



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ - FIOCRUZ
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ**



FIOCRUZ

Curso de Pós-graduação em Patologia Humana

TESE DE DOUTORADO

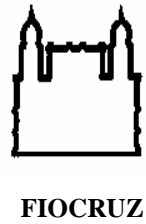
**ASPECTOS IMUNOPATOGÊNICOS DA
LEISHMANIOSE CUTÂNEA DIFUSA:
FATORES DA LEISHMANIA E DO HOSPEDERO**

JAQUELINE FRANÇA COSTA

**Salvador – Bahia – Brasil
2013**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ - FIOCRUZ
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ**



Curso de Pós-graduação em Patologia Humana

**ASPECTOS IMUNOPATOGÊNICOS
DA LEISHMANIOSE CUTÂNEA DIFUSA:
FATORES DA LEISHMANIA E DO HOSPEDERO**

JAQUELINE FRANÇA COSTA

Orientador: Valéria de Matos Borges

Tese apresentada ao Colegiado do Curso de Pós-graduação em Patologia Humana, como pré-requisito obrigatório para obtenção do grau Doutor.

Salvador – Bahia – Brasil
2013

À Norma e Cordeiro,
que em nenhum momento mediram esforços para
realização dos meus sonhos, que me guiaram pelos
caminhos corretos, me ensinaram a fazer as melhores
escolhas, me mostraram que a honestidade e o respeito
são essenciais à vida, e que devemos sempre lutar pelo
que queremos. A eles devo a pessoa que me tornei e
tenho muito orgulho por chamá-los de pai e mãe.

AGRADECIMENTOS

À Deus, meu refúgio e força, onde sempre encontrei respostas para os meus problemas.

À Dra Valéria Borges, minha orientadora, pelos conhecimentos transmitidos, pelas críticas construtivas, pelo incentivo e paciência para com as minhas dificuldades e principalmente pelo exemplo de amor, simplicidade, humildade e respeito para com o próximo.

À Dra Aldina Barral e Dr. Manoel Barral-Netto pelas sugestões dadas ao longo do desenvolvimento deste trabalho.

Ao Dr. Jackson Costa, pelo acompanhamento dos pacientes com Leishmaniose cutânea difusa e pela colaboração com os dados clínicos dos pacientes.

Ao grupo PS, Dr. Marcello Barcinski, Jéssica, Poliana e especialmente João Luiz pela colaboração e apoio inestimáveis para a realização deste trabalho.

Aos meus colegas de equipe: Théo, Nívea, Hayna e Deboraci pelos momentos de aprendizagem constante e pela amizade solidificada ao longo deste trabalho, que certamente se eternizará.

As minhas tias, Dalva e Nilzete, pela amizade, incentivo e apoio em todos os momentos de minha vida.

À família Petersen, Antonio, Carol e Dora por terem me acolhido durante a fase mais difícil dessa caminhada.

Aos meus amigos, Denise, Chico, Ana Paula, Brena, Nivaldo, Helbert e André por terem sido muitas vezes o motivo dos risos e o consolo do choro.

Aos colegas LIMI-LIP, em especial pela alegria e descontração que tornaram o ambiente de trabalho mais prazeroso.

Aos colegas do Curso de Mestrado em Patologia Experimental, pela cooperação mútua e amizade.

Aos professores da pós-graduação em patologia pela dedicação e empenho que demonstraram no decorrer de suas atividades para com o grupo.

Às secretárias do LIMI-LIP: Elze e Andrezza, pelo apoio administrativo, pela simpatia e amizade.

Aos Técnicos do laboratório, Jorge Tolentino e Natali pelo suporte no laboratório, sem o qual a parte experimental não funcionaria.

Ao Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz (CPqGM)/FIOCRUZ-BA, onde este trabalho foi realizado, pela disponibilização de recursos e infra-estrutura.

Ao CNPq e a CAPES pelo suporte financeiro para a realização deste trabalho.

À todos aqueles que contribuíram direta ou indiretamente para que conseguisse chegar até aqui e finalizar mais uma etapa de minha vida.

SUMÁRIO

RESUMO.....	VI
ABSTRACT	VII
LISTA DE ABREVIATURAS.....	VIII
LISTA DE FIGURAS.....	IX
1. INTRODUÇÃO.....	10
1.1 Características gerais e ciclo da Leishmania.....	10
1.2 Dados epidemiológicos e clínicos da Leishmaniose Tegumentar Americana	13
1.3 Leishmaniose Cutânea Difusa.....	15
1.4 Modelos de susceptibilidade e resistência à Leishmaniose.....	18
1.5 Respostas intramacrofágica à infecção por Leishmania	20
1.6 Regulação da resposta inflamatória na infecção por Leishmania	23
1.6.1 A via de ativação da arginase e inflamação	23
1.6.1.1 Arginase e a regulação da infecção por Leishmania	25
1.6.2 Mediadores lipídicos	27
1.6.3 Apoptose e parasitismo.....	29
1.6.3.1 Fenótipo apoptótico.....	29
1.6.3.2 Perda da assimetria de membrana durante a apoptose	30
1.6.3.3 Reconhecimento de fosfatidilserina	32
1.6.3.4 Consequências do reconhecimento de células apoptóticas	35
1.6.3.5 Mimetismo Apoptótico	36
2. JUSTIFICATIVA	40
3. PARTE I.....	41
3.1 HIPÓTESE	41
3.2 OBJETIVOS.....	41
Geral.....	41
Específicos.....	41

4. MANUSCRITOS

4.1 MANUSCRITO I	42
4.2 MANUSCRITO II	48
4.3 MANUSCRITO III.....	59
5. PARTE II.....	67
5.1 HIPÓTESE	67
5.2 OBJETIVOS.....	67
Geral	67
Específicos	67
5.3 MANUSCRITO IV	68
6. DISCUSSÃO	99
7. CONCLUSÕES	117
8. REFERÊNCIA BILIOGRÁFICA	118
9. ANEXOS	135

RESUMO

FRANÇA-COSTA, JAQUELINE. ASPECTOS IMUNOPATOGÊNICOS DA LEISHMANIOSE CUTÂNEA DIFUSA: FATORES DA LEISHMANIA E DO HOSPEDEIRO. Tese de Doutorado. Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Salvador, Bahia, 2013.

A progressão crônica da LCD é atribuída à falta da imunidade mediada por células específica para antígeno de *Leishmania* e predominância de uma resposta do tipo Th2. Neste sentido, tanto fatores do parasita quanto do hospedeiro podem atuar na desativação da resposta imune favorecendo a replicação da *Leishmania*. Inicialmente avaliamos o papel da exposição de fosfatidilserina na infecção de macrófagos murinos com *Leishmania amazonensis* isolados de pacientes com LCD. Para isso, macrófagos peritoneais de camundongos F1(BALB/c x C57BL/6) foram infectados com os diferentes isolados obtidos de pacientes com LCD e LCL. Os isolados obtidos de pacientes com LCD apresentaram maior expressão de PS do que os isolados de pacientes com LCL após 24 horas de infecção. Em seguida, avaliamos a infectividade dos diferentes isolados. As amastigotas de pacientes com LCD apresentaram maior porcentagem de macrófagos infectados e índice de infecção, quando comparados com amastigotas de pacientes com LCL. Quanto ao mecanismo, o grupo infectado com os isolados de pacientes com LCD apresentou um aumento na relação TGF- β /TNF- α e IL-10/TNF- α em relação ao grupo LCL. A análise de correlação revelou que a porcentagem de macrófagos infectados, o índice de infecção, os índices de TGF- β /TNF- α e IL-10/TNF- α , bem como o tamanho dos vacúolos estão diretamente associados a maior exposição de PS. Além disso, o número de lesões e o tempo de doença dos pacientes com LCD também estão associados à exposição de PS. O reconhecimento de PS tem como consequência a produção de TGF, IL-10, IL-4 e PGE2, que ativam a via da enzima arginase e consequentemente a produção de poliaminas. Por isso buscamos investigar a participação de tais mediadores em pacientes com LCD. Os níveis da arginase I, ODC e TGF- β no plasma de pacientes com LCD estava elevados quando comparado com os pacientes com LCL ou o controle saudável da área endêmica. Por outro lado, os níveis de TNF- α , IL-12, MCP-1 e CXCL-10 estavam reduzidos no plasma de pacientes com LCD comparado aos pacientes com LCL. Os níveis de arginase apresentaram correlação positiva com ODC, TGF- β e PGE e correlação negativa com TNF- α , IL-12, MCP-1 e CXCL-10. A produção da arginase e ODC também foi avaliada nas lesões dos pacientes através de imunohistoquímica. As lesões dos pacientes com LCD apresentaram uma marcação mais intensa e difusa do que as de LCL. Além disso, a expressão da cicloxigenase 2 também estava aumentada nas lesões de LCD. A expressão do mRNA das enzimas fosfolipase A2, COX-2, prostaglandina sintase, espermina e espermidina sintase apresentaram uma relação positiva com a enzima arginase, indicando que esta interfere diretamente no metabolismo dos mediadores lipídicos e na via de síntese das poliaminas. A inibição das enzimas arginase e ODC com nor-NOHA e DFMO, respectivamente, reduziu a carga parasitária de macrófagos humanos infectados com *L. amazonensis* após 72 h de infecção. Além disso, os inibidores reduziram a produção de TGF e PGE2 no sobrenadante das culturas. Em conjunto, nossos dados sugerem que a liberação local e sistêmica de prostaglandinas

e poliaminas associadas à via da arginase em pacientes com LCD deve estar associada com a inabilidade em montar uma resposta imune eficiente contra a infecção por *Leishmania* proporcionando um ambiente favorável para a replicação do parasita e disseminação da doença. Nossos resultados mostram também que este ambiente imunossuprimido pode ser induzido pela exposição de PS na superfície de *L. amazonensis* deflagrando uma resposta anti-inflamatória nos pacientes com LCD.

Palavras-Chave: Leishmaniose cutânea difusa, *Leishmania amazonensis*, Fosfatidilserina; Prostaglandina E₂; Arginase, Poliaminas, macrófagos.

ABSTRACT

FRANÇA-COSTA, JAQUELINE. IMMUNOPATHOGENICS ASPECTS OF DIFFUSE CUTANEOUS LEISHMANIASIS: LEISHMANIA AND HOST FACTORS. PhD Thesis – Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Salvador, Bahia, 2013.

The chronic progression of DCL is attributed to the lack of specific cell-mediated immunity to *Leishmania* antigen and predominance of a Th2-type response. In this sense, both factors of the parasite and the host can act in the deactivation of immune response, favoring parasite replication. Initially we evaluate the role of phosphatidylserine exposure in murine macrophages infected with *L. amazonensis* isolated from patients with DCL. First, peritoneal macrophages of mice F1 (BALB/c x C57BL/6) were infected with different isolates from patients with DCL and LCL. The DCL isolates showed higher PS expression than the LCL isolates after 24 hours of infection. The DCL-amastigotes patients showed a higher percentage of infected macrophages and the infectivity index when compared with patients with LCL- amastigotes. Regarding the mechanism, the group infected with isolates from patients with LCD showed an increase in TGF/TNF and IL-10/TNF when compared with LCL group. Correlation analysis revealed that the percentage of infected macrophages, the infectivity index, the rate of TGF/TNF and IL-10/TNF as well as the size of the vacuoles are directly associated with higher PS exposure. Moreover, the number of lesions and disease duration of DCL patients are also associated with PS exposure. Recognition of PS results in the production of TGF, IL-10, IL-4 and PGE₂, molecules with anti-inflammatory role that activate the enzyme arginase and consequently the polyamines production. Therefore, we investigated the involvement of these mediators in patients with DCL. The plasma of DCL patients showed high levels of arginase, ODC and TGF compared to the LCL patients or healthy control from endemic area. On the other hand, the levels of TNF, IL-12, MCP-1 and CXCL-10 were reduced in the DCL patients plasma compared to patients with LCL. Arginase levels were positively correlated with ODC, TGF and PGE and negatively correlated with TNF, IL-12, MCP-1 and CXCL-10. The production of arginase and ODC was also evaluated in the lesions of patients by immunohistochemistry. The DCL lesions showed a more intense and diffuse staining than LCL lesions. Furthermore, the expression of cyclooxygenase-2 was also increased in lesions of DCL. The mRNA expression of the enzymes phospholipase A₂, COX-2, prostaglandin synthase, spermine synthase and spermidine synthase showed a positive relationship with the arginase enzyme, indicating that it directly interferes with the metabolism of lipid mediators and in synthesis of polyamines. The inhibition of the enzyme arginase and ODC with nor-NOHA and DFMO, respectively, reduced the parasite load of *L. amazonensis* human infected macrophages 72 h after infection. Moreover, NOHA and DFMO reduced TGF and PGE₂ production in the supernatant of cultures. Together, local and systemic release of prostaglandins, arginase and polyamines pathways in DCL should be associated with the inability of these patients

to mount effective immune response against infection by *Leishmania* providing a favorable environment for replication and spread of the parasite disease. Our results also show that this immunosuppressed environment can be induced by PS exposure on the *L. amazonensis* surface triggering anti-inflammatory response in DCL patients.

Key Words: Diffuse Cutaneous Leishmaniasis, *Leishmania amazonensis*, Phosphatidylserine, Prostaglandin E₂, Arginase, Polyamines, Macrophages.

LISTA DE ABREVIATURAS

AA	Ácido aracdônico
COX	Ciclooxigenase
DNA	Ácido desoxirribonucléico
ΔMFI	Diferença entre as médias geométricas de intensidade de fluorescência
FcγR	Receptor da porção constante de anticorpos IgG
FITC	Fluoresceína
IFN-γ	Interferon gama
IDRM	Reação Intradérmica de Montenegro
IL	Interleucina
iNOS	Inducible Nitric Oxide Synthase
LPS	Lipopolissacarídeo
LCD	Leishmaniose Cutânea Difusa
LCL	Leishmaniose Cutânea Localizada
LCM	Leishmaniose Cutânea Mucosa
LTA	Leishmaniose Tegumentar Americana
MCP	Morte Celular Programada
MHC	Complexo de Histocompatibilidade Principal
MIP	Macrophage Inflammatory protein
NO	Óxido Nítrico
Nramp	Natural resistance-associated Macrophage protein
PBMC	Células mononucleares de sangue periférico
PGE	Prostaglandina E
PC	Fosfatidilcolina
PE	Fosfatidiletanolamina

PI	Iodeto de propídio
PLA	Fosfolipase
PS	Fosfatidilserina
PSpos	Promastigotas que apresentam PS em sua superfície
PSneg	Promastigotas que não apresentam PS em sua superfície
SFB	Soro Fetal Bovino
SM	Esfingomiéline
TGF- β	Fator de crescimento tumoral
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral
VP	Vacúolo parasitóforo

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. CICLO DE VIDA DO PARASITA11

**FIGURA 2. PRINCIPAIS ESPÉCIES DE LEISHMANIA E ASPECTOS
IMUNOLÓGICOS OBSERVADOS NA LTA..... 14**

**FIGURA 3. DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA DA LEISHMANIOSE CUTÂNEA
DIFUSA NO BRASIL 15**

**FIGURA 4. MIMETISMO APOPTÓTICO EM AMASTIGOTAS DE
LEISHMANIA AMAZONENSIS37**

1 INTRODUÇÃO

1.1 Características Gerais e Ciclo da *Leishmania*

Os protozoários do gênero *Leishmania* são parasitas flagelados pertencentes à ordem Kinetoplastidae e a família Trypanosomatidae. Estes protozoários caracterizam-se pela presença de uma estrutura denominada cinetoplasto, formada de minicírculos e maxicírculos de ácido desoxirribonucléico (DNA) altamente compactado dentro da mitocôndria única da célula (STUART, 1983).

Existem aproximadamente 21 espécies de Leishmanias agrupadas em dois grandes subgêneros: *Leishmania* e *Viannia* (LAINSON; SHAW; SILVEIRA, 1987; YURCHENKO; KOLESNIKOV; LUKES, 2000). As espécies também podem ser classificadas de acordo com a distribuição geográfica das áreas endêmicas como espécies do Velho Mundo (Europa e Ásia) e do Novo Mundo (Américas). Com relação aos vetores, o gênero *Lutzomyia* está associado à transmissão de espécies de *Leishmania* do Novo Mundo (GIL et al., 2003), enquanto que o gênero *Phlebotomos*, transmite espécies do Velho Mundo (LAINSON; RYAN; SHAW, 1987).

Durante o seu ciclo de vida, o parasita apresenta duas formas evolutivas: promastigotas, presentes em insetos vetores e amastigotas intracelulares, encontradas em hospedeiros vertebrados (Figura 1). As formas promastigotas são transmitidas por fêmeas de insetos hematófagos da subfamília Phlebotominae (Díptera, Psychodidae), denominados genericamente de flebótomos. A infecção do inseto ocorre no momento da alimentação, quando ele suga o sangue contendo amastigotas ou macrófagos infectados. No trato digestivo do vetor, ocorre rompimento da membrana dos macrófagos e as amastigotas liberadas diferenciam-se na forma promastigota. Estas formas são afiladas, apresentam flagelo externalizados e são capazes de se multiplicar no intestino do vetor.

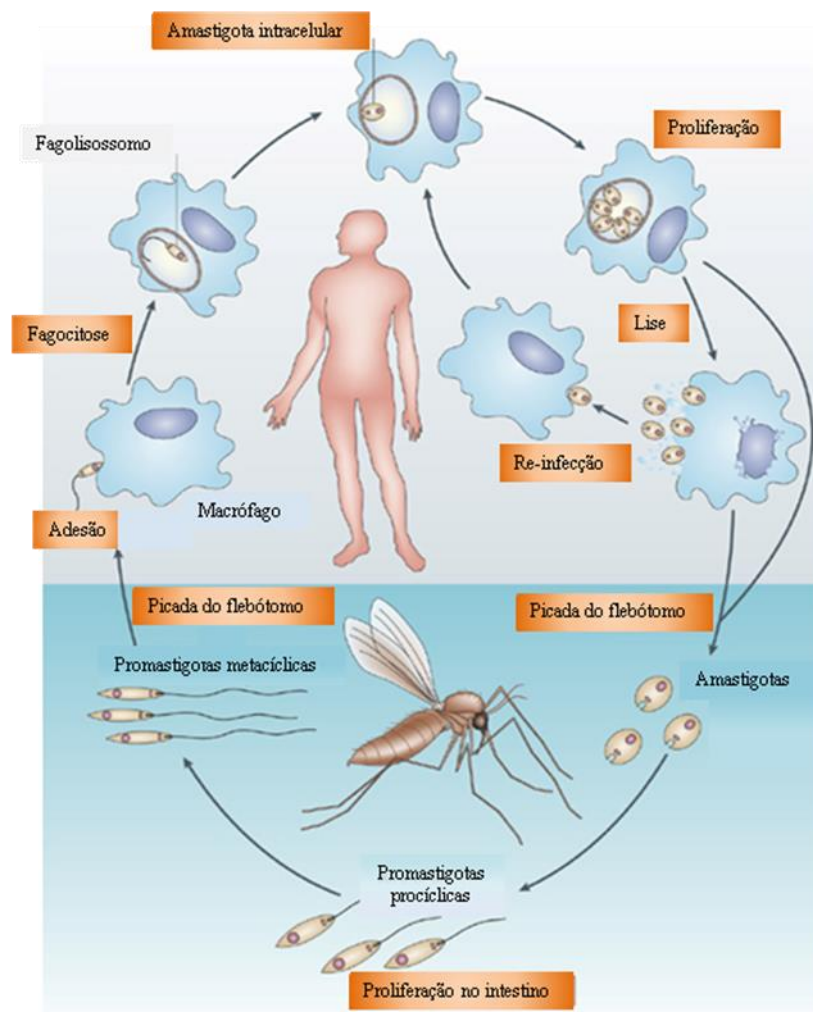


Figura 1. Ciclo de vida do parasita. (Modificado de Chappuis *et al.*, 2007).

Após a digestão do sangue, as promastigotas migram para a região anterior do inseto e sofrem um processo de diferenciação, denominado metaciclogênese (SACKS; PERKINS, 1984). Durante a metaciclogênese, as promastigotas apresentam redução de tamanho do corpo celular, tornam-se extremamente móveis e altamente infectivas, passando a ser denominadas de metacíclicas. As formas metacíclicas colonizam a glândula salivar do inseto e são transferidas ao hospedeiro vertebrado no momento da picada, durante um novo repasto sanguíneo. No local da picada, as formas metacíclicas são fagocitadas por células do sistema fagocítico mononuclear presentes na derme. No interior dos fagossomas, as formas promastigotas se diferenciam em amastigotas, células arredondadas e com flagelo contido na bolsa flagelar. Este período de diferenciação pode levar de 2 a 5 dias (COURRET *et al.*, 2002). Os fagossomas que contêm o parasita fundem-se com vesículas endocíticas e com lisossomas. As amastigotas são resistentes às enzimas e ao pH ácido do fagolisossoma, conseguindo se multiplicar no interior de vacúolos parasitóforos. Após diversas multiplicações, os macrófagos ficam superinfectados e rompem-se, liberando as amastigotas que são rapidamente fagocitadas por novos macrófagos, estabelecendo e disseminando a infecção (ALEXANDER; RUSSELL, 1992).

Embora os macrófagos sejam as células hospedeiras definitivas, neutrófilos também tem merecido destaque no ciclo biológico da *Leishmania*. Estas células são as primeiras a serem recrutadas para o local da picada, fagocitando os parasitas (PETERS *et al.*, 2008). Como os neutrófilos tem um ciclo de vida curto, entram em apoptose em

torno de 2-4 dias e são fagocitados por macrófagos (SAVILL; HASLETT, 1995) 1995). Assim os neutrófilos podem fornecer um abrigo seguro transitório para a *Leishmania*, antes da sua entrada em macrófagos, onde eles vão replicar. De fato, tem sido descrito que a *Leishmania* entra no macrófago através de um mecanismo conhecido como “Cavalo de Tróia”, onde neutrófilos apoptóticos infectados são fagocitados por macrófagos (LASKAY; VAN ZANDBERGEN; SOLBACH, 2008). Em um segundo mecanismo de evasão, conhecido como “Coelho de Tróia”, a *Leishmania* usa o neutrófilo como abrigo transitório, escapando do neutrófilo morto para infectar os macrófagos (RITTER; FRISCHKNECHT; VAN ZANDBERGEN, 2009).

1.2 Dados epidemiológicos e clínicos da Leishmaniose Tegumentar Americana

A leishmaniose é um problema grave de saúde pública, sendo incluída entre as seis mais importantes endemia do mundo. Estimativas da própria OMS (Organização Mundial de Saúde) indicam que além dos 12 milhões de indivíduos infectados em mais de 80 países, existem ainda cerca de 350 milhões de pessoas expostas ao risco de contrair a doença (DESJEUX, 2004).

