.
- Vannier-Santos MA, Martiny A, de Souza W. Cell biology of *Leishmania* spp.: invading and evading. *Curr. Pharm. Des.* 8(4):297–318, 2002.
- Vendrame CM, Carvalho MD, Rios FJ, Manuli ER, Petitto-Assis F, Goto H. Effect of insulin-like growth factor-I on *Leishmania amazonensis* promastigote arginase activation and reciprocal inhibition of NOS2 pathway in macrophage in vitro. *Scand. J. Immunol.* 66: 287-296, 2007.
- Vianna G. Comunicação à Sessão de 24 de abril de 1912 da Sociedade Brasileira de Dermatologia. *Arch. Bras. Med.* 1:36–81, 1912.
- Vincendeau P, Gobert AP, Daulouede S, Moynet D, Mossalayi MD. Arginases in parasitic diseases. *Trends Parasitol.* 19: 9-12, 2003.
- Wanasen N, Soong L. L-arginine metabolism and its impact on host immunity against *Leishmania* infection. *Immunol. Res.* 41: 15-25, 2008.
- Warburg A, Schlein Y. The effect of post-bloodmeal nutrition of *Phlebotomus papatasi* on the transmission of *Leishmania major*. *Am J Trop Med Hyg.* 35(5):926-30, 1986.
- Waterston RH, Lindblad-Toh K, Birney E, Rogers J, Abril JF, Agarwal P *et al.* Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. *Nature.* 5;420(6915):520-562, 2002.
- WHO. Clinical forms of the leishmaniasis: mucocutaneous leishmaniasis, 2017. Disponível em: [_http://www.who.int/leishmaniasis/clinical_forms_leishmaniasis/en/index1.html](http://www.who.int/leishmaniasis/clinical_forms_leishmaniasis/en/index1.html). Acessado em: 23 de junho de 2017.

WHO. Manual for epidemiological surveillance, monitoring and evaluation due soon. Geneva, Junho, 2016.

WHO. Meeting of WHO the expert committee on the control of Leishmaniasis. *WHO technical 526 reports series 949*. Geneva, Março, 2010.

Wiwanitkit V. Interest in paromomycin for the treatment of visceral leishmaniasis (kalaazar). *Ther. Clin. Risk Manag.* 8:323–328, 2012.

Wu G, Morris SM Jr. Arginine metabolism: nitric oxide and beyond. *Biochem. J.* 336, 1–17, 1998.

Yardley V & Croft SL. A comparison of the activities of three amphotericin B lipid formulations against experimental visceral and cutaneous leishmaniasis. *Int J Antimicrob Agents.* 13:243-248, 2000.

Yardley V & Croft SL. In: Handbooks of animal models of infection. Experimental models in antimicrobial chemotherapy. Cap. 93 Animal models of cutaneous leishmaniasis, 1999.

Zhou X, He P. Improved measurements of intracellular nitric oxide in intact microvessels using 4,5-diaminofluorescein diacetate. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2011.

pET-28a(+) Restriction Sites

TB074 12/98

Enzyme	# Sites	Locations
AclI	2	190 2894
AceII	7	690 1618 1949 2733 2674 3176 4867
AcII	77	
AflIII	2	1123 3224
AluI	22	
AlwI	13	
Alw21I	7	159 190 623 1107 2218 3042 3542
Alw44I	3	1103 3038 3538
AlwNI	1	3640
ApaI	1	1334
ApaBI	1	807
ApoI	6	192 1398 4039 4223 4929 4940
AvaI	2	158 4298
AvaII	5	1675 2051 2139 2230 2509
BamHI	1	198
BanI	9	253 445 466 560 1043 1762 1892 2018 5164
BanII	6	190 507 521 1334 4061 5202
BbsI	4	1269 1608 1982 2342
BbvI	27	
BccI	14	
Bce83I	6	21 1937 2107 3315 3613 3854
BcoII	6	642 983 1610 3726 4745 5153
BcgI	9	160 194 228 1415 1449 1949 1983 2801 2835
BclI	1	1137
BfnI	7	70 232 336 2238 3719 4026 5278
BglI	1	2187
BglIII	1	401
BmgI	1	1332
BpmI	4	961 1450 2084 2751
Bpu10I	2	2330 4443
Bpu1102I	1	80
BsaAI	2	2976 5127
BsaBI	3	400 406 2421
BsaHI	5	446 467 581 1080 1763
BsaJI	10	57 296 560 566 1758 2196 3384 4297 4298 4699
BsaWI	7	2 1442 1945 2413 3430 3577 4561
BsaXI	2	1782 5075
Bsbl	2	2940 5034
BscGI	11	
BsgI	3	974 1174 2384
Bsil	1	3397
BsIEI	5	169 1908 3140 3564 4426
BsII	23	
BsmI	2	4310 4387
BsmAI	6	820 1225 1351 1738 2865 4442
BsmBI	3	1738 2865 4442
BsmFI	4	584 2125 2485 5342
BscFI	46	
Bsp24I	12	
Bsp1286I	12	
BspEI	2	2 2413
BspGI	1	2750
BspLU11I	1	3224
BsrI	22	
BsrBI	4	356 3157 4625 5271
BsrDI	2	1170 1536
BsrFI	7	433 442 809 2021 2181 4380 5228
BssHII	1	1534
Bst1107I	1	2995

