



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA  
FACULDADE DE MEDICINA  
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
INSTITUTO GONÇALO MONIZ**



**Curso de Pós-Graduação em Patologia Humana**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL IMUNOMODULADOR DE MOLÉCULAS  
RELACIONADAS A INIBIÇÃO DA ARGINASE NO TRATAMENTO DA  
LEISHMANIOSE TEGUMENTAR**

**THIALE BORGES SILVA DOS SANTOS**

**Salvador – Bahi  
UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA**

**FACULDADE DE MEDICINA  
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
INSTITUTO GONÇALO MONIZ**

**Curso de Pós-Graduação em Patologia Humana**

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL IMUNOMODULADOR DE MOLÉCULAS  
RELACIONADAS A INIBIÇÃO DA ARGINASE NO TRATAMENTO DA  
LEISHMANIOSE TEGUMENTAR**

**THIALE BORGES SILVA DOS SANTOS**

Orientadora: Dr<sup>a</sup>. Jaqueline França Costa

Co-orientadora: Dr<sup>a</sup>. Valéria de Matos Borges

Dissertação apresentada ao Curso de  
Pós-Graduação em Patologia Humana  
para obtenção do grau de Mestre.

**Salvador – Bahia**

**2019**

Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca do  
Instituto Gonçalo Moniz / FIOCRUZ - Salvador - Bahia.

S237a Santos, Thiale Borges Silva dos.  
Avaliação do potencial imunomodulador de moléculas relacionadas a inibição da arginase no tratamento da leishmaniose tegumentar. / Thiale Borges Silva dos Santos. - 2019.  
80 f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Prof. Dr<sup>a</sup>. Jaqueline França Costa, Laboratório de Inflamação e Biomarcadores.

Dissertação (Mestrado em Patologia) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal da Bahia. Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, 2019.

1. Arginase. 2. *Leishmania amazonensis*. 3. Leishmaniose tegumentar.  
4. Triagem. I. Título.

CDU 616.993.161

**"AVALIAÇÃO DO POTENCIAL IMUNOMODULADOR DE FÁRMACOS RELACIONADOS À INIBIÇÃO DA ARGINASE NO TRATAMENTO DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR".**

**Thiale Borges Silva dos Santos**

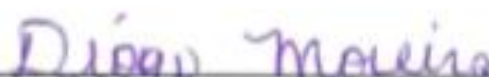
**FOLHA DE APROVAÇÃO**

Salvador, 20 de novembro de 2019.

**COMISSÃO EXAMINADORA**



Dr. Franco Henrique Andrade Leite  
Professor  
UEFS



Dr. Diogo Rodrigo de Magalhães Moreira  
Pesquisador  
IGM/FIOCRUZ



Dra. Jaqueline França Costa  
Pesquisadora  
IGM/FIOCRUZ

## **FONTES DE FINANCIAMENTO**

“O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001”

## AGRADECIMENTOS

À Deus que o foi o meu sustento todos os dias.

Aos meus pais que dão suporte em todos os momentos o que proporcionou crescimento pessoal e emocional.

À minha orientadora, Dr<sup>a</sup>. Jaqueline França, por todo carinho, dedicação e por toda paciência e ensinamentos, os quais me proporcionaram concluir essa etapa da vida profissional.

À minha co-orientadora Dr<sup>a</sup> Valéria Borges pela confiança e dedicação.

A Dr<sup>a</sup> Nivea Luz, às Msc Jessica Rebouças e à Hayna Malta por toda a ajuda e orientação durante meu ingresso na Fiocruz e durante o processo de pesquisa.

À Dayse e Paloma por sempre serem solícitas, prestativas e amigas, ajudando dentro e fora do laboratório.

Aos *Valerianos* por serem meu grupo e meu apoio e a todos os estudantes e pesquisadores do LIB por serem companheiros e tornarem o nosso laboratório um ambiente de trabalho amigável, alegre e próspero.

À Dr. Marcelo Castilho, Dr. Franco Leite, Dr. Odailson Paz e Dr. André Teles por suas ricas contribuições *in silico* que deram origem a este estudo.

À Dr. Cláudio Figueira, ambos da plataforma de Microscopia do IGM-Fiocruz-BA, pelas orientações nos ensaios de microscopia.

Agradeço também à Secretaria Acadêmica, à Biblioteca que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

Ao Instituto de Pesquisas Gonçalo Moniz - CPqGM/FIOCRUZ/BA e à CAPES, pelo suporte técnico e financeiro.

SANTOS, Thiale Borges Silva dos. Avaliação do potencial imunomodulador de moléculas relacionadas a inibição da arginase no tratamento da leishmaniose tegumentar. 2019. 80 f. Dissertação (Mestrado em Patologia) – Universidade Federal da Bahia. Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, 2019.

## RESUMO

**INTRODUÇÃO:** A Leishmaniose Tegumentar, causada pelo parasito *Leishmania*, afeta milhões de indivíduos em todo o mundo. Atualmente, os compostos antimoniais são o tratamento de primeira escolha para pacientes com leishmaniose, apesar da citotoxicidade e dos efeitos adversos que eles causam. Estudos prévios realizados *in silico* identificaram 116 compostos com potencial inibidor da enzima arginase, uma enzima chave na biossíntese de poliaminas, e que é essencial para a proliferação do parasita. **OBJETIVO:** Ensaios *in vitro* para testar os três compostos (A4021, M5171 e S783579) com melhor escore de acoplamento, melhor solubilidade e menor custo foram realizados com arginase recombinante, formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* e macrófagos infectados. **MATERIAL E MÉTODOS E RESULTADOS:** As moléculas A4021, M5171 e S783579 não apresentaram efeito inibitório da arginase recombinante purificada em nenhuma das concentrações usadas (500;125;31,25;7,81;1,95 e 1,95 $\mu$ M). No que se refere a cultura axênica de *L. amazonensis*, detectamos uma redução na proliferação de parasitas dose dependente (1000,500 e 100  $\mu$ M) e observamos redução da atividade da arginase nos grupos tratados com M5171 e S783579. Além disso, através de microscopia de fluorescência observou-se dilatação nuclear e coloração com iodeto de propídio pela alteração da permeabilidade da membrana, sugerindo que as moléculas causam necrose secundária ou apoptose tardia. Quanto a morfologia intracelular, avaliada por microscopia eletrônica de transmissão, observamos alterações estruturais indicativas de processo de morte celular nos grupos tratados com M5171 e S783579. Em relação, ao efeito de M5171(77,88 $\mu$ M) e S783579 (379,5 $\mu$ M) na interação parasita-hospedeiro observamos redução na carga parasitária, sendo o M5171 o mais eficaz, embora não tenha sido detectado redução na atividade da arginase. O estudo com A4021 foi interrompido por dificuldade de diluição e baixa eficácia. Embora os compostos apresentassem toxicidade para leishmania, a viabilidade dos macrófagos humanos não foi afetada em nenhuma das concentrações avaliadas pelo ensaio Alamar Blue (1000,100,10,1 e 0,1 $\mu$ M). **CONCLUSÃO:** Estes resultados demonstram a eficácia da abordagem *in silico* para selecionar compostos como possíveis candidatos para controlar a replicação de *L. amazonensis*. Além disso, a ausência de toxicidade celular e complexidade estrutural da A4021, M5171 e S783579 torna-os bons candidatos para otimização e design de novas moléculas com a perspectiva no desenvolvimento de tratamentos mais eficazes para a leishmaniose cutânea causada por *L. amazonensis*.

**Palavras-chave:** Arginase. *Leishmania amazonensis*. Leishmaniose tegumentar. Triagem *in silico*.

SANTOS, Thiale Borges Silva dos. Evaluation of immunomodulatory potential of molecules related with arginase inhibition in the treatment of cutaneous leishmaniasis. 2019. 80 f. Dissertação (Mestrado em Patologia) – Universidade Federal da Bahia. Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, 2019.

## ABSTRACT

**INTRODUCTION:** Cutaneous Leishmaniasis, caused by *Leishmania* parasites, affects millions of individuals worldwide. Despite its side-effect and cytotoxicity, antimonial compounds remain the first choice treatment to leishmaniasis. In order to discover novel leishmanicidal compounds *in silico* approaches were employed to identify putative inhibitors of arginase, a key enzyme in polyamines biosynthesis that is essential for parasite proliferation. **OBJECTIVE:** Herein, we report the *in vitro* assays for three of the compounds selected (A4021, M5171 e S783579) by this approach, against recombinant arginase, promastigote stages of *Leishmania amazonensis* and in infected macrophages. **MATERIAL AND METHODS AND RESULTS :** Drugs A4021, M5171 and S783579 showed no inhibitory effect of purified recombinant arginase at any of the concentrations used (500; 125; 31,25; 7,81; 1,95 and 1,95 $\mu$ M). Regarding the *L.amazonensis* axenic culture, we detected a reduction in parasite proliferation (1000,500 and 100  $\mu$ M) and observed a reduction in arginase activity in the M5171 and S783579 treated ones. In addition, through flowering microscopy nuclear, dilation and propidium iodide staining were observed by altering the membrane permeability, suggesting that the drugs cause secondary necrosis or late apoptosis. Concerning intracellular morphology, evaluated by transmission electron microscopy, structures indicative of cell death process in those treated with M5171 and S783579. Regarding the effect of M5171 (77.88 $\mu$ M) and S783579 (379.5 $\mu$ M) on parasite-host interaction, we observed a reduction in parasitic load, being M5171 the most effective, although no reduction in arginase activity has been detected. The study with A4021 was discontinued due to dilution difficulty and low efficacy. Although the compounds presented toxicity to leishmania, the viability in human macrophages was not affected at any concentrations evaluated by the Alamar Blue assay (1000,100,10,1 and 0,1 $\mu$ M). **CONCLUSION:** These results demonstrate the effectiveness of the *in silico* approach to select compounds as potential candidates for controlling *L. amazonensis* replication. In addition, the lack of cellular toxicity and chemical complexity of A4021, M5171 and S783579 make them good candidates for optimization and design of new drugs with the prospect of developing more effective treatments for cutaneous leishmaniasis caused by *L. amazonensis*.

**Keywords:** Arginase. *Leishmania amazonensis*. Cutaneous leishmaniasis. *In silico* screening.



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Distribuição endêmica da Leishmaniose Cutânea. WHO,2016. ....	12
Figura 2. Ciclo biológico da <i>Leishmania</i> spp. ....	15
Figura 3. Tráfego de L-arginina através de macrófagos infectados com <i>Leishmania</i> . ....	21
Figura 4. Curva de crescimento de cultura axênica de promastigotas de <i>L. amazonensis</i> tratadas <i>in vitro</i> com A4021, M5171 e S783579. ....	37
Figura 5. Avaliação da atividade enzimática da enzima arginase em promastigotas de <i>L. amazonensis</i> após tratamento com o nor-NOHA M5171 e S783579. ....	38
Figura 6. Microscopia de Fluorescência (1000X) de promastigotas de <i>L. amazonensis</i> após tratamento com nor-NOHA, M5171 e S783579. ....	40
Figura 7. Microscopia eletrônica de transmissão de promastigotas de <i>L. amazonensis</i> (Ba 336) após tratamento com nor-NOHA, A4021, M5171 e S783579. ....	43
Figura 8. Citotoxicidade avaliada pelo ensaio colorimétrico Alamar Blue. ....	44
Figura 9. Viabilidade de promastigotas e IC50 após a infecção de macrófagos diferenciados de THP-1 com A4021, M5171 e S783579 <i>in vitro</i> . ....	45
Figura 10. Viabilidade de promastigotas após a infecção de macrófagos humanos (THP-1) tratados com o nor-NOHA, M5171 e S783579 <i>in vitro</i> . ....	46
Figura 11. Viabilidade de promastigotas após a infecção de macrófagos humanos tratados com M5171 e S783579 <i>in vitro</i> . ....	47
Figura 12. Avaliação da atividade enzimática de macrófagos humanos infectados com <i>L. amazonensis</i> após tratamento com A4021, M5171 e S783579. ....	49
Figura 13. Avaliação da atividade enzimática da arginase após tratamento com A4021, M5171 e S783579. ....	50

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 .Fármacos utilizados no tratamento da leishmaniose.	25
Tabela 2. Informações físico-químicas dos moléculas selecionados previamente <i>in silico</i> .	28

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ARG	Arginase
IL	Interleucina
iNOS	Óxido Nítrico Sintase Induzível
LCD	Leishmaniose Cutânea Difusa
LCL	Leishmaniose Cutânea Localizada
LPS	Lipopolissacarídeo
LT	Leishmaniose Tegumentar
LV	Leishmaniose Visceral
NO	Nitric Oxide (Óxido nítrico)
NOHA	N-hidroxi-L-arginina
nor-NOHA	N $\omega$ -Hydroxy-nor-L-arginine
ODC	Ornitina Descarboxilase
OMS	Organização Mundial da Saúde
ROS	Reactive Oxygen Species (Espécies Reativas De Oxigênio)
SBF	Soro Bovino Fetal

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	11
1.1 ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS DA LEISHMANIOSE.....	11
1.2 AGENTE ETIOLÓGICO E VETOR DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA	13
1.3 CICLO BIOLÓGICO DO PARASITA .....	14
1.4 ESPECTRO CLÍNICO .....	15
1.5 RESPOSTA IMUNE À INFECÇÃO POR LEISHMANIOSE E MECANISMO DE ESCAPE DO PARASITA .....	16
1.6 VIA DE ATIVAÇÃO DA ENZIMA ARGINASE.....	18
1.7 POTENCIAL TERAPÊUTICO DA INIBIÇÃO DA ARGINASE DESCRITO NA LITERATURA .....	22
1.8 TRATAMENTOS PARA LEISHMANIOSE.....	22
1.9 UTILIZAÇÃO DE MODELOS <i>IN SILICO</i> NO CONTEXTO DA LEISHMANIOSE.....	26
<b>2. JUSTIFICATIVA</b> .....	27
<b>3. HIPÓTESE</b> .....	29
<b>4. OBJETIVOS</b> .....	29
4.1 OBJETIVO GERAL .....	29
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	29
<b>5. DESENHO EXPERIMENTAL</b> .....	30
<b>6. METODOLOGIA</b> .....	31
6.1 CULTURA DE PROMASTIGOTAS .....	31
6.2 CULTURA DE THP-1 .....	31
6.3 CULTURA DE MACRÓFAGOS HUMANOS .....	31
6.4 ENZIMA ARGINASE PURIFICADA .....	32
6.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DA ARGINASE .....	32
6.6 CURVA DE CRESCIMENTO DE CULTURA AXÊNICA DE <i>L.amazonensis</i> APÓS TRATAMENTO.....	33
6.7 AVALIAÇÃO DA MORFOLOGIA DA CULTURA AXÊNICA POR MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA.....	33
6.8 AVALIAÇÃO DA MORFOLOGIA INTRACELULAR POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO .....	34
6.9 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DOS COMPOSTOS POR ALAMAR BLUE EM MACRÓFAGOS HUMANOS.....	35
6.10 AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE DA LEISHMANIA <i>IN VITRO</i> APÓS INFECÇÃO E TRATAMENTO DOS MACRÓFAGOS .....	35
6.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	36

<b>7. RESULTADOS</b> .....	37
7.1 CURVA DE CRESCIMENTO <i>IN VITRO</i> APÓS TRATAMENTO DE PROMASTIGOTAS DE <i>L.amazonensis</i> COM A4121, M5171 E S783579.....	37
7.2 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DA ARGINASE APÓS TRATAMENTO DE CULTURA AXÊNICA DE <i>L.amazonensis</i> COM A4021, M5171 E S783579.....	38
7.3 MORFOLOGIA DE PROMASTIGOTAS DE <i>L. amazonensis</i> POR MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA APÓS TRATAMENTO COM NOR-NOHA, M5171 E S783579 .....	39
7.4 MORFOLOGIA INTRACELULAR DE <i>L.amazonensis</i> ATRAVÉS DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO APÓS TRATAMENTO COM NOR-NOHA, A4121, M5171 E S783579 .....	41
7.5 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DO A4021, M5171 E S783579 EM MACRÓFAGOS DIFERENCIADOS DE THP-1.....	44
7.6 DETERMINAÇÃO DO IC50 DO A4021, M5171 E S783579 SOBRE A VIABILIDADE DE <i>L.amazonensis</i> APÓS INFECÇÃO DE MACRÓFAGOS DIFERENCIADOS DE THP-1 .....	45
7.7 VIABILIDADE DE <i>L.amazonensis</i> APÓS INFECÇÃO E TRATAMENTO <i>IN VITRO</i> DE MACRÓFAGOS HUMANOS COM NOR-NOHA, A4021, M5171 E S783579 .....	47
7.8 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DA ARGINASE DE MACRÓFAGOS HUMANOS INFECTADOS COM <i>L.amazonensis</i> APÓS 72 HORAS DE TRATAMENTO COM A4021, M5171 E S783579 .....	48
7.9 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DA ARGINASE APÓS TRATAMENTO DA ENZIMA RECOMBINANTE PURIFICADA.....	50
<b>8. DISCUSSÃO</b> .....	51
<b>9. CONCLUSÃO</b> .....	61
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	622

## 1. INTRODUÇÃO

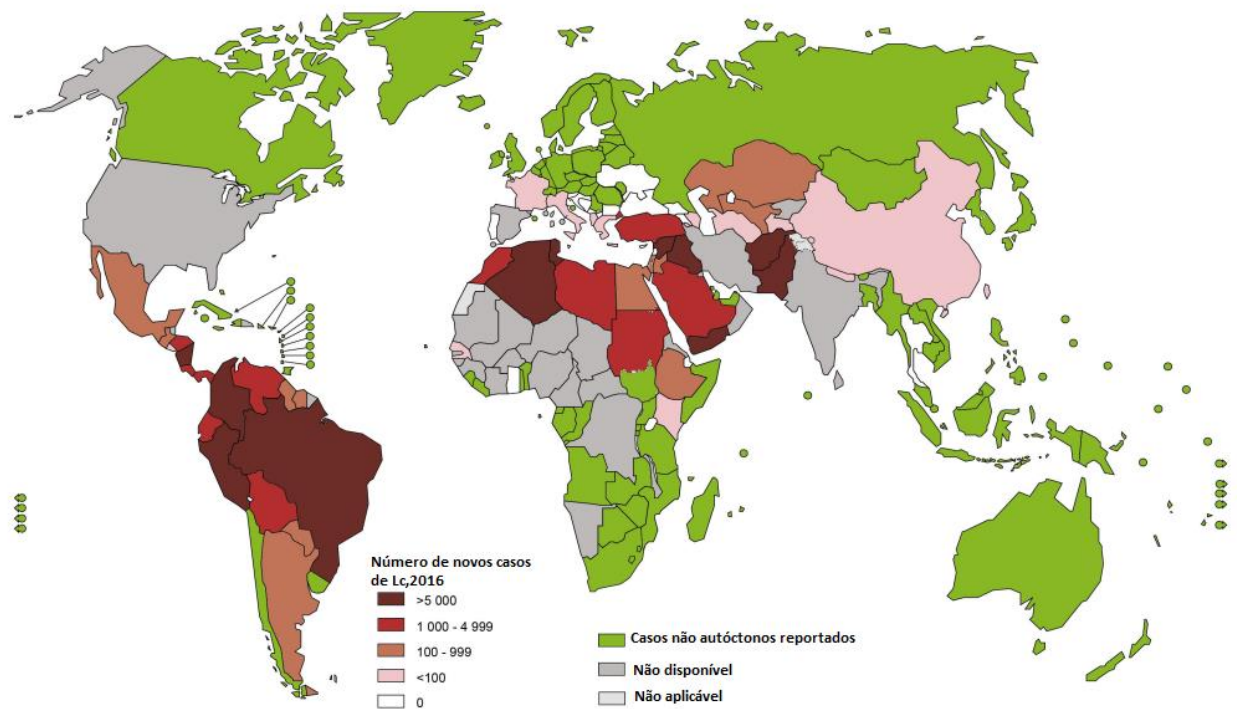
### 1.1 ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS DA LEISHMANIOSE

Segundo a Organização Mundial da Saúde, existem cerca de 12 milhões de casos de leishmaniose em todo o mundo, com um número estimado de 1,5 a 2 milhões de novos casos ocorrendo anualmente; 1 - 1,5 milhão de casos de leishmaniose cutânea e 500.000 casos de leishmaniose visceral (WHO, 2018).

A leishmaniose apresenta duas formas principais, a leishmaniose visceral (LV), também conhecida como calazar, e a leishmaniose tegumentar ou cutânea (LT) (HERWALDT, 1999, WHO, 2017). Em outubro de 2018, 50 países endêmicos da LV (66%) e 52 países endêmicos da LT (60%) relataram dados de 2017 ao programa Global de Leishmaniose da OMS (Figura 1). Os 10 países com o maior número de casos de LT notificados foram: Afeganistão, Argélia, Brasil, Colômbia, Iraque, Paquistão, Peru, República Árabe Síria, Tunísia e Iêmen, que juntos representam 84% da incidência global relatada de LT (WHO, 2018). Destes, o Brasil foi o único país a apresentar alto número de casos para ambas as formas de leishmaniose (WHO, 2016b). Além disso, no país já foram identificadas sete espécies de *Leishmanias* responsáveis pela doença sendo a *Leishmania amazonensis* um dos principais agentes etiológicos da leishmaniose no país (BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE., 2007). Existe um aumento do número de casos de leishmaniose nos últimos 25 anos em todo o mundo e isso se deve a fatores como a globalização e as mudanças climáticas, que são dois fatores contribuintes para a disseminação da leishmaniose em áreas não endêmicas (STEVERDING, 2017).