No Brasil, a Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) apresenta ampla distribuição com registro de casos em todas as regiões brasileiras. No período de 1988 a 2007, a LTA apresentou média anual de 27.736 casos autóctones registrados e coeficiente de detecção médio de 17,3 casos por 100.000 habitantes (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009). Dados recentes mostram que o número de casos de LTA no Brasil foi de 21.147 e a taxa de mortalidade foi de 231 casos em 2010 (ALVAR et al., 2012).

A LTA apresenta um amplo espectro de manifestações clínicas (BARRAL-NETTO et al., 1986). No centro do espectro clínico-imunológico, a Leishmaniose Cutânea

Localizada (LCL) é a forma mais freqüente e pode ser causada por *L. braziliensis*, *L. amazonensis* e *L. guyanensis*. Esta forma caracteriza-se por uma ou mais lesões cutâneas ulceradas, mantidas por uma eficiente resposta de células T, que geralmente favorece uma boa reação à terapia antimonial tradicional e tendem à cicatrização. Os cortes histológicos revelam uma reação inflamatória tecidual do tipo crônico granulomatoso com ausência ou escassez de parasitas. No pólo hiperérgico, a Leishmaniose Cutânea Mucosa (LCM), caracteriza-se por escassez de parasitos na lesão e reação imune exacerbada com intensa destruição tecidual. Estima-se que 3% dos casos de LCL causados por *L. braziliensis* desenvolvam lesão cutânea mucosa (BOAVENTURA et al., 2009). E por último, o pólo anérgico conhecido como Leishmaniose Cutânea Difusa (LCD), com presença de inúmeros macrófagos vacuolizados intensamente parasitados (CONVIT; PINARDI; RONDON, 1972). As principais espécies, suas associações com a doença em humanos e as manifestações clínicas apresentam-se demonstradas na figura 2.

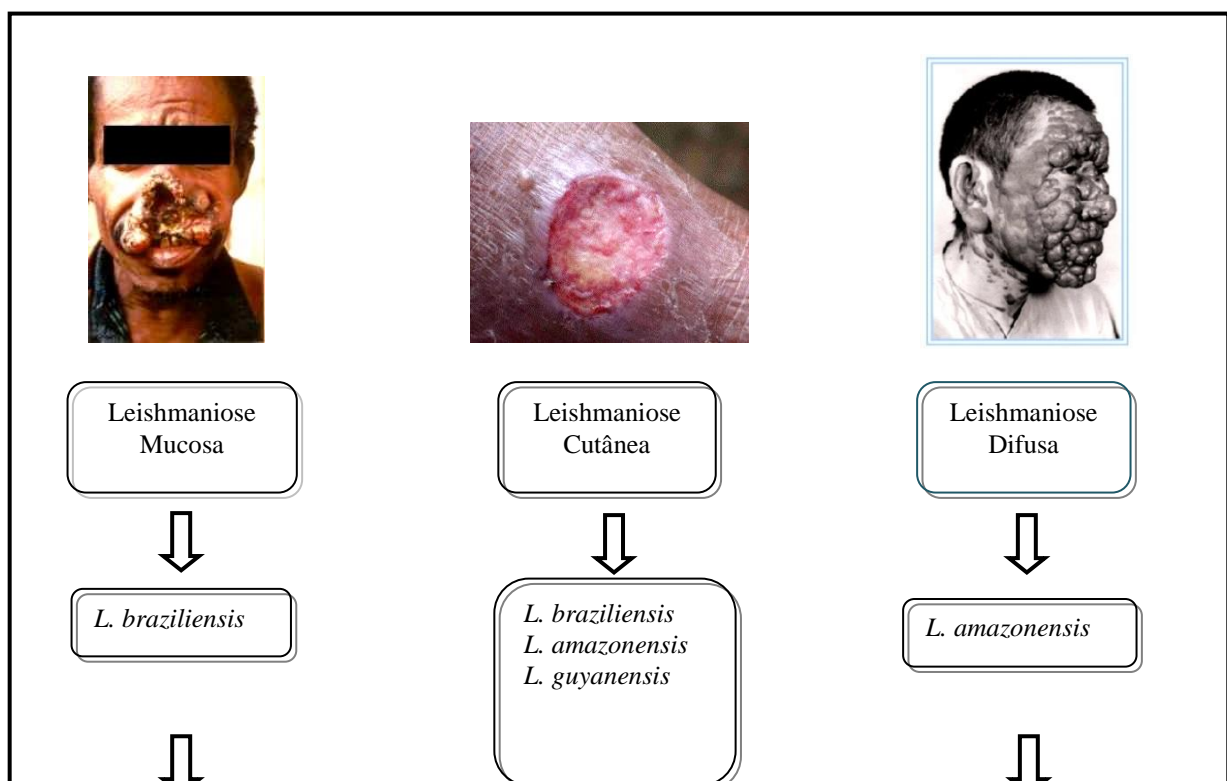


Figura 2. Principais espécies de *Leishmania* e aspectos imunológicos observados na LTA. Ac: Anticorpos; IFN- γ : Interferon gama; IL-10: Interleucina 10; - ausência; + Presença ; + leve; ++moderada; +++ intensa; ++++ muito intensa. (Fonte: Manual de Vigilância Tegumentar Americana, Ministério da Saúde, 2009).

Dentro da LTA, as formas clínicas de LCM e LCD são afecções dermatológicas que merecem mais atenção devido à sua capacidade de produzir deformidades, podendo comprometer o estado psicológico, com reflexos no campo social e econômico do indivíduo afetado por essas doenças. (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009).

1.3 Leishmaniose cutânea difusa

No Brasil, a LCD é causada pela *L. (L.) amazonensis*, sendo a maioria dos casos relatados no Maranhão (40%), Pará (20%), Bahia (12,5%), Mato Grosso (10%) e em menor intensidade em estados do Norte do país (Figura 3) (COSTA et al., 2005).

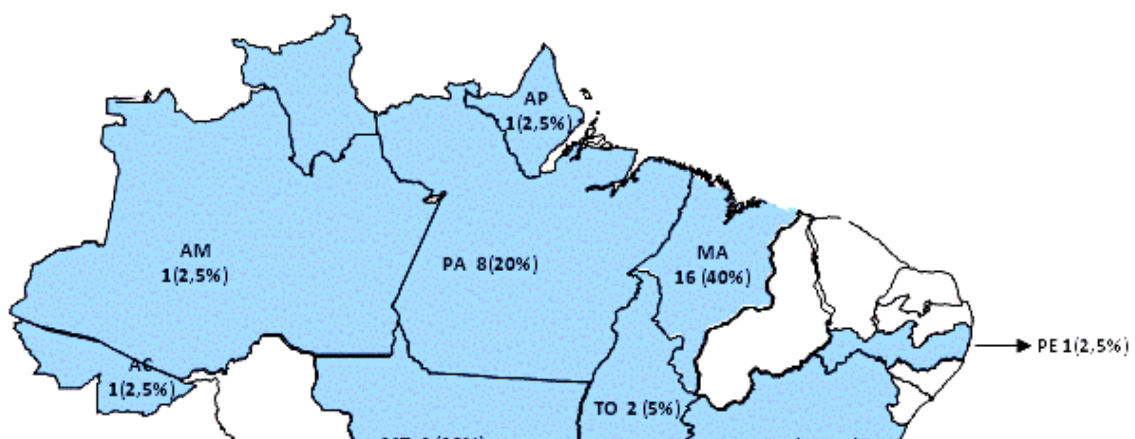


Figura 3. Distribuição geográfica da Leishmaniose Cutânea Difusa no Brasil

Fonte: Costa *et al.*, 2005.

A LCD é uma forma clínica rara, porém grave, caracterizando-se por maciço comprometimento dérmico, de natureza crônica, com recidivas frequentes e anergia ao teste intradérmico de Montenegro (IDRM) (CONVIT; PINARDI; RONDON, 1972). A maioria dos casos origina-se de infecção adquirida na infância, apresentando inicialmente lesões únicas e resposta ineficaz ao tratamento (COSTA et al., 2005). As lesões observadas na LCD evoluem de forma lenta com formação de pápulas, nódulos ou infiltrações difusas, de distribuição simétrica na face, no tronco e nos membros, podendo disseminar-se para todo o corpo por via hematogênica após meses ou anos da infecção (Fonseca *et al.*, 1981).

Na maioria dos casos, as lesões envolvem espontaneamente ou por ação do tratamento quimioterápico. Entretanto, as recidivas são freqüentes, podendo ser atribuída a reinfecção ou alterações no estado imunológico ou nutricional do paciente,

ou ainda problemas com a farmacocinética das drogas utilizadas (BARRAL et al., 1995; COSTA et al., 1995).

Histologicamente, as lesões se caracterizam por um denso infiltrado dérmico de macrófagos vacuolizados intensamente parasitados, obscurecendo estruturas da derme e da hipoderme (BARRAL et al., 1995; CONVIT; PINARDI; RONDON, 1972). Quando comparado com lesões de pacientes com a forma cutânea localizada, a LCD apresenta baixa densidade de células T CD4+ e CD8+ nas lesões (CARNEIRO et al., 2009; DIAZ et al., 2002; SILVEIRA; LAINSON; CORBETT, 2004).

Do ponto de vista imunológico chama atenção o teste de IDRM e transformação linfoblástica serem negativos, uma vez que culturas de células mononucleares do sangue periférico estimuladas com antígenos de *Leishmania*, não respondem aos testes de proliferação celular e produção de IFN- γ (BARRAL et al., 1995; PETERSEN et al., 1982; SILVEIRA; LAINSON; CORBETT, 2004). Com relação às moléculas associadas ao estado de ativação de linfócitos, as lesões de pacientes com LCD apresentam menor expressão de linfócitos CLA+ e CD69+ em comparação a pacientes com LCL (DIAZ et al., 2002). Apesar da ausência de respostas celulares específicas, os níveis de anticorpos IGg anti-*Leishmania* no soro dos pacientes são altos. Contudo não há evidências de sua influência no controle da infecção por *Leishmania amazonensis* (BARRAL et al., 1995).

Alguns trabalhos têm mostrado que na LCD predomina uma resposta imunológica do tipo Th2. Silveira e cols. (2004) evidenciaram baixa expressão de IFN- γ contrastando com a elevada quantidade de mRNA de IL-4 nas mesmas amostras de lesões cutâneas de pacientes com LCD. Bomfim e cols. (1996) demonstraram que durante a doença ativa, células do sangue periférico de pacientes com LCD não expressam mRNA para IFN- γ , contudo possuem altos níveis de mRNA para IL-2, IL-4 e IL-10. Entretanto

observou-se que após indução da cicatrização das lesões cutâneas pós-tratamento, ocorre uma expressão de IFN- γ e diminuição de IL-10. Outras citocinas também estão envolvidas no estado anérgico da LCD. O TNF- α , um importante potencializador do IFN- γ , encontra-se reduzido no soro de pacientes com LCD quando comparados com pacientes com LCM (CASTES et al., 1993). Estes dados demonstraram que uma das principais deficiências imunológica em LCD está na inabilidade em produzir IFN- γ e que a IL-10 tem um importante papel na modulação negativa na resposta desses pacientes (BOMFIM et al., 1996).

1.4 Modelos de Suscetibilidade e Resistência à Leishmaniose

Diversos modelos murinos têm sido utilizados para estudar as características clínicas, imunológicas e bioquímicas da Leishmaniose. O modelo murino mais estudado de resistência ou susceptibilidade a *Leishmania* é o da infecção com a espécie *Leishmania major*. Neste modelo, a dominância de uma resposta de células T CD4+ com fenótipo Th1 em geral resulta na cura da lesão e eliminação do parasita (HEINZEL et al., 1989; SACKS; NOBEN-TRAUTH, 2002). Muitas linhagens de camundongos (C57BL/6, C3H, CBA) desenvolvem lesões autolimitantes com *L. major*, sendo a resolução da infecção mediada pelas células Th1, com a produção de IFN- γ . Em contraste, a infecção por *L. major* em camundongos da linhagem de BALB/c desenvolve uma resposta de susceptibilidade do tipo Th2 (GUMY; LOUIS; LAUNOIS, 2004).

Diferente do que ocorre nos modelos de resistência e susceptibilidade bem definidos em infecções com *L. major*, a maioria das linhagens de camundongos é susceptível à

infecção com *L. amazonensis* (SOONG et al., 1997). No entanto, essa susceptibilidade não está relacionada a um perfil de resposta Th2 bem estabelecido. Nesse sentido, camundongos BALB/c são muito susceptíveis à infecção com *L. amazonensis* e apresentam uma produção importante de IL-4 no decorrer da infecção. No entanto, a quantidade de IL-4 produzida é insuficiente para polarizar a resposta imune para um perfil Th2 e reduzir a síntese de citocinas como IFN- γ e TNF- α que são produzidas constantemente, caracterizando uma resposta mista entre o perfil Th1 e Th2 (JI et al., 2002). O que os modelos murinos de susceptibilidade à infecção com *L. amazonensis* sugerem é que a interação entre o hospedeiro e o parasita resulta em ineficiência de polarização para um perfil Th1. Camundongos C57BL/6 quando infectados com *L. amazonensis*, desenvolvem lesões que, embora diminuam de tamanho no decorrer das semanas, raramente curam, tornando-se persistentes como uma infecção crônica. Em estudo comparativo de infecção com *L. major* e *L. amazonensis* nestes camundongos, Ji e colaboradores (2003) demonstraram que a susceptibilidade à *L. amazonensis* está relacionada à redução da produção de mediadores pró-inflamatórios, bem como de seus receptores, nas primeiras semanas após a infecção. Estas alterações, juntamente com a presença de baixos níveis de citocinas do tipo Th2, previnem o desenvolvimento de células Th1 específicas para o parasita (JI; SUN; SOONG, 2003). A susceptibilidade de camundongos C57BL/6 à infecção com *L. amazonensis* está relacionada à baixa produção de IFN- γ no decorrer da infecção e produção de IL-4 apenas nos momentos iniciais, revelando que também nestes animais a susceptibilidade está mais associada à ausência de resposta Th1 do que a presença de uma resposta Th2 bem estabelecida (AFONSO; SCOTT, 1993).

A produção de TGF- β também contribui para inibição da resposta inflamatória durante a infecção com *L. amazonensis* e a produção deste mediador é aumentada em

modelos de infecção de macrófagos *in vitro* e em lesões em camundongos BALB/c (BARRAL-NETTO et al., 1992). O tratamento de camundongos BALB/c com anti-TGF- β pela *L. amazonensis* impede o aparecimento de grandes lesões e aumenta os níveis de mRNA para IFN- γ nas células do linfonodo drenante da lesão. Desta forma, a indução da produção de TGF- β pela *L. amazonensis* pode estar envolvida com o controle da resposta imune, mantendo níveis baixo de IFN- γ e favorecendo o estabelecimento da infecção (BARRAL-NETTO et al., 1992).

Comparativamente com outras espécies, *L. amazonensis* apresenta maior resistência à ativação do macrófago (SCOTT; SHER, 1986; SOONG, 2012). Qi e colaboradores (2004) demonstraram que concentrações de até 100ng/ml de IFN- γ adicionados em culturas de macrófagos infectados com *L. amazonensis* induzem maior proliferação das amastigotas intracelulares, sugerindo que esta espécie pode ter evoluído mecanismos de subverter a ativação macrofágica e a resposta imune do hospedeiro (QI et al., 2004).

1.5 Resposta intramacrofágica à infecção por *Leishmania*

Macrófagos são as células hospedeiras preferenciais para a infecção e proliferação de parasitas do gênero *Leishmania*. Tanto o controle quanto o estabelecimento dos parasitas é determinado pelo grau de ativação dos macrófagos do hospedeiro, que por sua vez é dependente de interações com células do sistema imune (HANDMAN; BULLEN, 2002; KANE; MOSSER, 2000).

No entanto, o sucesso da infecção com *Leishmania* não depende apenas da interação entre o parasita e a célula hospedeira. Macrófagos infectados são potenciais candidatos a apresentarem antígenos do parasita para linfócitos T. Desta forma, peptídeos do parasita associados à molécula de complexo de histocompatibilidade principal (MHC)

de classe II expostas na superfície dos macrófagos podem ativar células T CD4⁺ específicas para *Leishmania*, potencializando a resposta imune (REINER et al., 1988). Diversos trabalhos têm demonstrado que a infecção com *Leishmania* interfere negativamente na apresentação de antígenos pelos macrófagos. Em infecção com *L. major* e *L. amazonensis* os macrófagos têm a capacidade de apresentação diminuída tanto para antígenos do parasita como para outros antígenos (FRUTH; SOLIOZ; LOUIS, 1993; PRINA et al., 1993). Trabalhos do grupo de Jean-Claude Antoine demonstraram que moléculas de MHC de classe II são retidas no vacúolo parasitóforo de *L. amazonensis* e *L. donovani* (LANG; DE CHASTELLIER et al., 1994; LANG; HELLIO et al., 1994). Utilizando inibidores de proteases este grupo conseguiu observar que as formas amastigotas de *L. amazonensis* internalizam as moléculas de MHC-II do macrófago, degradando-as em organelas equivalentes aos lisossomos característicos dessa espécie de *Leishmania*, denominadas megassomas (DE SOUZA LEO et al., 1995).

Após serem fagocitados, os parasitos do gênero *Leishmania* se localizam em fagossomas denominados vacúolos parasitóforos (VPs). Os VPs amadurecem fusionando com vesículas da via endocítica, endossomas tardios e/ou lisossomas. A morfologia e a maturação de compartimentos contendo o parasito variam dependendo da espécie de *Leishmania*. Amastigotas de espécies do Velho Mundo, como *L. donovani* e *L. major*, sobrevivem em um vacúolo caracterizado como “justo” que apresenta vários pontos de contato com a membrana do parasita e em geral poucos amastigotas em seu interior (CASTRO et al., 2006). No entanto, espécies do Novo Mundo, como *L. amazonensis* e *L. mexicana* induzem a formação de vacúolos parasitóforos com um lúmen grande, descritos como “largos”, que podem apresentar várias amastigotas, aderidas à membrana preferencialmente pela região posterior (BENCHIMOL; DE

SOUZA, 1981). Isto pode ser resultado de processos distintos que controlam a fusão e fissão de endossomas e organelas aos vacúolos ou diferenças nas interações entre as espécies e a célula hospedeira (ANTOINE et al., 1998).

Em consequência da morfologia peculiar que os vacúolos das espécies de *Leishmania* do Novo Mundo apresentam, há diversos trabalhos na literatura caracterizando a composição e a dinâmica de formação destas estruturas. Vacúolos de *L. amazonensis* são altamente fusogênicos com lisossomos, podendo depletar estas organelas do citoplasma da célula infectada nas primeiras horas após a infecção (ANTOINE et al., 1990; BARBIERI; BROWN; RABINOVITCH, 1985). Devido a esta dinâmica, os vacúolos apresentam pH entre 4,74 e 5,26 (ANTOINE et al., 1990) e diversas proteases lisossomais como as catepsinas B, H, L e D (PRINA et al., 1990). Além da fusão com os lisossomas, os vacúolos desta espécie também adquirem proteínas características de endossomas tardios (COURRET et al., 2002; MARCHESINI; DOCAMPO, 2002).

Apesar da presença do conteúdo lisossomal no vacúolo de *L. amazonensis*, as formas amastigotas desenvolveram diversas estratégias para sobreviverem neste ambiente de pH ácido. Devido a ação de uma H^+ - ATPase na membrana das amastigotas, o pH é mantido em torno de 6,36, o que não compromete a atividade das enzimas citoplasmáticas (MARCHESINI; DOCAMPO, 2002). Além disso, transportadores importantes para a aquisição de nutrientes como prolina, glicose e poliaminas estão presentes na superfície das formas amastigotas e apresentam atividade ótima em pH próximo ao do vacúolo parasitóforo (BASSELIN; COOMBS; BARRETT, 2000; BURCHMORE; HART, 1995; GLASER; MUKKADA, 1992). Outro nutriente importante para sobrevivência intracelular da *Leishmania* é o ferro (Fe). O primeiro transportador de Fe identificado em tripanossomatídeos foi descrito em amastigotas de

L. amazonensis, o receptor LIT1 (JACQUES; ANDREWS; HUYNH, 2010). A deleção do gene LIT1 do genoma da *Leishmania* inibe a replicação do parasita dentro de macrófagos e o desenvolvimento de lesões cutâneas em camundongos (HUYNH; SACKS; ANDREWS, 2006).

Mesmo apresentando características altamente fusogênicas, a interação entre o vacúolo de *L. amazonensis* com vesículas da via endocítica não parece ser um processo aleatório. Veras e colaboradores (1992) demonstraram que vacúolos contendo amastigotas podem fundir com endossomas contendo zimozan, β -glicana e leveduras mortas pelo calor (VERAS; DE CHASTELLIER; RABINOVITCH, 1992). Real e colaboradores (2008) também demonstraram que vacúolos de macrófagos infectados com amastigotas de *L. amazonensis* fundem com vacúolos recentes de uma nova infecção, tanto de promastigotas como amastigotas. No entanto, a fusão com endossomas contendo partículas de látex, eritrócitos fixados e eritrócitos opsonizados com IgG é inibida (REAL; POUCHELET; RABINOVITCH, 2008). A bactéria *Coxiella burnetti* apresenta vacúolo morfológicamente semelhante ao de *L. amazonensis*, também bastante fusogênico. Porém, diferente do observado para *L. amazonensis* esta bactéria não parece controlar seletivamente a fusão do vacúolo com as vesículas endossomais (VERAS; DE CHASTELLIER; RABINOVITCH, 1992).

A interação da *Leishmania* com o macrófago é um processo extremamente complexo e regulado. A sobrevivência do parasita dentro do vacúolo envolve mecanismos de captação de nutrientes, de controle da ativação dos macrófagos e da resposta imune mediada pelas células T.

1.6 Regulação da resposta inflamatória na infecção por *Leishmania*

1.6.1 A via de ativação da arginase e inflamação

A arginase é uma metaloenzima que catalisa o último passo do ciclo da uréia, envolvido na eliminação da amônia: a arginase hidrolisa L-arginina em L-ornitina e em uréia (ILIES et al., 2011; WU; MORRIS, 1998). Nos mamíferos, existem duas isoformas da arginase. Ambas têm 60% de similaridade na sequência de aminoácidos e 100% de similaridade nas regiões críticas para a função enzimática (CEDERBAUM et al., 2004), mas são codificadas por genes diferentes, estão localizadas em compartimentos distintos da célula e também têm distribuição tecidual distintas (MUNDER, 2009). A arginase I, presente no citosol, é muito expressa no fígado e a sua principal função é a desintoxicação, a partir da eliminação da amônia como parte do ciclo da uréia. A arginase II é uma enzima mitocondrial, expressa em níveis menores no rim, cérebro, intestino delgado e glândula mamária, com pouca ou nenhuma expressão no fígado (MUNDER, 2009).