Enzyme	# Sites	Locations
BstEII	1	1304
BstXI	3	925 1054 1177
BstYI	9	132 198 401 687 1689 2416 3865 3876 4675
CacBI	40	
CjeI	26	
CjePI	30	
Clai	1	4117
CviJI	86	
CviRI	22	
DdeI	11	
DpnII	21	
DraIII	1	5127
DrdI	3	2917 3332 5082
DrdII	2	846 5132
DsaI	3	296 560 2196
EaeI	4	166 431 563 1797
EagI	1	166
EarI	3	741 3108 4239
EclI	3	900 3298 3444
Eco47III	3	528 2029 2478
Eco57I	1	3772
EcoNI	2	658 4338
EcoO109I	3	53 556 2230
EcoRI	1	192
EcoRII	10	256 846 1161 1701 1758 3250 3371 3384 4314 4671
EcoRV	1	1573
FauI	17	
FokI	9	1169 1178 2443 2505 2583 2769 2910 4064 4670
FspI	1	2205
GdlII	4	166 431 563 1797
HaeI	6	851 2172 3239 3250 3702 4513
HaeII	14	
HaeIII	24	
HgaI	11	
HgeII	2	721 3810
HhaI	47	
HinAI	3	1022 4112 4654
HincII	2	181 1629
HindIII	1	173
HindII	18	
HpaI	1	1629
HphI	16	
MaeII	14	
MaeIII	16	
MboII	12	
MluI	1	1123
MmeI	7	3439 3623 4068 4262 4624 4633 5104
MniI	25	
MseI	25	
MslI	6	1175 1463 1493 2211 2406 2797
MspI	29	
MspAII	9	84 264 1153 1723 1816 2815 2934 3566 3811
Mwcl	39	
NarI	4	446 467 581 1763
NciI	12	
NcoI	1	296
NdeI	1	238
NgoAIV	4	433 2021 2181 5228
NheI	1	231
NhaII	26	
NlaIV	22	
NotI	1	166
NruI	1	4883
NsiI	2	4276 4542
NspI	4	598 2569 2661 3228

Enzyme	# Sites	Locations
Pfi116BI	1	2018
PflMI	2	705 4689
PteI	9	384 672 759 1555 3118 3603 4658 5062 5070
PshAI	1	1968
Psp5II	1	2230
Psp1406I	4	785 2153 2549 4912
PvuI	1	4426
PvuII	3	1723 1816 2815
PcaI	3	521 3944 4819
PsaI	3	1270 3030 4261
SacI	1	190
SaiI	1	179
SapI	1	3108
Sau96I	14	
Sau3AI	21	
ScrFI	22	
SfaII	23	
SfcI	4	369 3489 3680 5346
SglI	1	4426
SgrAI	1	442
SmaI	1	4300
SphI	1	598
SspI	2	4351 4919
StyI	2	57 296
TaqI	15	
TaqII	6	1031 1249 1922 3126 4680 5031
TfiI	9	1802 2104 2274 2778 3199 4337 4393 4565 4656
ThaI	38	
TseI	27	
Tsp45I	7	1304 2132 2563 2876 2971 4573 5300
Tsp500I	20	
Tth1111I	1	2969
Tth1111II	8	962 1655 2685 3814 3821 3853 4262 4389
UbaJI	21	
VspI	5	384 1906 1867 4625 4814
XbaI	1	335
XcmI	3	979 1495 1513
XhoI	1	158
XmnI	2	2782 4815

Enzymes that do not cut pET28a(+):

AatII	AflII	AgeI	AscI	AvrII
BaeI	BsaI	BseRI	BspMI	BsrGI
Bsu36I	DraI	Eam1105I	FseI	KpnI
MscI	MunI	NspV	PacI	PmeI
PmlI	PstI	RleAI	RsrII	SacII
Scal	SexAI	SfiI	SnaBI	SpeI
SrfI	Sse8387I	StuI	SunI	SwaI