No Brasil a leishmaniose tegumentar é a forma mais comum e apresenta ampla distribuição por todas as regiões geográficas (FURTADO; VIEIRA, 1982; SAMPAIO *et al.*,

1980). Ocorre principalmente em diferentes ambientes das regiões Norte, Nordeste, Centro-Oeste e Sudeste do país (BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE., 2010). A região Norte apresenta o maior coeficiente (46,4 casos/100.000 habitantes), seguida das regiões Centro-Oeste (17,2 casos/10.000 habitantes) e Nordeste (8 casos/100.000 habitantes) (BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE., 2019). Em 2009 o estado da Bahia registrou 3.435 casos de leishmaniose tegumentar americana, onde o coeficiente de detecção no estado foi de 23,5 casos por 100.000 habitantes e o percentual de cura clínica foi de 66,3% (BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE., 2011).



**Figura 1. Distribuição endêmica da Leishmaniose Cutânea. WHO, 2016.**

## 1.2 AGENTE ETIOLÓGICO E VETOR DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA

Os agentes etiológicos da Leishmaniose Tegumentar americana são protozoários pertencentes à família Trypanosomatidae, parasitos intracelulares obrigatórios das células do sistema fagocítico mononuclear. Duas formas morfológicas principais são identificadas no ciclo de vida: uma promastigota e a forma amastigota (SILVEIRA, LAINSON, *et al.*, 2004). A promastigota, extracelular, adquire essa forma no intestino médio do vetor (flebótomo) e pode ser encontrada livre ou ligada à região intestinal (WALTERS, CHAPLIN, *et al.*, 1989). No país, as três principais espécies são: *Leishmania Viannia braziliensis*, *Leishmania Viannia guyanensis* e *Leishmania Leishmania amazonensis* e, mais recentemente, as 3 espécies *Leishmania Viannia lainsoni*, *Leishmania Viannia naiffi*, *Leishmania Viannia lindenberg* e *Leishmania Viannia shawi* foram identificadas em estados das regiões Norte e Nordeste (BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE., 2010). A leishmaniose é transmitida entre os animais e o homem pelos insetos hematófagos de diversas espécies de flebótomos da ordem: Diptera, família: Psychodidae, subfamília: Phlebotominae (BRASIL, 2006). Os dois principais gêneros de dípteros responsáveis pela transmissão da leishmaniose são: *Lutzomya*, vetores de transmissão do parasito nas Américas, e o gênero *Phlebotomus*, relacionado com a transmissão no Velho Mundo (SILVA-LÓPEZ, 2010). Esses insetos geralmente possuem cor parda (“mosquito palha”), sendo que apenas as fêmeas estão adaptadas para picar a pele de vertebrados e realizar o repasto sanguíneo (REBÊLO, 1999). Além disso, a transmissão está associada, geralmente, à presença de roedores silvestres e marsupiais, sendo a infecção humana menos frequente. Por tanto, o homem, ao entrar em contato com áreas florestais aumenta o risco de infecção (BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE., 2000).



### 1.3 CICLO BIOLÓGICO DO PARASITA

A transmissão da doença ocorre quando a fêmea do flebotomíneo que está infectada com o parasito pica um indivíduo e inocula na pele, mais especificamente no tecido subcutâneo, as formas promastigotas do agente. (NEVES, 2005).

No intestino dos insetos as formas promastigotas passam por modificações bioquímicas em um processo denominado metaciclogênese, que é o processo pelo qual estas formas deixam de se reproduzir, perdem a sua capacidade de adesão ao epitélio do intestino médio do flebotomo e tornam-se infectantes (promastigotas metacíclicas). Deste modo, livres, migram para a faringe e cavidade bucal, de onde elas são transmitidas ao hospedeiro vertebrado durante o próximo repasto sanguíneo (AKOPYANTS, MATLIB, *et al.*, 2004).

Nos vertebrados, a *Leishmania* infecta células fagocíticas, especialmente macrófagos, que são considerados os principais compartimentos celulares para *Leishmania* no hospedeiro vertebrado de mamíferos (KOBETS *et al.*, 2012). As formas promastigotas, depois de infectarem os macrófagos, passam para a forma amastigota e começam a se multiplicar (Figura 2). A multiplicação leva à ruptura da célula hospedeira liberando parasitas, que infectam outros macrófagos (BORGHI *et al.*, 2017). O ciclo de transmissão é completo quando outro flebotomíneo durante o repasto sanguíneo de um hospedeiro infectado, entra em contato com os fagócitos infectados e as amastigotas convertem-se em promastigotas no intestino médio dos flebotomos (KAYE, 2011).

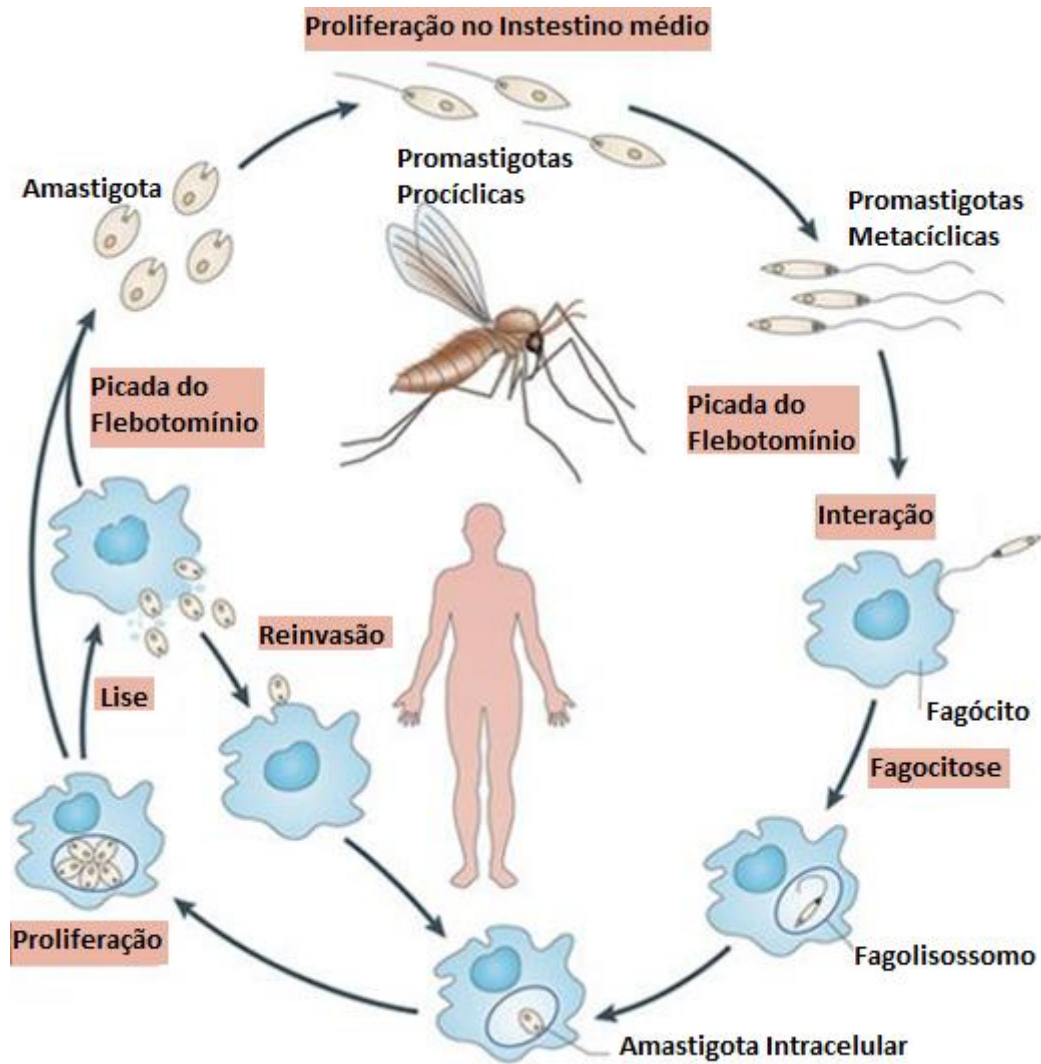


Figura 2. Ciclo biológico da *Leishmania* spp. Adaptado de: “Leishmaniasis: complexity at the host–pathogen interface”. *Nature Reviews Microbiology*, 2007.

#### 1.4 ESPECTRO CLÍNICO

A Leishmaniose é uma doença multifatorial, pois a depender de fatores genéticos do hospedeiro, do vetor e da diversidade entre as espécies de *Leishmania* que infectam os humanos podem apresentar um amplo espectro clínico. As principais manifestações clínicas da leishmaniose tegumentar (LT) são: a leishmaniose cutânea localizada (LCL), caracterizada por lesão geralmente do tipo úlcera (única ou múltipla), com tendência à cura espontânea (BRASIL.

MINISTÉRIO DA SAÚDE., 2010); a leishmaniose cutânea difusa (LCD) com formação de placas e múltiplas nodulações não ulceradas recobrando grandes extensões do tegumento cutâneo do corpo (COSTA, SALDANHA, *et al.*, 2009) e a leishmaniose mucosa ou mucocutânea (LM) (REITHINGER, DUJARDIN, *et al.*, 2007), caracterizada por resposta imunológica exacerbada e ineficaz, agredindo as mucosas das vias aéreas superiores (como nariz e boca, por exemplo) (PINHEIRO, 2014). No passado admitia-se a *Leishmania braziliensis* como único agente da leishmaniose tegumentar americana (LTA) existente no país (VALE, 2005). Mas já foi estabelecido que *L. amazonensis* também é um agente causador da LTA e em contraste com *L. braziliensis*, às vezes pode se manifestar como leishmaniose cutânea difusa (LCD) uma forma relativamente rara de leishmaniose, sendo que no Brasil, a *L. (L.) amazonensis* é considerada a principal espécie causadora de LCD (SILVEIRA, 2009).

## 1.5 RESPOSTA IMUNE À INFECÇÃO POR LEISHMANIOSE E MECANISMO DE ESCAPE DO PARASITA

Após a infecção, a *Leishmania* pode ser reconhecida por várias células do sistema imune, como: neutrófilos, células dendríticas e macrófagos (PIU, DEBANJAN, MITALI, 2011). Os neutrófilos são as primeiras células recrutadas para o local da infecção e são cruciais (MCFARLAN E *et al.*, 2011), mas os macrófagos residentes e os recrutados abrigam a maior carga de *Leishmania* intracelular (PETERS, 2008) e são indispensáveis para a sobrevivência, replicação e diferenciação do parasita (LIU, 2012).

Os macrófagos podem desempenhar um papel ambíguo na infecção por *Leishmania* (TOMIOTTO, 2018). Essas células normalmente estão em repouso (M0), mas o microambiente em que essas células são encontradas fornece sinais diferentes que as ativam e levam ao desenvolvimento de fenótipo de macrófagos distintos, em direção a “ativação

clássica” (M1) ou “ativação alternativa ” (M2) (ARANGO, 2014). A *Leishmania* possui um arsenal metabólico complexo permitindo sua sobrevivência, replicação e diferenciação em diferentes ambientes de hospedeiros invertebrados e vertebrados (SÉGUIN, DESCOTEAUX, 2016) tornando-se capaz de modular a infecção, o perfil de ativação dos macrófagos e a resposta imune (SICA e MANTOVANI, 2012).

A polarização dos macrófagos M1 pode ser principalmente devida à presença de lipopolissacarídeo (LPS), IFN- $\gamma$  ou TNF- $\alpha$  (XU, 2013). Esses macrófagos são caracterizados por uma alta produção de citocinas pró-inflamatórias (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12, IL-18, IL-23 e IFN tipo 1), alta taxa de fagocitose, produção de espécies reativas de oxigênio e expressão de óxido nítrico sintase induzível (iNOS/NOS2), uma enzima que catalisa a *L-arginina* para gerar espécies reativas de nitrogênio que atua no controle de patógenos intracelulares (LIEW *et al.*, 1990). Além do NO, os macrófagos durante o primeiro estágio da infecção produzem o superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>), que é catalisado pela enzima NADPH oxidase devido ao aumento do consumo de oxigênio em decorrência do processo de fagocitose (BABIOR 2000; VAN ASSCHE *et al.*, 2011). Estudos realizados por Abhishek Mandal em 2016 demonstram que para evitar a apoptose mediada por ROS, *Leishmania donovani* controla o nível de ROS por regulação, sendo as poliaminas uma das moléculas cruciais que demonstraram exercer atividade antioxidante na infecção por *Leishmania* (MANDAL. A, *et al.*, 2016).

Os macrófagos alternativamente ativados, exibem um fenótipo anti-inflamatório / imunorregulatório que está relacionado ao remodelamento e reparo tecidual, resistência a alguns parasitas e promoção do crescimento tumoral (ANDERSON, 2002). Além disso, são caracterizados pela biossíntese de poliaminas, que são benéficas para o crescimento intramacrofágico de *Leishmania*, favorecendo a sobrevivência do parasita nos macrófagos infectados e a progressão da doença (ARANGO, 2014).

O equilíbrio entre os fatores do macrófago do hospedeiro e parasita que controlam a ativação / desativação de macrófagos determina o resultado final (ou destino) dos parasitas nos macrófagos infectados (LIU, 2012). Nesta modulação, a resistência do hospedeiro está relacionada ao desenvolvimento de linfócitos T helper 1 (T<sub>H</sub>1) e à produção de citocinas pró-inflamatórias (IL-12, IL-1, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e / ou IL-2) que conduzem à ativação de macrófagos (VON STEBUT, 2003). Enquanto que a suscetibilidade à infecção está ligada ao desenvolvimento da resposta T helper 2 (T<sub>H</sub>2) e produção de citocinas anti-inflamatórias (IL-4, IL-5 e / ou IL-13) levando à replicação parasitária e persistência da infecção (SACKS, 2002). Essa relação das respostas T<sub>H</sub>1/T<sub>H</sub>2 na infecção por *Leishmania* determina o estabelecimento da infecção uma vez que durante a resposta imune, influencia na ativação dos macrófagos (via clássica e via alternativa) que são o alvo principal na infecção, e podem promover respostas pró-inflamatórias ou anti-inflamatória, respectivamente (SICA e MANTOVANI, 2012). Estudos evidenciam que *L. amazonensis* é capaz de suprimir as respostas imunes efetivas do hospedeiro (SILVEIRA *et al.*, 2004) e que a interleucina IL-10 contribui, pelo menos em parte, para a imunidade específica ao parasita (JONES *et al.*, 2002, JI *et al.*, 2003). Além disso, *L. amazonensis* promove a atividade do complexo repressor transcricional NF- $\kappa$ B, promovendo um processo ativo de desvio imunológico evitando a expressão de muitos mediadores imunológicos, incluindo quimiocinas, citocinas, moléculas de adesão e enzimas que produzem mediadores inflamatórios secundários (TERESA. *et al.*, 2009).

## 1.6 VIA DE ATIVAÇÃO DA ENZIMA ARGINASE

Os macrófagos classicamente ativados regulam positivamente a enzima iNOS e os ativados alternativamente regulam positivamente a arginase (ARG) (MULEME, 2009). Dependendo diretamente do equilíbrio dessas duas importantes enzimas, os macrófagos podem ser susceptíveis a promover a sobrevivência dos parasitas intracelulares de *Leishmania* ou a

elimina-los (MÜLLER,2008). As células humanas expressam duas isoenzimas da arginase. As duas enzimas catalisam a mesma reação bioquímica, porém diferem na expressão celular, regulação e localização subcelular (JENKINSON *et al.*, 1996). A arginase I, citosólica, é expressa no fígado e exerce funções em hepatócitos, principalmente como um componente do ciclo da ureia, enquanto a arginase II está presente na matriz mitocondrial e é largamente distribuída entre os tecidos, principalmente no rim, próstata, intestino delgado e a glândula mamaria lactante (LOUIS *et al.*, 1999; MUNDER *et al.*, 1999). A arginase utiliza como substrato o aminoácido L-arginina que é hidrolisado para ornitina e ureia (VINCENDEAU, 2003). A L-arginina é absorvida por macrófagos através do transportador de membrana CAT-2B (Figura 3). Durante o metabolismo da L-arginina pela arginase ocorre a produção de L-ornitina, um intermediário para metabolização de poliaminas através da ornitina descarboxilase (ODC) (MUNDER, 2009). Essa enzima catalisa a descarboxilação da ornitina para putrescina que é uma poliamina importante para proliferação da *Leishmania* (INIESTA, *et al.*, 2001).

As Poliaminas são pequenas moléculas catiônicas que participam de uma variedade de funções fundamentais celulares, como por exemplo, na proliferação e no transporte através da membrana celular (MUNDER, 2009). Uma das funções das poliaminas envolve a síntese de ácidos nucléicos, transportadores de membrana e para a proliferação celular, dentre elas, as moléculas de ocorrência mais comum são a putrescina, a espermidina e a espermina. (MORRIS, 2002). A espermidina compõe a produção de um importante regulador do equilíbrio intracelular, a tripanotiona, que também atua na desintoxicação do hidróperóxido e outros oxidantes químicos estressantes (OZA *et al.*, 2005 ). A inibição da biossíntese e do transporte desta poliamina pode resultar em desequilíbrio oxidativo e peroxidação de lipídeos (OUELLETTE *et al.*, 2004).

O aminoácido L –arginina, que também está envolvido na produção de óxido nítrico (NO), (VINCENDEAU, 2003) é catalisado pela NOS II em citrulina e NO em dois passos. Na

primeira, a L-arginina é hidroxilada a N-hidroxi-L-arginina (NOHA) e, no segundo, o NOHA é oxidado para citrulina e NO (STUEHR, 1991). Além de intermediário na síntese de NO, o NOHA também é um inibidor competitivo natural da arginase (VINCENDEAU, 2003). Além disso, a citrulina é exportada de macrófagos para a regeneração da arginina através do ciclo da ornitina (KORNBERG, 2000).

A arginase atua como uma enzima imunorreguladora reduzindo a produção de NO por macrófagos, através da limitação da disponibilidade de L-arginina ao NOS II (MUXEL, LARANJEIRA-SILVA, *et al.*, 2017). Essa disponibilidade de L-arginina e arginase, assim como a produção de poliaminas pelo macrófago são essências para a sobrevivência de *Leishmania* nos hospedeiros (GOLDMAN-PINKOVICH,; BALNO,; STRASSER, *et al.*, 2016).

Durante a infecção, a *Leishmania major* é capaz de induzir a polarização dos macrófagos para um perfil M2, aumentando a expressão da enzima arginase e beneficiando o parasita (INIESTA *et al.*, 2002). Além disso, a arginase codificada por *Leishmania* aumenta a patogênese da doença aumentando as atividades da arginase celular do hospedeiro, levando à sobrevivência e proliferação do parasita nos macrófagos infectados(LIU, 2012).A *Leishmania* expressa apenas uma única enzima arginase localizada no glicosoma, (ROBERTS *et al.*, 2004; REGUERA *et al.*, 2009) onde exerce um papel vital em processos fisiológicos como o crescimento, diferenciação e a biossíntese macromolecular (PEGG e MCC- ANN, 1982; PEGG, 2009). Contudo, para atingir a arginase da *Leishmania*, a L-arginina deve atravessar as barreiras da célula hospedeira: a membrana celular e a membrana do vacúolo parasitóforo (figura 3), em seguida a membrana do parasita, através do transportador AAP3 e, finalmente, atravessar a membrana do glicosoma. Ainda não são conhecidos os mecanismos responsáveis pelo transporte da L-arginina através das membranas do vacúolo parasitóforo do hospedeiro

nem da membrana do glicossomo da Leishmania (DA SILVA; FLOETER-WINTER, 2014; p 103-117).