A arginase hidroliza a L-arginina em L-ornitina, a qual é descarboxilada pela ornitina descarboxilase (ODC) formando as poliaminas: putrecina, espermina, espermidina. As poliaminas são importantes para a síntese de ácidos nucléicos, transportadores de membrana e para a proliferação celular. A L-ornitina também pode sofrer a ação da ornitina aminotransferase (OAT) originando a prolina, um importante aminoácido para síntese de colágeno durante o processo de cicatrização da lesão cutânea ou mucosa (MORRIS, 2002).

As vias de ativação macrofágica estão centradas no metabolismo do aminoácido L-arginina. Os macrófagos apresentam duas vias metabólicas que competem por este aminoácido. A via de ativação clássica é caracterizada pelo processamento da L-arginina pela enzima Óxido Nítrico Sintase induzida (iNOS). Esta via é ativada por

citocinas características de resposta imune do tipo Th1, como o IFN- γ e o TNF- α (MUNDER et al., 1999; PERANZONI et al., 2007). O aumento da síntese da enzima iNOS induz maior produção de NO ativando os mecanismos microbicidas (BOGDAN et al., 2000; BROSNAN et al., 1994). Por outro lado, a via alternativa envolve o processamento da L-arginina pela enzima arginase I e a descarboxilação da L-ornitina pela enzima ODC formando putrecina, primeiro intermediário exclusivo para a síntese de poliaminas (BANSAL; OCHOA, 2003).

Esta via é ativada por citocinas características de resposta imune do tipo Th2 como IL-4, IL-10 ou prostaglandinas E₂ (PGE₂) (MODELELL et al., 1995; MORI; GOTOH, 2000; POPOVIC et al., 2007). A expressão divergente entre Arginase I e iNOS tem contribuído para a nomenclatura dicotômica de macrófagos (GORDON, 2003; MORRIS; KEPKA-LENHART; CHEN, 1998). Macrófagos classicamente ativados (M1) expressam altos níveis de iNOS e baixos níveis de Arg I e participam do controle de patógenos intracelulares. Por outro lado, macrófagos alternativamente ativados (M2) expressam o padrão inverso e não só se desenvolvem em resposta a infecções parasitárias, de uma forma dependente da citocina Th2 (HESSE et al., 2001), mas também protegem o tecido do hospedeiro contra danos inflamatórios (PESCE et al., 2009). Enquanto a expressão desregulada de iNOS por macrófagos M1 promove danos inflamatórios, tal como ocorre na aterosclerose (CHINETTI-GBAGUIDI; STAELS, 2011; PERROTTA et al., 2011), o excesso de expressão de Arginase I por macrófagos M2 reduz a eficácia da imunidade contra agentes patogênicos intracelulares (EL KASMI et al., 2008; WANASEN; SOONG, 2008), e exacerba o crescimento de tumores (LISSBRANT et al., 2000; RODRIGUEZ et al., 2004; ZEA et al., 2005). Assim, tanto durante o início quanto na resolução da imunidade, a expressão do iNOS e

Arg1 em macrófagos deve ser bem regulada para proteger o hospedeiro de uma inflamação potencialmente prejudicial.

1.6.1.1 Arginase e a regulação da infecção por *Leishmania*

A sobrevivência da *Leishmania* e o estabelecimento da infecção estão relacionados com a sua diferenciação da forma promastigota em amastigota dentro dos macrófagos, a qual depende do seu aparato bioquímico para conseguir nutrientes (BURCHMORE; BARRETT, 2001; NADERER; MCCONVILLE, 2008).

A atividade da arginase I leva a produção de poliaminas, que são compostos que favorecem a proliferação de parasitas intracelulares, (VINCENDEAU et al., 2003). A importância da ativação da enzima arginase I para a sobrevivência de várias espécies de *Leishmania* foi demonstrada em modelos *in vitro* e *in vivo*. Formas amastigotas de *L. major* e *L. infantum* proliferam mais em macrófagos incubados com IL-4, IL-10 e TGF- β , que induzem aumento da atividade da arginase I (INIESTA; GOMEZ-NIETO; CORRALIZA, 2001), mostrando que o desvio da utilização da L-arginina para a via da arginase sofre influência da resposta Th2 (INIESTA et al., 2005).

A arginase também é um importante modulador da resposta inflamatória no contexto de infecção por microorganismos (DAS et al., 2010; WANASEN; SOONG, 2008). Arginase I é altamente expressa no local da lesão causada por *L. major*, interferindo na capacidade das células T de produzirem IFN- γ (MODOLELL et al., 2009). Na susceptibilidade, observada em camundongos BALB/c, os linfócitos T auxiliares são do tipo 2 (Th2) e produzem IL-4 e IL-10, citocinas que desativam os macrófagos e que aumentam a expressão de arginase I (GORDON, 2003), inibindo a morte parasitária e favorecendo a replicação.

Na infecção por *L. major*, o tratamento com o inibidor competitivo da arginase I, nor-NOHA, retarda o aparecimento da lesão (INIESTA et al., 2005). No entanto, o controle do crescimento parasitário, observado durante a inibição da arginase I, não é acompanhada pelo aumento de NO (INIESTA; GOMEZ-NIETO; CORRALIZA, 2001; KROPF et al., 2005). Por outro lado, a suplementação com ornitina aumenta a expressão da arginase I e a susceptibilidade, pois aumenta os níveis de poliaminas (INIESTA et al., 2005). A indução de arginase I diminui a disponibilidade de arginina no local da inflamação e também impede a produção de IFN-g no sítio de infecção, favorecendo a sobrevivência do parasita. Com a disponibilização da L-arginina, este quadro se inverte e os animais desenvolvem lesões menores (MODOLELL et al., 2009).

Recentemente, Abebe e colaboradores (2012), mostraram que a atividade da arginase estava aumentada em lesões de pacientes com leishmaniose cutânea na Etiópia quando comparado aos controles saudáveis. Em um segundo trabalho, o mesmo grupo relatou que a atividade da arginase está significativamente aumentada no sangue periférico de indivíduos com Leishmaniose Visceral e que a mesma diminuiu após o tratamento (ABEBE et al., 2013).

1.6.2 Mediadores lipídicos

Os mediadores lipídicos desempenham um papel importante nos estágios iniciais da inflamação, bem como nas etapas de resolução do processo inflamatório (BANNENBERG; SERHAN, 2010). Após a lesão tecidual a produção de prostaglandinas e leucotrienos está associada ao processo de vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular e recrutamento celular de neutrófilos, gerando uma resposta

pró-inflamatória, característica dos primeiros estágios da resposta inflamatória aguda (SERHAN, 2010). Já nos estágios tardios, a fagocitose de neutrófilos apoptóticos por macrófagos recrutados para o sítio inflamatório induz uma mudança na categoria de mediadores lipídios para um perfil antiinflamatório e, conseqüentemente, há uma redução no influxo de células ao local da lesão associado ao processo de resolução da inflamação (LAWRENCE; WILLOUGHBY; GILROY, 2002). Os mediadores lipídicos mais estudados são os eicosanóides, uma família de metabólitos derivados da oxidação do ácido araquidônico (AA). O AA liberado pela estimulação da fosfolipase A2 (PLA2), por sua vez, pode ser metabolizado principalmente por duas classes de enzimas: as ciclooxigenases (COX) e a lipoxigenases (LO) (SERHAN; CHIANG; VAN DYKE, 2008).

As COXs são isoenzimas que catalisam, a partir do AA, a formação de prostaglandina H₂, a qual pode ser convertida pela ação de PG sintases célula-específica em diversas moléculas biologicamente ativas, bem como: PGE₂, PGF_{2a}, PGI₂, PGD₂ e tromboxano A₂ (TXA₂), coletivamente conhecidos como prostanóides (FUNK, 2001; PARK; CHRISTMAN, 2006). COX-1 tem expressão constitutiva sendo a enzima responsável pela síntese basal de prostanóides, enquanto que a COX-2 é importante em vários processos inflamatórios devido a sua expressão ser induzível (FUNK, 2001)(Funk, 2001).

No contexto da infecção com microorganismos, a produção de prostaglandina E₂ tem sido associada ao aumento da produção de cAMP, supressão da resposta imune do hospedeiro com a inibição da produção de citocinas pró-inflamatórias, tais como: IFN- γ , TNF-alfa, IL-12, IL-2 e IL-1beta. Em contrapartida, a PGE₂ é capaz de induzir a produção de citocinas de perfil Th₂, bem como IL-10, IL-4 e imunoglobulinas do tipo IgE e IgG1 (HARRIS et al., 2002). Os efeitos imunomoduladores potentes

desempenhados por PGE2 são ambíguos, dependendo do perfil de outros mediadores presentes *in situ* e da interação com receptores específicos. Nesse sentido, demonstrou-se que a PGE2 tem efeito sinérgico com o TNF- α e induz níveis elevados de IL-12 por células dendríticas (RIESER et al., 1997). A prostaglandina E2 tem quatro receptores prostanóide acoplado a proteína G: EP1, EP2, EP3 e EP4, que se ligam a PGE2 induzindo diferentes vias de sinalização e várias funções efetoras, refletindo as funções ubíquas de PGE2 (HATA; BREYER, 2004; KALINSKI, 2012; SUGIMOTO; NARUMIYA, 2007).

PGE2 foi também demonstrado ser essencial para o desenvolvimento da função supressora em macrófagos após o reconhecimento de corpos apoptóticos, promovendo o crescimento de parasitas intracelulares (FREIRE-DE-LIMA et al., 2000). A produção de PGE2 tem sido associada com a supressão da resposta imune do hospedeiro por meio da inibição das citocinas pró-inflamatórias, tais como TNF- α e IL-12 (REINER; MALEMUD, 1984), e alternar a resposta Th1 para Th2 por suprimir a produção de IFN e IL-12 (BETZ; FOX, 1991; NARUMIYA, 2009).

As lipoxigenases constituem a outra via de metabolismo do AA, dentre as quais, a 5- lipoxigenase (5-LO) se destaca pela produção de leucotrienos (LTs) e lipoxinas (LXs) (PETERS-GOLDEN; HENDERSON, 2007). A expressão 5-LO está correlacionada a eventos de inflamação da fase aguda, com a produção de citocinas pró-inflamatórias e radicais de oxigênio. Entre os produtos da via da 5-LO se destacam o LTB4 em doenças infecciosas e os chamados cis-leucotrienos LTC4, LTD4 e LTE4 envolvidos na resposta alérgica. O LTB4 está correlacionado com um aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias e diminuição da infecção em diversas patologias associado ao aumento da produção de óxido nítrico (PETERS-GOLDEN et al., 2005).

Mediadores lipídicos desempenham um papel crucial na infecção por *Leishmania*. Entretanto as respostas parecem distintas a depender da espécie do parasita. Nesse sentido, a infecção de macrófagos por *L. donovani* induz uma maior expressão de ciclooxigenase, PGE sintase e produção de prostaglandinas quando comparada a infecção por *L. major* (MATTE et al., 2001). Foi demonstrado que macrófagos murinos infectados por *L. donovani* tem o metabolismo de AA direcionado a produção de PGE₂ (REINER; MALEMUD, 1985; REINER; SCHULTZ; MALEMUD, 1988). PGE₂ exógeno também foi capaz de aumentar a carga parasitária em macrófagos de BALB/c infectados com *L. amazonensis* (GUIMARAES et al., 2006; PINHEIRO et al., 2009). A interação *in vitro* entre macrófagos infectados e neutrófilos apoptóticos no modelo experimental murino (RIBEIRO-GOMES et al., 2005) e em células humanas (AFONSO et al., 2008) resultou no sucesso da infecção por *Leishmania* e aumento da carga parasitária por um mecanismo de supressão da resposta imune dependente da produção de PGE₂ e TGF- β .

1.6.3 Apoptose e Parasitismo

1.6.3.1 Fenótipo Apoptótico

O processo de morte celular programada (MCP) é um mecanismo dependente de uma programação genética, com a participação de genes ativadores e repressores, que modulam os eventos envolvidos nesse tipo de morte celular. Diversos estímulos podem ativar diferentes vias de sinalização celular que levam a MCP. Células sofrendo esse processo de morte apresentam características próprias que dependem do tipo celular

envolvido e do estímulo indutor da morte (FADEEL; ORRENIUS, 2005; PROTO; COOMBS; MOTTRAM).

O fenótipo mais encontrado em células sofrendo MCP é a apoptose, que é caracterizada por diversas modificações morfológicas e bioquímicas características na célula, iniciadas e efetuadas pelas enzimas da família das caspases (MILLER, 1997): cisteíno proteases que tem especificidade por seqüências com ácido aspártico na posição P1. Perda do potencial de membrana de mitocôndria, alterações estruturais de membrana, degradação oligonucleossomal do DNA, condensação da cromatina nuclear, formação de extrusões da membrana plasmática (blebs) e formação de corpos apoptóticos são as principais alterações que caracterizam o fenótipo apoptótico (DANIEL et al., 1999; FANG; ZHANG; XUE, 1996; OBERHAMMER et al., 1994; TOUNEKTI; BELEHRADEK; MIR, 1995). No contexto de manutenção da homeostasia, o reconhecimento e a rápida fagocitose das células apoptóticas permitem que células auto-reativas, que já desempenharam sua função, que sofreram algum tipo de estresse físico ou químico, sejam reconhecidas e eliminadas sem iniciar um processo inflamatório danoso ao tecido adjacente, já que não ocorre liberação do conteúdo citoplasmático no ambiente extracelular (SAVILL; FADOK, 2000).

1.6.3.2 Perda da assimetria de membrana durante a apoptose

Em células viáveis, os principais fosfolipídios que formam a bicamada lipídica da membrana plasmática são fosfatidilcolina (PC), fosfatidilserina (PS), fosfatidiletanolamida (PE) e esfingomiéline (SM). A localização de cada fosfolipídio é fundamental para o desempenho de suas funções; esta localização é controlada pela atividade de determinadas enzimas. Aproximadamente 100% da PS e 80% da PE são encontrados na face interna da membrana e 75% da PC e 80% da SM são encontrados

na face externa da membrana (DIAZ; SCHROIT, 1996). Essa distribuição assimétrica é mantida através de enzimas denominadas translocases, que catalisam o movimento vertical de fosfolipídios na membrana, chamado flip-flop ou translocação, redirecionando as moléculas para o seu sítio habitual. Essas enzimas são denominadas fosfolipídio-translocases, sendo que as flopases direcionam os lipídios para a face externa enquanto que as flipases induzem o movimento contrário (DIAZ; SCHROIT, 1996).

Uma das modificações mais bem definidas em células apoptóticas é a perda da assimetria da membrana plasmática, que está vinculada à inativação das translocases, e a superexpressão das enzimas fosfolipídio-escramblases que promovem a translocação bidirecional dos lipídios, em um mecanismo dependente de cálcio intracitoplasmático e ativação de caspases (BEVERS et al., 1999). A translocação dos lipídios leva a alguns efeitos importantes para o processo de apoptose e reconhecimento das células alvo. Um deles é a internalização de SM, que ao chegar ao citoplasma, sofre a ação de esfingomielinases citoplasmáticas liberando ceramida que desempenha papel importante na formação e liberação dos corpos apoptóticos (TEPPER et al., 2000). A alteração estrutural mais bem estudada na membrana plasmática de células apoptóticas é a exposição de PS (FADOK et al., 1992), fosfolipídio aniônico que é reconhecido por fagócitos ou por moléculas presentes no soro (VAN DEN EIJNDE et al., 1998). Como a maior parte dos tipos celulares apresenta a exposição de PS na sua superfície externa quando em processo de apoptose, esse fosfolipídio é utilizado como um marcador específico de apoptose. Para tanto, o PS é, em geral, marcado com a proteína anexina V, que tem alta afinidade por PS na presença de altas concentrações de cálcio (TAIT; GIBSON, 1992).

1.6.3.3 Reconhecimento de Fosfatidilserina

O reconhecimento de células apoptóticas ocorre devido à expressão ou exposição de ligantes de superfície que interagem com as células fagocíticas do sistema imune inato, como macrófagos e células dendríticas, principais responsáveis pela endocitose e eliminação destas células. Muitos destes ligantes, já foram caracterizados, sendo o PS o mais estudado na literatura (MOREIRA; BARCINSKI, 2004).

Uma tentativa de identificação dos mecanismos de reconhecimento do PS na superfície das células apoptóticas foi pela caracterização de receptores específicos presentes na membrana dos fagócitos. O primeiro relato de um possível receptor para PS foi descrito por Fadok e colaboradores (2000). Neste trabalho os autores identificaram um anticorpo policlonal da classe IgM que bloqueia a fagocitose de células apoptóticas. O epítipo reconhecido por este anticorpo foi isolado pela técnica de *phage display* e o gene que codifica para esse epítipo foi identificado como sendo o receptor de PS (PSR). O PSR foi descrito como uma proteína transmembrana e a expressão deste receptor em células não fagocíticas aumentou a eficiência de fagocitose destas células (FADOK et al., 2000). A partir da caracterização da estrutura protéica e gênica do PSR, diversos grupos desenvolveram camundongos homozigotos com deleção do gene *psr* (BOSE et al., 2004; KUNISAKI et al., 2004; LI et al., 2003).

Como consenso, foi observado que a deleção deste gene é letal para os camundongos, entretanto os artigos posteriores ao de Fadok e colaboradores (2000) indicaram questionamentos sobre a sequência do receptor para PS inicialmente proposto, uma vez que experimentos posteriores com substituição dos primeiros éxons do gene *psr* (de um total de 6 éxons) por um gene de resistência a neomicina levaram a resultados conflitantes entre estes grupos.

Li e colaboradores (2003) observaram anomalias no pulmão, no sistema nervoso central e redução da fagocitose de células apoptóticas por macrófagos derivados de precursores retirados do fígado de fetos homozigotos para a mutação (LI et al., 2003), enquanto que as alterações observadas por Kunisaki e colaboradores (2004) foram relacionadas com defeito na eritropoiese, anemia intensa e atrofia tímica, resultando em falhas no desenvolvimento de linfócitos T (BOSE et al., 2004). Além disso, os autores demonstraram acúmulo de células apoptóticas no fígado e no timo, porém sem a presença de inflamação, sugerindo que a fagocitose destas células não estava inibida, e sim retardada.

Contrariamente a implicação do PS no reconhecimento e fagocitose de células apoptóticas, Böse e colaboradores (2004) observaram que os camundongos mutados apresentavam retardo na diferenciação de rins, intestino, pulmão, fígado e olhos. No entanto, não foi encontrado acúmulo de células apoptóticas em nenhum destes órgãos e macrófagos derivados do fígado fetal não apresentaram dificuldades em fagocitar células apoptóticas. Os autores concluíram então que o PSR possui funções essenciais durante a embriogênese, mas que não está envolvido na fagocitose de células apoptóticas (BOSE et al., 2004).

Mitchel e colaboradores (2006) desenvolveram uma linhagem de fibroblastos a partir de células de camundongos deficientes para o PSR. Os autores demonstraram que ausência do PSR nos fibroblastos não influencia no reconhecimento, na fagocitose ou na resposta às células apoptóticas (MITCHELL et al., 2006), corroborando as observações anteriores de Böse e colaboradores (2004). Em experimentos de fusão do PSR com a proteína GFP os autores demonstraram que a localização deste receptor é nuclear. A localização nuclear do PSR já havia sido demonstrada anteriormente em células de mamíferos (CUI et al., 2004), em Hydra (CIKALA et al., 2004) e foi descrita em

Drosophila (KRIESER et al., 2007), contradizendo os resultados apresentados por Fadok e colaboradores (2000).

Em 2007, Santiago e colaboradores demonstraram que proteínas da família transmembrana, imunoglobulina e mucina de células T (TIM) são receptores de reconhecimento padrão especializados no reconhecimento de PS (SANTIAGO et al., 2007). Em humanos existem três membros TIM1, TIM3 e TIM4 que diferem na expressão e estrutura molecular (KUCHROO et al., 2006). TIM1 é preferencialmente expresso em células Th2 e funciona como molécula co-estimulatória na ativação das células T. TIM3 é preferencialmente expresso em células Th1 e gera um sinal inibitório que resulta na apoptose das células que as expressam. TIM4 é exclusivamente expresso em células apresentadoras de antígeno, mediando a fagocitose de células apoptóticas (RODRIGUEZ-MANZANET et al., 2009). Deste modo, as moléculas TIM tem um repertório funcional para o reconhecimento de células apoptóticas, o qual determina se o reconhecimento leva a ativação imune ou a tolerância, dependendo do tipo de molécula TIM envolvida e da célula que a expressa (FREEMAN et al., 2010).

Até este momento não está claro se existe de fato um receptor específico para o PS e qual seria esse receptor, mas existe um consenso atual que o sistema de reconhecimento de ligantes na superfície de células apoptóticas compreende vários receptores na membrana de fagócitos que atuam de modo redundante, otimizando a capacidade do organismo de eliminar rapidamente essas células (BRATTON; HENSON, 2008). Devido à importância que o reconhecimento e a rápida remoção que as células apoptóticas apresentam para a manutenção da viabilidade dos tecidos, é muito provável que novos sistemas de reconhecimento para PS sejam descritos no futuro.

1.6.3.4 Consequências do reconhecimento de células apoptóticas

O papel do reconhecimento de células apoptóticas é mediar a rápida fagocitose destas células e destruí-las através de digestão intracelular, impedindo o extravasamento do conteúdo citoplasmático de células mortas. As principais células responsáveis pelo clearance de células apoptóticas são os macrófagos. Quando células apoptóticas são fagocitadas, os macrófagos não são induzidos a gerarem uma resposta inflamatória, o que é absolutamente necessário para a manutenção da homeostase do organismo (Kumar *et al.* 2005)

A fagocitose de células apoptóticas leva a supressão da produção de TNF- α por macrófagos ativados (VOLL *et al.*, 1997) e a indução da produção de TGF- β , PGE2 e PAF (FADOK *et al.*, 1998; FREIRE-DE-LIMA *et al.*, 2006; XIAO *et al.*, 2006). A produção de quimiocinas pró-inflamatórias como IL-8, MIP-1c (macrophage inflammatory protein-1c), MIP- 2 e óxido nítrico por macrófagos é modulada negativamente pelo reconhecimento de células apoptóticas (MCDONALD *et al.*, 1999) A produção de TGF- β é fundamental na modulação da resposta macrofágica, conforme foi demonstrado pela adição dessa citocina à cultura, o que mimetizou os efeitos causados pelo reconhecimento de células apoptóticas. Anticorpos que bloqueiam TGF- β reverterem o fenótipo dos macrófagos que endocitaram células apoptóticas (MCDONALD *et al.*, 1999). A fagocitose de células apoptóticas tem sido utilizada como estratégia de escape para diversos patógenos. A fagocitose de linfócitos apoptóticos por macrófagos infectados com *Coxiella burnetii* também aumenta a replicação da bactéria na cultura (ZAMBONI; RABINOVITCH, 2004). A interação de linfócitos T apoptóticos com macrófagos infectados com *Trypanosoma cruzi* induz o crescimento do parasita de forma dependente de PGE2, TGF e biossíntese de poliaminas (FREIRE-DE-LIMA *et al.*, 2000). Semelhante ao modelo de *T. cruzi*, fagocitose de neutrófilos apoptóticos por macrófagos infectados com *L. major*

(RIBEIRO-GOMES et al., 2004) e *L. amazonensis* (AFONSO et al., 2008) tem a carga parasitária aumentada por um mecanismo depende de PGE2 e TGF.

1.6.3.5 Mimetismo Apoptótico

Formas promastigotas de *L. amazonensis* morrem por apoptose quando submetidas a choque térmico. Isto foi observado em experimentos de transferência dos parasitos da temperatura de crescimento *in vitro*, para a temperatura de crescimento *in vivo* (de 22°C para 37°C, respectivamente) (MOREIRA et al., 1996). Durante este processo, os parasitas apresentam mudanças morfológicas características de uma célula apoptótica como fragmentação da cromatina e clivagem de DNA. Formas amastigotas desta espécie quando purificadas de lesões cutâneas na pata de camundongos expõem PS na sua superfície. No entanto, estes parasitos são viáveis, altamente infectivos e replicam em macrófagos após a infecção, o que sugere que não estão morrendo por apoptose (DE FREITAS BALANCO et al., 2001). Os autores observaram que, semelhante ao que ocorre durante o reconhecimento de células apoptóticas, o reconhecimento destas amastigotas pelo macrófago induz um fenótipo anti-inflamatório, com produção de TGF- β , IL-10 e inibição de NO. Esse mecanismo foi denominado de “Mimetismo Apoptótico” (DE FREITAS BALANCO et al., 2001)(Figura 4).

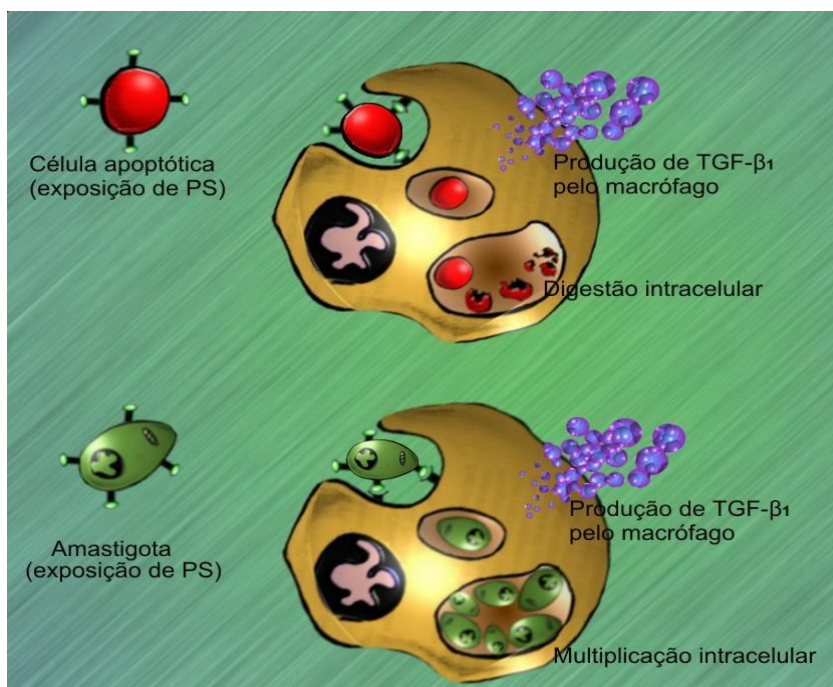


Figura 4. Mimetismo apoptótico em amastigotas de *Leishmania amazonensis*. (Figura cedida por João Luiz Mendes Wanderley).

Assim, a expressão de PS na superfície das formas amastigotas de *Leishmania amazonensis* não tem como desfecho a morte celular programada. Ao invés disso, o PS é considerado um fator de virulência, pois funciona como um ligante, mediando o reconhecimento destes parasitas por macrófagos (DE FREITAS BALANCO et al., 2001). O bloqueio da sinalização por PS diminui a internalização e a proliferação intracelular das formas amastigotas de modo específico (DE FREITAS BALANCO et al., 2001). Estes resultados mostram que a exposição de PS por formas amastigotas, além de torná-las mais infectivas induz uma permissividade macrofágica para o crescimento do parasita.

Este mecanismo ou mecanismos semelhantes parecem operar em outras infecções parasitárias, como tem sido mostrado em alguns trabalhos. A infecção ativa de macrófagos pelo parasita *Toxoplasma gondii* inibe a produção de óxido nítrico, e esta

inibição depende da exposição de PS pelo parasita. Bloqueando PS na superfície do parasita, através da incubação com anexina V, ou bloqueando-se TGF- β_1 com um anticorpo monoclonal específico este efeito é abolido (SEABRA; DE SOUZA; DAMATTA, 2004).

As formas tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi*, que são infectivas para as células do hospedeiro vertebrado, parecem ser as únicas formas evolutivas deste parasita que apresentam exposição de PS, mesmo quando provenientes de formas axênicas de cultura (DAMATTA et al., 2007). O reconhecimento dessa molécula na superfície das tripomastigotas também está relacionado à inibição da produção de NO em macrófagos infectados.

Mercer e Helenius demonstraram que uma forma infectiva não envelopada do vírus Vaccínia expõe PS na superfície (MERCER; HELENIUS, 2008). O reconhecimento desta forma do vírus induz sua internalização pelo processo de macropinocitose. Esta internalização é dependente do PS exposto pelo vírus e este mecanismo também foi descrito como Mimetismo Apoptótico (MERCER; HELENIUS, 2008). Estes resultados sugerem que a habilidade em induzir uma resposta anti-inflamatória utilizando características de células apoptóticas parece ser um mecanismo comum entre patógenos intracelulares, que precisam lidar com mecanismos microbicidas das células hospedeiras.

2. JUSTIFICATIVA

A progressão crônica da LCD é atribuída à falta da imunidade mediada por células específica para antígeno de *Leishmania* e predominância de uma resposta do tipo Th2. Neste sentido, mecanismos imunossupressores podem ser modulados por moléculas do próprio parasita durante a interação com a célula hospedeira.

Trabalhos de Barcinski e colaboradores vêm descrevendo a exposição e o reconhecimento de PS na superfície de amastigotas de *L. amazonensis* como mecanismo de desativação de macrófagos por uma via dependente de TGF- β_1 . O reconhecimento de PS tem como consequência a liberação de mediadores da inflamação como: PGE2, IL0 e IL-4. Tais mediadores ativam a via da enzima arginase, levando a produção de poliaminas, que são essenciais para a replicação e sobrevivência do parasita. A infecção de macrófagos murinos com *Leishmania amazonensis* aumenta os níveis de arginase e a inibição da enzima leva ao controle da proliferação e desenvolvimento da lesão.

Se a exposição de PS, PGE2, arginase e as poliaminas estão envolvidas na patogênese da LCD ainda é desconhecido. Portanto, a avaliação da exposição de PS na superfície de isolados de *L. amazonensis* obtidos de pacientes com LCD, bem como a análise das vias biossintéticas das prostaglandinas e poliaminas pelo hospedeiro é de fundamental importância para o entendimento de mecanismos imunopatogênicos que podem estar envolvidos na supressão da resposta imune associada a LCD.

Tendo em vista que este trabalho tem duas abordagens, uma em relação aos aspectos da Leishmania e outra do hospedeiro, achamos conveniente dividi-lo em duas partes.

3. Parte I

3.1 HIPÓTESE

Os isolados de *L. amazonensis* obtidos de pacientes com LCD apresentam maior exposição de PS em comparação com a forma LCL e isto contribui para desativação do macrófago favorecendo a replicação do parasita.

3.2 OBJETIVO GERAL

Avaliar a exposição de PS em cepas de *L. amazonensis* de pacientes com LCL e LCD e qual o papel imunossupressor dessa molécula durante a infecção de macrófagos.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

1. Comparar a exposição de PS na superfície das amastigotas de *L. amazonensis* obtidos de pacientes com LCL e LCD;
2. Avaliar a carga parasitária e mediadores liberados no sobrenadante durante a infecção in vitro de macrófagos com isolados de *L. amazonensis* de pacientes com LCL e LCD;
3. Avaliar a morfometria dos vacúolos induzidos *L. amazonensis* obtidos de pacientes com LCL e LCD e sua relação com exposição de PS;
4. Comparar a exposição de PS na superfície das amastigotas de *L. amazonensis* isolados de camundongos Balb/c selvagem e nude;
5. Associar a exposição de PS a parâmetros clínicos da LCD.

3. MANUSCRITOS

3.1 Manuscrito I

Mimetismo Apoptótico como Possível Mecanismo Imunopatogênico da Leishmaniose Cutânea Difusa

Nesta revisão abordamos as consequências do reconhecimento de células apoptóticas e o papel da exposição de fosfatidilserina em amastigotas de *Leishmania amazonensis* na leishmaniose cutânea difusa.

Resumo: A exposição e o reconhecimento de fosfatidilserina (PS) na superfície de células apoptóticas fagocitadas por macrófagos atua como mecanismo de desativação de macrófagos por uma via dependente de TGF- β 1 e PGE2. Semelhante ao que ocorre durante o reconhecimento e fagocitose de células apoptóticas, formas amastigotas de *L. amazonensis* expõem PS em sua superfície, em um mecanismo chamado “Mimetismo Apoptótico” que resulta na desativação do macrófago e possibilita o estabelecimento e manutenção da infecção. Nesse contexto, o estudo da exposição de PS nos isolados de *L. amazonensis* de pacientes com LCD pode contribuir na elucidação de mecanismos supressores nessa patologia.

4.2 Manuscrito II

Exposure of Phosphatidylserine on *Leishmania amazonensis* isolates is associated with Diffuse cutaneous Leishmaniasis and parasite infectivity

Este trabalho compara a exposição de fosfatidilserina em isolados de *Leishmania amazonensis* de pacientes com Leishmaniose Cutânea Localizada (LCL) e LCD e seu papel durante a infecção de macrófagos murinos.

Resumo resultados: Macrófagos peritoneais de camundongos F1(BALB/c x C57BL/6) foram infectados com os diferentes isolados obtidos de pacientes com LCD e LCL. Os isolados obtidos de pacientes com LCD apresentaram maior exposição de PS do que os isolados de pacientes com LCL após 24 horas de infecção. Em seguida, avaliamos a infectividade dos diferentes isolados. As amastigotas de pacientes com LCD apresentaram maior porcentagem de macrófagos infectados e índice de infecção, quando comparados com amastigotas de pacientes com LCL. Quanto ao mecanismo, o grupo infectado com os isolados de pacientes com LCD apresentou um aumento entre as razões TGF/TNF e IL-10/TNF quando comparado ao grupo LCL. A análise de correlação revelou que a porcentagem de macrófagos infectados, o índice de infecção, os índices de TGF/TNF e IL-10/TNF bem como o tamanho dos vacúolos induzidos pelos diferentes isolados estão diretamente associados a maior exposição de PS. Além disso, o número de lesões e o tempo de doença dos pacientes com LCD também estão associados á exposição de PS.

4.3 Manuscrito III

Subversion of Immunity by *Leishmania amazonensis* parasites: Possible role of phosphatidylserine as a main regulator

Nesta revisão nós discutimos o possível papel da exposição de fosfatidilserina por *Leishmania amazonensis* como um regulador principal do mecanismo de subverter o sistema imune, em diferentes etapas durante a infecção.

Resumo da revisão: Células T ativadas por antígenos de *Leishmania* exibem um fenótipo patogênica caracterizada pela produção de citocinas não polarizadas. Estas citocinas são capazes de ativar as duas vias intracelulares de macrófagos dependentes de iNOS e arginase. Neste ambiente, o estresse causado pelo óxido nítrico derivado do iNOS desencadeia altos níveis de exposição de PS na superfície das amastigotas de *Leishmania amazonensis*. Simultaneamente, arginase I também é induzida aumentando os níveis de poliamina intracelular. As poliaminas são indispensáveis para a sobrevivência e proliferação de parasitas, mantendo-os, mesmo na presença de NO. Após a ruptura do macrófago, amastigotas expressando elevados níveis de PS (PS^{HIGH}) são liberadas, sendo capazes de infectar novas células hospedeiras e de propagar os sinais anti-inflamatórios derivados do reconhecimento PS.

5. Parte II

5.1 HIPÓTESE

Arginase, ornitina descarboxilase e PGE2 estão envolvidas com a supressão da resposta imune em pacientes com Leishmaniose cutânea difusa.

5.2 OBJETIVO GERAL

Avaliar o papel dos mediadores lipídicos e as enzimas da via biossintética das poliaminas e prostaglandinas na resposta inflamatória de pacientes com Leishmaniose cutânea difusa

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

1. Comparar a expressão dos marcadores associados com a resposta inflamatória (Arginase, ODC, PGE2, TGF- β , TNF- α , IL-12, MCP-1, CXCL10) no soro de pacientes com LCD e seus parentes da área endêmica bem como soro de pacientes com LCL;
2. Avaliar mRNA de marcadores associados com a resposta inflamatória (Arginase, fosfolipaseA2, COX2, PGE2 sintase, espermina sintase e espermidina sintase) em lesões de pacientes com LCD através de nanostring;
3. Valiar marcadores associados com a resposta inflamatória (Arginase, ODC, COX-2) em lesões de pacientes com LCD através de imunohistoquímica;
4. Avaliar do papel do nor-NOHA (inibidor da arginase) e do DFMO (inibidor da ODC) *in vitro* na infecção de macrófagos humanos com *Leishmania amazonensis*.

5.3 Manuscrito IV

Polyamines and Prostaglandin E₂ biosynthetic pathway suppresses inflammatory response in Diffuse Cutaneous Leishmaniasis

Jaqueline França-Costa ^{a,b}, Johan Van Weyenbergh^a, Viviane Boaventura ^{a,b}, Nívea Luz ^{a,b}, Hayna Malta ^{a,b}, Murilo Cezar Souza Oliveira ^{a,b}, Daniela Conceição Santos de Campos ^{a,b}, Ana Cristina Saldanha ^{a,c}, Washington Luiz ^{a,b}, Patrícia T. Bozza ^d, Manoel Barral Netto ^{a,b,e}, Aldina Barral ^{a,b,e}, Jackson M. Costa ^{a,b}, Valeria M. Borges ^{a,b,e} #

Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz/FIOCRUZ-BA, Salvador, Brasil;

Faculdade de Medicina, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Brasil;

Universidade Federal do Maranhão, UFMA, Maranhão, Brasil;

Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brasil

Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Investigação em Imunologia (iii - INCT), Brasil

Address correspondence and reprint requests to Dr. Valéria Borges. Rua Waldemar Falcão, 121, Candeal, CEP 40295-001. Salvador, Bahia, Brazil. Phone: 55-71-31762249. Fax: 55-71-31762279 E-mail: vborges@bahia.fiocruz.br.

Abstract

Diffuse Cutaneous Leishmaniasis (DCL) is a rare clinical chronic manifestation of tegumentary leishmaniasis caused by *Leishmania amazonensis*. DCL is characterized by an inefficient parasite-specific cellular response and heavily parasited macrophages and poses an important challenge to treatment. It has been demonstrated that lipid mediators and enzymes associated with the polyamines biosynthetic pathway, such as arginase I and ornithine decarboxylase (ODC) plays a crucial role in *Leishmania* infection. It has been shown that murine macrophage infection by *L. amazonensis* increases arginase I, TGF- β and PGE₂ contributing to parasite proliferation. In addition, experimental arginase inhibition is able to control *Leishmania* proliferation. However, whether these mediators participate in DCL pathogenesis remains unknown. Here, we compare arginase, ODC, PGE, cytokines and chemokines in plasma and lesions from LCL and DCL patients. Moreover we evaluated arginase and ODC inhibition in human macrophages infected with *L. amazonensis*. Investigating the involvement of lipid mediators and the polyamines pathway with inflammatory response in DCL pathogenesis can favor the development of new strategies for therapeutic intervention.

Keywords

Leishmania amazonensis; Diffuse cutaneous leishmaniasis; arginase I, ODC, TGF- β and Prostaglandin E₂.

Introduction

Cutaneous leishmaniasis presents a wide spectrum of clinical manifestations varying from hyper-responsive mucocutaneous leishmaniasis (MCL) and hypo-responsive (DCL) and with most cases being of self-healing localized cutaneous leishmaniasis (LCL) with moderate cell-mediated immune response [1,2]. Diffuse cutaneous leishmaniasis (DCL) is a rare clinical manifestation of human leishmaniasis and is characterized by chronic evolution of the disease, several nonulcerated nodular skin lesions affecting large areas of the body, predominance of macrophage cells in the lesions, uncontrolled parasite proliferation inside macrophages, absence or reduction of the cellular immune effectivity response against parasite antigens resulting in negative responses of the Intradermo Reaction of Montenegro (IRM) and resistance to most therapeutic strategies [3,4]. The molecular mechanisms underlying DCL pathogenesis are still unclear and there is no efficient treatment available.

Regarding immune response from DCL patients, it is well characterized in lesions or restimulated peripheral blood mononuclear cells that whilst there is an increase in anti-inflammatory cytokines [2,5], pro-inflammatory cytokines and chemokines are decreased [6], indicating that immunosuppression might be involved with inflammatory balance. However, the effective mechanisms responsible for this hiporesponsiveness are not yet clarified. In this context, the arginase is emerging as a critical mechanism of immune regulation in *Leishmania* infection. This enzyme metabolizes L-arginine into urea and L-ornithine, the substrate used for ornithine decarboxylase (ODC) to produce polyamines that are crucial for the parasite replication [7, 8, 9].

It has been demonstrated that arginase is important for experimental *Leishmania* infection since macrophages treated with LOHA (L-hydroxyl arginine), an arginase inhibitor, had parasite load impressive decreased [10]. Recently was showed that arginase is increased in lesions from patients with LCL and might be important for pathogenesis of the disease [11], proving this is also an important route for *Leishmania* human infection.

Several groups have proven that others inhibitors for polyamines biosynthetic enzymes are efficient in control Leishmania replication *in vitro* and *in vivo* for mice model. DFMO, a potent ODC inhibitor, effectively inhibited *L. donovani* [12] and *L. infantum* [13] promastigotes growth in culture. ODC deficiency also affects the growth of the intracellular amastigote form since mice infected with ODC-knockout strains of *L. donovani* had a decreased parasite load on the liver and spleen when compared with wild-type [14]. Moreover, knockout strains of *Leishmania amazonensis*, *L. major* and *L. donovani* promastigotes deficient for arginase or ODC were all demonstrated to be auxotrophic for polyamines [15,16,17,18], showing that polyamines biosynthetic enzymes could be used as potential drugs targets for Leishmania.

Arginase competes with iNOS (inducible nitric oxide synthetase) for the same substrate, L-arginine. Which enzyme will preferentially be activated is determined by the profile of molecules in microenvironment. When INF- γ , IL-1, IL-12 or TNF- α prevail iNOS is rather activated triggering NO production, that has a potent Leishmania microbicidal [19,20,21]. In another hand, anti-inflammatory cytokines as IL-4, IL-13, IL-10 and TGF- β as well some lipid mediators like PGE₂ up regulate the enzyme arginase [22]. Phospholipase A₁ cleaves arachidonic acid (AA) from plasma membrane and it is converted by COX1 or COX2 into PGH₂, which is converted to PGD, PGE and PGF, by the action of their respective synthase.

It has been demonstrated that *L. amazonensis* is able to increase arginase I, TGF- β and prostaglandin E₂ contributing to parasite proliferation enhancement in murine macrophage [23, 24, 25] and the outcome of Leishmania infection depends on the inflammatory response balance. Nevertheless, the relevance of these mediators for DCL pathogenesis remains unknown. Therefore, in this study we evaluate not only the cytokines and chemokines, but we attempt to the lipid mediators, arginase, ODC and the others polyamines biosynthetic enzymes to better understand the immune and inflammatory response in human Leishmania infection. Investigating the involvement of arginase, enzymes from polyamines biosynthetic

pathway and lipid mediators associated with inflammatory response in DCL pathogenesis can favor the development of new strategies for therapeutic intervention.

Materials and methods

Ethics Statement

Written informed consent was obtained from all participants or legal guardians and all data analyzed were anonymized. All clinical investigations were conducted according to the principles expressed in the Declaration of Helsinki. The project was approved by the institutional review board from Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, FIOCRUZ - BA approved the project license number 136/2007.

Epidemiological and clinical evaluations

Epidemiological and clinical characteristics of the patients with LCL and DCL are presented in Table 1. DCL patient's data were obtained between 1980 and 1990 [5,26] and were studied at the University of Bahia Hospital and in the Hospital dos Servidores do Estado do Maranhão, a state located in the Northeast of Brazil and were followed by Dr. Jackson Costa [27]. All DCL patients were diagnosed following previously described criteria [28,29]. DCL patients presented prolonged natural history of their disease, negative skin response to leishmanin, intense number of parasited macrophages, multiple nodular lesions in all over the skin and chronic evolution of the disease, with several remissions. LCL patients were from State of Bahia, Brazil and were followed by Dr. Aldina Barral. Individuals with LCL presented a typical skin ulcer, positive skin test response to leishmanin (Montenegro test), duration of disease up to two months and presence of single or few ulcerated lesions [30]. Relatives were chosen as controls to ensure that environmental factors would be as similar as possible between study groups. They had careful physical examinations and showed no

cutaneous lesions and had no prior history of cutaneous leishmaniasis. Leishmanin skin test-reactive (LST+) and nonreactive (LST-) controls were identified among 49 family members of DCL patients. Since there were no differences for any LST + and LST- data, in all the graphs this group appears only as endemic control (EC).