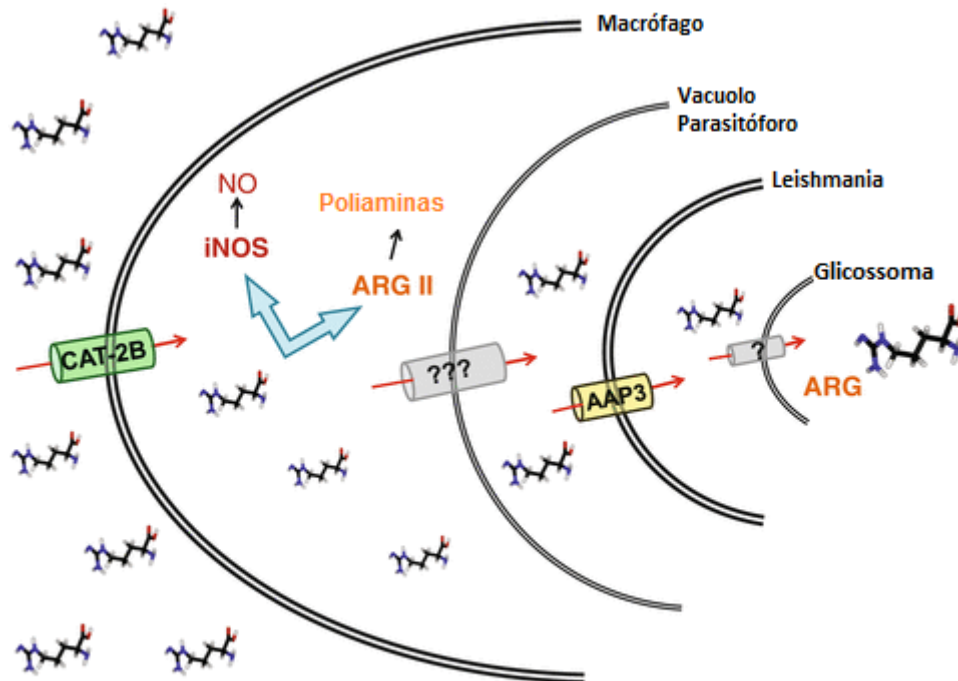


Figura 3. Tráfego de L-arginina através de macrófagos infectados com Leishmania. Adaptado do artigo: Arginase in leishmania. MFL da Silva e LM Floeter-Winter. Subcellular Biochemistry, 2014.

Existem estudos que mostram que a transferência da arginase do parasita do glicossoma para o citosol em *L. mexicana* e *L. amazonensis* reduziu dramaticamente a proliferação do parasita, o que implica que o meio glicossômico, embora não seja crítico para a função da arginase em promastigotas (ROBERTS, 2014), é indispensável para a função adequada em amastigotas (D'ANTONIO, 2013). Em um estudo de doenças parasitárias realizado por Gaur na infecção por *L. mexicana* em murinos, ele demonstrou que a arginase do parasito inibe a atividade microbicida de macrófagos, utilizando a L-arginina que seria utilizada como substrato



pela iNOS, enquanto que a ausência da arginase em *Leishmania* knockout resultou em uma infecção significativamente atenuada (GAUR *et al.*, 2007).

## 1.7 POTENCIAL TERAPÊUTICO DA INIBIÇÃO DA ARGINASE DESCRITO NA LITERATURA

Na família Trypanosomatidae, os alvos enzimáticos mais estudados, visando à quimioterapia, são as enzimas da via glicolítica e as enzimas óxido nítrico sintase, arginase, superóxido dismutase, tripanotona redutase, DNA topoisomerasas, cisteína protease e hipoxantina-guanina fosforibosiltransferase (VICKERMAN, 1976). Dentre essas enzimas, o aumento nos níveis de arginase tem sido associado a vários estados patológicos como leishmaniose e câncer (POREMBSKA, *et al.*, 2001). Por isso, novos inibidores da arginase estão sendo estudados com o objetivo de desenvolver novas estratégias no tratamento de doenças relacionadas com a via dessa enzima como por exemplo a leishmaniose (COLLELUORI, 2001). No estudo realizado em 2001 por Iniesta, a inibição da enzima arginase na infecção de macrófagos murinos por *Leishmania major* e *L. chagasi* reduziu drasticamente a carga parasitária das células hospedeiras (INIESTA, *et al.*, 2001).

## 1.8 TRATAMENTOS PARA LEISHMANIOSE

O tratamento adequado depende das características clínicas da lesão e da infecção por *Leishmania* spp. (BLUM *et al.*, 2014). No entanto, os antimoniais pentavalentes são amplamente empregados na terapêutica de todas as formas de leishmanioses (tabela 1). Os mais utilizados são o gluconato de amônio (V) sódico ou estibogluconato de sódio (Solustibosan® ou Pentostam®) e o antimoniato de N-metil glucamina ou antimoniato de N-metilglucamina (Glucantime ®) (SINGH, SIVAKUMAR, 2004). Acredita-se que esses fármacos atuam

inibindo a glicólise e a beta-oxidação de ácidos graxos nas formas amastigotas do parasito, provocando a depleção dos níveis de ATP intracelular (RATH *et al.*, 2003). No Brasil, o medicamento de primeira escolha na terapêutica é o antimoniato de N-metilglucamina (RATH *et al.*, 2003). O paciente é submetido aos fármacos ao longo de 20 dias aproximadamente, segundo a padronização da Organização Mundial da Saúde (BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE., 2010). O antimoniato de metilglucamina é especialmente eficaz no tratamento de leishmaniose cutânea, mucocutânea e visceral. Porém, os fármacos antimoniais não podem ser administrados sem acompanhamento médico e possuem efeitos adversos agressivos, entre elas: mialgias, dores abdominais, alterações hepáticas e distúrbios cardiológicos (BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE., 2010). Além dos antimoniais, outros fármacos têm sido empregados no tratamento das diversas formas da leishmaniose, entre as quais se destacam a pentamidina, anfotericina B, paromomicina e o miltefosine (BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE., 2000). O mecanismo de ação da pentamidina ocorre por interferência na síntese de poliaminas ao inibir uso da S-adenosil-L-metionina, como substrato, por enzimas como a ornitina descarboxilase e a espermidina sintetase, impedindo, desta maneira, a síntese de poliaminas importantes à vida do parasito, que atuam na regulação do crescimento e diferenciação celular. Além disto, a pentamidina é capaz de se ligar ao DNA do parasito em regiões ricas em sequências A-T (adenina-timina), interferindo na biossíntese de DNA e prejudicando, assim, a manutenção da vida da Leishmania (SOARES-BEZERRA *et al.*, 2004). A resistência à pentamidina tem sido descrita em tripanossomas e Leishmanias (WERBOVETZ K. 2006). Apesar da eficácia, a pentamidina apresenta efeitos adversos graves como: hipoglicemia, hipotensão, alterações cardiológicas, nefrotoxicidade e, até mesmo, morte repentina foram descritas (BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE., 2000). A anfotericina B é um antibiótico macrolídeo, usada como fármaco de segunda escolha, empregada quando não se obtém resposta ao tratamento com antimonial, principalmente em lesões mucosas ou na

impossibilidade de seu uso (TRACY, 2001). A dose inicial de 0,5 mg/kg/dia deve ser aumentada gradativamente, conforme a tolerância do paciente, até 1 mg/kg/dia (FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE, 2002). Esse tratamento atua em moléculas de esterol, principalmente ergosterol, presentes na membrana celular do parasito, alterando a permeabilidade da membrana e equilíbrio osmótico da célula (SINGH, SIVAKUMAR, 2004; SOARES-BEZERRA *et al.*, 2004). Assim como antimoniais, o uso desse tratamento gera uma série de efeitos adversos, os mais comuns incluem náuseas, vômitos, febre, hipopotassemia, insuficiência renal, anemia e alterações cardíacas, cardiotoxicidade e nefrotoxicidade, (BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE., 2000). Além dos efeitos adversos, a necessidade de hospitalização por longos períodos, administração via intravenosa, monitorização contínua e elevados custos do fármaco são importantes limitações na utilização da anfotericina como tratamento (SUNDAR, RAI, 2002). Um outro tratamento estudado é a Miltefosina, um fármaco utilizado no tratamento de câncer pertencente a classe fosfocolina (SMORENBURG, 2000). A miltefosina atua afetando o metabolismo fosfolipídico da membrana plasmática do parasita ou afetando o potencial da membrana mitocondrial levando à morte celular por apoptose (REF). Existe atualmente a anfotericina B lipossomal, incorporada dentro de lipossomas feitos com fosfatidilcolina, colesterol e disterolfosfatidilglicerol (REF). Apesar de possuir uma meia vida mais curta, no Brasil este fármaco já está registrado na Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) para uso no tratamento da leishmaniose visceral. Entretanto, não existe registro para uso na leishmaniose tegumentar (BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE., 2010).

Tabela 1. Fármacos utilizados no tratamento da leishmaniose.

<b>Fármaco</b>	<b>Mecanismo de Ação</b>	<b>Efeitos adversos</b>	<b>Referências</b>
<b>Gluconato de amônio (V) sódico ou estibogluconato de sódio (Solustibosan® ou Pentostam®)</b>	Depleção dos níveis de ATP intracelular	Mialgias, dores abdominais, alterações hepáticas, náuseas e vômitos.	(RATH <i>et al.</i> , 2003; BROCHU <i>et al.</i> , 2003)
<b>Antimoniato de N-metilglucamina (Glucantime)</b>	Depleção dos níveis de ATP intracelular	Mialgias, dores abdominais, alterações hepáticas e distúrbios cardiológicos	(RATH <i>et al.</i> , 2003; OUELLET <i>et al.</i> , 1998b)
<b>Anfotericina B (Fugizone)</b>	Alteração da permeabilidade da membrana e equilíbrio osmótico da célula.	Náuseas, vômitos, febre, hipopotassemia, insuficiência renal, anemia, cardiotoxicidade e nefrotoxicidade	(TRACY JW. 2001; SUNDAR S. 2006).
<b>Pentamidina (Lomidina®)</b>	Interfere na síntese de poliaminas e na biossíntese do DNA do parasito	Hipoglicemia, hipotensão, alterações cardiológicas e nefrotoxicidade	(SOARES-BEZERRA <i>et al.</i> , 2004; BASSELIN <i>et al.</i> , 2002)
<b>Miltefosina (Oral)</b>	Altera o metabolismo fosfolipídico da membrana plasmática ou o potencial da membrana mitocondrial	Náuseas, vômitos, dor abdominal e diarreia. Possui potencial efeito teratogênico.	(COSTA FILHO, <i>et al.</i> , 2008; MACHADO <i>et al.</i> , 2010)

## 1.9 UTILIZAÇÃO DE MODELOS *IN SILICO* NO CONTEXTO DA LEISHMANIOSE

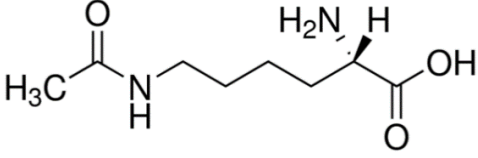
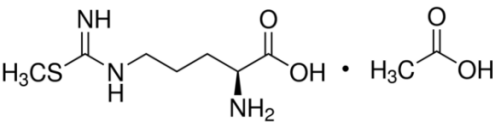
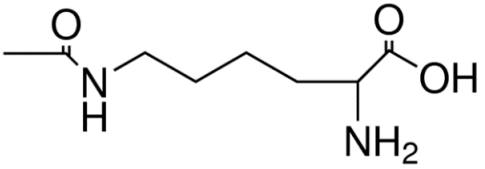
A utilização de modelos *in silico* para triagem de fármacos alternativos tem sido descrita no cenário da leishmaniose utilizando a arginase como alvo. Um estudo realizado em 2016, utilizou o banco de dados MetIDB contendo 5667 compostos e selecionou 200 flavonóides candidatos a inibidores da arginase da *Leishmania*. Desses compostos, através de técnicas de acomplamento virtual, dez apresentaram perfis de interação favoráveis com arginase (GLISIC, 2016). Um outro estudo realizado por Stevanovic, utilizou os compostos da triagem virtual realizada em 2016 para sintetizar e rastrear novos compostos capazes de interagir com arginase da *Leishmania*, identificando três compostos com atividade Leishmanicida *in vitro*. (STEVANOVIC, 2019). A técnica de triagem *in silico* é uma das principais etapas do processo de desenvolvimento de medicamentos, uma vez que propriedades biológicas de uma proteína dependem de sua interação física com outras moléculas (STEVANOVIC, 2019). O prévio conhecimento das prováveis interações dos fármacos com os alvos terapêuticos refina as possibilidades e otimizam o estudo sendo um melhor ponto de partida do que rastrear compostos aleatoriamente. No entanto, os resultados obtidos *in silico* não representam o cenário biológico durante um tratamento, por isso estudos experimentais *in vitro* de inibição enzimática são necessários, bem como estudos com o objetivo de desvendar o mecanismo de ação. O estudo realizado por Glissic em 2016 não realizou a experimentação *in vitro*, enquanto o realizado por Stevanovic em 2019 apenas avalizou os compostos triados *in silico* na forma amastigota da *Leishmania*.

## 2. JUSTIFICATIVA

As leishmanioses constituem um crescente problema de saúde pública no Brasil. Apesar de incapacitar ou matar milhões de pessoas a leishmaniose ainda representa uma necessidade médica importante que permanece não atendida, sendo considerada uma doença negligenciada. Além disso, não existem vacinas e o controle da leishmaniose depende principalmente de quimioterapia. Mas os fármacos utilizados como tratamento para leishmaniose tegumentar americana ainda possuem limitações. A maioria dos fármacos comumente utilizados são tóxicos causando efeitos adversos graves e a necessidade de um acompanhamento médico rigoroso. Sabe-se que a eficácia dos antimoniais varia entre espécies, apresentação clínica e resposta imune do hospedeiro. Além disso, quando ocorre um aumento da quimiorresistência do parasita os fármacos não eliminam completamente a *Leishmania* do organismo do hospedeiro (NATERA, 2007). Segundo a Academia Brasileira de Ciências uma das prioridades no apoio à pesquisa são os estudos voltados para uma triagem em larga escala de novos fármacos e quimioterapia e desenvolvimento pré-clínico de substâncias com atividade antiparasitária estabelecida (ACADEMIA BRASILEIRA DE CIÊNCIAS, 2016). Além disso, o estudo das doenças consideradas negligenciadas é uma das prioridades dos países emergentes. Diante das dificuldades e limitações do tratamento existente, é necessário o desenvolvimento de novos medicamentos com menos efeitos adversos e de fácil administração para substituir ou complementar as opções terapêuticas disponíveis. A arginase tem sido estudada como um potencial alvo de moléculas leishmanicidas, porque N – Hidroxi-L-Arginina (NOHA), um inibidor da arginase, e que é produzido por macrófagos como um intermediário durante a formação de óxido nítrico, pode diminuir os níveis de poliaminas em amastigotas e assim, reduzir a carga parasitária (INIESTA, 2001). Em estudos previamente realizados no nosso grupo de pesquisa, 116 moléculas com potencial inibidor da arginase foram identificados *in silico* com maior probabilidade de interação com a molécula receptora. As moléculas foram

selecionadas considerando a estrutura da arginase I e utilizando seis inibidores da enzima arginase I (2- aminoimidazole, A1P, AHD, ANH, L-LYSINE e nor-NOHA) para a construção de modelos farmacofóricos. Dentre as moléculas identificadas e disponíveis para aquisição foram escolhidos: o Nε-Acetyl-L-lysine (A4021), S-methyl-L-thiocitrulline (M5171) e S783579 Nε-acetyl-DL-lysine (S783579), por apresentarem os melhores índices de solubilidade, maiores escores de acoplamento molecular e menor custo (tabela 2).

**Tabela 1. Informações físico-químicas das moléculas selecionadas previamente *in silico*.**

Molécula	Massa Molecular	Estrutura Molecular	Score de acoplamento (kcal/mol)	Solubilidade (g/L)
Nε-Acetyl-L-lysine (A4021)	188.22		2,43	16,24
S-methyl-L-thiocitrulline (M5171)	265.33		2,36	29,5
Nε-acetyl-DL-lysine (S783579)	188.228		2,38	16,24

Nesse contexto, o estudo do efeito biológico das moléculas selecionadas previamente *in silico* possibilitará a identificação de uma alternativa terapêutica no tratamento da leishmaniose.

### 3. HIPÓTESE

As moléculas A4021, M5171 e S783579 selecionadas *in silico* são capazes de controlar a infecção por *L. amazonensis in vitro* através da inibição da enzima arginase.

### 4. OBJETIVOS

#### 4.1 OBJETIVO GERAL

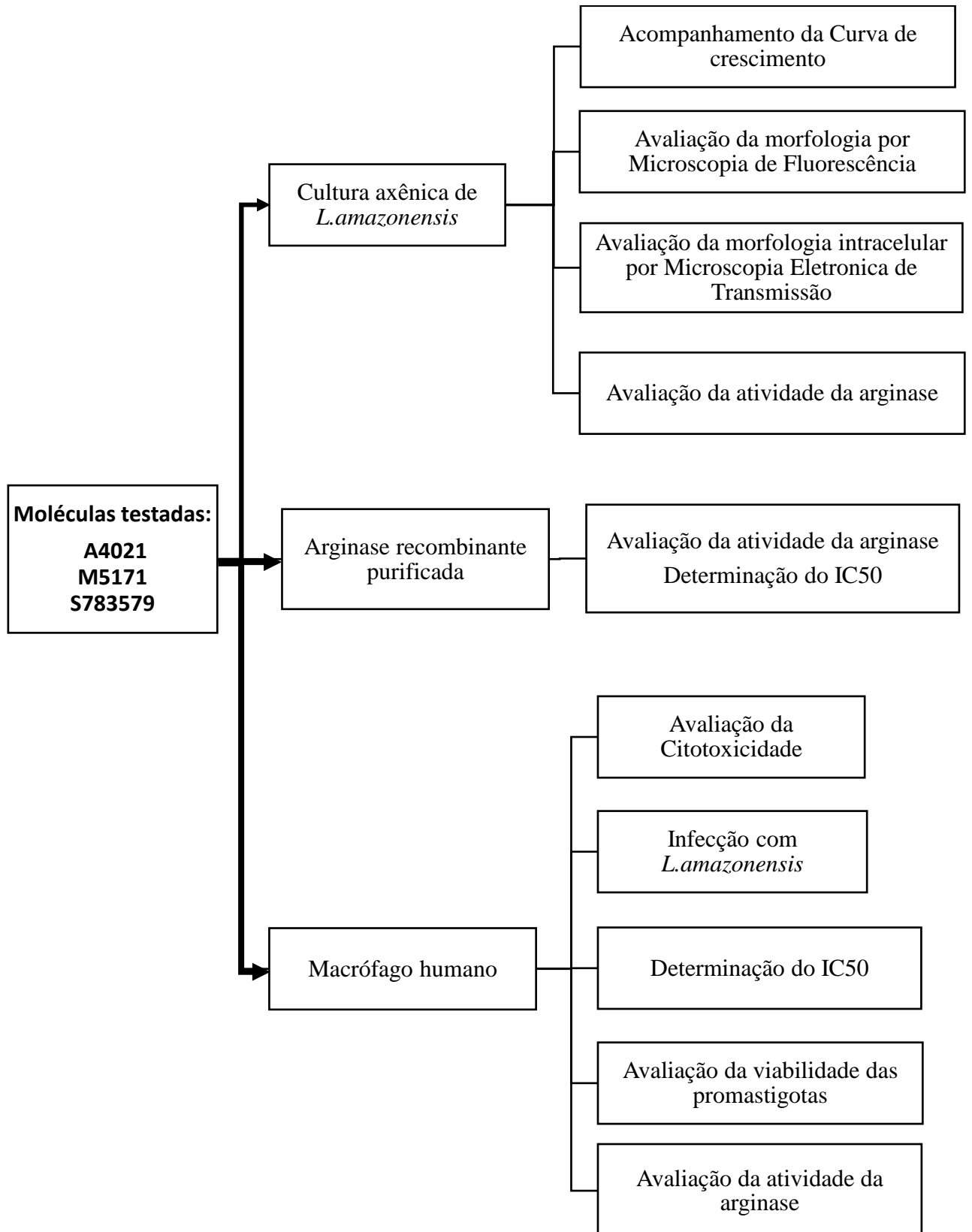
Investigar o efeito biológico das moléculas A4021, M5171 e S783579 na proliferação de *L.amazonensis* na cultura axênica e em macrófagos infectados.

#### 4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o efeito das moléculas A4021, M5171 e S783579 na atividade da enzima arginase purificada;
- Avaliar o efeito das moléculas A4021, M5171 e S783579 na atividade da arginase após tratamento de cultura axênica de promastigotas de *L.amazonensis*;
- Avaliar o efeito das moléculas A4021, M5171 e S783579 na interação parasita-hospedeiro após tratamento de macrófagos humanos infectados.



## 5. DESENHO EXPERIMENTAL



## 6. METODOLOGIA

### 6.1 CULTURA DE PROMASTIGOTAS

As promastigotas utilizadas de *L. amazonensis* foram isoladas de pacientes com leishmaniose cutânea difusa (MHOM / BR / 87 / BA336) . Foram cultivadas em BOD a 26°C no meio de Schneider (Invitrogen) suplementado com 10% de SBF (Gibco) e penicilina (100 µg / ml). Os parasitos utilizados nos ensaios de infecção foram selecionados de culturas em fase estacionária, quando existe predominância de formas metacíclicas enquanto nos ensaios realizados em cultura axênica de prosmatigotas, os parasitos utilizados estavam na fase log com predominância de formas procíclicas.

### 6.2 CULTURA DE THP-1

As células de linhagem humana (THP-1) foram armazenadas em nitrogênio líquido e cultivadas rotineiramente segundo protocolo estabelecido pelo Laboratório de Inflamação e Biomarcadores do Instituto Gonçalo Muniz (LIB-IGM). As células foram cultivadas em meio RPMI 1640 (Hyclone, Nova York, EUA) suplementadas com 10% de (SBF), 1% de piruvado de sódio e 1% de penicilina na incubadora de CO<sub>2</sub> (5%).