Plasma and biopsy sampling

Individuals were examined and their blood samples (10 mL) were collected for serological experiments. Twelve DCL, twenty nine LCL and 49 family members of DCL patients plasma samples were studied. Skin biopsies (3 or 4 mm) were embedded in a cryopreservation resin, snap-frozen and stored in liquid nitrogen. We have studied lesions from 7 patients with LCL for less than two months (early LCL) and 3 biopsies of DCL patients. All DCL and LCL patients had active disease when plasma or cutaneous biopsies were collected.

Inflammatory mediators Measurement

Plasma levels of arginase, ODC and TGF were measured using ELISA according to the manufacturer's instructions (Hycult Biotech, Wuhan EIAAB science co. and R&D Systems, respectively). Total TGF- β_1 was measured in plasma after acidification to activate latent TGF- β_1 followed by neutralization. Interleukin (IL)-10, IL-12, IFN- γ , MCP-1, CXCL-10 and TNF- α plasma levels were measured using de Cytometric Bead Array - CBA Human Inflammatory kit (BD Biosciences Pharmingen) according to the manufacturer's protocol. The flow cytometry assay was performed and analyzed by a single operator. PGE2 production was measured using a specific enzyme immunoassay (PGE2 EIA kit, Cayman Chemical, Ann Arbor, MI) according to manufacturer's instructions. The concentrations of the arginase, ODC, PGE, LTB4, TGF- β_1 , IL-10, IL-12, IFN- γ , MCP-1, CXCL-10 and TNF- α were determined by comparison with a curve generated from each inflammatory mediator standard, respectively. The same protocols were used for in vitro assay to measure TGF, PGE, TNF and IL-12 in supernatant from human macrophage infected with *Leishmania amazonensis*.

Measurement of arginase enzymatic activity

Urea is a product of L-arginine hydrolysis by arginase; therefore, arginase activity was measured by colorimetric assay for the detection of urea in plasma samples. Accordingly, 50 ul 10 mM MnCl₂/50 mM Tris/HCl, pH 7.4 was added, and the plasma was activated at 55°C for 10 min. Arginine hydrolysis was performed at 37°C for 60 min by mixing 50 ul 0.5 M L-arginine (Sigma-Aldrich) pH 9.7. The reaction was stopped by the addition of 400 ul H₂SO₄/H₃PO₄/H₂O (1:3:7, v/v/v). For quantification of urea produced, 25 ul 9% a-isonitrosopropiophenone (ISPF, dissolved in 100% ethanol, Sigma) was added and incubated for 45 min at 100°C. A standard curve was obtained by adding 100ul (1, 2, 5, 10, 15, 20 mg) urea (J. T. Baker, Phillipsburg, NJ) to 400 ul acidic mixture and 25 ul a-isonitrosopropiophenone. After 10 min in the dark, the optical density (OD) was measured at 550 nm. One unit of enzyme activity is defined as the amount of enzyme that catalyzes the formation of 1 umol of urea per min.

Immunohistochemistry

Paraffin sections were cleared in xylene, rehydrated in graded ethanol (100–30%) and distilled water, and subjected to antigen retrieval by boiling in citrate buffer for 30 min. After cooling to room temperature in citrate buffer, sections were incubated in 3% hydrogen peroxide (H₂ O₂) for 20 min to inhibit endogenous peroxidase activity, and then with 3% skimmed milk in PBS for 60 min to inhibit nonspecific reactions. The sections were incubated overnight at 4 °C in a humidified chamber with primary antibodies against human Arginase I (2 ug/ml; 1:100 - Santa Cruz Biotechnology, INC), ODC (4 ug/ml; 1:100 - Cayman Chemical, Ann Arbor, MI), COX-2 (2 ug/ml; 1:50 - Cayman Chemical, Ann Arbor, MI) and. The samples were then rinsed in PBS and incubated with biotinylated secondary antibody for 30 min at room temperature followed by streptavidine-HRP for 30 min. Positive reactions

were visualized with 3,30-diaminobenzidine (DAKO, Cambridge, UK). Non-immunized mouse or rabbit IgG served as negative controls. Sections were counterstained lightly with hematoxylin. Digital images were obtained from fields of 400x magnification, captured using Nikon E600 microscope and Olympus Q-Color 1 digital camera with Image Pro Plus program.

nCounter™ analysis

Total RNA was extracted from biopsy from lesions of LCL (n=7) and DCL (n=4) patients using Trizol, according to the manufacturer's protocol, followed by an additional purification step using RNeasy columns (QIAGEN Benelux B.V., Venlo, the Netherlands). nCounter™ (NanoString Technologies, Seattle, United States) analysis was performed at the VIB MicroArray Facility (Leuven, Belgium), based on direct molecular bar-coding of target RNA transcripts and digital detection (Geiss et al., 2008; Moens et al., 2012). Through the use of colour-coded probe pairs and direct hybridization, without the use of reverse transcriptase nor amplification, host specific cellular genes, including housekeeping genes for normalization, were quantified at the femtomolar range (ARG I; ODC; EP1; EP2; EP3; EP4; PLA1 A; PLA2G4A; PTGS1; PTGS2; PGES; SMS; SRM; GUSB; G6PD; GAPDH; HPRT1; CD45).

Cell culture

Human blood was obtained from healthy volunteers from Hemocentro do Estado da Bahia, BA, Brazil. Human monocytes were isolated by centrifugation using Phicol medium according to the manufacturer's instructions (Robbins Scientific Corporation, Sunnyvale, CA, USA). Peripheral Blood Mononuclear Cells -PBMC were isolated by passage over Ficoll-Hypaque gradients (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Briefly, the blood was centrifuged for 30 min at 300 g at room temperature. PBMC were washed three times, resuspended at a concentration of 5×10^6 cells per ml in RPMI-1640 medium (Invitrogen, Carlsbad, CA,

USA), plated in a 24-well tissue culture plate (Corning Incorporation, Costar, NY, USA), and incubated at 37°C and 5% CO₂ for 30 min. Nonadherent cells were removed; adherent cells were cultured in RPMI 1640 medium supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS-Hyclone, Ogden, UT, USA), 2 mM/ml L-glutamine, 100 U/ml penicillin and 100 µg/ml streptomycin (all from Invitrogen) for 7 days to macrophage differentiation.

Leishmania culture and macrophage infection

The parasite used in these experiments was obtained by puncture and aspiration after previous asepsis and anesthesia of nodular lesions from a DCL patient. *L. amazonensis* (MHOM/BR/87/BA336) promastigotes were cultured at 25°C in Schneider medium, supplemented with 10% SBF, 2 mM/ml L-glutamine, 100 U/ml penicillin, and 100 µg/ml streptomycin (all from Invitrogen, Carlsbad, CA), pH 7.2, at 25°C until they reached the stationary phase. Macrophages, previously differentiated, were infected with *L. amazonensis* in the early stationary phase at a parasite-to-cell ratio of 6:1. After 4 h incubation at 34°C, free parasites were removed by extensive washing with PBS to remove extracellular parasites and arginase (nor-NOHA - 10µg/ml) or ODC inhibitors (DFMO - 0,5 mM) were added into cultures. After 72 h post-infection, infected macrophage monolayers were extensively washed, and medium was replaced by 0.5 ml of Schneider medium (Life Technologies), supplemented with 10% FBS, 100 U/ml penicillin and 100 µg/ml streptomycin (all from Invitrogen) (Gomes et al. 2000). Monolayers were cultured at 26°C for additional 4 days. Intracellular load of *L. amazonensis* amastigotes was estimated by production of proliferating extracellular motile promastigotes in Schneider medium (Gomes et al. 2000). Alternatively, cultures after 24 or 72 h post-infection Gomes et al. 2000 were fixed in 100% methanol and stained with Giemsa (Merck). The percentage of infected macrophages and the infectivity index (percentage of infected macrophages x average number of amastigotes per macrophage)

were determined by randomly counting at least 200 macrophages per slide in light microscope, using the immersion objective (100X).

Statistical analysis

Data are reported as median of representative experiments and were analyzed using GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software Inc.). For the ordinal variables, differences between groups were calculated using nonparametric Kruskal-Wallis with two-tailed Dunn's multiple comparison post test and nonparametric Mann-Whitney unpaired-t tests for two groups comparison. The chi-square test was used to compare differences in categorized variables. Spearman test was used to verify the significance in the correlations between arginase and arginase activity, ODC, TGF- β , PGE₂, TNF, IL-12, MCP-1, IFN- γ and CXCL-10. Non-linear curve fit was also plotted to illustrate the general trend of the correlations. Linear regression was used to analyze nanostring data. The r and p values are plotted in each graph. Differences were considered statistically significant at $p \leq 0.05$.

Results

3.1 Arginase I and inflammatory mediators in plasma from DCL patients

Parasite *Leishmania* depends on the arginase to survive and proliferate inside macrophage [31] and in axenic culture [16]. Considering that lesions from DCL patients have several macrophages heavily parasitized we firstly measured arginase in plasma from DCL patients. We showed that DCL plasma had the highest arginase I levels in comparison to LCL or endemic controls (EC) (Fig1A). It is interesting to note although LCL is less severe than DCL, arginase I was also increased at least fivefold in LCL plasma compared to EC. Besides the arginase protein, we evaluated the enzyme activity and also DCL patients presented higher

arginase activity (69.850 U/ml) than in LCL (36.602 U/ml) and EC (28.971 U/ml) (data not shown). L-ornithine, the arginase product, can be used for two different enzymes, ODC and ATC, resulting in polyamines or proline, respectively [32]. In order to check if the subsequent polyamine biosynthetic enzyme was also modulated we compared ODC levels between the groups. Indeed, ornithine decarboxylase was augmented in DCL plasma when compared with groups, EC and LCL (Fig.1B).

Next we investigated the mediators known to modulate the outcome of L-arginine enzymes pathway. The PGE₂, an important lipid mediator involved with *Leishmania amazonensis* surveillance, had higher levels in DCL and LCL when comparing to EC. No difference was detected between DCL and LCL plasma (Fig.1C). After that, we evaluated the anti-inflammatory cytokine TGF- β , known by deactivating macrophages making them permissive to *Leishmania* infection. DCL plasma showed increased levels of TGF- β compared to LCL plasma patients (Fig.1D).

Further we examined the pro-inflammatory mediators. It was observed that while IL-12 (Fig.1I) and MCP-1 (Fig.1K) decreased in DCL compared with both LCL and EC group, TNF- α (Fig.1J) and CXCL-10 (Fig.1L) were reduced in relation just to LCL.

To check whether arginase production was linked with inflammatory mediator profile, we applied correlation statistics tests between these variables. Arginase had positive correlation with anti-inflammatory mediators: arginase activity (Fig. 1E, $r = 0.497$, $p = 0.003$); ODC (Fig. 1E, $r = 0.559$, $p = 0.0003$); PGE₂ (Fig. 1E, $r = 0.455$, $p = 0.006$); TGF (Fig. 1E, $r = 0.599$, $p = 0.0001$) and a negative correlation with pro-inflammatory mediators: IL-12 (Fig. 1E, $r = -0.633$, $p = 0.001$); TNF (Fig. 1E, $r = -0.487$, $p = 0.001$); CXCL-10 (Fig. 1E, $r = -0.512$, $p = 0.002$), except MCP-1 (Fig. 1E, $r = -0.048$, $p = 0.771$). These data emphasize that a predominant anti-inflammatory and reduced pro-inflammatory phenotype be associated with high arginase levels and that systemic release of inflammatory mediators reflect the immunosuppression observed in DCL patients.

3.2 Arginase and PGE2 pathway expression is increased in DCL lesions

In order to check whether arginase, ODC and PGE2 were also expressed in situ, we performed immunohistochemistry in lesions from DCL and LCL patients. Arginase and ODC expression were consistently higher in DCL lesions (n=3) than in LCL samples (n=3), as shown in Fig. 2A, 2B, 2D and 2E. For PGE2 analysis, we evaluated an enzyme involved with its synthesis, COX-2. Figure 2C shows clearly that DCL lesions had an expressive increase in COX2 expression compared with LCL lesions (Figure 2F). No reactivity was detected using an isotype control antibody (Data not Shown).

To validate the role of arginase and PGE2 pathways in LTA, we performed a comprehensive in situ analysis of all known arginase pathway enzymes genes, including ODC, OAZ, spermidine synthetase, spermine synthetase and a selection of specific cellular genes related with PGE₂ signaling, i.e., PGES, PLA2, PTGS1, PTGS2, the receptors EP1, EP2, EP3 and EP4 in DCL (n=4) and LCL (n=7) biopsies, as well as control skin biopsies. Using nCounter analysis (Geiss et al., 2008; Moens et al., 2012), mRNA levels of selected genes were quantified and normalized to pan-leukocyte marker CD45 mRNA, to correct for differential levels of leukocyte infiltration between patient biopsies. DCL cells showed significantly increased mRNA levels of arginase when compared to LCL, confirming the enzyme expression in plasma and the lesions by ELISA and immunohistochemistry, respectively (Supplemental figure 1A). However, ODC mRNA levels were not significantly different between both pathologies (Supplemental figure 1B). Regarding cytokines, mRNA levels of IL-4 and IL-10 genes were also significantly increased, whereas TNF mRNA was decreased in DCL in situ (Supplemental figure 2A, 2B and 2C).

PGE2 binds to several cellular receptors, with different outcomes for inflammatory response. Among the four receptors we analyzed, only EP2 mRNA was significantly overexpressed in DCL vs. LCL biopsies (Figure I). Upstream of PGE, phospholipase A1 (PLA1), is the crucial

enzyme for arachidonic acid production. Likewise, PLA1 mRNA was significantly higher in DCL vs. LCL lesions (Data not shown).

Next, we assessed the in situ relationship between arginase gene expression and prostaglandins, as well as polyamine biosynthetic enzymes by linear regression analyses. As shown in Fig. 2G, arginase mRNA levels are positively correlated to PLA2G4A ($r^2=0,505$; $p=0.01$), PGES ($r^2=0,444$; $p=0.02$), PTGS1 ($r^2=0,807$; $p=0.0002$), PTGS2 ($r^2=0,396$; $p=0.03$), all of them enzymes in the prostaglandin and also to SMS ($r^2=0,605$; $p=0,004$) and SRM ($r^2=0,645$; $p=0,002$), the polyamine enzymes (Figure 2H). Accordingly, these data substantiate that arginase plays a central role in modulating essential enzymes of both prostaglandin and polyamines pathways, thus offering an environment extremely permissive to *Leishmania* establishment.

3.3 Arginase and ODC inhibition control *Leishmania amazonensis* infection in human macrophages

To determine whether arginase could alter the course of *Leishmania* infection, human monocyte-derived macrophages from health volunteers were infected with *Leishmania amazonensis*, treated with arginase (NOHA- N ω -hydroxy-L- arginine) or ODC (DFMO) inhibitors and had parasite burden evaluated through parasite viability assay. Parasite load was similar at 24 h post-infection for all groups, indicating the drugs used in this study did not affect the parasite internalization. However, the control group, macrophages infected with *Leishmania* plus medium only, increased the number of parasites 72 hours post infection, whereas the groups treated with NOHA or DFMO the amount of viable parasites is much lower than in Ctrl group, suggesting that treatment inhibits parasite replication (Figure 3A). In addition, the photomicrography at 72 h pos infection confirmed that NOHA (Figure 3B2) and DFMO (Figure 3B3) were able to control parasite proliferation more efficiently than control

group (Figure 3B1), corroborating with results obtained by optical microscopy analysis, for both the percentage of infected macrophages and the infectivity index (Data not Shown).

Next, we measured essential mediators for Leishmania survival and proliferation in human macrophage culture supernatants at 24h. First, we observed that NOHA or DFMO treatment decreased TGF (Figure 3C) and PGE (Figure 3D) production at least by half when compared with the control group. Subsequently, we measured key cytokines controlling Leishmania infection in macrophage supernatants. NOHA-treated cells displayed a three-fold increase in both TNF (Figure 3E) and IL-12 levels (Figure 3F), whereas DFMO-treated cells did not alter cytokine levels, as compared to untreated cells. Thus, arginase and ODC inhibitors modulate inflammatory mediators and may be regarded as promising targets to inhibit Leishmania proliferation in infected human macrophages.

Discussion

Previous reports identified arginase as a key molecule in susceptibility to leishmaniasis [11,33]. However, data concerning its relationship to polyamine biosynthetic enzymes, PGE2 and the inflammatory response are lacking. Our findings lead us to propose a straightforward pathway by which TGF-beta stimulates COX-2/PGE2, which in turn increases the polyamine biosynthesis pathway in DCL lesions, thus resulting in a permissive microenvironment for Leishmania proliferation and progression to chronic disease.

Plasma from DCL patients displayed higher expression and activity levels of arginase when compared to LCL. High levels of arginase activity has been reported in several other human pathologies in plasma or saliva as useful biological biomarkers [34, 35, 36], in some cases also being an indicator of disease progression [37,38] and in others parasitic diseases [67], but the mechanism by which arginase is released remained unclear. Regardless of its source, the data point out that arginase levels in plasma is unbalanced in DCL and LCL patients when compared with health endemic control. Further, the relation between arginase level and clinical forms, allow us consider arginase as a biomarker for Leishmaniasis severity. In fact,

arginase is recently described as inflammatory biomarker associated with cardiovascular disease [39], obesity [40], asthma [41], psoriasis [42], and breast cancer [43, 44].

Hitherto, experimental murine models have shown that *Leishmania*-infected macrophages increase arginase expression and activity [10, 45]. Recently, increased arginase activity was demonstrated *in situ* in LCL lesions from Ethiopian patients [11] as well as plasma from visceral Leishmaniasis patients. The difference in arginase expression, plasma and lesions, could be induced by the parasite or can be a consequence of the host gene polymorphisms, as indicated for others pathologies [46, 47].

The arginase pathway is preferentially driven by the presence of anti-inflammatory mediators such as the lipid mediator PGE₂ [48] and TGF- β [31]. Though PGE₂ production between DCL and LCL patients had no differences in plasma, both forms had higher values compared with endemic control showing that PGE₂ might be relevant to cutaneous leishmaniasis. Prostaglandin E₂ has four G-protein-coupled E-prostanoid receptor, EP₁, EP₂, EP₃ and EP₄, which bind PGE₂ and trigger different signalling pathways inducing multiple effector functions, reflecting the ubiquitous functions of PGE₂ [49,50,51]. In fact, differences between DCL and LCL lesions were only detected for EP₂ mRNA levels. It has been shown that signaling of PGE₂ through EP₂ promotes Th₂ immune response [52] and suppression of microbicidal activity of alveolar macrophages through EP₂/EP₄ receptors, increases cAMP inhibiting the assembly and activation of p47phox [53].

Indeed, the potent immunomodulatory effects played by PGE₂ are ambiguous, depending on the profile of *in situ* mediators. It has been demonstrated that PGE₂ synergized with TNF- α induces high levels of IL-12 production by DCs [54], while TGF- β synergizes with PGE₂ blocking IFN- α and TNF secretion [55] therefore associated with suppression of host immune response [56, 57] and switching the Th₁ to Th₂ response [58,59]. Therefore, it seems PGE₂ from LCL plasma together with TNF and IL-12 support properly activation by immune system whilst in DCL patients, PGE together with TGF has opposite effects suppressing their

immunological response. In fact, arginase levels is up-regulate by anti-inflammatory mediators and down-regulate by pro-inflammatory mediators as shown by statistical correlation analysis, emphasizing that there indeed is an association between arginase expression and inflammatory mediators and it should also be decisive for the outcome of the clinical forms of cutaneous leishmaniasis.

Although unexpected, investigating plasma mediators in DCL patients with restricted tegumentary lesions is conceivable since these lesions should disseminate throughout the body by the hematogenic pathway and might leave metabolic traces of the inflammatory response in peripheral blood. In agreement with the literature, anti-inflammatory mediators in the lesions and in restimulated PBMC from DCL patients is also present in plasma [5, 60]. Interestingly, LCL with few lesions (2-6), also showed changes in inflammatory mediators, even when compared to endemic controls. This scenario in patients plasma is highly consistent with LCL and DCL clinical status and disease outcome, cure or persistence, respectively. Therefore it is feasible monitor the clinical status of patients by measurement of biomarkers in the blood, by a fast and less invasive manner that could be useful in targeting the most appropriate treatment.

Besides arginase, ODC, the subsequent downstream enzyme required for polyamine synthesis, was also enhanced in DCL vs. LCL plasma. Beyond ODC, L-ornithine can also be metabolized in proline by ornithine aminotransferase, which is related with collagen production. The increased expression of ODC is an indicative that arginase pathway is being diverted to the first step of polyamines biosynthesis. In addition, both arginase and ODC have also increased expression in DCL lesions compared to LCL indicating that there must be a difference in the amount of polyamines produced in situ. Indeed we also found through linear regression that arginase mRNA levels was increased in DCL lesions and is directly related to spermine and spermidine synthase mRNA levels, the two enzymes responsible for polyamine synthesis, spermine and spermidine respectively. Histological analysis of the DCL lesions

show heavily parasitized cells while in LCL lesions parasite is scarce [30]. So, the high expression of polyamines biosynthetic enzymes is possible contributing to the intense *Leishmania* proliferation in DCL patients.

Arginase was also directly related to phospholipaseA1, COX-1, COX2, and Prostaglandin E2 synthase, all enzymes involved with PGE2 syntheses. Arginase relation with prostaglandin biosynthetic pathway is enforced by difference in COX2 expression in situ between DCL and LCL lesions.

The expression of COX-2 is usually absent under basal conditions and induced by stimuli, such as growth factors and cytokines. TGF- β has been shown to induce COX-2/PGE2 expression in numerous epithelial cell types [61,62] and in peripheral blood lymphocytes [63] by suppressing degradation of COX-2 mRNA [64]. In addition, TGF enhances arginase activity in macrophages and hence increases polyamine release [65]. In agreement with the literature, our data show that both TGF and COX are increased in DCL and have a positive correlation with arginase, emphasizing that they should be involved in its production.

Macrophages are the major cells constituting the cellular infiltrate in lesions of DCL patients [26, 28]. Th2 cytokines induce alternative activation of macrophages, and a characteristic feature of this functional state is pronounced arginase activity, fail to produce NO and fail to control the intracellular replication of pathogens, including *Leishmania* [31,66,67]. Taken together, high expression of arginase, ODC, TGF, PGE, IL-4 and IL-10 in lesions or plasma from DCL patients support a functional phenotype for alternative activation of its macrophages. High arginase activity expressed by macrophages results in increased uptake and hydrolysis of extracellular L-arginine into the cells, thereby causing a reduction of L-arginine levels in the microenvironment. Arginase-mediated L-arginine deprivation has been shown to cause T cell hyporesponsiveness in a variety of pathological and physiological responses [68, 69, 70]. Regarding the inability to mount an efficient cell response against *Leishmania amazonensis*, it is tempting to speculate that in DCL, the increased arginase

expression by macrophages at the site of infection could result in a down modulation of the effectors functions of the infiltrating T cells. The reduced levels of L-arginine in the plasma from Human Visceral Leishmaniasis was associated with decreased expression levels of CD3 ζ in T cells [71], but whether this mechanism is indeed involved with DCL immunosuppression still needs to be further explored.