### 6.3 CULTURA DE MACRÓFAGOS HUMANOS

As Células mononucleares de sangue periférico humano (CMSP) foram isolados de *buffy coats* (fração de leucócitos e plaquetas) de sangue de doadores saudáveis fornecido pelo HEMOBA (Hematologia e Fundação de Hemoterapia da Bahia). A separação foi realizada utilizando o meio Histopaque (SIGMA-ALDRICH) em 1: 2 (sangue-salina). As centrifugações

sucessivas foram realizadas inicialmente a 1500 RPM durante 30 minutos à temperatura ambiente, seguida de centrifugações a 4 ° C durante 10 minutos a 1500, 1300 e 1100 RPM. Os monócitos utilizados nos ensaios foram cultivadas em meio RPMI suplementado (10% de SBF, 1% de HEPES, 1% de NEAA, 1% de antibiótico, 1% de piruvato de sódio e 50 ng de MCSF) e mantidos a 37 ° na incubadora de CO<sub>2</sub> (5%) durante seis dias para a diferenciação em macrófagos.

#### 6.4 ENZIMA ARGINASE PURIFICADA

As enzimas recombinantes da proteína hepática Arginase humana recombinante (ab168047) da ABCAM e NBP1-44388 (Arginase 1 humana recombinante / ARG1 / proteína hepática) da Novus Biologicals foram adquiridas pelo Laboratório de Inflamação e Biomarcadores. Para utilização das enzimas, inicialmente foi avaliado a atividade da arginase em diferentes concentrações da enzima (2, 0.5, 0.1, 0.01 e 0.001U/ $\mu$ M) para padronização da quantidade ideal para o ensaio de atividade enzimática. A atividade da arginase foi mensurada em diferentes concentrações da enzima (2-0,001U/ $\mu$ g) e a concentração ideal escolhida foi de 0,5U/ $\mu$ g.

#### 6.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DA ARGINASE

Macrófagos humanos ( $1 \times 10^6$ ) infectados com *L.amazonensis* (Ba 336) e cultura axênica de promastigotas ( $1 \times 10^7$ ) foram lisados com 100 $\mu$ L Triton-X (0,1%), por 30 minutos em placa agitadora. A atividade da arginase foi medida de acordo com Hesse *et al.* (HESSE, 2001). Resumidamente, a enzima foi ativada por aquecimento com adição de 100 $\mu$ L dos cofatores da enzima, MnCl<sub>2</sub> (10 mM) e 100 $\mu$ L de TRIS-HCL (50 mM) a 56 ° C durante 10 min. A hidrólise da arginina foi obtida a partir da incubação com 10 mL de L-arginina

(0,05 M) a 37° C (pH 9,7) durante 15-120 minutos em estufa seca. A reação foi interrompida com H<sub>2</sub>O/H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>(85%)/ H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (96%) (7/3/1, v / v / v). A atividade enzimática foi estimada com base na formação de 1 mM de ureia por minuto que foi determinada a 540 nm após a adição de 25 µL de a-isonitrosopropiofenone, seguido de aquecimento a 92°C durante 45 min (RODRIGUES.2017). O mesmo protocolo foi realizado com a enzima arginase purificada (0,5U/µg), exceto a adição do Triton-X. O tratamento da arginase purificada foi realizado por 30 minutos antes da adição dos cofatores.

#### 6.6 CURVA DE CRESCIMENTO DE CULTURA AXÊNICA DE *L.amazonensis* APÓS TRATAMENTO

Promastigotas de *L. amazonensis* (BA 336) cultivadas em meio Schneider (Invitrogen) suplementado com 10% de SBF (Gibco) e penicilina (100 µg / ml) na placa de 48 poços (1x10<sup>6</sup> em triplicata). As promastigotas foram tratadas com nor-NOHA, A4021, M5171 e S783579 em diferentes concentrações (1000, 500,100, 10 e 1 µM). A contagem dos parasitos viáveis foi realizada diariamente por microscopia óptica utilizando câmara de Neubauer por até 9 dias durante o ciclo de crescimento.

#### 6.7 AVALIAÇÃO DA MORFOLOGIA DA CULTURA AXÊNICA POR MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA

As promastigotas de *L. amazonensis* (BA 336) foram cultivadas em uma placa de 24 poços (2x10<sup>5</sup>) com e sem adição das moléculas nor-NOHA, M5171 e S783579 (100 µM). Após 72 horas de cultivo, as leishmanias foram contadas e depois fixadas em lâminas por centrifugação a 500 RPM durante 5 minutos através de citospin. Em seguida, foram coradas

com iodeto de propídio na concentração de 100µg/ml (cor vermelha) e laranja de acridina na concentração de 100µg/ml (FITC). Os poços do controle positivo foram tratados com anfotericina b por 24 horas (0,5 µg / ml), devido à toxicidade já descrita deste composto. A observação das amostras foi realizada no microscópio florescente Olympus e as imagens obtidas pelo programa Imagem-pro 6.3 (1000x).

## 6.8 AVALIAÇÃO DA MORFOLOGIA INTRACELULAR POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO

Promastigotas de *L. amazonensis* foram distribuídas em placa de 48 poços ( $1 \times 10^6$ ) e incubadas com nor-NOHA, A4021, M5171 e S783579 (100µM). Após um período de incubação de 4 dias, os parasitos foram fixados em glutaraldeído (2,5%) e paraformaldeído (2%) e em tampão cacodilato de sódio (0,1M), pH 7,4, por 2 dias a 4°C. Em seguida as amostras foram lavadas com tampão cacodilato de sódio 0,1M, pH 7,4 (3 banhos de 5 minutos em temperatura ambiente), sempre seguido de centrifugação 3000 rpm. Posteriormente, os parasitos foram corados com tetroxido de ósmio (1%) com ferricianeto de potássio (0,8%) e cloreto de cálcio (5mM) em tampão cacodilato de sódio (0,1M) por 1 hora. As amostras foram novamente lavadas, como já descrito e foram desidratadas em etapas, lavando-as em concentrações crescentes de acetona (30%, 50%, 70%, 90% e três vezes 100%). Em seguida, foram embebidas em acetona (100%) e resina (2:1) na polybed overnight, depois em acetona (100%) e resina (1:1), seguida de acetona (100%) e resina (1:2) e finalmente em resina pura para polimerizar em estufa a 60° C por 3 dias. Os cortes para MET (80 nm) foram cortados usando um ultramicrotomo LEICA UC6 e foram carregados em redes de níquel revestidas com carbono de forma variável. Os parasitos foram finalmente contrastados com acetato de uranila

e citrato de chumbo e foram visualizados. As fotos foram adquiridas em um microscópio eletrônico de transmissão JEM-1230 JEOL (10.000x).

## 6.9 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DOS COMPOSTOS POR ALAMAR BLUE EM MACRÓFAGOS

Os macrófagos obtidos foram plaqueados em placas de 96 poços ( $10^5$  por poço) e tratados em diferentes concentrações (1000,100,10,1 e  $0,1\mu\text{M}$ ) de M5171, S783579, A4021 (SIGMA-Aldrich-Aldrich). Em seguida, incubados em estufa a  $37^\circ\text{C}$ , 5% de  $\text{CO}_2$ , por 72 horas. Posteriormente, as células foram incubadas por mais 4 h com meio RPMI suplementado (10% de SBS e 1% de antibiótico) contendo 10% de Alamar Blue. A absorbância do reagente foi lida a 570 nm e 600 nm utilizando um espectrofotômetro (SPECTRA Max 190). O peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) foi usado como controle positivo.

## 6.10 AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE DA LEISHMANIA *IN VITRO* APÓS INFECÇÃO E TRATAMENTO DOS MACRÓFAGOS

As células THP-1 foram plaqueadas em placas de 96 poços ( $1 \times 10^5$  por poço) com adição de RPMI completo (10% de soro fetal bovino (Gibco) e 1 % de penicilina, 1% de piruvato de sódio) suplementado com PMA ( $200\mu\text{M}$ ). As células foram incubadas à  $37^\circ\text{C}$  e 5%  $\text{CO}_2$ .

Após sete dias de incubação para diferenciação, as células foram infectadas com *Leishmania amazonensis* (BA 336) na proporção 1:6 (célula: Leishmania). Após 4 horas de infecção, o nornoha, M5171, S783579 e A4021 (produzidas pela SIGMA-ALDRICH) foram utilizados em diferentes concentrações (1500,1000,500,250,100 e  $50\mu\text{M}$ ) para o cálculo do IC50. Após 72 horas de tratamento o meio foi trocado para meio Schneider (Invitrogen) suplementado com 10% de SBF (Gibco) e penicilina ( $100\text{ug/mL}$ ). A viabilidade das promastigotas foi avaliada

diariamente através da contagem de parasitas por microscopia óptica utilizando câmara de Neubauer durante 13 dias.

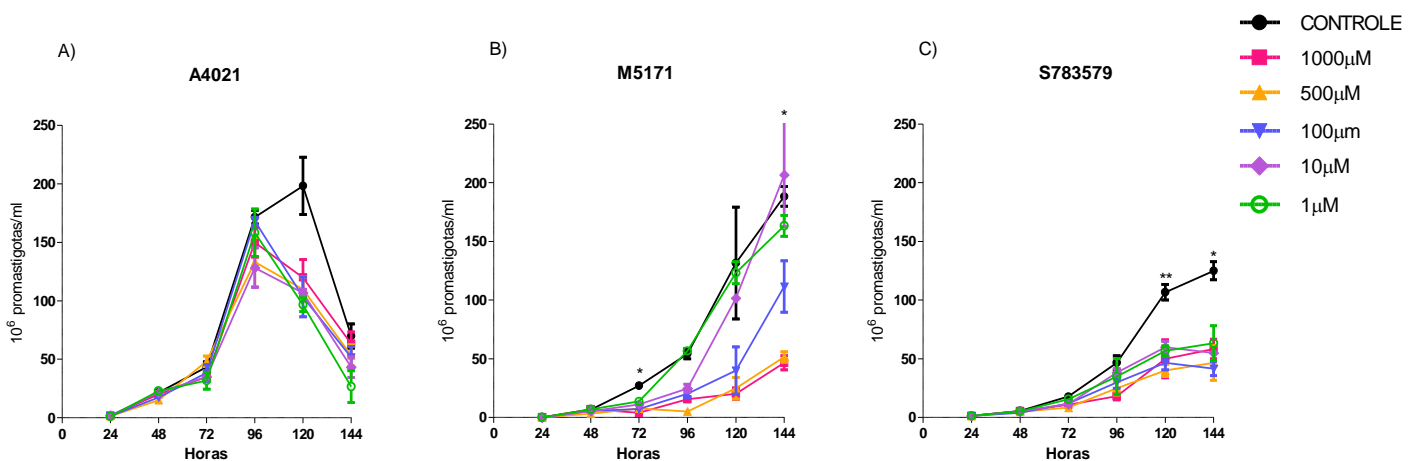
#### 6.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos foram avaliados pelo teste de Kruskal-Wallis, teste não paramétrico, com pós teste de Dunn para múltiplas comparações das amostras, com intervalo de confiança de 95%, sendo os valores considerados estatisticamente significantes quando  $p < 0,05$ . As análises foram feitas no GraphPad Prism versão 5.00 para Windows, (GraphPad Software, San Diego California USA). Os resultados foram plotados neste mesmo programa em gráfico de colunas, dispersão e curva de crescimento.

## 7. RESULTADOS

### 7.1 CURVA DE CRESCIMENTO *IN VITRO* APÓS TRATAMENTO DE PROMASTIGOTAS DE *L.amazonensis* COM A4121, M5171 E S783579

A arginase presente no parasita possui um grau de similaridade com a arginase humana, por isso, para avaliar se as moléculas apresentam efeito citostático em promastigotas de *L.amazonensis* (Ba 336), os parasitos foram tratados com diferentes concentrações das moléculas A4021, M5171 e S783579 (1000, 500, 100, 10 e 1 $\mu$ M,) e foi realizado a contagem de parasitas viáveis.



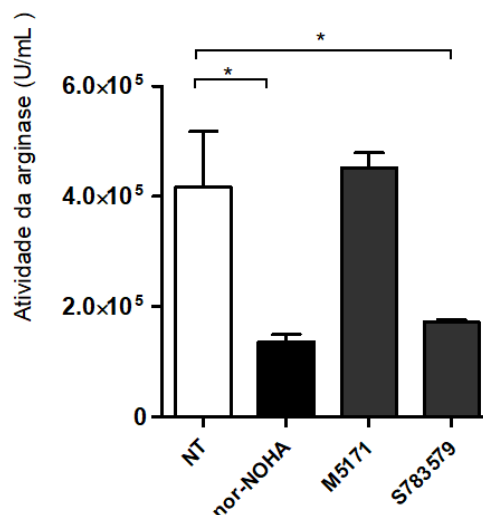
**Figura 4.** Curva de crescimento de cultura axênica de promastigotas de *L. amazonensis* tratadas *in vitro* com A4021, M5171 e S783579. As promastigotas (MHOM / BR / 87 / BA276) foram cultivadas em triplicata e tratadas com as moléculas A4021, M5171 e S783579 em diferentes concentrações (1000, 500, 100, 10 e 1 $\mu$ M). Foi realizada contagem dos parasitos viáveis tratados com A4021 (A); M5171 (B) e S783579 (C) (\*P<0,05, \*\* P <0,01) até 144 horas após o início da avaliação da curva de crescimento. Os resultados foram avaliados através do teste não-paramétrico Kruskal-Wallis com o pós-teste de comparações múltiplas de Dunn. As diferenças foram consideradas estatisticamente significantes quando  $p \leq 0,05$ .



Nas promastigotas tratadas com A4021 não existiu efeito significativo (Figura 4A), apesar do ponto de 120 horas apresentar uma tendência à redução da proliferação. Enquanto nas promastigotas tratadas com M5171 existiu efeito significativo mostrando redução após 72 horas (Figura 4B) e as tratadas com S783579 a partir de 120 horas e (Figura 4C).

## 7.2 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DA ARGINASE APÓS TRATAMENTO DE CULTURA AXÊNICA DE *L.amazonensis* COM A4021, M5171 E S783579

Utilizando os dados da redução da proliferação, calculamos o IC50 das moléculas M5171 (5,18 $\mu$ M) e S783579 (153.5  $\mu$ M) no tempo de 96 horas. Além disso, calculamos o IC50 do nor-NOHA (114,9 $\mu$ M), um inibidor da arginase já estabelecido como controle na literatura. Uma vez que a arginase do parasita é essencial para sua proliferação, investigamos se a redução da proliferação estava relacionada a inibição da arginase (Figura 5).



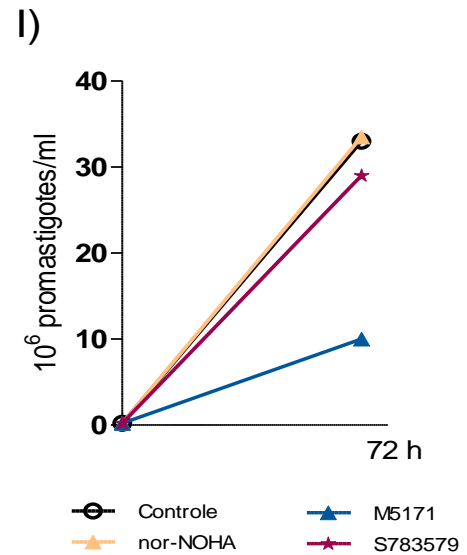
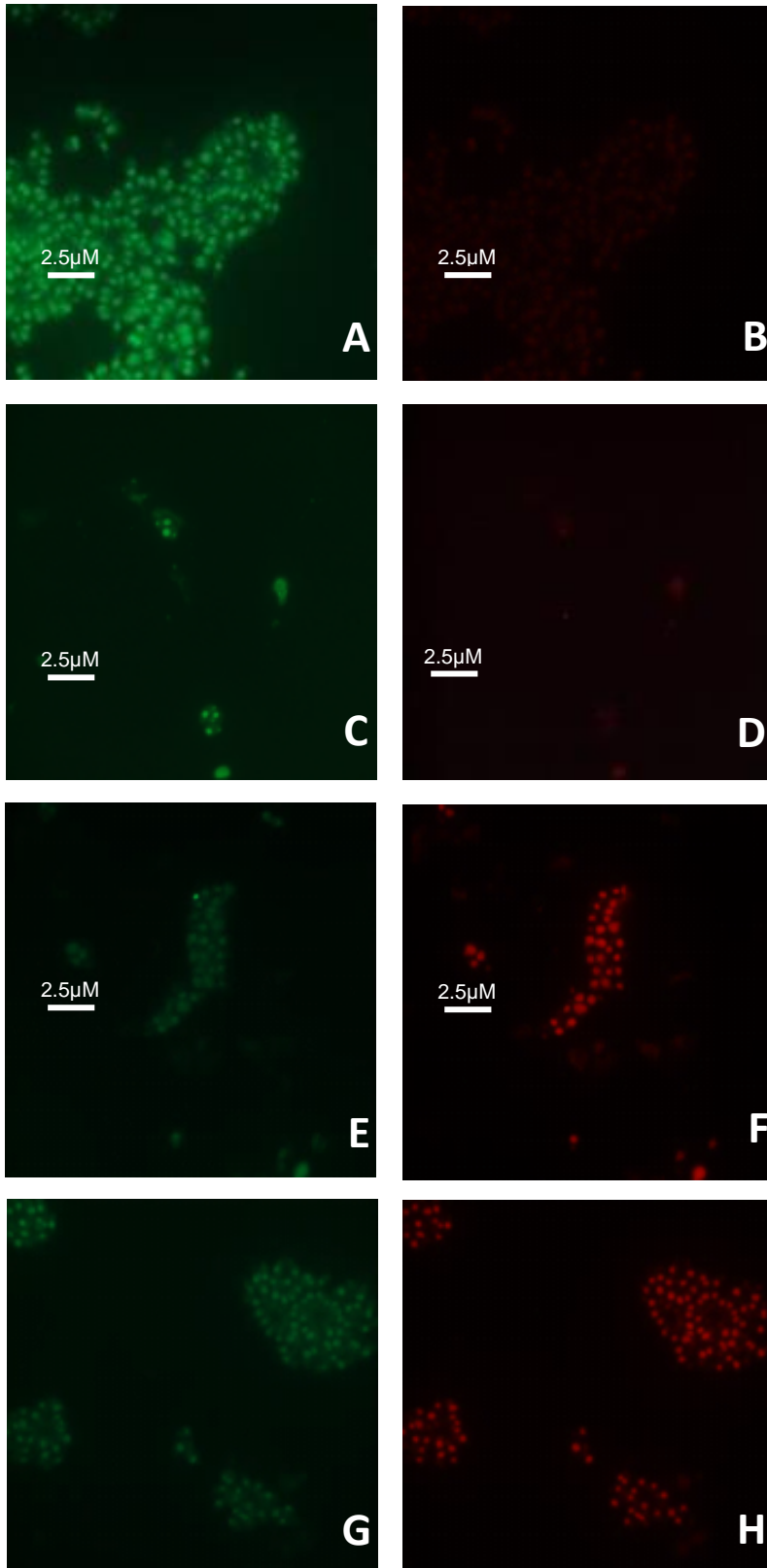
**Figura 5. Avaliação da atividade enzimática da arginase em promastigotas de *L.amazonensis* após tratamento com o nor-NOHA M5171 e S783579.** As promastigotas foram tratadas com nor-NOHA (114,9  $\mu$ M) M5171 (5,18 $\mu$ M) e S783579 (153.5  $\mu$ M), e após 96 horas de tratamento a atividade enzimática foi avaliada através de um ensaio colorimétrico baseado na curva padrão da ureia. Gráfico representativo de três experimentos independentes realizados em triplicata. Os resultados foram avaliados através do teste não-paramétrico Kruskal-Wallis com o **pós-teste de comparações múltiplas de Dunn**. As diferenças foram consideradas estatisticamente significantes quando  $p \leq 0,05$ .

Promastigotas de *L.amazonensis* foram tratadas com M5171, S783579 e nor-NOHA, logo após 96 horas de tratamento os parasitas foram centrifugados e lisados com Tritron-x conforme a metodologia descrita. Houve, redução da atividade da arginase nos tratados com S783579 e nor-NOHA comparados com os não tratados. No entanto, nos grupos tratados com M5171, não houve redução. O A4021 foi retirado desse experimento, pois seu efeito com as diferentes concentrações na cultura axênica foi irregular impedindo a determinação do IC50.