The inhibition of polyamines pathway enzymes are efficient for experimental Schistosomal [72], Toxoplasma and Trypanosoma infection [73] and have been used as treatment in patients with African sleep sickness [74]. It is well known that arginase and ODC inhibition directly affect the production of polyamines, which are critical for the survival and replication of the Leishmania [10, 14, 75]. Hence, in our model, control of Leishmania amazonensis replication in NOHA (arginase inhibitor) and DFMO (ODC inhibitor) treated macrophage could be by decrease in polyamines. Besides the expected polyamines, NOHA and DFMO appear to modulated inflammatory response. Arginase and ODC inhibition decreased TGF and PGE, which are crucial to parasite survive and proliferation by inhibiting activation of the macrophage [76]. Moreover, treatment with nor-NOHA increased TNF and IL-12, what could activate macrophage to produce nitric oxide (NO) [77], a potent Leishmanicidal molecule. In fact, NO release in NOHA group was augmented compared with untreated-group. Another possible explanation for NO increasing could be inhibition arginase activity by nor-NOHA improved availability of arginine, the substrate for iNOS. Accordingly, treatment with the arginase inhibitor nor-NOHA altered cytokine profile suggesting that functional status of macrophage was changed from classically for an alternative activation. Interesting, DFMO treatment did not increase pro-inflammatory cytokines or NO levels although proved to be as efficient as NOHA in controlling parasite load. These data proves that polyamines seem sufficient to support Leishmania amazonensis survival and multiplication and its inhibition is decisive for the outcome of infection. We cannot rule out that arginase and ODC inhibition affect the viability of Leishmania by reducing the availability of trypanothione, molecule

responsible for the elimination of free radicals in the parasite, since their synthesis depends on the spermidine, which is inhibited by the treatment with NOHA and DFMO. Therefore, arginase or ODC inhibition could act through a plethora of mechanism: reduction of polyamines, change in functional status of inflammatory response and parasite redox system, meaning that inhibition of the polyamines is also effective for the human leishmaniasis treatment.

Taken together, our data suggested that local and systemic release of prostaglandins and polyamines pathway in DCL might be implicated in the inability of these patients to mount an efficient immune response against *Leishmania* infection providing a favorable environmental for parasite replication and dissemination of the disease. Thereby, we conclude that Leishmaniasis pathology is strictly associated with inflammatory response unbalance and such pathways should be explored as novel targets for therapeutic intervention in the Leishmaniasis treatment.

Acknowledgements

This work was supported by grants from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB; grant # xxxxx/2009). We thank Drs Marcelo Barcinski and João Luiz Wanderley for valuable suggestions. We also thank Juqueline Rocha Cristal, Jorge Tolentino, Adorielze Leite and Andrezza Souza for technical and logistic support. Mr. JFC is recipient of a CAPES fellowship and NFL is recipient of a CNPq fellowship. VMB, JC, AB and MBN are senior investigators from CNPq.

Author contributions

Conceived and designed the experiments: JFC, AB, MBN, JC, VMB. Performed the experiments: JFC, VBO, MO, DC. Analyzed the data: JFC, VBO, AB, MBN, JC, VMB.

Contributed reagents/materials/analysis tools: ACS, JC, PTB, MBN, AB, VMB. Wrote the paper: JFC, AB, MBN, JC, VMB.

References

1. Castes M, Tapia FJ (1998) [Immunopathology of American tegumentary leishmaniasis]. *Acta Cient Venez* 49: 42-56.
2. Silveira FT, Lainson R, Corbett CE (2004) Clinical and immunopathological spectrum of American cutaneous leishmaniasis with special reference to the disease in Amazonian Brazil: a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 99: 239-251.
3. Convit J, Ulrich M (1993) Antigen-specific immunodeficiency and its relation to the spectrum of American cutaneous leishmaniasis. *Biol Res* 26: 159-166.
4. Costa JM, Saldanha AC, Silva CM, Branco Mdos R, Barral A, et al. (1995) Spontaneous regional healing of extensive skin lesions in diffuse cutaneous Leishmaniasis (DCL). *Rev Soc Bras Med Trop* 28: 45-47.
5. Bomfim G, Nascimento C, Costa J, Carvalho EM, Barral-Netto M, et al. (1996) Variation of cytokine patterns related to therapeutic response in diffuse cutaneous leishmaniasis. *Exp Parasitol* 84: 188-194.
6. Castes M, Trujillo D, Rojas ME, Fernandez CT, Araya L, et al. (1993) Serum levels of tumor necrosis factor in patients with American cutaneous leishmaniasis. *Biol Res* 26: 233-238.
7. Iniesta V, Carcelen J, Molano I, Peixoto PM, Redondo E, et al. (2005) Arginase I induction during *Leishmania major* infection mediates the development of disease. *Infect Immun* 73: 6085-6090.
8. Modolell M, Choi BS, Ryan RO, Hancock M, Titus RG, et al. (2009) Local suppression of T cell responses by arginase-induced L-arginine depletion in nonhealing leishmaniasis. *PLoS Negl Trop Dis* 3: e480.
9. Vincendeau P, Gobert AP, Daulouede S, Moynet D, Mossalayi MD (2003) Arginases in parasitic diseases. *Trends Parasitol* 19: 9-12.
10. Iniesta V, Gomez-Nieto LC, Corraliza I (2001) The inhibition of arginase by N(omega)-hydroxy-L-arginine controls the growth of *Leishmania* inside macrophages. *J Exp Med* 193: 777-784.
11. Abebe T, Hailu A, Woldeyes M, Mekonen W, Bilcha K, et al. (2012) Local increase of arginase activity in lesions of patients with cutaneous leishmaniasis in Ethiopia. *PLoS Negl Trop Dis* 6: e1684.
12. Kaur K, Emmett K, McCann PP, Sjoerdsma A, Ullman B (1986) Effects of DL-alpha-difluoromethylornithine on *Leishmania donovani* promastigotes. *J Protozool* 33: 518-521.
13. Balana-Fouce R, Ordonez D, Alunda JM (1989) Putrescine transport system in *Leishmania infantum* promastigotes. *Mol Biochem Parasitol* 35: 43-50.
14. Boitz JM, Yates PA, Kline C, Gaur U, Wilson ME, et al. (2009) *Leishmania donovani* ornithine decarboxylase is indispensable for parasite survival in the mammalian host. *Infect Immun* 77: 756-763.
15. Muleme HB, Reguera RM, Berard A, Azinwi R, Jia P, et al. (2009) Infection with arginase-deficient *Leishmania major* reveals a parasite number-dependent and cytokine-independent regulation of host cellular arginase activity and disease pathogenesis. *J Immunol* 183: 8068-8076.
16. Castilho-Martins EA, Laranjeira da Silva MF, dos Santos MG, Muxel SM, Floeter-Winter LM (2011) Axenic *Leishmania amazonensis* promastigotes sense both the external and internal arginine pool distinctly regulating the two transporter-coding genes. *PLoS One* 6: e27818.
17. Gilroy C, Olenyik T, Roberts SC, Ullman B Spermidine synthase is required for virulence of *Leishmania donovani*. *Infect Immun* 79: 2764-2769.
18. Jiang Y, Roberts SC, Jardim A, Carter NS, Shih S, et al. (1999) Ornithine decarboxylase gene deletion mutants of *Leishmania donovani*. *J Biol Chem* 274: 3781-3788.
19. Peranzoni E, Marigo I, Dolcetti L, Ugel S, Sonda N, et al. (2007) Role of arginine metabolism in immunity and immunopathology. *Immunobiology* 212: 795-812.
20. Bogdan C, Donhauser N, Doring R, Rollinghoff M, Diefenbach A, et al. (2000) Fibroblasts as host cells in latent leishmaniasis. *J Exp Med* 191: 2121-2130.
21. Brosnan CF, Battistini L, Raine CS, Dickson DW, Casadevall A, et al. (1994) Reactive nitrogen intermediates in human neuropathology: an overview. *Dev Neurosci* 16: 152-161.
22. Ochoa AC, Zea AH, Hernandez C, Rodriguez PC (2007) Arginase, prostaglandins, and myeloid-derived suppressor cells in renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 13: 721s-726s.
23. Barral-Netto M, Barral A, Brownell CE, Skeiky YA, Ellingsworth LR, et al. (1992) Transforming growth factor-beta in leishmanial infection: a parasite escape mechanism. *Science* 257: 545-548.
24. Guimaraes ET, Santos LA, Ribeiro dos Santos R, Teixeira MM, dos Santos WL, et al. (2006) Role of interleukin-4 and prostaglandin E2 in *Leishmania amazonensis* infection of BALB/c mice. *Microbes Infect* 8: 1219-1226.
25. Lacerda DI, Cysne-Finkelstein L, Nunes MP, De-Luca PM, Genestra Mda S, et al. Kinetoplastid membrane protein-11 exacerbates infection with *Leishmania amazonensis* in murine macrophages. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 107: 238-245.

26. Barral A, Costa JM, Bittencourt AL, Barral-Netto M, Carvalho EM (1995) Polar and subpolar diffuse cutaneous leishmaniasis in Brazil: clinical and immunopathologic aspects. *Int J Dermatol* 34: 474-479.
27. Costa JM, Saldanha AC, de Melo e Silva AC, Serra Neto A, Galvao CE, et al. (1992) [The current status of diffuse cutaneous leishmaniasis (DCL) in the state of Maranhao. II. The epidemiological and clinico-evolutionary aspects]. *Rev Soc Bras Med Trop* 25: 115-123.
28. Convit J, Pinaridi ME, Rondon AJ (1972) Diffuse cutaneous leishmaniasis: a disease due to an immunological defect of the host. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 66: 603-610.
29. Convit J, Ulrich M, Fernandez CT, Tapia FJ, Caceres-Dittmar G, et al. (1993) The clinical and immunological spectrum of American cutaneous leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 87: 444-448.
30. Barral A, Pedral-Sampaio D, Grimaldi Junior G, Momen H, McMahon-Pratt D, et al. (1991) Leishmaniasis in Bahia, Brazil: evidence that *Leishmania amazonensis* produces a wide spectrum of clinical disease. *Am J Trop Med Hyg* 44: 536-546.
31. Iniesta V, Gomez-Nieto LC, Molano I, Mohedano A, Carcelen J, et al. (2002) Arginase I induction in macrophages, triggered by Th2-type cytokines, supports the growth of intracellular *Leishmania* parasites. *Parasite Immunol* 24: 113-118.
32. Colotti G, Ilari A (2011) Polyamine metabolism in *Leishmania*: from arginine to trypanothione. *Amino Acids* 40: 269-285.
33. Takele Y, Abebe T, Weldegebreal T, Hailu A, Hailu W, et al. (2013) Arginase activity in the blood of patients with visceral leishmaniasis and HIV infection. *PLoS Negl Trop Dis* 7: e1977.
34. Eleftheriadis T, Liakopoulos V, Antoniadi G, Stefanidis I, Galaktidou G (2011) Arginase type I as a marker of coronary heart disease in hemodialysis patients. *Int Urol Nephrol* 43: 1187-1194.
35. Ozer L, Elgun S, Ozdemir B, Pervane B, Ozmeric N (2011) Arginine-nitric oxide-polyamine metabolism in periodontal disease. *J Periodontol* 82: 320-328.
36. Sippel TR, White J, Nag K, Tsvankin V, Klaassen M, et al. (2011) Neutrophil degranulation and immunosuppression in patients with GBM: restoration of cellular immune function by targeting arginase I. *Clin Cancer Res* 17: 6992-7002.
37. Cloke TE, Garvey L, Choi BS, Abebe T, Hailu A, et al. (2010) Increased level of arginase activity correlates with disease severity in HIV-seropositive patients. *J Infect Dis* 202: 374-385.
38. Elgun S, Kumbasar H (2000) Increased serum arginase activity in depressed patients. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 24: 227-232.
39. Tektas AK, Uslu S, Yalcin AU, Sahin G, Temiz G, et al. (2012) Effects of lipoprotein-associated phospholipase A2 on arginase/nitric oxide pathway in hemodialysis patients. *Ren Fail* 34: 738-743.
40. Kim OY, Lee SM, Chung JH, Do HJ, Moon J, et al. (2012) Arginase I and the very low-density lipoprotein receptor are associated with phenotypic biomarkers for obesity. *Nutrition* 28: 635-639.
41. North ML, Khanna N, Marsden PA, Grasmann H, Scott JA (2009) Functionally important role for arginase 1 in the airway hyperresponsiveness of asthma. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 296: L911-920.
42. Bruch-Gerharz D, Schnorr O, Suschek C, Beck KF, Pfeilschifter J, et al. (2003) Arginase 1 overexpression in psoriasis: limitation of inducible nitric oxide synthase activity as a molecular mechanism for keratinocyte hyperproliferation. *Am J Pathol* 162: 203-211.
43. Polat MF, Taysi S, Polat S, Boyuk A, Bakan E (2003) Elevated serum arginase activity levels in patients with breast cancer. *Surg Today* 33: 655-661.
44. Perez G, Olivares IM, Rodriguez MG, Ceballos GM, Garcia Sanchez JR (2012) Arginase activity in patients with breast cancer: an analysis of plasma, tumors, and its relationship with the presence of the estrogen receptor. *Onkologie* 35: 570-574.
45. Shweash M, Adrienne McGachy H, Schroeder J, Neamatallah T, Bryant CE, et al. (2011) *Leishmania mexicana* promastigotes inhibit macrophage IL-12 production via TLR-4 dependent COX-2, iNOS and arginase-1 expression. *Mol Immunol* 48: 1800-1808.
46. Li H, Romieu I, Sienra-Monge JJ, Ramirez-Aguilar M, Estela Del Rio-Navarro B, et al. (2006) Genetic polymorphisms in arginase I and II and childhood asthma and atopy. *J Allergy Clin Immunol* 117: 119-126.
47. Dumont J, Zureik M, Cotel D, Montaye M, Ducimetiere P, et al. (2007) Association of arginase 1 gene polymorphisms with the risk of myocardial infarction and common carotid intima media thickness. *J Med Genet* 44: 526-531.
48. Corraliza IM, Soler G, Eichmann K, Modolell M (1995) Arginase induction by suppressors of nitric oxide synthesis (IL-4, IL-10 and PGE2) in murine bone-marrow-derived macrophages. *Biochem Biophys Res Commun* 206: 667-673.
49. Kalinski P (2012) Regulation of immune responses by prostaglandin E2. *J Immunol* 188: 21-28.
50. Hata AN, Breyer RM (2004) Pharmacology and signaling of prostaglandin receptors: multiple roles in inflammation and immune modulation. *Pharmacol Ther* 103: 147-166.
51. Sugimoto Y, Narumiya S (2007) Prostaglandin E receptors. *J Biol Chem* 282: 11613-11617.
52. Kaul V, Van Kaer L, Das G, Das J (2012) Prostanoid receptor 2 signaling protects T helper 2 cells from BALB/c mice against activation-induced cell death. *J Biol Chem* 287: 25434-25439.

53. Serezani CH, Chung J, Ballinger MN, Moore BB, Aronoff DM, et al. (2007) Prostaglandin E2 suppresses bacterial killing in alveolar macrophages by inhibiting NADPH oxidase. *Am J Respir Cell Mol Biol* 37: 562-570.
54. Rieser C, Bock G, Klocker H, Bartsch G, Thurnher M (1997) Prostaglandin E2 and tumor necrosis factor alpha cooperate to activate human dendritic cells: synergistic activation of interleukin 12 production. *J Exp Med* 186: 1603-1608.
55. Bekeredjian-Ding I, Schafer M, Hartmann E, Pries R, Parcina M, et al. (2009) Tumour-derived prostaglandin E and transforming growth factor-beta synergize to inhibit plasmacytoid dendritic cell-derived interferon-alpha. *Immunology* 128: 439-450.
56. Farrell JP, Kirkpatrick CE (1987) Experimental cutaneous leishmaniasis. II. A possible role for prostaglandins in exacerbation of disease in *Leishmania major*-infected BALB/c mice. *J Immunol* 138: 902-907.
57. Reiner NE, Malemud CJ (1984) Arachidonic acid metabolism in murine leishmaniasis (Donovani): ex-vivo evidence for increased cyclooxygenase and 5-lipoxygenase activity in spleen cells. *Cell Immunol* 88: 501-510.
58. Betz M, Fox BS (1991) Prostaglandin E2 inhibits production of Th1 lymphokines but not of Th2 lymphokines. *J Immunol* 146: 108-113.
59. Narumiya S (2009) Prostanoids and inflammation: a new concept arising from receptor knockout mice. *J Mol Med (Berl)* 87: 1015-1022.
60. Diaz NL, Zerpa O, Ponce LV, Convit J, Rondon AJ, et al. (2002) Intermediate or chronic cutaneous leishmaniasis: leukocyte immunophenotypes and cytokine characterisation of the lesion. *Exp Dermatol* 11: 34-41.
61. Sheng H, Shao J, Dixon DA, Williams CS, Prescott SM, et al. (2000) Transforming growth factor-beta1 enhances Ha-ras-induced expression of cyclooxygenase-2 in intestinal epithelial cells via stabilization of mRNA. *J Biol Chem* 275: 6628-6635.
62. Liu M, Yang SC, Sharma S, Luo J, Cui X, et al. (2007) EGFR signaling is required for TGF-beta 1 mediated COX-2 induction in human bronchial epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 37: 578-588.
63. Baratelli F, Lee JM, Hazra S, Lin Y, Walser TC, et al. (2010) PGE(2) contributes to TGF-beta induced T regulatory cell function in human non-small cell lung cancer. *Am J Transl Res* 2: 356-367.
64. Matsumura T, Suzuki T, Aizawa K, Sawaki D, Munemasa Y, et al. (2009) Regulation of transforming growth factor-beta-dependent cyclooxygenase-2 expression in fibroblasts. *J Biol Chem* 284: 35861-35871.
65. Boutard V, Havouis R, Fouqueray B, Philippe C, Moulinoux JP, et al. (1995) Transforming growth factor-beta stimulates arginase activity in macrophages. Implications for the regulation of macrophage cytotoxicity. *J Immunol* 155: 2077-2084.
66. Balana-Fouce R, Calvo-Alvarez E, Alvarez-Velilla R, Prada CF, Perez-Pertejo Y, et al. (2012) Role of trypanosomatid's arginase in polyamine biosynthesis and pathogenesis. *Mol Biochem Parasitol* 181: 85-93.
67. Das P, Lahiri A, Lahiri A, Chakravorty D (2010) Modulation of the arginase pathway in the context of microbial pathogenesis: a metabolic enzyme moonlighting as an immune modulator. *PLoS Pathog* 6: e1000899.
68. Kropf P, Baud D, Marshall SE, Munder M, Mosley A, et al. (2007) Arginase activity mediates reversible T cell hyporesponsiveness in human pregnancy. *Eur J Immunol* 37: 935-945.
69. Rodriguez PC, Hernandez CP, Quiceno D, Dubinett SM, Zabaleta J, et al. (2005) Arginase I in myeloid suppressor cells is induced by COX-2 in lung carcinoma. *J Exp Med* 202: 931-939.
70. Zea AH, Rodriguez PC, Atkins MB, Hernandez C, Signoretti S, et al. (2005) Arginase-producing myeloid suppressor cells in renal cell carcinoma patients: a mechanism of tumor evasion. *Cancer Res* 65: 3044-3048.
71. Abebe T, Takele Y, Weldegebreal T, Cloke T, Closs E, et al. (2013) Arginase activity - a marker of disease status in patients with visceral leishmaniasis in ethiopia. *PLoS Negl Trop Dis* 7: e2134.
72. Hesse M, Modolell M, La Flamme AC, Schito M, Fuentes JM, et al. (2001) 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* 167: 6533-6544.
73. Gobert AP, Daulouede S, Lepoivre M, Boucher JL, Bouteille B, et al. (2000) L-Arginine availability modulates local nitric oxide production and parasite killing in experimental trypanosomiasis. *Infect Immun* 68: 4653-4657.
74. Van Nieuwenhove S, Schechter PJ, Declercq J, Bone G, Burke J, et al. (1985) Treatment of gambiense sleeping sickness in the Sudan with oral DFMO (DL-alpha-difluoromethylornithine), an inhibitor of ornithine decarboxylase; first field trial. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 79: 692-698.
75. Riley E, Roberts SC, Ullman B (2011) Inhibition profile of *Leishmania mexicana* arginase reveals differences with human arginase I. *Int J Parasitol* 41: 545-552.

76. Ribeiro-Gomes FL, Otero AC, Gomes NA, Moniz-De-Souza MC, Cysne-Finkelstein L, et al. (2004) Macrophage interactions with neutrophils regulate *Leishmania major* infection. *J Immunol* 172: 4454-4462.
77. Balestieri FM, Queiroz AR, Scavone C, Costa VM, Barral-Netto M, et al. (2002) *Leishmania (L.) amazonensis*-induced inhibition of nitric oxide synthesis in host macrophages. *Microbes Infect* 4: 23-29.

Legends of figures

Figure 1. Arginase I, ODC and antiinflammatory mediators in plasma from DCL and LCL patients. Plasma levels of protein Arginase (A) ODC (B), PGE2 (C), TGF- β 1 (D), TNF- α (I), IL-12 (J), MCP-1 (K) and CXCL-10 (L) were measured by ELISA in endemic health controls (EC) (n=35), patients with DCL active form (n = 12) or Localized Cutaneous Leishmaniasis (LCL) (n = 30). Arginase activity was evaluated by measuring the rate of urea formation from L-arginine. Correlation between Arginase I and Arginase activity (E), ODC (F), PGE2 (G), TGF(H), TNF- α (M), IL-12 (N), MCP-1 (O) and CXCL-10 (P). Each point represents a different donor, and each bar represents the median. The opened circles represent DCL donor and closed circles LCL donors. Differences were checked using Kruskal-Wallis with Dunn's multiple comparison post test. Spearman test was used to verify the significance in the correlations.