### 7.3 MORFOLOGIA DE PROMASTIGOTAS DE *L. amazonensis* POR MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA APÓS TRATAMENTO COM NOR-NOHA, M5171 E S783579

Após observarmos redução na proliferação de promastigotas de *L.amazonensis*, avaliamos se as moléculas também eram capazes de promover alterações morfológicas na leishmania. Desse modo, promastigotas de *L. amazonensis* (BA 336) foram primeiramente tratadas com A4021, M5171 e S783579 (100 µM) por 72 horas. Em seguida, os parasitos incubados na presença das moléculas foram corados com laranja de acridina (LA) e iodeto de propídio (IP) e observados por microscopia de fluorescência. As promastigotas não tratadas irradiavam fluorescência verde uniforme no núcleo e nos cinetoplastos (Figura 6A) e não apresentaram a fluorescência do iodeto de propídio (Figura 6B). O nor-NOHA foi usado como controle positivo. As promastigotas tratadas com nor-NOHA mostraram clivagem da cromatina (Figura 6C), mas não foram corados com iodeto de propídio (Figura 6D), indicando que ainda existe integridade na membrana, sugerindo a presença de uma apoptose inicial. Este perfil mudou consideravelmente nos parasitos tratados com M5171 e S783579. Ambos exibiram dilatação nuclear e coloração com iodeto de propídio causada pela permeabilização da membrana, indicando necrose ou apoptose secundária. Não foi possível realizar a microscopia

de fluorescência com a molécula A4021, pois ao ser diluído no meio Schneider produzia cristais, os quais refletiam a fluorescência, impedindo a captura de imagens das promastigotas.



**Figura 6. Microscopia de Fluorescência (1000X) de promastigotas de *L. amazonensis* após tratamento com nor-NOHA, M5171 e S783579.** As promastigotas foram pré-tratadas com as moléculas (100  $\mu$ M) por 72 h. Posteriormente foram coradas com 100  $\mu$ g / ml de iodeto de propídio (cor vermelha) e laranja de acridina a 100  $\mu$ g / ml (cor verde). Promastigotas observadas no filtro do laranja de acridina (A, C, E e G) e observadas no filtro do iodeto de propídio (B, D, F e H). Promastigotas não tratadas (controle negativo) (A e B); tratadas com nor-NOHA (100  $\mu$ M) (C e D); M5171 (E e F) e tratadas com S783579 (G e H). Número de parasitas viáveis por contagem através de microscopia ótica 72 horas após o tratamento (I).

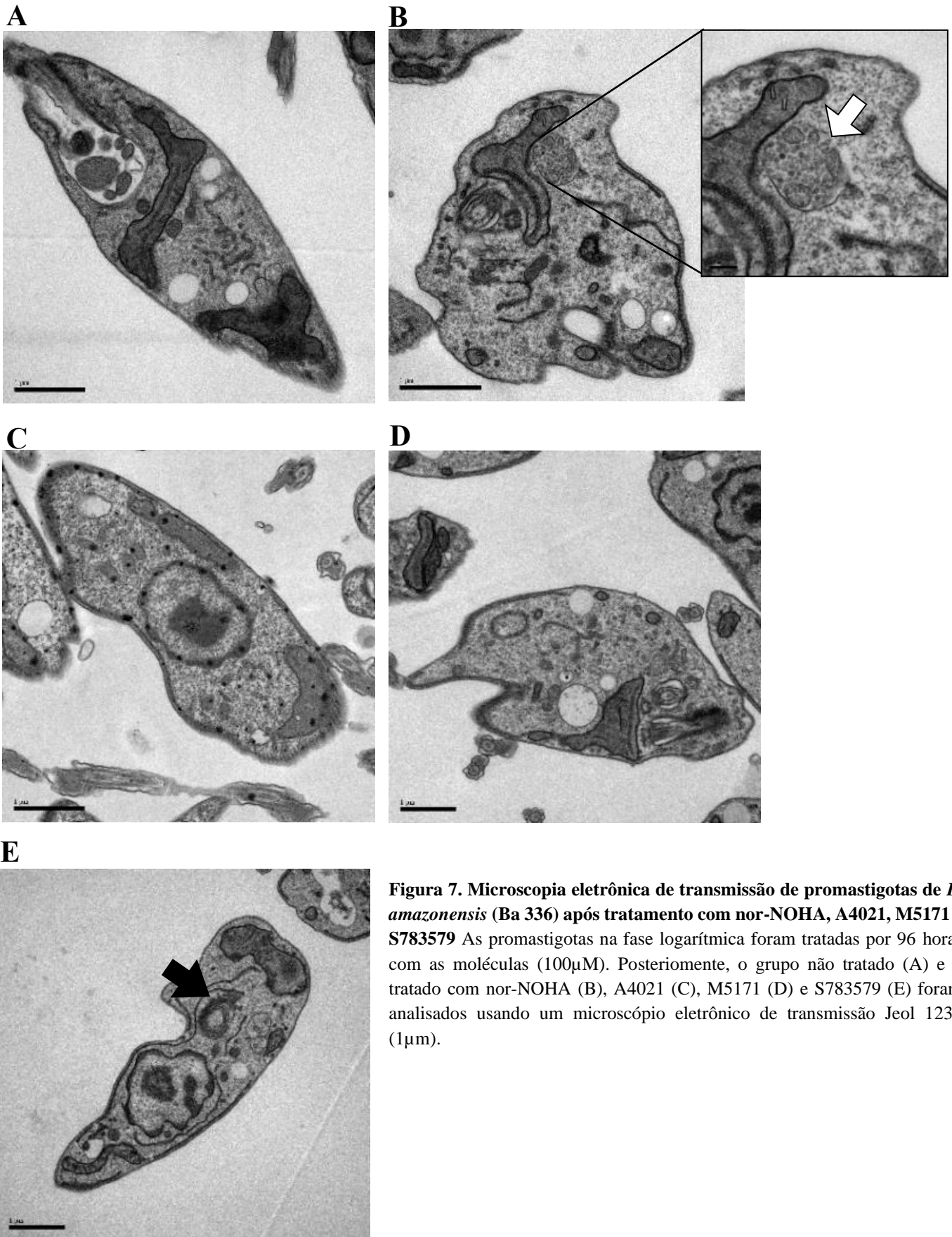
A contagem de promastigotas viáveis foi igualmente avaliada (Figura 6I) e foi possível observar que as alterações morfológicas acompanharam a redução da proliferação nos grupos tratados com M5171.

#### 7.4 MORFOLOGIA INTRACELULAR DE *L.amazonensis* ATRAVÉS DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO APÓS TRATAMENTO COM NOR-NOHA, A4121, M5171 E S783579

Diante das alterações observadas por microscopia de fluorescência, seguimos para avaliação de alterações ultraestruturais através de Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) após o tratamento com as moléculas. Promastigotas de *L.amazonensis* (Ba 336) foram avaliadas por microscopia eletrônica de transmissão após 96 horas de tratamento com nor-NOHA, A4021, M5171 e S783579 (100  $\mu$ M). Promastigotas não tratadas (Figura 7A) apresentaram organelas organizadas de acordo com as regras de programação nuclear com uma única mitocôndria localiza abaixo da membrana plasmática percorrendo todo o corpo do parasita abaixo dos microtúbulos e um núcleo bem delimitado, bem como organelas bem definidas. Por outro lado, as promastigotas tratadas com nor-NOHA apresentaram clivagem da membrana nuclear (Figura 7B) semelhantes à apresentada na microscopia de fluorescência. Além disso, nas promastigotas tratadas com nor-NOHA, foi possível observar formação de autofagolisossomos (seta branca indicativa na Figura 7B)

No grupo tratado com A4021 (Figura 7C), foi possível observar a precipitação do composto diluído em Schneider, corroborando com o baixo índice de solubilidade observado na microscopia de fluorescência. Nos parasitos tratados com M5171 (Figura 7D) e S783579 (Figura 7E) foi possível observar uma desorganização mais acentuada no citoplasma, com a membrana e o citoesqueleto irregulares ao longo das promastigotas. Além disso, as tratadas

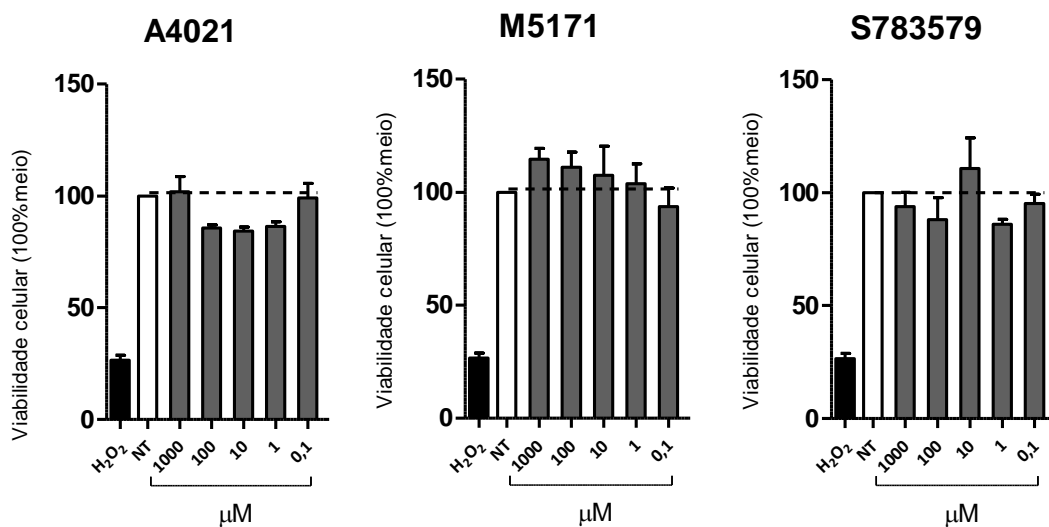
com S783579 (Figura 8E) exibiram estruturas semelhantes às figuras de mielina (seta preta), que surgem durante os processos de degeneração celular, ratificando o efeito citotóxico da molécula.



**Figura 7. Microscopia eletrônica de transmissão de promastigotas de *L. amazonensis* (Ba 336) após tratamento com nor-NOHA, A4021, M5171 e S783579** As promastigotas na fase logarítmica foram tratadas por 96 horas com as moléculas (100 $\mu$ M). Posteriormente, o grupo não tratado (A) e o tratado com nor-NOHA (B), A4021 (C), M5171 (D) e S783579 (E) foram analisados usando um microscópio eletrônico de transmissão Jeol 1230 (1 $\mu$ m).

## 7.5 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DO A4021, M5171 E S783579 EM MACRÓFAGOS DIFERENCIADOS DE THP-1

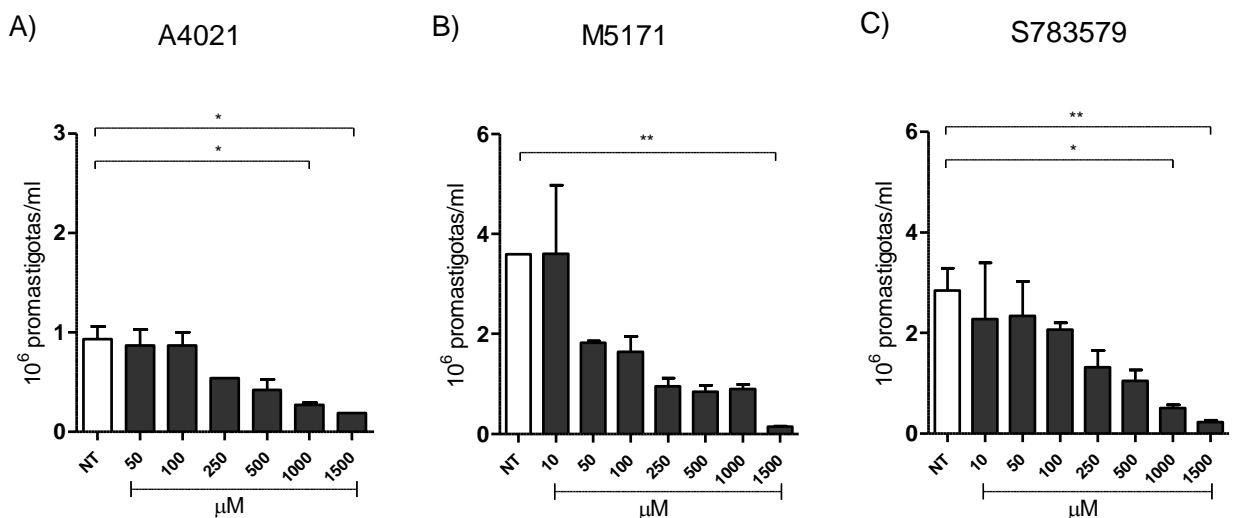
Os macrófagos humanos são a principal célula hospedeira em infecção por Leishmania. Por isso, avaliamos a citotoxicidade das moléculas A4021, M5171 e S783579 para a célula. Os macrófagos foram tratados em diferentes concentrações (1500; 1000;500;250;100;50;25;10 e 5 $\mu$ M) com as moléculas testadas: A4021 (Figura 8A), M5171 (Figura 8B) e S783579 (Figura 8C). Após 72 horas de tratamento, os macrófagos foram avaliados quanto à citotoxicidade dos compostos pelo teste colorimétrico Alamar Blue. Não houve diferença significativa, ou seja, as moléculas não apresentaram citotoxicidade para principal célula hospedeira de Leishmania.



**Figura 8. Citotoxicidade avaliada pelo ensaio colorimétrico Alamar Blue.** Macrófagos diferenciados de THP-1 foram plaqueados em triplicata e tratados com A4021 (A), M5171 (B), e S783579 (C) em diferentes concentrações (1500 - 5  $\mu$ M) por 72 horas. A viabilidade celular foi avaliada no espectrofotômetro (570 nm e 600 nm). Gráfico representativo de três experimentos independentes. Os resultados foram avaliados através do teste não-paramétrico Kruskal-Wallis com o pós-teste de comparações múltiplas de Dunn. As diferenças foram consideradas estatisticamente significantes quando  $p \leq 0,05$ .

## 7.6 DETERMINAÇÃO DO IC50 DO A4021, M5171 E S783579 SOBRE A VIABILIDADE DE *L.amazonensis* APÓS INFECÇÃO DE MACRÓFAGOS DIFERENCIADOS DE THP-1

Após verificarmos que as moléculas não possuíam efeitos citotóxicos, avaliamos se as moléculas A4021, M5171 e S783579 apresentavam efeito na viabilidade do parasito após a infecção dos macrófagos humanos, utilizando uma faixa de concentração entre 1000-3,9 $\mu$ M. Após 72h de tratamento, os moléculas foram capazes de reduzir de forma dose-dependente a viabilidade de *L. amazonensis* (Figura 9). O resultado foi obtido no sétimo dia e com esse dado foi calculado o IC50 das moléculas M5171 (77,88 $\mu$ M) S783579 (379,5 $\mu$ M) e A4021 (566,4 $\mu$ M).



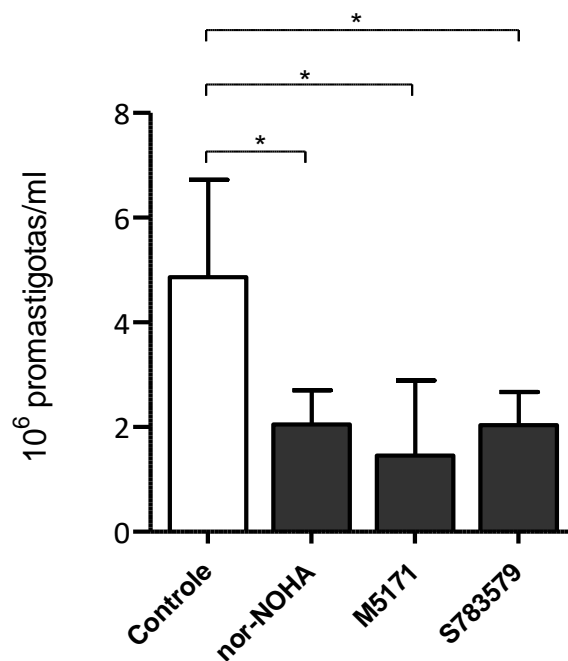
**Figura 9.** Viabilidade de promastigotas e IC50 após a infecção de macrófagos diferenciados de THP-1 e tratados com A4021, M5171 e S783579 *in vitro*. Macrófagos diferenciados a partir da linhagem de monócitos THP-1 infectados com *L.amazonensis* (6: 1) não tratados (NT) e tratados com diferentes concentrações (1000-3,9 $\mu$ M) de A4021 (P <0,05) (A); M5171 (P <0,01) (B) e S783579 (P <0,001) (C). A viabilidade de promastigotas foi avaliada 7 dias após o tratamento de 72 horas. Gráfico representativo de três experimentos independentes realizados em triplicata. Os resultados foram avaliados através do teste não-paramétrico Kruskal-Wallis com o pós-teste de comparações múltiplas de Dunn. As diferenças foram consideradas estatisticamente significantes quando p ≤ 0,05.

A)

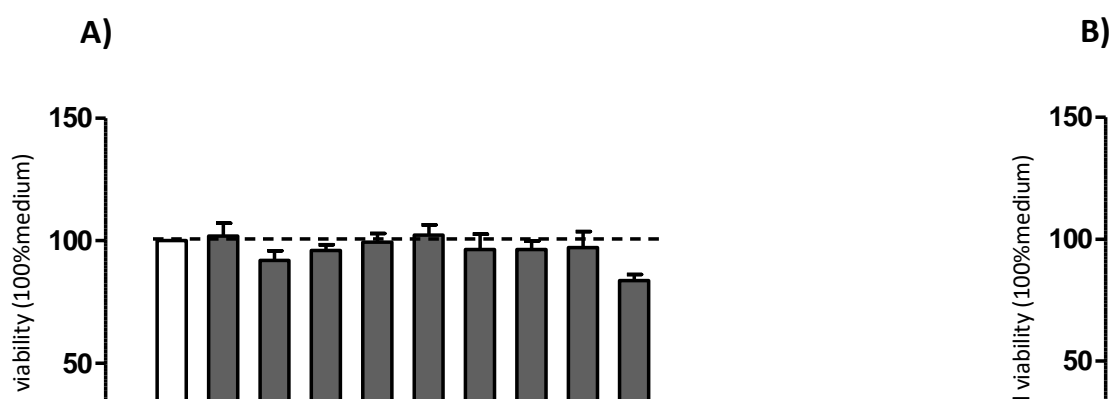
B)



A partir do cálculo do IC50 a viabilidade foi avaliada utilizando as novas concentrações (Figura 10). Com isso foi possível observar que existe uma redução da proliferação das leishmanias após a infecção dos macrófagos, confirmando que o M5171 ( $P < 0,001$ ) e S783579 ( $P < 0,001$ ) são capazes de reduzir a viabilidade de *L. amazonensis*. A A4021 foi retirada do experimento, por apresentar baixa solubilidade no modelo de estudo utilizado.

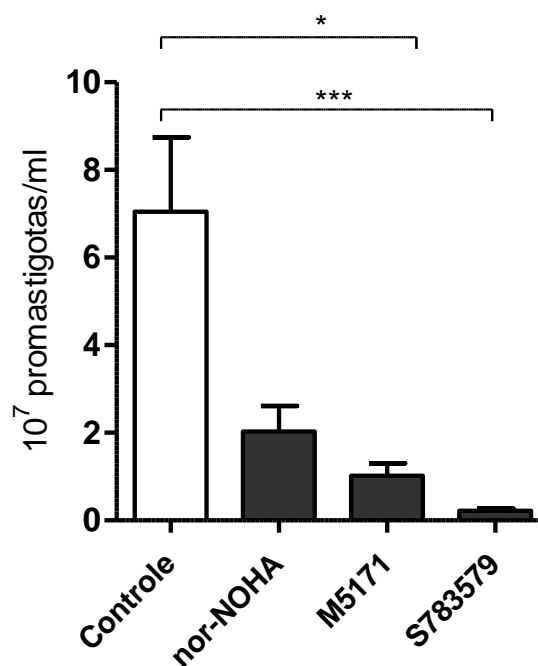


**Figura 10. Viabilidade de promastigotas após a infecção de macrófagos humanos (THP-1) tratados com o nor-NOHA, M5171 e S783579 in vitro.** Macrófagos humanos diferenciados de monócitos de THP-1 infectados com *L. amazonensis* (6: 1) e tratados por 72 horas com M5171 (77,88 $\mu$ M) S783579 (379,5 $\mu$ M). A viabilidade de promastigotas foi avaliada 7 dias (\*  $P < 0,001$ ). Gráfico representativo de três experimentos independentes realizados em triplicata. Os resultados foram avaliados através do teste não-paramétrico Kruskal-Wallis com o pós-teste de comparações múltiplas de Dunn. As diferenças foram consideradas estatisticamente significantes quando  $p \leq 0,05$ .



## 7.7 VIABILIDADE DE *L.amazonensis* APÓS INFECÇÃO E TRATAMENTO *IN VITRO* DE MACRÓFAGOS HUMANOS COM NOR-NOHA, A4021, M5171 E S783579

Observado o efeito na viabilidade de *L.amazonensis* após a infecção de macrófagos humanos diferenciados de células de linhagem THP-1, avaliamos em macrófagos diferenciados de monócitos derivados de sangue periférico fornecido pelo HEMOBA. Para avaliar o efeito leishmanicida intracelular, realizamos a contagem de promastigotas viáveis após a infecção e tratamento de macrófagos humanos obtidos de separação por gradiente de sangue periférico, conforme descrito em *Materiais e Métodos*.