Figure 2. Local expression of Arginase I, in DCL and LCL patients, is related to polyamines and PG biosynthetic pathways. Immunohistochemistry was performed on embedded-paraffin sections of lesions from DCL and LCL patients with primary antibodies for Arginase I (A,B) (2 ug/ml; 1:100 - Santa Cruz Biotechnology, INC), ODC (C,D) (4 ug/ml; 1:100 - all Cayman Chemical, Ann Arbor, MI), COX-2 (E,F) (2 ug/ml; 1:50 - Cayman Chemical, Ann Arbor, MI). The labeling was revealed with diaminobenzidine (DAB) and colored with hematoxilina of Harris. Digital images were obtained from fields of 400x magnification, captured using Nikon E600 microscope and Olympus Q-Color 1 digital camera with Image Pro Plus program. Bars represents 10 μ m. Total RNA was extracted from lesions of LCL (n=7) and DCL (n=4) patients using RNeasy kit. Through the use of colour-coded

probe pairs, without the use of reverse transcriptase nor amplification, mRNA transcripts of host specific cellular genes were quantified (G,H e I), including housekeeping genes for normalization (CD45). Statistical significance was determined by Linear regression (Phospholipase A2, $r^2=0,505$ and $p=0.01$; Prostaglandine Synthase, $r^2=0,444$ and $p=0.02$; Cyclooxygenase 2, $r^2=0,396$ and $p=0.03$; Spermine Synthase, $r^2=0,605$ and $p=0,004$; Spermine Synthase, $r^2=0,645$ and $p=0,002$) and two-tailed Mann-whitney test (D). Bars

Figure 3. Effectiveness of Arginase and ODC inhibitor - N ω -hydroxy-L- arginine (NOHA) in Leishmania amazonensis infection. Infected macrophage monolayers were cultured with medium alone (), NOHA () or with DFMO () (A). Each point represents a different donor, and each bar represents the median. Micrographs from *L. amazonensis*-infected human macrophages in the absence (B) or presence of 100 mM NOHA (C) or DFMO (D) for 72 h. Original magnification: x400. Bars represents 10 μ m. Differences were checked using Kruskal-Wallis with Dunn's multiple comparison post test. Supernatants were collected 24h later and assayed for the presence of TGF- β 1 (E), PGE2 (F) by ELISA and TNF- α (G) and IL-12 (H) by Cytometric Bead Array (CBA). Each point represents a different donor, and each bar represents the median. Statistical significance was determined by a two-tailed Mann-whitney test.

Figures

Figure 1.

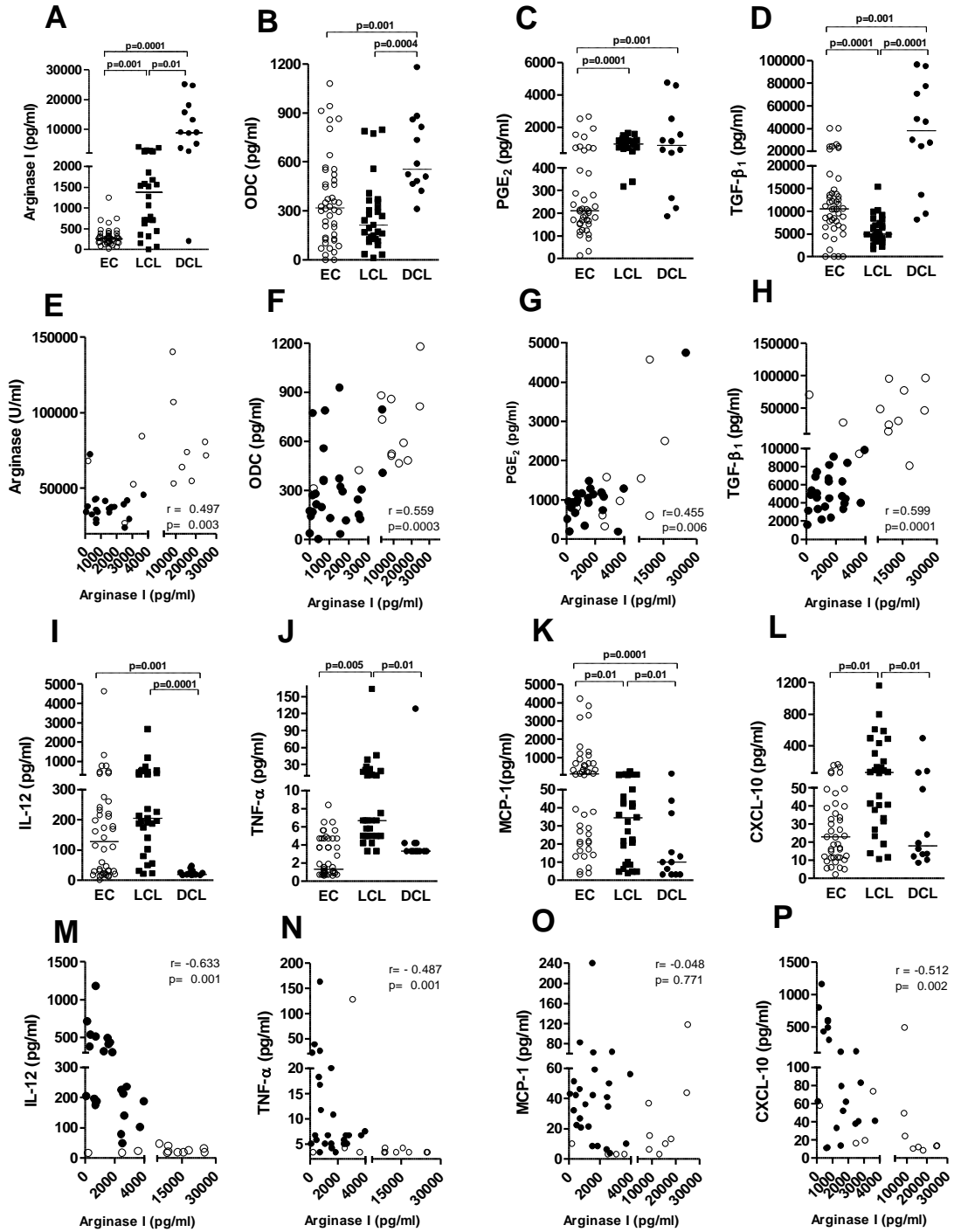


Figure 2.

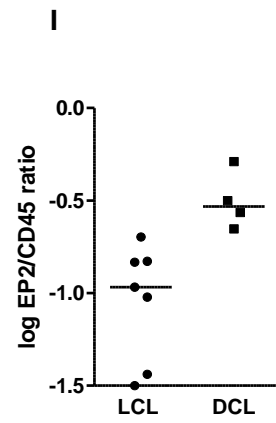
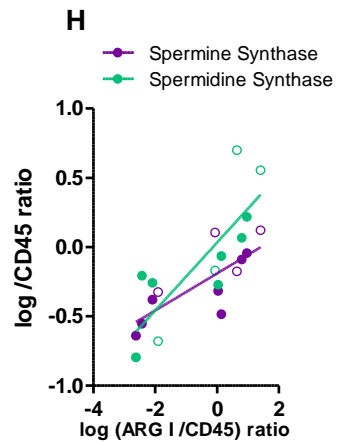
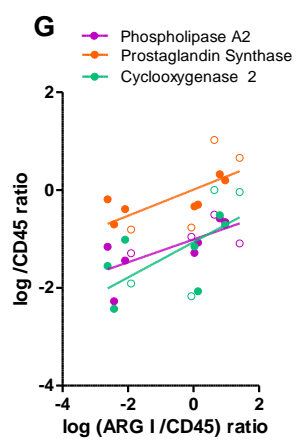
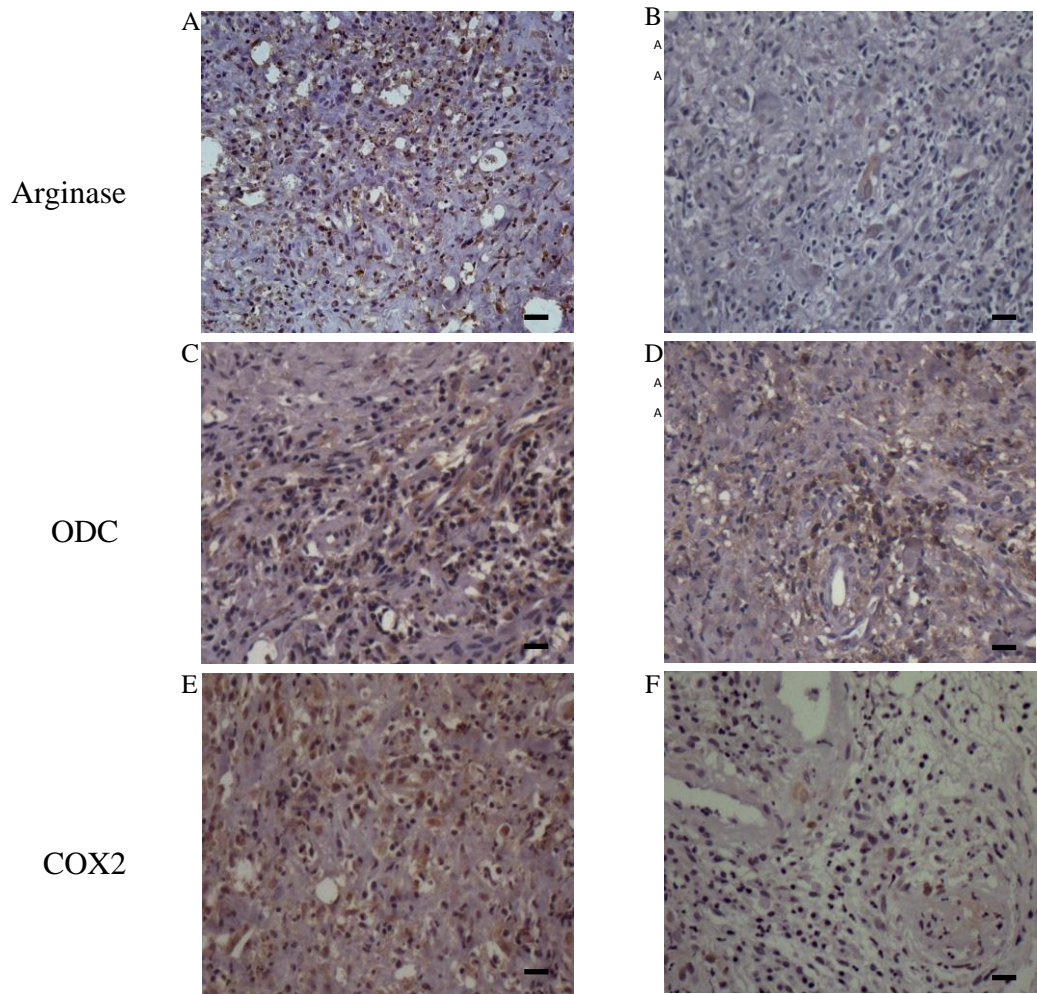
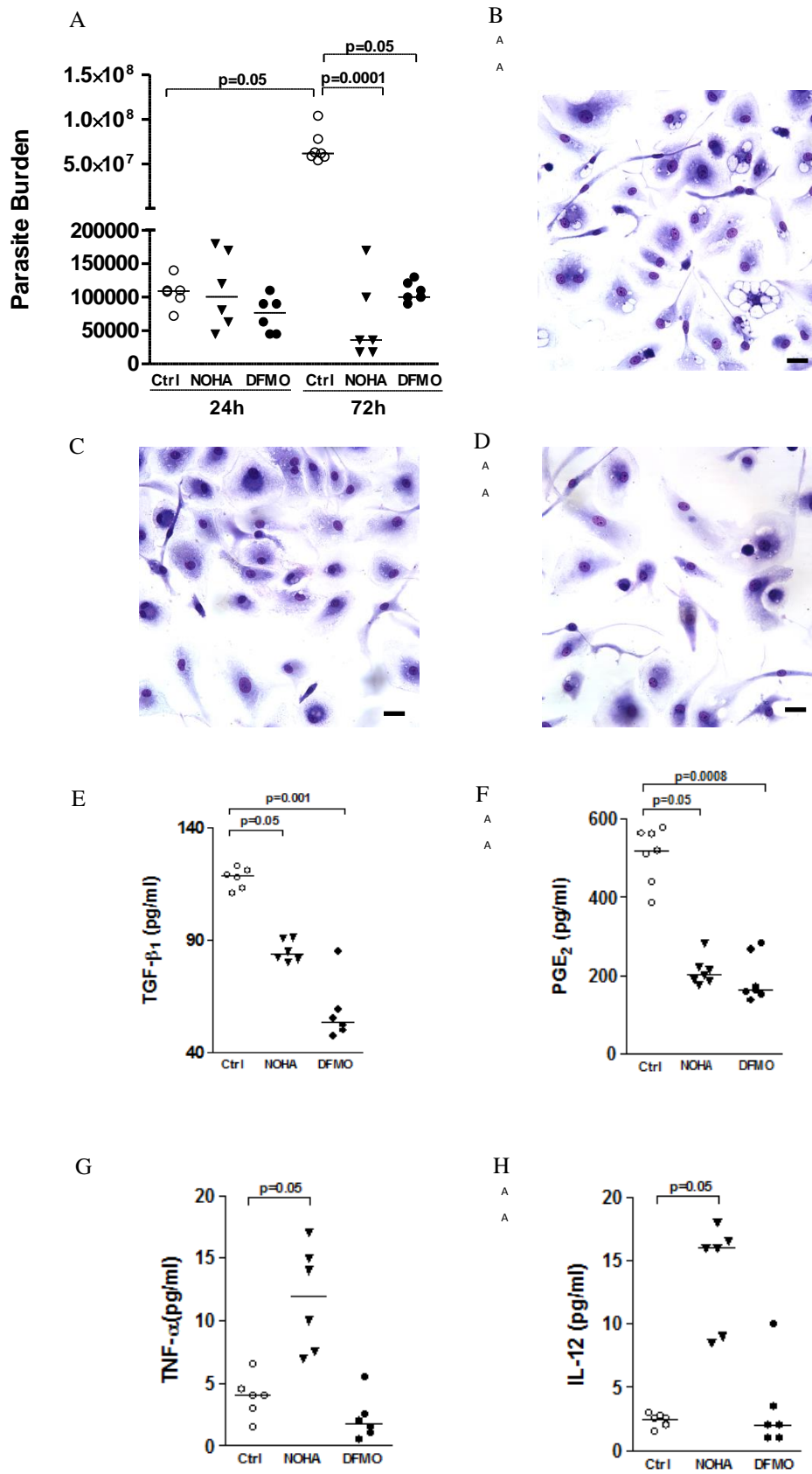
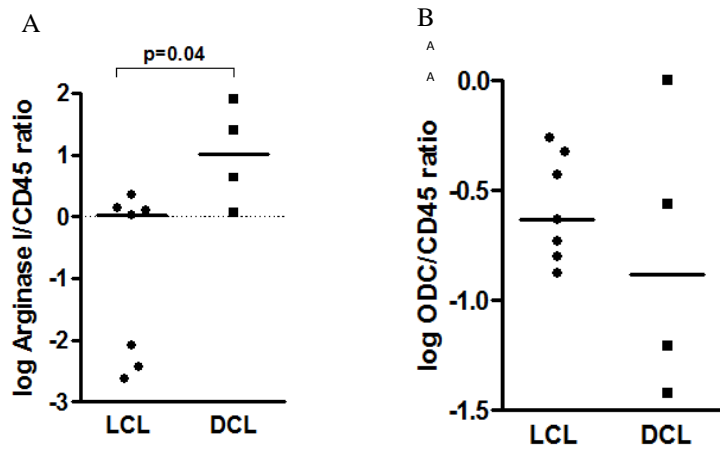


Figure 3.

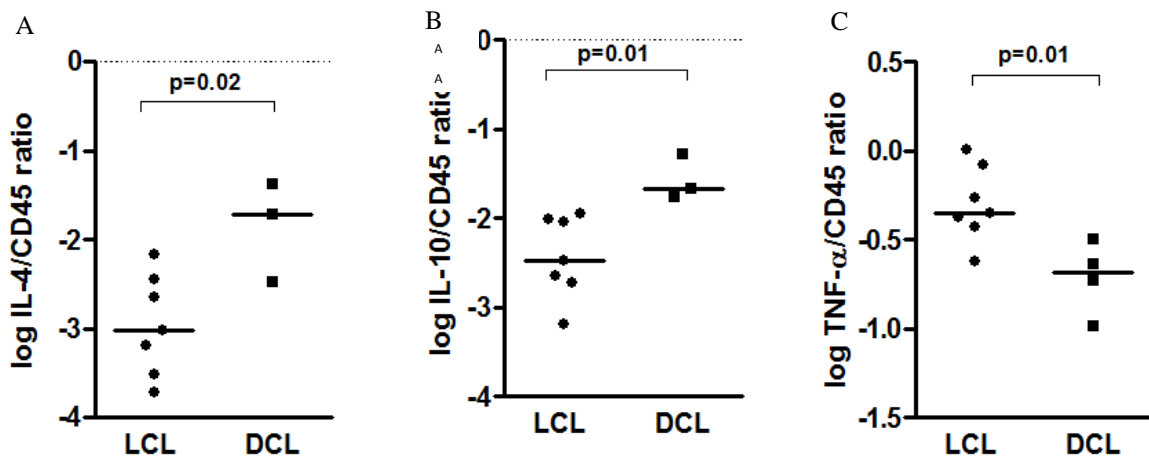


Supplemental figures

Supplemental figure 1



Supplemental figure 2



6. DISCUSSÃO

Apesar de mais de 50 anos de investimentos notáveis, não há informação suficiente disponível sobre a imunopatogênese da Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) e nenhum tratamento confiável é fornecido para lidar com essa grave doença (<http://www.who.int/leishmaniasis/en/>). Esta situação é agravada para a LCD, a forma progressiva sem cura da leishmaniose, em que o paciente não responde a nenhum tratamento, as lesões frequentemente recidivam e que a doença tem uma evolução crônica (BARRAL et al., 1995; CONVIT et al., 1972).

Os fatores determinantes da LCD ainda permanecem sem esclarecimentos definitivos, podendo estar associados tanto a eventos imunológicos e genéticos do paciente quanto a fatores patogênicos relacionados ao parasita e ao vetor (BARRAL-NETTO et al., 1986; BOMFIM et al., 1996; CARVALHO et al., 1994). Assim, nesta tese investigamos o papel da exposição de fosfatidilserina como fator de virulência da *Leishmania amazonensis* e a relação das enzimas das vias metabólicas da arginase, das poliaminas e prostaglandinas como mediadores inflamatórios chave para patogênese em pacientes com LCD.

Inicialmente buscamos avaliar a exposição de PS como um fator do parasita que poderia contribuir durante a interação parasita-hospedeiro como possível mecanismo imunossupressor da LCD (MANUSCRITO 2). A exposição e o reconhecimento de PS na superfície de amastigotas de *L. amazonensis* têm sido implicados na desativação de macrófagos, fenômeno que foi denominado de “Mimetismo Apoptótico” (DE FREITAS BALANCO et al., 2001; WANDERLEY et al., 2005). Dentro desse contexto, nossa hipótese é que as cepas de *L. amazonensis* isoladas de pacientes com LCD modulariam positivamente a exposição de PS na superfície dos parasitas, favorecendo sua infecção e sobrevivência na célula hospedeira. Para testarmos nossa hipótese, comparamos a exposição de PS na superfície de isolados de *L. amazonensis* obtidos de pacientes com forma cutânea difusa e

cutânea localizada e a resposta deflagrada pela interação desses isolados com macrófagos peritoneais murinos.

Inicialmente investigamos se existia alguma diferença na exposição de PS entre as formas amastigotas dos isolados de *L. amazonensis* obtidos de pacientes com LCL e LCD. A diferença encontrada para os valores de PS no tempo de 24 horas pós-infecção pode ser decorrente de uma modulação positiva na exposição deste fosfolípido pelo hospedeiro do qual foram isolados.

A exposição de PS pode ser fundamental para o reconhecimento e fagocitose do parasita durante a interação com a célula hospedeira, uma vez que amastigotas podem expor PS na superfície sem evoluírem necessariamente para a morte por apoptose. Amastigotas de *L. amazonensis* purificadas de lesões de camundongos, mantidas em cultura axênica a 34°C, na ausência de células hospedeiras, morrem após alguns dias de cultura, apresentando fragmentação de DNA, característica de morte por apoptose (MOREIRA; BARCINSKI, 2004). No entanto quando cultivadas na presença de macrófagos, estas amastigotas são altamente infectivas e sustentam a infecção por vários dias, não apresentando evidências de que estejam em processo de morte (MOREIRA; BARCINSKI, 2004).

Existem outros trabalhos na literatura demonstrando que a exposição de PS na superfície de células eucarióticas nem sempre está relacionada ao processo de morte celular. A exposição deste fosfolípido é um fenômeno que antecede a degradação de DNA (VERHOVEN; SCHLEGEL; WILLIAMSON, 1995) que pode ser revertido antes do comprometimento da célula (YANG et al., 2002) e pode estar envolvido em processos de sinalização durante as interações celulares. Hemácias senescentes, por exemplo, podem expor PS na superfície por um longo período de tempo e esta exposição facilita a remoção destas células pelo sistema monocítico-fagocitário no baço (CONNOR; PAK; SCHROIT, 1994). Esses dados sugerem que o PS exposto na superfície das amastigotas de pacientes com LCD e

LCL não está relacionado ao processo de morte, mas de fato ao mecanismo descrito como “Mimetismo Apoptótico”.

No entanto, este mecanismo não é válido para as formas promastigotas das Leishmanias. Apesar de não termos observado diferença na exposição de PS entre os diferentes isolados na forma promastigotas durante os sete dias de cultura axênica, houve um discreto aumento para ambos os grupos, LCL e LCD, no último dia de análise (dado não mostrado). Essa observação sugere que a exposição de PS faz parte do processo de morte das promastigotas após alcançarem à diferenciação em formas estacionárias metacíclicas. Nesse sentido, van Zandbergen e colaboradores demonstraram que promastigotas apoptóticas de *L. major*, em um comportamento altruísta, permite a sobrevivência intracelular dos parasitas viáveis (VAN ZANDBERGEN et al., 2006). O comportamento altruísta tem sido descrito como mecanismo de sobrevivência para várias outras populações de organismos unicelulares, como *Dictyostelium discoideum* (KAISER, 1986) e para o *Bacillus subtilis* (KAISER; LOSICK, 1993).

Wanderley e colaboradores apontam o PS como a molécula responsável para este tipo de comportamento (WANDERLEY et al., 2009). Os autores demonstraram que o reconhecimento das células PS^{pos} pelos macrófagos estimula os processos de internalização e inibe a atividade microbicida, facilitando a sobrevivência e a proliferação das formas PS^{neg} no interior da célula hospedeira. A importância deste mecanismo de cooperação entre as duas populações foi confirmada em modelo de infecção *in vivo*. Camundongos infectados com formas metacíclicas PS^{pos} ou PS^{neg} isoladamente não desenvolvem lesão ou apresentam lesões significativamente menores que aquelas infectadas concomitantemente com as duas formas do parasita (WANDERLEY et al., 2009). Apesar de não termos observado diferença quanto à exposição de PS na superfície dos promastigotas de *L. amazonensis* isolados de pacientes com LCL e LCD, esse parece ser um mecanismo geral que constitui um fator de virulência importante no estabelecimento da infecção por esse parasita.