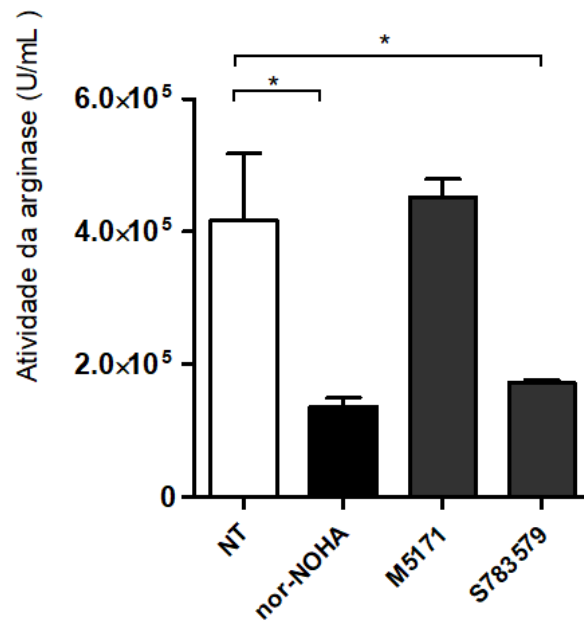


**Figura 11.** Viabilidade de promastigotas após a infecção de macrófagos humanos tratados com M5171 e S783579 *in vitro*. Macrófagos humanos diferenciados a partir de monócitos derivados de sangue periférico infectados com *L.amazonensis* (6: 1) e tratados com nor-NOHA, M5171 e S783579 (100  $\mu$ M). A viabilidade de promastigotas monitorados por 11 dias após o tratamento de 72 horas. Representação dos valores da área sob a curva do oitavo dia da curva de crescimento (\* P <0,001). Gráfico representativo de três experimentos independentes realizados em triplicata. Os resultados foram avaliados através do teste não-paramétrico Kruskal-Wallis com o pós-teste de comparação múltipla de Dunn. As diferenças foram consideradas estatisticamente significantes quando  $p \leq 0,05$ .

Os resultados foram obtidos após 11 dias de acompanhamento e mostraram diferença nos poços tratados com A M5171 a partir do 6º dia ( $p = 0,047$ ). No 8º dia, houve diferenças no tratamento com M5171 ( $P < 0,05$ ) e S783579 ( $P < 0,001$ ). Os resultados da diferença de viabilidade do parasita pós-infecção continuaram até dez dias após o tratamento (Figura 11). Os resultados sugerem que M5171 e S783579 são capazes de inibir a viabilidade de *L. amazonensis* após infecção por macrófagos humanos. A A4021 foi retirada do estudo, por apresentar baixa solubilidade e não apresentar resultados significativos no controle da infecção.

#### 7.8 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DA ARGINASE DE MACRÓFAGOS HUMANOS INFECTADOS COM *L.amazonensis* APÓS 72 HORAS DE TRATAMENTO COM A4021, M5171 E S783579

Para avaliar se o efeito observado na viabilidade da leishmania era decorrente da inibição da arginase, avaliamos o efeito do A4021, M5171 e S783579 na atividade da arginase em macrófagos (THP-1) infectados (Figura 12). As moléculas A4021, M5171 e S783579 não apresentaram efeito inibitório na atividade da arginase quando avaliada no sistema parasita-hospedeiro.

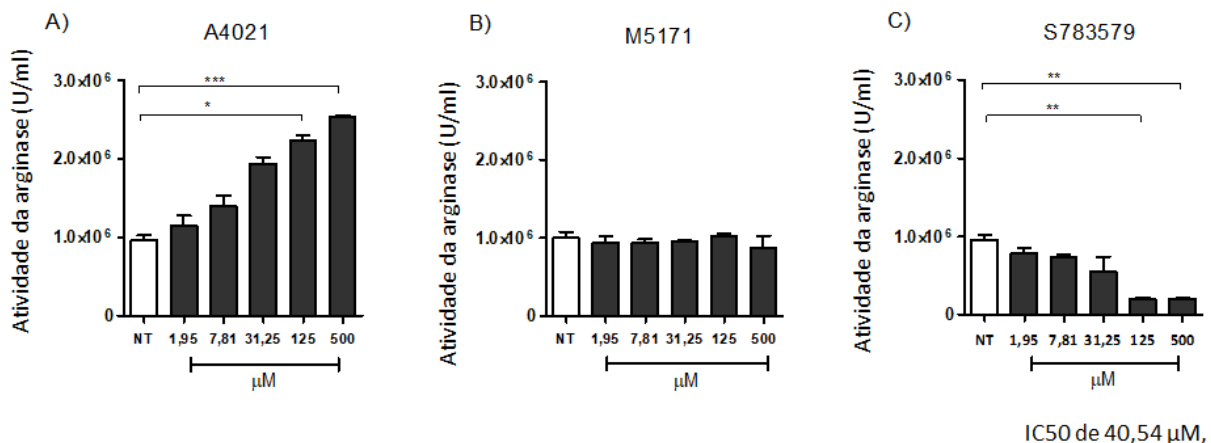


**Figura 12. Avaliação da atividade enzimática de macrófagos humanos infectados com *L.amazonensis* após tratamento com A4021, M5171e S783579.** Os macrófagos foram tratados com nor-NOHA (100  $\mu$ M) A4021 (566,4 $\mu$ M), M5171 (77,88 $\mu$ M) e S783579 (379,5 $\mu$ M), após 72 horas de tratamento a atividade enzimática foi avaliada através de um ensaio colorimétrico baseado na curva padrão de ureia. Gráfico representativo de três experimentos independentes realizados em triplicata. Os resultados foram avaliados através do teste não-paramétrico Kruskal-Wallis com o pós-test de comparação múltipla de Dunn. As diferenças foram consideradas estatisticamente significantes quando  $p \leq 0,05$ .

Apenas o nor-NOHA apresentou uma redução na atividade enzimática, igualando a atividade da arginase a de macrófagos não infectados.

## 7.9 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DA ARGINASE APÓS TRATAMENTO DA ENZIMA RECOMBINANTE PURIFICADA

Para avaliar se as moléculas inibem a enzima arginase, mensuramos os níveis de ureia, produzidos após o tratamento com A4021, M5171 e S783579 em diferentes concentrações (500;125;31,25;7,81;1,95 e 1,95 $\mu$ M). A arginase recombinante purificada foi tratada por 30 minutos com diferentes concentrações das moléculas (Figura 13). Foi possível observar que o a S783579 (Figura 13C) foi capaz de reduzir a atividade da arginase ( $P < 0,01$ ), apresentando um IC50 de 40,54  $\mu$ M, em contrapartida seu isômero a molécula A4021 (Figura 13)



**Figura 13. Avaliação da atividade enzimática da arginase após tratamento com A4021, M5171 e S783579.** A enzima arginase purificada, tratada por 30 minutos com diferentes concentrações das moléculas A4021 (A); M5171 (B) e S783579 (C), a atividade enzimática foi avaliada através de um ensaio colorimétrico capaz de mensurar a produção de ureia. Gráfico representativo de três experimentos independentes realizados em triplicata. Os resultados foram avaliados através do teste não-paramétrico Kruskal-Wallis com o pós-teste de comparação múltipla de Dunn. As diferenças foram consideradas estatisticamente significantes quando  $p \leq 0,05$ .

apresentou uma atividade enzimática aumentada na concentração de 500  $\mu$ M ( $P < 0,001$ ) e 125  $\mu$ M ( $P < 0,05$ ). O M5171 (Figura 13B) não apresentou inibição no modelo experimental utilizando a enzima recombinante purificada.

## 8. DISCUSSÃO

A terapia medicamentosa para a leishmaniose não mudou significativamente desde o início do século XX. O tratamento amplamente utilizado envolve a administração a longo prazo de antimoniais pentavalentes ou os fármacos de segunda escolha dentre os quais se destacam a pentamidina, anfotericina B, paromomicina e como a melhor alternativa para o tratamento da leishmaniose visceral, o miltefosine (SOARES-BEZERRA *et al.*, 2004). Esses fármacos provocam uma série de efeitos colaterais e demandam um acompanhamento médico rigoroso (BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE., 2010). Além disso, a resistência ao tratamento utilizando a pentamidina já foi descrita (WERBOVETZ, 2006).

Na busca por formas alternativas de tratamento, estudos conduzidos nos últimos anos mostraram que a arginase é uma enzima chave na biossíntese de poliaminas, sendo essencial para a proliferação de parasitas além de desempenhar um papel crucial na imunologia, por isso é uma estratégia terapêutica promissora (SICA e BRONTE, 2007; RODRIGUEZ e OCHOA, 2008).

Na triagem *in silico*, a análise da relação estrutura-atividade e avaliação biológica *in vitro* ou *in vivo* são consideradas ferramentas farmacológicas valiosas para doenças negligenciadas como a leishmaniose (SHAHRAM, 2019). O conhecimento da estrutura terciária de uma proteína usada como alvo do fármaco, juntamente com métodos computacionais, pode levar à identificação de potenciais locais de ligação ao fármaco (RAHIM, 2010). Assim, o uso prévio de triagem *in silico* pode contribuir para encontrar medicamentos eficazes e relativamente seguros.

No presente estudo, avaliamos o efeito biológico *in vitro* das moléculas A4021, M5171 e S783579 selecionados *in silico* como potenciais inibidores da enzima arginase. Embora o

modelo utilizado para seleção dessas moléculas tenha sido a enzima arginase 1 humana, os parasitas do gênero *Leishmania* também possuem uma única cópia do gene para a arginase. Como a arginase da *Leishmania* compartilha cerca de 39 a 43% da identidade com a arginase humana (ILARI, *et al.*, 2015), inicialmente, investigamos se a utilização do A4021, M5171 e do S783579 teriam efeito sobre a cultura axênica de *L. amazonensis*. Através da contagem de *Leishmanias* viáveis observamos o efeito das moléculas sobre a curva de crescimento de cultura axênica de *L. amazonensis* (Figura 4). Nas promastigotas tratadas com A4021 não houve efeito significativo (Figura 4A), apesar do ponto de 120 horas apresentar uma tendência à redução da proliferação. No entanto, no grupo tratado com M5171, observou-se que houve diferença estatística no terceiro dia de contagem, na concentração de 1000 $\mu$ M ( $p = 0,01$ ) e no sexto dia para as concentrações de 1000 $\mu$ M ( $p = 0,01$ ) e 500 $\mu$ M ( $p = 0,01$ ) em relação ao grupo sem tratamento. Os resultados sugerem que o M5171 reduz a proliferação do parasita e retarda a fase estacionária. Além disso, sugere que 72 horas são suficientes para o efeito de controle da proliferação. As promastigotas tratadas com S783579 na concentração de 500  $\mu$ M no quinto dia e 100  $\mu$ M no sexto dia apresentaram diferença estatisticamente significativa ( $p = 0,06$  e  $p = 0,1$ , respectivamente) em relação ao grupo sem tratamento. O resultado sugere que somente após 96 horas a molécula tem o efeito de limitação da proliferação. A molécula M5171 tem efeito em menor tempo que o S783579, o que pode estar relacionado à solubilidade das moléculas 29,5 (g / L) e 16,24 (g / L) respectivamente, já que uma menor solubilidade resulta em dificuldade de absorção. Quanto a A4021, não apresentou redução na proliferação da *Leishmania*, apesar de possuir uma solubilidade de 16,24 (g / L). Esta molécula quando diluída no meio Schneider formava cristais que possivelmente alteravam a interação da molécula com o parasita e conseqüentemente com a arginase. Uma vez que a arginase da *Leishmania* está localizada em uma organela chamada glicossomo, para que a molécula alcance o alvo é preciso atravessar a membrana plasmática do parasito e da organela. Além disso, durante uma infecção, a molécula

precisa atravessar a membrana da célula hospedeira e do vacúolo parasitóforo. Essa série de barreiras naturais dificulta a ação de moléculas que tem como alvo a arginase, por isso, uma melhor solubilidade é fundamental.

Em um estudo realizado por Roberts em 2004, foi demonstrado que *L.mexicana* arginase knockout foi incapaz de crescer *in vitro*. Então, uma vez que a arginase do parasita regula o crescimento (ROBERTS, 2004) é possível que a redução na proliferação observada em nosso estudo esteja relacionada diretamente com a inibição da arginase. Por isso, avaliamos a atividade da arginase após o tratamento de culturas axênicas de *L.amazonensis* com as moléculas testadas nesse estudo. Observamos que houve redução nos grupos tratados com S783579 (Figura 5), demonstrando que a redução observada está provavelmente relacionada com a inibição da atividade da arginase. Porém nos grupos tratados com M5171, não houve redução na atividade da arginase, indicando que deve haver outro mecanismo envolvido na redução da proliferação de promastigotas tratadas com M5171. A avaliação da atividade da arginase não foi realizada com a A4021 em promastigotas de *L.amazonensis*, por que essa molécula não apresentou redução significativa na proliferação e não foi possível calcular o IC50.

Além de estar relacionada com a proliferação da Leishmania, a ausência da arginase compromete a sobrevivência do parasito, como demonstrado em estudos utilizando Leishmania com arginase knockout e ornitina descarboxilase knockout (SILVA, 2010; HEBY, ROBERTS, , 2003). Por isso, avaliamos a viabilidade das promastigotas tratadas com as moléculas através de microscopia de fluorescência. Neste método, o corante laranja de acridina permeia todas as células e faz com que os núcleos pareçam verdes, enquanto o iodeto de propídio só é assimilado pelas células quando a integridade da membrana citoplasmática é perdida e o núcleo fica marcado de vermelho. (RIBBLE, GOLDSTEIN, *et al.*, 2005). O núcleo das células vivas tem uma morfologia intacta e apresenta cromatina verde com estruturas organizadas; as células em



apoptose contêm cromatina condensada ou fragmentada (verde ou laranja); as células necróticas têm coloração nuclear semelhante às células vivas, exceto a cromatina que é corada em laranja ao invés de verde (RIBBLE, GOLDSTEIN, *et al.*, 2005). Foi possível observar a integridade do núcleo nos poços não tratados (Figura 6A), com as células vivas com o núcleo normal corado em verde; no grupo tratado com nor-NOHA observamos células apoptóticas com núcleo verde claro e cromatina condensada ou fragmentada e, como observamos, sem marcação pelo iodeto de propídio, indicando que ainda existe alguma integridade na membrana que caracteriza a apoptose inicial. Embora não tenha sido possível observar a redução da proliferação, o nor-NOHA teve um efeito adicional, um apoptose inicial, possivelmente causada pela inibição da arginase. Antes, na avaliação da morfologia intracelular por microscopia eletrônica de transmissão (Figura 7B), observamos que as promastigotas tratadas com nor-NOHA apresentaram clivagem da membrana nuclear (Figura 7B) semelhantes à apresentada na microscopia de fluorescência. Além disso, nos parasitas tratados com nor-NOHA, foi possível observar formação de autofagolisossomos (seta branca indicativa na figura 7B). O surgimento de estruturas semelhantes ou derivadas de autofagolisossomos pode ser associada a uma degeneração por vias autofágicas como descrito por Dunn. (DUNN, 1990). Essa degeneração também foi descrita em um estudo realizado por Bera em 2003, eles demonstraram que utilizando peptídeos no tratamento da infecção por *L.donovani* ocorria a formação de vacúolos derivados de lisossomos e isso estava associado a uma redução na proliferação e viabilidade do parasita (BERA, *et al.*, 2003).

Por outro lado, as amostras tratadas com as moléculas M5171 e S783579 na microscopia de fluorescência mostraram dilatação nuclear e coloração com iodeto de propídio causada pela alteração da permeabilidade da membrana, indicando necrose secundária ou apoptose tardia, o que corrobora a redução de parasitos viáveis na contagem realizada antes da microscopia de fluorescência e com o resultado da concentração de 100µM após 72 horas de tratamento (Figura

6I). Além disso, na microscopia eletrônica de transmissão, foi possível observar nos parasitas tratados com M5171 (Figura 7D) e S783579 (Figura 7E) uma desorganização acentuada no citoplasma, com a membrana e o citoesqueleto irregulares ao longo da promastigota. Exclusivamente no grupo tratado com S783579 (Figura 7E) foi possível observar estruturas semelhantes às figuras de mielina (seta preta), que surgem durante os processos de degeneração celular, indicando um efeito citotóxico da molécula. Essa degeneração celular possivelmente está relacionada diretamente com a inibição da atividade enzimática da arginase observada, uma vez que a arginase e a óxido nítrico sintase competem pelo mesmo substrato, a inibição da arginase disponibilizaria mais L-arginina para produção de óxido nítrico (NO) (INIESTA, 2001).

A molécula A4021 foi retirado da análise da microscopia de fluorescência, pois ao ser diluído no meio Schneider, a molécula formava cristais que impossibilitavam a captura de imagem no microscópio de fluorescência. Além disso, na microscopia eletrônica de transmissão, no grupo tratado com A4021 (Figura 7C), foi possível observar a precipitação do composto diluído em Schneider. Apesar do A4021 possuir solubilidade igual ao do S783579 (16,4 g/L), o A4021 não diluiu no meio Schneider da mesma forma. As moléculas A4021 e S783579 são isômeros e por isso é possível que a presença do carbono quiral, característico de um composto isômero, tenha influenciado na solubilidade, impedindo a obtenção de imagens na microscopia de fluorescência. Outra possível explicação é que a A4021 interaja de forma diferente com os componentes do meio de cultivo schneider e para contornar essa limitação, talvez fosse necessário uma solubilização em outro meio de cultura, uma vez que a cristalização não era observada quando diluído no meio RPMI.

Possivelmente, a diferença no tipo de morte entre as drogas testadas (M5171 e S783579) e o nor-NOHA esteja relacionada à fórmula estrutural e forma como eles interagem com a enzima arginase. As moléculas foram selecionadas *in silico* com base em um modelo

farmacofórico utilizando como referência inibidores conhecidos de arginase entre eles o nor-NOHA, mas as moléculas têm propriedades diferentes. Por exemplo, o M5171 é análogo à citrulina capaz de inibir a enzima iNOS (NARAYANAN e GRIFFITH, 1994).

O grupo de Rocío Nieto também utilizou avaliações *in silico* e explorou os efeitos dos benzimidazol na inibição da arginase, uma vez que já é descrito seu uso como antibacteriano, antifúngico, antimalárico e leishmanicida (MENESES, *et al.*, 2018). A triagem virtual realizada foi utilizada para selecionar quais derivados tinham potencial como inibidores da arginase da *Leishmania*. No entanto, diferentes das moléculas utilizadas neste estudo, os derivados de benzimidazol possuem anéis aromáticos e sistemas rígidos, essas propriedades estão associadas a baixa solubilidade e problemas de farmacocinética / farmacodinâmica. Apesar disso, um dos compostos mostrou eficiência como leishmanicida e com efeito inibitório na atividade da enzima arginase. Outros estudos foram realizados recentemente empregando a triagem virtual para identificação de potenciais inibidores da arginase utilizando como base compostos flavonoides (GLISIC, *et al.*, 2019) e oxadiazóis (STEVANOVIC, *et al.*, 2019).

Após avaliarmos os efeitos das moléculas no parasita e diretamente na enzima, investigamos os efeitos na interação parasita-hospedeiro. Primeiro, avaliamos a citotoxicidade em macrófagos humanos, uma vez que essa é a principal célula hospedeira nos vertebrados e crucial para o estabelecimento da infecção. Não observamos, nenhum efeito tóxico do A4021, M5171 e S783579 nos macrófagos humanos nem nas maiores concentrações testadas (1500; 1000; 500; 250; 100; 50; 25; 10 e 5  $\mu\text{M}$ ). Em seguida avaliamos se as moléculas eram capazes de interferir na infecção dos macrófagos. Para medir a atividade dos compostos, utilizamos um parâmetro IC<sub>50</sub>, que corresponde à dose capaz de matar 50% dos parasitos: assim, quanto menor o IC<sub>50</sub>, mais ativo é um composto. Finalmente, ao utilizarmos as concentrações calculadas do IC<sub>50</sub> do A4021 (566,4  $\mu\text{M}$ ), M5171 (77,88  $\mu\text{M}$ ) e S783579 (379,5  $\mu\text{M}$ ) observamos que as moléculas são capazes de reduzir a quantidade de promastigotas viáveis

após a infecção de macrófagos humanos. Das três moléculas testados o M5171 apresentou o menor IC50, da mesma forma que apresentou na cultura axênica de promastigotas, apesar de não ser capaz de reduzir a atividade da arginase na enzima purificada e nem no parasita. Provavelmente o acoplamento molecular observado *in silico* para essa molécula não reflita os acontecimentos *in vitro*, que envolve variáveis como tempo de tratamento, meio utilizado para diluição, e as barreiras naturais para alcançar a arginase, a membrana da *Leishmania* e a membrana do glicossomo. Apesar disso, houve redução na proliferação das promastigotas de *L.amazonensis*, o que indica que a molécula possui um mecanismo de ação independente da modulação negativa da atividade da arginase.

Em virtude das moléculas terem sido desenhados utilizando como modelo a enzima arginase 1 humana, presente nas células, avaliamos se a redução na proliferação estava relacionada a inibição da atividade da arginase durante a infecção. Apesar das moléculas apresentarem alta interação *in silico* com a enzima arginase, observamos que não houve redução na atividade da arginase, demonstrando que quando as moléculas são administradas durante a infecção de macrófagos humanos não são capazes de reduzir a atividade enzimática do complexo parasita-hospedeiro. Esse resultado pode estar relacionado a dois fatos: durante a infecção a L-arginina pode ser absorvida por macrófagos através do transportador de membrana CAT-2B ou absorvida pelo parasita através do transportador AAP3. Em outras palavras, para que a molécula interaja com a arginase do macrófago existe apenas uma barreira, a membrana plasmática, mas para inibir a arginase da *Leishmania* a molécula precisa ser capaz de ultrapassar quatro níveis: a membrana do macrófago, o vacúolo parasitóforo, a membrana do parasita e glicossomo. O modelo de estudo utilizado não permite confirmar se as moléculas são capazes de ultrapassar os níveis envolvidos durante a infecção. Além disso, demonstramos que as moléculas são capazes de reduzir a atividade enzimática em cultura axênica de promastigotas, mas na infecção a enzima dos macrófagos também está presente, e com a metodologia que

utilizamos não é possível separar a atividade de qual enzima (*Leishmania* ou macrófago) estamos observando. Provavelmente, as moléculas não são capazes de reduzir a atividade da arginase dos macrófagos, mas apenas da *Leishmania*, ou o efeito das moléculas na forma amastigota seja diferente da forma promastigota. Em um estudo recente realizado por Stevanovic que utilizou avaliação *in silico* para identificar oxadiazóis como potenciais inibidores da arginase da *Leishmania* avaliou a viabilidade de amastigotas intracelulares em macrófagos diferenciados de RAW 264.7 e cultura axênica de *Leishmania donovani* (STEVANOVIC, *et al.*, 2019). Apesar do objetivo principal ser semelhante, Stevanovic utilizou células de linhagem animal e não avaliou a interação dos compostos com a arginase da *Leishmania*. Em contrapartida ele avaliou os efeitos dos oxadiazóis na cultura axênica de amastigotas e de amastigotas intracelulares. Esta técnica seria interessante para responder se a inibição da arginase observada nas promastigotas seria observada também nas amastigotas. Além disso, avaliando a atividade da arginase em amastigotas recuperadas dos macrófagos infectados seria possível inferir se as moléculas foram capazes de alcançar a arginase da *Leishmania*, atravessando a membrana da *Leishmania*, o vacúolo parasitóforo e o glicosomo. Uma outra possibilidade é que apesar das moléculas selecionadas possuírem maior afinidade com o sítio catalítico da arginase 1 humana *in silico*, durante a infecção são capazes de reduzir a proliferação por outros mecanismos ainda não esclarecidos, mas que não estão relacionados a atividade da arginase.

Finalmente, utilizamos arginase recombinante purificada para avaliarmos diretamente a interação das moléculas com a enzima. Os testes avaliaram a atividade da arginase de forma indireta, através da quantificação da ureia que é um subproduto na etapa final do metabolismo da L-arginina pela arginase. Ao mensurarmos os níveis de ureia, produzidos após a adição do A4021, M5171 e S783579 em diferentes concentrações (500;125;31,25;7,81;1,95 e 1,95 $\mu$ M) observamos que a molécula A4021 promoveu um aumento na atividade da enzima. Dentre as

moléculas estudadas, o A4021 foi o que apresentou o escore de acoplamento mais alto, mas o escore é uma extrapolação de alguns componentes envolvidas na interação. As propriedades biológicas de uma proteína dependem de sua interação física com outras moléculas, portanto, a capacidade de criar interações de alta afinidade e seletivas com um medicamento ou outras moléculas biologicamente importantes depende da formação de um conjunto de ligações e interações (ADIBPOUR 2012). Por isso, a triagem *in silico* possui algumas limitações importantes como avaliar as componentes entrópicas.

A enzima com M5171 não apresentou efeito na atividade da arginase purificada, reforçando que essa molécula possivelmente atue por mecanismos que não envolvam a inibição por competição da arginase. Em contrapartida, o S783579 apresentou redução da atividade da arginase, com um IC50 de 40,54  $\mu$ M, indicando que essa molécula é capaz de interagir com a enzima bloqueando o metabolismo da L-arginina. No entanto, não avaliamos, se a molécula bloqueia o sítio ativo apenas ou é metabolizado pela arginase.

O uso de técnicas de triagem computacional ajuda a testar *in silico* compostos além dos limites de restrições experimentais, como acoplamento e solubilidade, e selecionar ou projetar inibidores com mais eficiência contribuindo para uma pesquisa mais direcionada. No entanto, a triagem virtual não recria o cenário biológico que pode ser observado *in vitro*, por isso, a avaliação biológica não é excluída como ferramenta farmacológica. Entre as moléculas utilizadas neste estudo, o A4021 mostrou a menor eficiência como controle de infecção e proliferação da Leishmania. Enquanto o S783579 apresentou o resultado esperado, foi capaz de reduzir a proliferação da Leishmania e na cultura axênica foi capaz de inibir a atividade da arginase. Contudo, observamos que a M5171 apesar, de virtualmente apresentar acoplamento a enzima arginase, não apresentou efeito sobre a enzima, e apesar disso, reduziu a proliferação na cultura axênica de promastigotas e após a infecção de macrófagos humanos. Diante disso, os nossos resultados indicam as moléculas M5171 e S783579 como potenciais alternativas

terapêuticas para a leishmaniose, mas o mecanismo de ação e as vias envolvendo o padrão de morte observado nas promastigotas precisam ser esclarecidos. Além disso, é preciso uma avaliação mais ampla do efeito dessas moléculas na interação parasita-hospedeiro, uma vez que o balanço da resposta imune do macrófago M1 e M2 está relacionada com a ativação da arginase e é fundamental para o estabelecimento da infecção. Possivelmente avaliando a produção de poliaminas, NO, e no caso de macrófagos infectados os mediadores inflamatórios produzidos, seja possível desvendar se a redução da proliferação da *Leishmania* observada com M5171 e o S783579 no tratamento da cultura axênica e na infecção estaria relacionada a atividade da arginase ou a outro mecanismo.

## 9. CONCLUSÃO

Em conjunto, nossos resultados demonstram a eficácia da abordagem *in silico* para selecionar compostos como possíveis candidatos para controlar a replicação de *L. amazonensis*. Além disso, a ausência de toxicidade celular, a complexidade estrutural e eficiência no controle da proliferação de *L. amazonensis* em cultura axênica e na infecção de macrófagos humanos tratados com as moléculas M5171 e S783579 tornam-as boas candidatas para otimização e design de novas moléculas com a perspectiva no desenvolvimento de tratamentos mais eficazes para a leishmaniose cutânea causada por *L. amazonensis*.



## REFERÊNCIAS

- ABBAS, A. K. *et al.* **Cellular and molecular immunology**. 7 ed. Saunders Elsevier. 2007. p. 560.
- ABBAS, A. K. *et al.* Functional diversity of helper T lymphocytes, **Nature**, v. 383, n. 6603, p. 787–793, 1996.
- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILAI, S. **Imunologia celular e molecular**. 7. ed. Elsevier, 2012.
- ACUÑA, S.M. *et al.* Arginase expression modulates nitric oxide production in *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. **PLoS One**, v. 12, n.11, p.187-186, 2017.
- ADIBPOUR, N. *et al.* *In silico* designing selective inhibitor of drugs, medicinal plants compounds and experimental ligands for pteridine reductase targeting visceral leishmaniasis, **Afr. J. Microbiol. Res.**, v. 6 p. 917-926, 2012.
- AKHOUNDI, M. *et al.* A historical overview of the classification, evolution, and dispersion of leishmania parasites and sandflies. **PLoS Negl. Trop. Dis.** v.10, p. 1-40.2016.
- AKOPYANTS, N. S. *et al.* Expression profiling using random genomic DNA microarrays identifies differentially expressed genes associated with three major developmental stages of the protozoan parasite *Leishmania major*. **J. Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 136, n. 1, p. 71-86, Jul, 2004.
- ANDERSON, C.F.; MENDEZ, S.; SACKS, D.L. Nonhealing Infection despite Th1 Polarization Produced by a Strain of *Leishmania major* in C57BL/6 Mice. **J. Immunol.**, v. 174, n. 5, p. 2934-2941, 2005.
- ANDERSON, C.F.; MOSSER, D.M. A novel phenotype for an activated macrophage: the type 2 activated macrophage. **J. Leukoc. Biol.**, v. 72, p. 101–106, 2002.
- AOKI, J.I. *et al.* L-arginine availability and arginase activity: Characterization of amino acid permease 3 in *Leishmania amazonensis*. Jardim A, ed. **PLoS Neglected Trop. Dis.**, v.11, 2017.
- ARANGO DUQUE, G.; DESCOTEAUX, A. Macrophage cytokines: involvement in immunity and infectious diseases. **Front. Immunol.**, v. 5, p. 491, 2014.
- BABIOR, B. M. Phagocytes and oxidative stress. **Am. J. Med.**, v. 109, n. 1, p. 33-44, 2000.
- BASANO, S. D. A.; CAMARGO, L. M. A. American cutaneous Leishmaniasis: history, epidemiology and prospects for control. Brazilian. **J. Epidemiol.**, v.7, p. 328–337, 2004.
- BASSELIN, M. *et al.* Resistance to pentamidine in *Leishmania mexicana* involves exclusion of the drug from the mitochondrion. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 46. p. 3731-3738, 2002.

BASU, NK. *et al.* Isolation of a nitric oxide synthase from the protozoan parasite, *Leishmania donovani*. **FEMS Microbiol Lett.**, v. 156, p. 43-47, 1997.

BECKER, I.; HERNÁNDEZ-RUIZ, J.; BECKER, C. M. Linfocitos T citotóxicos CD8+ en la Leishmaniasis cutánea. **Instituto Nacional de Salud Pública**, v. 48. 2006.

BERA, A. *et al.* Induction of autophagic cell death in *Leishmania donovani* by antimicrobial peptides Author links open overlay panel. **Mol Biochem Parasitol**, v. 127, n. 1, p. 23-35, 2003.

BESTEIRO, S. *et al.* Endosome sorting and autophagy are essential for differentiation and virulence of *Leishmania major*. **J Biol Chem**, v.281, p.11384-96, 2006.

BLUM, J. *et al.* LeishMan recommendations for treatment of cutaneous and mucosal leishmaniasis in travelers, **J. Travel Med.** , v. 21 ( 2 ) , p. 116 – 129.2014.

BOCEDI, A. *et al.* Trypanothione efficiently intercepts nitric oxide as a harmless iron complex in trypanosomatid parasites. **FASEB J.** v.24, n. 4, p. 1035-42, abr, 2010.

BOGDAN, C. and ROLLINGHOFF, M. The immune response to Leishmania: mechanisms of parasite control and evasion. **International Journal for Parasitology**, v. 28, n. 1, p. 121-34, 1998.

BOUCHER, J.L; MOALI, C. J.P. Tenu Nitric oxide biosynthesis, nitric oxide synthase inhibitors and arginase competition for l-arginine utilization. **Journal Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 55, p. 1015–1028.1999.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Atlas de leishmaniose tegumentar americana: diagnósticos clínico e diferencial**. Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2006.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Vigilância e monitoramento da leishmaniose tegumentar americana em unidades territoriais**, Brasil, 1994 – 2001.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Disponível em: <http://saude.gov.br/saude-de-a-z/leishmaniose-tegumentar>. Acesso em 14 de outubro de 2019.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. Guia de Vigilância Epidemiológica. Brasília: Ministério da Saúde; 2010.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. Guia de Vigilância Epidemiológica. Brasília: Ministério da Saúde; 2000.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. Sistema Nacional de Vigilância em Saúde. 2011. Disponível em:

[http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/sistema\\_nacional\\_vigilancia\\_saude\\_ba\\_5ed.pdf](http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/sistema_nacional_vigilancia_saude_ba_5ed.pdf).  
Acesso em: 14 de outubro de 2019.

BROCHU, C. *et al.* Antimony uptake systems in the protozoan parasite *Leishmania* and accumulation differences in antimony-resistant parasites. **Antimicrob Agents Chemother.** v 47. p 3073-3079. 2003.

CARVALHO, L. *et al.* Immune response mechanisms to infections. **Continuing Medical Education.** v. 79, p. 647–662. 2004.

CASTELLANO, L.R. *et al.* Th1/Th2 immune responses are associated with active cutaneous leishmaniasis **and** clinical cure is associated with strong interferongamma production. **Human immunology.** v. 70(6). p. 383-90, 2009.

CHAKRAVORTTY, D.; HENSEL, M. Inducible nitric oxide synthase and control of intracellular bacterial pathogens. **Microbes Infect.** v. 5. p. 621-627.2003.

CHAPPUIS, F., *et al.* Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? **Nature Reviews Microbiology,** v. 5, n. 11, p. 873-82, 2007.

CHAPPUIS, F.*et al.* Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? **Nature Reviews Microbiology,**p. 873 – 882.2007.

COLLELUORI, D. M., AND ASH, D. E. Classical and slow-binding inhibitors of human type II arginase. **Biochemistry,** v. 40, p. 9356–9362. 2001.

COLOTTI, G.; ILARI, A. Polyamine metabolism in *Leishmania*: From arginine to trypanothione. **Amino Acids,** v. 40, p. 269–285. 2011.

CONVIT, J.; LAPENTA, P. Sobre un caso de leishmaniasis diseminada. **Rev Pat Clin.** v 17. p. 153–8. 1946.

COSTA, J. M. L.*et al.* Modalidades clínicas, diagnóstico e abordagem terapêutica da leishmaniose tegumentar no brasil clinical. **Gazeta Médica Da Bahia,** v. 79, p. 70–83. 2009.

CUBA, C.A. *et al.* Parasitologic and immunologic diagnosis of American cutaneous leishmaniasis. **Pan American Sanitary Bureau,** v. 89, p. 195-208. 1980.

D'ANTONIO, E. L. *et al.* Crystal Structure of Arginase from *Leishmania mexicana* and Implications for the Inhibition of Polyamine Biosynthesis in Parasitic Infections. **Archives of Biochemistry and Biophysics,** v. 535(2), p. 163–176. 2014.

DA SILVA M.F.; FLOETER-WINTER, L.M. Arginase in leishmania. **Subcell Biochem.**v.74,p.103–17. 2014

DE ALMEIDA, MC. *et al.* Leishmanial Infection: Analysis of its First Steps. A Review. **Mem Inst Oswaldo Cruz,** v. 98, p.861–870. 2003.

DEDET, J. P., *et al.* Cutaneous leishmaniasis. The parasite. **Clinics in Dermatology**, v. 17, n. 3, p. 261-8, 1999.

DEL, V. J. *et al.* Visceral leishmaniasis: a One Health approach. **Veterinary Record**, p. 2014–2017. 2014.

DESJEUX, P. (N.D.). Leishmaniasis Public Health Aspects and Control. **Clinics in Dermatology**. v. 14(5), p. 417-23,1996.

DING, A. H., C. F. NATHAN, "Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages. Comparison of activating cytokines and evidence for independent production." **J Immunol**. v. 141(7). p. 2407-2412. 1988.

DO VALE ECS, FURTADO T. Tegumentary leishmaniasis in Brazil: a historical review related to the origin, expansion and etiology. **Anais Brasileiros de Dermatologia**. v 80: p.421-8. 2005.

DUGCA, H. J. The American leishmaniasis : some observations on their ecology and epidemiology. **Transactions of the royal.Society of tropical medicine and hygien**. 1983.

DUNN, J.R. W.A. Studies on the mechanisms of autophagy: maturation of the autophagic vacuole. **J. Cell Biol**, v. 110, p. 1935-1945,1990.

ESKELINEN, E.L. *et al.* Seeing is believing: the impact of electron microscopy on autophagy research. **Autophagy** v.7,p. 935–956, 2011.

FAIRLAMB, A.H.; CERAMI, A. Metabolism and functions of trypanothione in the Kinetoplastida. **Annual Review of Microbiology**. v. 46. p. 695–729. 1992.

FAIRLAMB, H.; CERAMI, A. Metabolism and functions of trypanothione in the kinetoplastida. **Annual Review of Microbiology**. v. 46, p. 695-729, 1992.

FATKINS, D. G., & ZHENG, W. Substituting N (epsilon)-thioacetyl-lysine for N(epsilon)-acetyl-lysine in peptide substrates as a general approach to inhibiting human NAD(+)-dependent protein deacetylases. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 9(1), p.1–11. 2008.

FRANCA-COSTA, J., *et al.* Arginase I, polyamine, and prostaglandin E2 pathways suppress the inflammatory response and contribute to diffuse cutaneous leishmaniasis. **Journal of Infectious Diseases**, v. 211, n. 3, p. 426-35, 2015.

FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE. **Informe técnico – introdução da vacina tetravalente**. Brasília: FUNASA; 2002.

FURTADO, T., AND J. B. F. VIEIRA. Geografia da leishmaniose tegumentar americana no Brasil. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 57, p. 135-140. 1982

- GARGANTA, C.L, AND BOND,J,S. **Anal. Biochem.**v. 154, p. 300-394. 1986.
- GAUR, U. An effect of parasite-encoded arginase on the outcome of murine cutaneous leishmaniasis. **The Journal of Immunology**, v. 179, n. 12, p. 8446-53, 2007.
- GENESTRA, M. *et al* .Comparative analysis of the nitric oxide production by *Leishmania* ssp . **Med Microbiol Immunol** v.192 p. 217-223, 2003.
- GIUDICE, A.*et al* . Resistance of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* and *Leishmania (Viannia) braziliensis* to nitric oxide correlates with disease severity in Tegumentary Leishmaniasis. **BioMedCentral**, v. 12, p. 1–12. 2007.
- GLISIC, S. *et al* . Arginase Flavonoid Anti-Leishmanial *in Silico* Inhibitors Flagged against Anti-Targets. **Journal Molecules**, v. 21(5), p. 589. 2016.
- GLISIC, S. *et al* . Arginase Flavonoid Anti-Leishmanial *in Silico* Inhibitors Flagged against Anti-Targets. **Molecules**,v. 21, p.589.2016
- GOGOI, M. *et al* . Dual role of arginine metabolism in establishing pathogenesis. Current Opinion in Microbiology, **Science Direct**. v. 29, p. 43–48. 2016.
- GOIS, L. L. *et al* . Decreased memory T-cell response and function in human immunodeficiency virus-infected patients with tegumentary leishmaniasis. **Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 109, p. 9–14. 2014.
- GOLDMAN-PINKOVICH, A.*et al* . An Arginine Deprivation Response Pathway Is Induced in *Leishmania* during Macrophage Invasion. **PLoS Pathog**, v. 12.2016.
- GORDON, S. Alternative activation of macrophages. **Nature reviews immunology**. v 3(1).
- GORELIK, L.; FLAVELL, RA. Transforming growth factor-[beta] in T-cell biology. **Nat Rev Immunol**.v. 2(1), p. 46-53. 2002.
- GREEN SJ, *et al* . Resistance to *Leishmania major* infection correlates with the induction of nitric oxide synthase in murine macrophages. **J Immunol**, v. 145, p.4290-4297. 1990.
- GREEN, L. C. *et al* . Analysis of nitrate, nitrite, and [15N nitrates] in biological fluids. **Analytical Biochemistry**, v. 126, p. 131-138, 1982.
- HEINZE, F.P. *et al* . Production of interferon gamma, interleukin 2, interleukin 4, and interleukin 10 by CD4+ lymphocytes *in vivo* during healing and progressive murine leishmaniasis. **Proc Natl Acad Sci U S A**. v. 88(16). p. 7011–7015. 1991.
- HERWALDT, B.L. Leishmaniasis. **The Lancet**.v. 354, p. 1191-1199, 1999.

- HESSE, M. *et al.* Differential regulation of nitric oxide synthase-2 and arginase-1 by type 1/type 2 cytokines *in vivo*: granulomatous pathology is shaped by the pattern of L-arginine metabolism. **J. Immunol.**, v.167, p. 6533-6544,2001.
- INIESTA, B. V., GÓMEZ-NIETO, L. C. e CORRALIZA, I. The Inhibition of Arginase by N (omega) -Hydroxy- L -Arginine Controls the Growth of Leishmania Inside Macrophages.**The Journal of Experimental Medicine**, v. 193, n. 6, p. 777-83, 2001.
- INIESTA, V., *et al.* Arginase I Induction during *Leishmania major* Infection Mediates the Development of Disease. **Infection and immunity**, v. 73, n. 9, p. 6085-90, 2005.
- INIESTA, V. *et al*, I. Arginase I induction in macrophages , triggered by Th2-type cytokines , supports the growth of intracellular Leishmania parasites, **Parasite Immunology**. p 113–118. 2002.
- ISNARD, A.; SHIO, M.T.; OLIVIER, M., Impact of Leishmania metalloprotease GP63 on macrophage signaling, **Front. Cell. Infect. Microbiol.** v. 2, p 72, 2012.
- JENKINSON, C. P., GRODY, W. W. and CEDERBAUM, S. D. Comparative properties of arginases. **Biochemistry and Molecular Biology of Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 114, n. 1, p. 107-32. 1996.
- JONES DE, CA. *et al.* Early Th1 response increased after infection by *Leishmania amazonensis* from mice deficient of interleukin-10 C57BL / 6 did not lead to resolution of infection. **Infect Immun**, v.70, p. 2151-2158. 2002
- KAPUSCINSKI, J., DARZYNKIEWICZ, Z. Condensation of nucleic acids by intercalating aromatic cations. **Proceedings of National Academy of Science**,v. 81, p 7368–7372. 1994.
- KAYE P, SCOTT P. Leishmaniasis: complexity at the host–pathogen interface. **Nature Reviews Microbiology**. v.9, p 604–615.2011.
- KHADEM VATAN, S.*et al.* *In silico* and *in vitro* comparative activity of green tea components against *Leishmania infantum*,**Journal of Global Antimicrobial Resistance**,v. 18, p. 187-194, 2019.
- KORNBERG H. Krebs and his trinity of cycles. **Nat Rev Mol Cell Biol**.v.1. p. 225–228.2000.
- KRISHNASWAMY NARAYANAN AND OWEN W. GRIFFITH. Synthesis of L-Thiocitrulline, L-Homothiocitrulline, and S-Methyl-L-thiocitrulline: A New Class of Potent Nitric Oxide Synthase Inhibitors. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 37 (7), p 885-887. 1994.
- KROPF, P., *et al.* Arginase and polyamine synthesis are key factors in the regulation of experimental leishmaniasis *in vivo*. **The FASEB Journal**, v. 19, n. 8, p. 1000-2, Jun 2005.

LAINSON, R., RYAN, L. and SHAW, J. J. Infective stages of *Leishmania* in the sandfly vector and some observations on the mechanism of transmission. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 82, n. 3, p. 421-4, Jul-Set, 1987.

LESSA, M. M. *et al.* Mucosal leishmaniasis: epidemiological and clinical aspects. **Brazilian Journal of Otorhinolaryngology**, v. 73, p; 843–847. 2007.

LIEW FY, LI. Y.; MILLOT, T.S. Tumor necrosis factor (TNF-alpha) in leishmaniasis. II. The leishmanicidal activity of macrophages induced by TNF-alpha is mediated by the nitric oxide of L-arginine. **Immunology**, v. 71, p. 556-559. 1990.

LIEW FY, WEI XQ, Proudfoot L. Cytokines and nitric oxide as effector molecules against parasitic infections. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci**. v. 352(1359). p. 1311-5. 1997.

LIEW, F. Y. "TH1 and TH2 cells: a historical perspective," **Nature Reviews: Immunology**, v. 2, n. 1, p. 55–60, 2002.

LIU, DONG, AND JUDE E UZONNA. "The early interaction of *Leishmania* with macrophages and dendritic cells and its influence on the host immune response." **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 2p. 83. 2012,

LOUIS, C.A. *et al.* Regulation of arginase isoforms I and II by IL-4 in cultured murine peritoneal macrophages. **American Journal of Physiology**, v. 276. p. 237–242.1999.

LSTNER, E. F. AND A. HEUPEL. "Inhibition of nitrite formation from hydroxylammoniumchloride: a simple assay for superoxide dismutase." **Anal Biochem** v. 70(2). p. 616-620. 1976.

LYNN, M.A.; MARR, A.K.; MCMASTER, W.R. Differential quantitative proteomic profiling of *Leishmania infantum* and *Leishmania mexicana* density gradient separated membranous fractions. **Journal of proteomics**. v. 82. p. 179–92. 2013.

MALKI-FELDMAN, L. and JAFFE, C. L. *Leishmania major*: effect of protein kinase A and phosphodiesterase activity on infectivity and proliferation of promastigotes. **Experimental Parasitology**, v. 123, n. 1, p. 39-44, Set 2009.

MANDAL, ABHISHEK *et al.* " Deprivation of L-Arginine Induces Oxidative Stress Mediated Apoptosis in *Leishmania donovani* Promastigotes: Contribution of the Polyamine Pathway", Ed. Kiyoshi Kita. **PLoS Doenças Tropicais Negligenciadas**. v. 10.1 2016.

MANUAL DE VIGILÂNCIA DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA. 2010. Disponível em: [http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/lta\\_casos08\\_09\\_11.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/lta_casos08_09_11.pdf) Acesso em 20 de janeiro de 2016.

MARSDEN, P.D. Mucosal leishmaniasis ("espundia" Escomel, 1911). **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**. v. 80(6), p. 859–76, 1986.

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

MONTE, R. L. *et al.* Morphological and physiological changes in Leishmania promastigotes induced by yangambin, a lignan obtained from *Ocotea duckei*. **Experimental Parasitology**, v. 127(1), p. 215–221. 2011.

MORATO, C. I. **Avaliação da modulação da infecção de macrófagos humanos com *Leishmania Viannia braziliensis* por leucotrienos.** Dissertação - Universidade Federal de Goiás. 2013.

MORIEARTY, P. L., *et al.* Borderline cutaneous leishmaniasis. Clinical, immunological and histological differences from mucocutaneous leishmaniasis. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 20, n. 1, p. 15-21, Jan-Fev 1978.

MORRIS, S.M., JR. Regulation of enzymes of the urea cycle and arginine metabolism. **Annu Rev Nutr** v.22, p. 87–105, 2002.

MOSIMANN, V. *et al.* Liposomal amphotericin B treatment of Old World cutaneous and mucosal leishmaniasis: A literature review. **Acta Tropica**, v. 182, 2018.

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

MUKBEL, R.M. *et al.* Macrophage killing of *Leishmania amazonensis* amastigotes requires both nitric oxide and superoxide. **Am J Trop Med Hyg.** v.76, n. 4, p.669-75, 2007.

MULEME, HM. *et al.* Infection with arginase-deficient *Leishmania major* reveals a parasite number-dependent and cytokine-independent regulation of host cellular arginase activity and disease pathogenesis. **J Immunol.**v.183, p.8068–76, 2009.

MÜLLER, I. *et al.* Age-related alteration of arginase activity impacts on severity of leishmaniasis. **PLoS Negl Trop Dis.** v.2(5), p.235, 2008.

MUNDER, M. Arginase: an emerging key player in the mammalian immune system. **British Journal of Pharmacological Sciences**, v. 158, n. 3, p. 638-51, 2009.

MUNDER, M., *et al.* Th1/Th2-regulated expression of arginase isoforms in murine macrophages and dendritic cells. **The Journal of Immunology**, v. 163, n. 7, p. 3771-7, Out 1999.

MUXEL, S.M. *et al.* Arginine and Polyamines Fate in Leishmania Infection. **Front Microbiol.**v.8, p.2682. 2018.



- MUXEL, S.M. *et al.* A *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis* induz a expressão de macrófagos miR-294 e miR-721 e modula a infecção visando o metabolismo de NOS2 e L-arginina. **Sci Rep**, v. 7. 2017.
- NADERER, T. AND MCCONVILLE, M. J., The *Leishmania*–macrophage interaction: a metabolic perspective. **Cellular Microbiology**, v. 10, p. 301–308. 2008.
- NANDAN, D.; DE OLIVEIRA, C. C.; MOEENREZAKHANLOU, A., “Myeloid cell IL-10 production in response to *Leishmania* involves inactivation of glycogen synthase kinase-3 $\beta$  downstream of phosphatidylinositol-3 kinase,” **Journal of Immunology**, v. 188, n. 1, p. 367–378, 2012.
- NATERA, S. *et al.* *Leishmania* spp: proficiency of drug-resistant parasites. **The International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 29, p. 637–42. 2007.
- NEGRÃO, G. N. *et al.* Considerations about leishmaniasis tegumentary american and your expansion in brazilian territory. **Revista Percurso - NEMO**, p. 147–168. 2010.
- NEVES, D.P. *Parasitologia Humana*. São Paulo: Atheneu, v. 11, 2005.
- NIETO-MENESES, R. *et al.* *In vitro* activity of new N-benzyl-1H-benzimidazol-2-amine derivatives against cutaneous, mucocutaneous and visceral *Leishmania* species, **Experimental Parasitology**, v. 184, p. 82-89, 2018.
- NOVAES, R.D. *et al.* Parasite control and skeletal myositis in *Trypanosoma cruzi* infected and exercised rats. **Acta Trop**, v. 170, p. 8-15, 2017.
- OUELLETTE, M.; DRUMMELSMITH, J.; PAPADOPOULOU, B. Leishmaniasis: drugs in the clinic, resistance and new developments. **Drug Resist Updat.**, v. 7, p. 257-266, 2004.
- OUELLETTE, M. *et al.* ABC transporters: biochemical, cellular, and molecular aspects. In: Ambudkar SV, Gottesman MM, editors. *Methods enzymology*. **San Diego: Academic Press**, v. 1998a. p. 1668-1679, 2011.
- OZA, S. L. *et al.* Trypanothione biosynthesis in *Leishmania major*. **Mol. Biochem. Parasitol.** v.139, p. 107–116. 2004.
- PACE, D. Leishmaniasis. **Journal of Infection**, v. 69, p. S10-S18, 2014.
- PALMER, E.M. *et al.* IL-12 decreases activation induced cell death in human naive Th cells costimulated by intercellular adhesion molecule-1. I. IL-12 alters caspase processing and inhibits enzyme function. **J Immunol.** v. 167(2), p. 749-58. 2001.
- PEGG, A. E. and MCCANN, P. P. Polyamine metabolism and function. **American Journal of Physiology**, v. 243, n.5, p. C212-21, 1982.

- PEGG, A. E. Mammalian polyamine metabolism and function. **IUBMB Life**, v. 61, n.9, p. 880-94, 2009.
- POREMBSKA, Z. *et al.* Arginase isoforms in human colorectal cancer. **Clinica Chimica Acta**, v. 305, p. 157–165. 2001.
- RATH, S. *et al.* Antimoniais empregados no tratamento da leishmaniose: estado da arte. **Revista Química Nova**, v. 26, p.550–555. 2003.
- READY, P. D. Biology of phlebotomine sand flies as vectors of disease agents. **Annu Rev Entomol**, v.58, p. 227-250, 2013.
- REBÊLO, J. M. M. *et al.* Flebótomos (Diptera, Phlebotominae) da Ilha de São Luís, zona do golfão maranhense. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. Trop, v. 32, p. 247-253. 1999.
- REGUERA *et al.* Leishmania major lacking arginase (ARG) are auxotrophic for polyamines but retain infectivity to susceptible BALB/c mice. **Mol Biochem Parasitol**, v. 165(1), p.48-56. , 2009.
- REIS, L. D. C. *et al.* Mecanismos imunológicos na resposta celular e humoral na leishmaniose tegumentar americana. **Revista de patologia tropical**, v. 35, p. 103–115. 2006.
- REIS, L. DE C. **Caracterização da resposta imune celular em portadores de leishmaniose tegumentar americana antes e após tratamento quimioterápico.** Dissertação - Fundação Oswaldo Cruz Centro De Pesquisas AGGEU Magalhães. 2007.
- REITHINGER, R. *et al.* Cutaneous leishmaniasis. **The Lancet**. v. 7, 2007. Disponível em: <http://infection.thelancet.com>. Acesso em 13 de janeiro de 2016.
- RIBBLE, D. *et al.* A simple technique for quantifying apoptosis in 96-well plates. **BMC Biotechnol**, v.5:12. 2005.
- RIBBLE, D., *et al.* A simple technique for quantifying apoptosis in 96-well plates. **BMC biotechnology**, v. 5, p. 12, 2005.
- ROBERTS, S.C.*et al.* Arginase plays a pivotal role in polyamine precursor metabolism in Leishmania. Characterization of gene deletion mutants. **J Biol Chem**. v.279, p. 23668–78. 2004.
- RODRIGUES, J.P.F. *et al.* mansonii-T. cruzi co-infection modulates arginase-1/iNOS expression, liver and heart disease in mice. **Nitric Oxide**, v. 66, p. 43-52,2017.
- RODRIGUEZ, N. E. AND WILSON, M. E. “Eosinophils and mast cells in leishmaniasis,” **Immunologic Research**, v. 59, n. 1–3, p. 129–141, 2014.

- ROSENZWEIG, D. *et al.* RETOOLING Leishmania metabolism: from sandfly gut to human macrophage. **FASEB Journal**. v 22. p 590–602. 2008.
- SACKS, D.; NOBEN-TRAUTH, N. The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice. **Nat Rev Immunol**. v. 2(11), p. 845-58.
- SAHA, P.; MUKHOPADHYAY, D.; CHATTERJEE, M. Immunomodulation by hemotherapeutic agents against Leishmaniasis, **International Immunopharmacology**, v. 11,p. 1668–79, 2011.
- SAMPAIO, R.N.R. *et al.* Leishmaniose tegumentar americana. Casuística do Hospital Escola da universidade do Brasil. **Anais Brasileiros de Dermatologia**. v. 55, p. 69-76. 1980.
- SCHOENBORN, J.R.; WILSON, C.B. Regulation of interferon-gamma during innate and adaptive immune responses. **Adv Immunol**.v. 96. p 41-101. 2007.
- SCHWEICHEL, J-U.; MERKER, H-J. The morphology of various types of cell death in prenatal tissues. **Teratology**.v. 7, p.253–266, 1973.
- SCOTT, P. *et al.* 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**. v. 168(5). p. 1675–1684. 1988.
- SEBASTIA, C. *et al.* A cellular and molecular review. **Immunobiology**, v. 210,p. 121–126. 2005.
- SÉGUIN, O.; DESCOTEAUX, A. Leishmania, the phagosome, and host responses: The journey of a parasite. **Cell Immunol**,v. 309, p. 1–6, 2016.
- SHOWLER, A.J.; BOGGILD, A.K. Cutaneous leishmaniasis in travellers: a focus on epidemiology and treatment in 2015. **Curr Infect Dis Rep**. v.17(7), p.489. 2015
- SHWEASH, M. *et al.* *Leishmania mexicana* promastigotes inhibit macrophage IL-12 production via TLR-4 dependent COX-2 , iNOS and arginase-1 expression. **Molecular Immunology**, v. 48(15-16), p. 1800–1808. . 2011.
- SICA, A. and BRONTE, V. Altered macrophage differentiation and immune dysfunction in tumor development. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 117, n. 5, p. 1155-66, Mai 2007.
- SICA, A. and MANTOVANI, A. Macrophage plasticity and polarization: *in vivo* veritas. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 122, n. 3, p. 787-95, 2012.
- SILVA, M. (2010). **The relationship between the cellular location of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* arginase and its role during murine macrophage infection**, p. 1–36. Disponível em: [www.teses.usp.br/teses/disponiveis/41/41135/.../Tese\\_versaoCompleta.pdf](http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/41/41135/.../Tese_versaoCompleta.pdf). Acesso em 20 de janeiro de 2016.

SILVEIRA, F. T., LAINSON, R. and CORBETT, C. E. Clinical and immunopathological spectrum of American cutaneous leishmaniasis with special reference to the disease in Amazonian Brazil: a review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 99, n. 3, p. 239-51, 2004.

SILVEIRA, F. T. *et al.* Review of the pathogenesis of the american tegumentary leishmaniasis in amazonian, with emphasis to the disease due to leishmania (v.) *Braziliensis* and leishmania. **Revista Paraense de Medicina**, v. 22, p. 9–20. 2008.

SILVEIRA, F.T.; LAINSON, R.; CORBETT, CEP. Clinical and immunopathological spectrum of American cutaneous leishmaniasis with special reference to the disease in the Brazilian Amazon - A review. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 99, p. 239-251. 2004.

SILVEIRA, F.T. *et al.* Competências imunopatogênicas de *Leishmania (V.) braziliensis* e *L. (L.) amazonensis* na leishmaniose tegumentar americana. **Parasite Immunol.** v. 31,p. 423-431,2009.

SINGH, S. and SIVAKUMAR, R. Challenges and new discoveries in the treatment of leishmaniasis. **The Journal of Infection and Chemotherapy**, v. 10, n. 6, p. 307-15, 2004.

SMORENBURG, C. , *et al.* Phase II study of miltefosine 6% solution as topical treatment of skin metastases in breast cancer patients.**Anti Canc. Drugs.** v.11. p. 825 – 828. 2000.

SOARES-BEZERRA, R.J.; LEON, L.; GENSTRA, M. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.40, p.139-149, 2004.

STEMPIN, C. C. *et al.* Arginase in Parasitic Infections: Macrophage Activation , Immunosuppression , and Intracellular Signals. **Journal of Biomedicine and Biotechnology.** 2010.

STEVANOVIC, S. *et al.* Synthesis, *In Silico*, and *In Vitro* Evaluation of Anti-Leishmanial Activity of Oxadiazoles and Indolizine Containing Compounds Flagged against Anti-Targets. **Molecules.** v.24, p.1282. 2019.

STEVERDING,D. he history of leishmaniasis **Parasit Vectors**, v. 10, p. 82, 2017.

STUEHR, D.J. *et al.* N omega-hydroxy-L-arginine is an intermediate in the biosynthesis of nitric oxide from L-arginine. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 266: p. 6259–63. 1991.

SUNDAR, S. & RAI, M. Advances in the treatment of leishmaniasis. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 15, p. 593–8. 2002.

SUNDAR, S.; CHAKRAVARTY, J. Anfotericina B Lipossomal e Leishmaniose: Dose e Resposta. **Jornal de Doenças Infeciosas global.** v 2 (2). p 159-166. 2010.

SUNDAR, S. *et al.* Oral miltefosine for the treatment of Indian visceral leishmaniasis. **Trans R Soc Trop Med Hyg.** v. 100. p. S26-33. 2006.

- TERESA C. *et al.* NF- $\kappa$ B-mediated repression of iNOS expression in *Leishmania amazonensis* macrophage infection, **Immunology Letters**, v. 127, p. 19-26, 2009.
- TIUMAN, T. S., SANTOS, A. O., DIAS, B. P., & NAKAMURA, C. V. Recent advances in leishmaniasis treatment. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 15. 2011.
- TOMIOTTO-PELLISSIER, F. *et al.* Macrophage polarization in Leishmaniasis: broadening horizons. **Front. Immunol.** v. 9, p.2529. 2018.
- TRACY, J.W.; WEBSTER, J.R. L.T. Drugs used in the chemotherapy of protozoal infections: amebiasis, trichomoniasis, trypanosomiasis, leishmaniasis, and other protozoal infections. In: Hardman JG, Limbird LE, Gilman AG, editors. **Goodman and Gilman's the pharmacological basis of therapeutics**. 10th ed. New York: McGraw-Hill, p. 1097-113. 2001.
- VALE, E.C.S.; FURTADO, T. Leishmaniose tegumentar no Brasil: revisão histórica da origem, expansão e etiologia. **An. Bras. Dermatol.**, v. 80, n. 4, p. 421-428, 2005.
- VAN ASSCHE, T. *et al.* "Leishmania-macrophage interactions: insights into the redox biology." **Free Radic Biol Med.** v. 51(2). p. 337-351. 2011.
- VAN MEERLOO, J.; KASPERS, G. J. and CLOOS, J. Cell sensitivity assays: the MTT assay. **Methods in Molecular Biology**, v. 731, p. 237-45, 2011.
- VANNIER-SANTOS, M.A. *et al.* The putrescine analogue 1,4-diamino-2-butanone affects polyamine synthesis, transport, ultrastructure and intracellular survival in *Leishmania amazonensis*. **Microbiology**, v.154, p. 3104–3111, 2008.
- VERCELLI, D. Arginase : marker , effector , or candidate gene for asthma ?. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 111, p. 1815–1817. 2003.
- VICKERMAN, K.; PRESTON, T.M. Comparative cell biology of the kinetoplastid flagellates. In WHR Lumsden, DA Evans (eds), **Biology of the Kinetoplastida**, Academic Press, London/New York/San Francisco, p. 35-130. 1976.
- VINCENDEAU, P. *et al.* Arginases in parasitic diseases. **TRENDS in Parasitology**, v. 19, p. 9–12. 2003.
- VINCENDEAU, P.; GOBERT, A.P.; DAULOUEDE, S. *et al.* Arginases in parasitic diseases. **Trends Parasitol**, v. 19, p. 9–12. 2003.
- WALTERS, L. L., *et al.* Ultrastructural biology of *Leishmania (Viannia) panamensis* (*Leishmania braziliensis panamensis*) in *Lutzomyia gomezi* (Diptera: Psychodidae): a natural host-parasite association. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 40, n. 1, p. 19-39, Jan 1989.
- WERBOVETZ, K. Diamidines as antitrypanosomal, antileishmanial and antimalarial agents. **Curr Opin Investig Drugs**, v. 7, n. 2, p. 147-57, Feb 2006.

World Health Organization, 2017. Leishmaniasis. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/en/>. Acesso em: 21 ago. 2018.

World Health Organization, 2018. Leishmaniasis. Disponível em: [https://www.who.int/gho/neglected\\_diseases/leishmaniasis/en/](https://www.who.int/gho/neglected_diseases/leishmaniasis/en/) Acesso em: 14 out. 10.2019.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **World Alliance for Patient Safety – Forward Programme. Geneva, 2009.** Disponível em: World Health Organization/Department of Control of Neglected Tropical Diseases. **Global leishmaniasis update, 2006–2015: a turning point in leishmaniasis surveillance.**

XU W, ZHAO X, DAHA MR, VAN KOOTEN C. Reversible differentiation of pro- and anti-inflammatory macrophages. *Mol Immunol.* v.53,p.179–86. 2013.