Nossos dados então corroboram que os mecanismos pelos quais a exposição de PS favorece a infecção da *Leishmania* diferem entre as duas formas evolutivas do parasita. Enquanto que, em formas promastigotas esta exposição parece ser consequência da progressão na diferenciação do parasita, a exposição de PS em formas amastigotas não compromete sua viabilidade e modula a resposta inflamatória para desativar o sistema imune do hospedeiro. A diferença na exposição de PS em formas amastigotas de *L. amazonensis* isoladas de pacientes com LCL e LCD no tempo de 24 horas refletiu na resposta macrofágica durante o curso da infecção tanto na porcentagem de macrófagos infectados bem como no índice de infectividade. Apesar dos valores semelhantes na avaliação do tempo inicial de 5 horas, após 24 horas se observa uma manutenção da infecção pelas cepas de LCD enquanto que ocorre uma redução nas cepas de LCL. Esta diferença no tempo de 72 horas foi diretamente relacionada à maior exposição de PS na superfície das ama-LCD no tempo de 24 horas em relação às ama-LCL. Nossos dados sugerem que as consequências do reconhecimento de PS interferem no curso da infecção nos momentos tardios e que a maior exposição de PS nas cepas LCD em tempos iniciais possa estar associada a mecanismos de desativação do macrófago mediados por PS, que possibilitariam a manutenção da infecção e o crescimento intramacrofágico exacerbado. Nesse sentido, já havia sido demonstrado que formas amastigotas de *L. amazonensis* são capazes de inibir a atividade microbicida de fagócitos através da exposição e do reconhecimento de PS na sua superfície, o que favorece a replicação do parasita (DE FREITAS BALANCO et al., 2001).

Nossos resultados indicam que isolados de uma mesma espécie de *Leishmania*, proveniente de diferentes formas clínicas apresentam variações que determinam diferenças no curso da infecção. Akuffo e colaboradores (1987) demonstraram que culturas de células mononucleares de sangue periférico de pacientes, quando estimuladas com antígeno solúvel de *Leishmania aethiopia* (agente etiológico da LCL e da LCD na Etiópia) respondem menos ao antígeno de *Leishmania* obtido de paciente com LCD, nos testes de proliferação celular e

produção de IFN- γ , do que aos antígenos de *Leishmania* obtido de paciente com LCL (AKUFFO et al., 1987). Além disso, estudos anteriores do nosso grupo mostraram que cepas de *L. amazonensis* isoladas de diferentes formas clínicas promovem padrões diferentes de lesão no curso da infecção em camundongos BALB/c, sugerindo que devam existir diferenças sutis entre esses parasitas, não relacionadas com características e moléculas utilizadas para taxonomia, que sejam importantes na determinação do curso da infecção (ALMEIDA et al., 1996). Recentemente foi demonstrada a existência de polimorfismo em parasitas da espécie *Leishmania (Viannia) brasiliensis* isolados de pacientes com LCL, LCM e Leishmaniose Disseminada (QUEIROZ et al., 2012). Este trabalho indica que a infecção com diferentes isolados pode conduzir a formas clínicas distintas e pode também interferir na resposta ao tratamento. Embora esses trabalhos reforcem a participação de fatores associados ao parasita na Leishmaniose, não esclarecem quais são e como esses fatores atuam na patogênese e imunorregulação de tal doença.

Uma característica marcante das análises histológicas feitas em biopsias de pacientes com LCD é a presença de macrófagos amplamente vacuolizados (BARRAL et al., 1995). O tamanho dos vacúolos induzidos pelos isolados de pacientes com LCD no tempo de 72 horas foram consideravelmente maiores do que os induzidos pelos isolados de casos de LCL. Esta observação é bastante interessante, tendo em vista a semelhança com a descrição histopatológica para as lesões dos pacientes com LCD e LCL dos quais foram isoladas as cepas utilizadas neste estudo. Neste trabalho também verificamos que o tamanho do vacúolo está relacionado com a quantidade de PS exposto na superfície do parasita, sendo maior nos isolados de difusa. Amastigotas isoladas de lesões de camundongos Balb/c nude expressam pouco PS e o tamanho dos PVs são bem reduzidos quando comparados com camundongos selvagens, confirmando que o tamanho do PV é diretamente proporcional à exposição de PS.

Existem evidências de que amastigotas de *L. mexicana* secretam proteofosfoglicanas no interior do VP e estes compostos induzem a formação de grandes vacúolos nos macrófagos

mesmo na ausência do parasita, sugerindo que possam contribuir para a formação dos vacúolos característicos desta espécie (PETERS; STIERHOF; ILG, 1997). Por outro lado, Wanderley e colaboradores demonstraram que os grandes vacúolos formados durante a internalização das formas amastigotas de *L. amazonensis* são consequência de um processo de macropinocitose induzido pelo parasita e são dependentes da exposição de PS (WANDERLEY et al., 2006). Embora os mecanismos pelos quais as espécies do complexo *L. mexicana* manipulam a formação de grandes vacúolos parasitóforos ainda não estejam bem caracterizados, tem sido sugerido que a expansão do VP pode proteger a *L. amazonensis* dos mecanismos microbicidas do hospedeiro, por diluir as enzimas proteolíticas presentes no VP (SACKS; SHER, 2002) e a fusão das vesículas macropinocíticas com o vacúolo podem ser um importante mecanismo de aquisição de nutrientes pelas amastigotas intracelulares. Assim, a indução e manutenção dos grandes vacúolos observados em pacientes com LCD pode está relacionada à exposição de PS nos isolados de *L. amazonensis*, favorecendo um ambiente para replicação e estabelecimento do parasita.

O TGF- β_1 tem sido a principal citocina envolvida nos mecanismos de desativação macrofágica em resposta ao reconhecimento de PS. A produção desta molécula tem sido observada em modelos de reconhecimento de células apoptóticas (FADOK et al., 1998; SAVILL et al., 2002; FREIRE-DE-LIMA et al., 2006) e lipossomos contendo PS (HOFFMANN et al., 2005; OTSUKA; NEGISHI; ARAMAKI, 2007). Da mesma forma que o observado durante o reconhecimento de células apoptóticas, De Freitas Balanco e colaboradores (2001) demonstraram a produção de citocinas antiinflamatórias por macrófagos após o reconhecimento de PS na superfície de amastigotas de *L. amazonensis*. Os autores detectaram a produção de TGF- β após a fagocitose de formas amastigotas, processo que é inibido quando o parasita é incubado previamente com excesso de Anexina-V (DE FREITAS BALANCO et al., 2001). Posteriormente Wanderley e colaboradores, (2006) demonstraram que a produção deste mediador anti-inflamatórias é diretamente dependente da

quantidade de PS exposto na superfície do parasita, comprovando a atividade funcional desta molécula (WANDERLEY et al., 2006).

Para determinarmos se o aumento da exposição de PS em isolados de *L. amazonensis* de pacientes com LCD se correlaciona com um mecanismo de inativação macrofágica via TGF- β_1 , avaliamos a produção deste mediador no sobrenadante de macrófagos ativados com LPS e infectados com os diferentes isolados. Nossos resultados mostraram que houve um aumento gradual na produção de TGF- β_1 ao longo da infecção tanto para os macrófagos infectados com os isolados de pacientes com LCD, quanto para os infectados com os isolados de pacientes com LCL, embora estatisticamente não tenha sido observado diferenças entre os grupos. No entanto, a relação TGF/TNF está aumentada no grupo infectado com LCD em comparação ao LCL sugerindo que isolados da forma difusa induzem uma resposta preferencialmente anti-inflamatória que pode favorecer a proliferação do parasito em sua célula hospedeira.

Além de ser umas das principais citocinas envolvidas na resposta macrofágica deflagrada em reconhecimento ao PS, o TGF- β_1 está diretamente relacionado à regulação dos eventos que sucedem o reconhecimento deste fosfolipídio. Freire-de-Lima e colaboradores, (2006) demonstraram que a indução da produção de mediadores antiinflamatórios por células apoptóticas é bloqueada na presença de macrófagos da linhagem RAW com receptor truncado para TGF- β_1 (RAWT β II). Por outro lado, A supressão de NO e a expressão de iNOS induzidos pelo reconhecimento de PS foi revertida em macrófagos RAWT β II (FREIRE-DE-LIMA et al., 2006). Estes resultados indicam o TGF- β como principal regulador da expressão de mediadores antiinflamatórios e concomitante inibição dos mediadores pró-inflamatórios induzidos em resposta ao reconhecimento de PS por macrófagos.

Outra molécula que pode estar influenciando no curso da infecção é a citocina IL-10 que tem se destacado por imunomodular a resposta do hospedeiro. Embora não tenhamos observado diferenças nos valores absolutos de IL-10 entre os grupos LCL e LCD, a relação

IL-10/TNF está aumentada no grupo LCD. Camundongos BALB/c *knockout* para IL-10 (IL-10^{-/-}) infectados com *L. major* controlam a progressão da doença, além de terem lesões e carga parasitária relativamente menores do que os camundongos selvagens (KANE; MOSSER, 2001). Em humanos, a produção desta citocina é correlacionada com a progressão da lesão em pacientes com LCL (LOUZIR et al., 1998) e LCD (BOMFIM et al., 1996). Além disso, a IL-10 também tem sido relacionada aos efeitos imunossupressores em resposta ao reconhecimento de PS na superfície de células apoptóticas (FADOK et al., 1998; VOLL et al., 1997) e de *L. amazonensis* (DE FREITAS BALANCO et al., 2001; WANDERLEY et al., 2006).

Comparando os valores de PS expostos no tempo de 24 horas e a produção de TGF- β e IL-10 no tempo de 72 horas, nossos resultados indicam que existe uma correlação positiva entre a exposição de PS nos isolados de *L. amazonensis* com a produção de TGF- β_1 e IL-10. Sendo assim é possível que o aumento da exposição de PS na superfície das amastigotas isoladas de *L. amazonensis* de pacientes com LCD esteja associada ao aumento na produção de TGF- β_1 e IL-10 em tempos mais tardios da infecção.

Embora esteja bem evidenciado o papel da exposição de PS por *Leishmania amazonensis*, não podemos descartar a possibilidade de tais consequências serem resultante da exposição de PS por células do hospedeiro, ou seja, células em apoptose. Este processo pode ser consequência da própria infecção ou induzido pela *Leishmania*, como estratégia de sobrevivência.

Em conjunto nossos resultados demonstraram que os isolados de *L. amazonensis* de pacientes com LCD foram mais infectivos do que os isolados casos com LCL. Nossos dados sugerem o aumento na exposição do PS como um dos possíveis fatores patogênicos para LCD. Os resultados até aqui foram abordados no MANUSCRITO 2 e discutidos amplamente nas revisões que compõem essa tese (MANUSCRITOS 1 e 3).

Tendo em vista que o reconhecimento de PS suprime a resposta imune através da produção de mediadores anti-inflamatórios, como TGF e PGE2, e que tais mediadores ativam a via alternativa em macrófagos, com aumento da expressão de arginase e consequentemente poliaminas, buscamos avaliar no MANUSCRITO 4 (em preparação) o papel dos mediadores inflamatórios e as enzimas das vias metabólicas da arginase, poliaminas e prostaglandinas na LCD.

Nas duas últimas décadas as vias biossintéticas da arginase, poliaminas e prostaglandinas têm sido relatadas como sendo essencial para a infecção por *Leishmania*, contribuindo significativamente para a proliferação do parasita (WANASEN; SOONG, 2008). No entanto, a maioria dos trabalhos usa um modelo murino, não esclarecendo se de fato essas moléculas contribuem para a leishmaniose humana. Aqui, foram avaliadas as enzimas fundamentais relacionados com a via da arginase, poliaminas e de produção de prostaglandina E2 no plasma e de lesões de pacientes com LTA.

Trabalhos anteriores mostram a arginase como uma molécula chave na suscetibilidade à leishmaniose (ABEBE et al., 2012; TAKELE et al.). No entanto, dados sobre a sua relação com enzimas de biossíntese de poliaminas, PGE2 e da resposta inflamatória permanecem em aberto. Os nossos achados levam-nos a propor uma via simples, através da qual o TGF-beta estimula COX-2/PGE2, que por sua vez aumenta a expressão da arginase e consequentemente a biossíntese de poliaminas nas lesões de pacientes com LCD, resultando assim num microambiente permissivo para a proliferação da *Leishmania* e progressão de doença crônica. O plasma de pacientes com LCD apresentaram maiores níveis de expressão e de atividade da arginase quando comparado com LCL. Os elevados níveis de atividade da arginase tem sido relatada em diversas outras patologias humanas em plasma ou saliva como biomarcadores biológicas úteis (ELEFTHERIADIS et al., ; OZER et al., ; SIPPEL et al., 2011), em alguns casos também sendo um indicador da progressão da doença (CLOKE et al., 2010; ELGUN; KUMBASAR, 2000) e em outras doenças parasitárias (Das et al., 2010), mas o mecanismo

pelo qual a arginase é liberada permanece obscuro. Independentemente da sua origem, os dados apontam que o nível de arginase no plasma está alterado em pacientes com DCL e LCL, quando comparado com o controle endêmico saudável. Além disso, a relação entre o nível de arginase e as formas clínicas permite-nos considerar a arginase como um biomarcador para a gravidade da leishmaniose. Nesse contexto, a arginase têm sido recentemente descrita como biomarcador inflamatória associada com as doenças cardiovasculares (TEKTAS et al., 2012), obesidade (KIM et al., 2012), asma (NORTH et al., 2009), psoríase (BRUCH-GERHARZ et al., 2003) e câncer de mama (PEREZ et al., 2012; POLAT et al., 2003).

Até agora, os modelos murinos têm mostrado que macrófagos infectados com *Leishmania* aumentam a expressão e a atividade da arginase (INIESTA; GOMEZ-NIETO; CORRALIZA, 2001; SHWEASH et al.). Recentemente, o aumento da atividade da arginase foi demonstrado *in situ* em lesões de pacientes Etíopios com LCL (ABEBE et al., 2012), assim como no plasma de pacientes com leishmaniose visceral (ABEBE et al., 2013). A diferença na expressão da arginase no plasma e lesões, poderia ser induzida pelo parasita, ou pode ser uma consequência de polimorfismos de genes do hospedeiro, como indicado por outras patologias (DUMONT et al., 2007; LI et al., 2006).

A via da arginase é preferencialmente conduzida pela presença de mediadores anti-inflamatórios, tais como, o PGE₂, mediador lipídico (CORRALIZA et al., 1995) e TGF- β (INIESTA et al., 2002). Apesar da produção de PGE₂ entre pacientes com LCD e LCL não apresentarem diferenças no plasma, ambas as formas apresentaram valores mais elevados em comparação com o controle endêmico mostrando que o PGE₂ pode ser relevante para a leishmaniose cutânea. A prostaglandina E₂ tem quatro receptores E-prostanóide acoplado a proteína G, EP₁, EP₂, EP₃ e EP₄, que se ligam ao PGE₂ e conduz a diferentes vias de sinalização e funções efetoras, refletindo as funções ubíquas do PGE₂ (HATA; BREYER, 2004; KALINSKI, 2012; SUGIMOTO; NARUMIYA, 2007). Comparando a expressão de

mRNA nas lesões de pacientes com LCD e LCL foram detectadas diferenças apenas para o receptor EP2. Tem sido demonstrado que a sinalização de PGE2 através do receptor EP2 promove uma resposta imune Th2 (KAUL et al., 2012) e a supressão da atividade microbicida dos macrófagos alveolares através dos receptores EP2/EP4 aumenta cAMP que inibe a ativação e a montagem do p47phox (SEREZANI et al., 2007).

Os efeitos imunomoduladores potentes desempenhados por PGE2 são ambíguos, dependendo do perfil de mediadores presentes *in situ*. Demonstrou-se que o PGE2 em sinergia com o TNF- α induz níveis elevados de IL-12 por células dendríticas (RIESER et al., 1997), enquanto que a sinergia do TGF- β com PGE2 bloqueia o IFN- α e a secreção de TNF (BEKEREDJIAN-DING et al., 2009), portanto, associada à supressão da resposta imune do hospedeiro (FARRELL; KIRKPATRICK, 1987; REINER; MALEMUD, 1984) mudando o perfil de Th1 para Th2 (BETZ; FOX, 1991; NARUMIYA, 2009). Assim, parece que o PGE2 no plasma de pacientes com LCL juntamente com TNF e IL-12 provê uma ativação adequada pelo sistema imunológico, enquanto em pacientes com DCL, PGE2 juntamente com TGF tem efeitos opostos suprimindo a resposta imunológica. Os níveis de arginase são aumentados por mediadores anti-inflamatórios e reduzidos por mediadores pró-inflamatórios, como mostrado pela análise de correlação estatística, enfatizando que há de fato uma associação entre a expressão de arginase e mediadores inflamatórios e que isso também deve ser decisivo para o desfecho das formas clínicas da leishmaniose cutânea.

Embora possa ser considerado inesperado, investigar os mediadores no plasma de pacientes com LCD onde as lesões estão restritas ao tegumento a ideia é concebível uma vez que estas lesões difundem pelo corpo por via hematogênica e podem deixar vestígios metabólicos da resposta inflamatória no sangue periférico. Em consonância com a literatura, os mediadores anti-inflamatórios no plasma de pacientes com LCD também estão aumentados nas lesões (DIAZ et al., 2002) e em PBMC reestimulado (BOMFIM et al., 1996). Curiosamente, LCL que possui poucas lesões (2-6), também mostrou mudanças nos mediadores inflamatórios,

mesmo quando comparados aos controles endêmicos. Este cenário no plasma de pacientes com LCL e DCL é altamente consistente com os estado clínico e a evolução da doença, a cura ou a persistência, respectivamente. Sendo assim, é possível propor monitorar o estado clínico dos pacientes por medições de biomarcadores plasmáticos no sangue, através de uma forma rápida e menos invasiva, que pode ser útil no prognóstico e escolha do tratamento mais adequado.

Além da arginase, ODC, que é a enzima subsequente necessária para a síntese das poliaminas, também foi aumentada no plasma de LCD vs. LCL. O aumento da expressão de ODC é um indicativo de que a via arginase está sendo desviada para o primeiro passo da biossíntese de poliaminas. Além disso, tanto a arginase quanto a ODC também tiveram um aumento na expressão em lesões de LCD quando comparado com LCL indicando que deve haver uma diferença na quantidade de poliaminas produzidas *in situ*. De fato, quando comparamos a expressão de mRNA em lesões também verificamos um aumento da arginase nos pacientes com LCD quando comparado com LCL. Para verificar se o aumento da expressão da arginase estava relacionado com a síntese de poliaminas nas lesões dos pacientes utilizamos a análise de regressão linear. Os níveis de mRNA da arginase estão diretamente relacionados aos níveis de mRNA da espermina e espermidina sintase, as duas enzimas responsáveis pela síntese de espermina e espermidina, respectivamente. A análise histológica das lesões de pacientes com LCD mostra células intensamente parasitadas, enquanto nas lesões de LCL a quantidade de parasita é escassa (BARRAL et al., 1991). Assim, a elevada expressão de enzimas biossintéticas da via das poliaminas pode estar contribuindo para a proliferação intensa de *L. amazonensis* em pacientes com LCD.

A expressão dos níveis do mRNA da arginase também foi diretamente relacionada com fosfolipase A1, COX-1, COX-2 e prostaglandina E2 sintase, todas enzimas envolvidas com a síntese da PGE2. A relação da arginase com a via biossintética da prostaglandina é reforçada

com o aumento da expressão de COX2 *in situ* nas lesões de pacientes com LCD comparada com LCL.

A expressão da COX-2 é geralmente ausente em condições basais e induzida por estímulos, tais como fatores de crescimento e citocinas. Tem sido mostrado que TGF- β aumenta a expressão de COX-2/PGE2 em vários tipos de células epiteliais (LIU et al., 2007; SHENG et al., 2000) e em linfócitos do sangue periférico (BARATELLI et al.) por suprimir a degradação do mRNA de COX-2 (MATSUMURA et al., 2009). Além disso, o TGF- β é capaz de aumentar a atividade da arginase em macrófagos e, conseqüentemente, aumenta a produção de poliaminas (BOUTARD et al., 1995). Em concordância com a literatura, os nossos dados mostram que o TGF assim como a PGE2 estão aumentados no plasma de pacientes com LCD e tem uma correlação positiva com a arginase, ressaltando que eles devem estar envolvidos na sua produção.

Os macrófagos são as principais células que constituem o infiltrado celular nas lesões de pacientes com LCD (BARRAL et al., 1995; CONVIT; PINARDI; RONDON, 1972). Citocinas Th2 induzem ativação alternativa de macrófagos, que tem como características deste estado funcional a pronunciada atividade da arginase, a ausência da produção de NO e a incapacidade de controlar a replicação intracelular de micróbios patogênicos, incluindo *Leishmania* (BALANA-FOUCE et al., 2012; DAS et al., 2010; INIESTA et al., 2002). Em conjunto nossos dados sugerem que a expressão elevada da arginase, ODC, TGF, PGE, IL-4 (Figura Suplementar 2) e IL-10 (Figura Suplementar 2) em lesões ou plasma de pacientes com LCD suporta um fenótipo funcional para a ativação alternativa dos seus macrófagos. Alta atividade da arginase em macrófagos resulta em aumento da absorção e hidrólise de L-arginina extracelular nas células, causando assim uma redução dos níveis de L-arginina no microambiente. A privação de L-arginina causado pelo consumo da arginase tem sido associada à hiporesponsividade das células T numa variedade de respostas patológicas e fisiológicas (KROPF et al., 2007; RODRIGUEZ et al., 2005; ZEA et al., 2005). Com relação

à inabilidade de montar uma resposta celular eficiente contra *Leishmania amazonensis* observada em pacientes com LCD é possível especular que o aumento da expressão da arginase pelos macrófagos no local da infecção pode suprimir as funções efetoras das células T. Tem sido demonstrado que a arginase participa na supressão das células T em outros modelos, como: *Helicobacter pylori* (ZABALETA et al., 2004), células tronco embrionárias humanas (YACHIMOVICH-COHEN et al.) e período de gestação (KROPF et al., 2007). Recentemente foi demonstrado que os níveis reduzidos de L-arginina no plasma de pacientes com leishmaniose visceral foi associado com a diminuição dos níveis de expressão de CD3 ζ em células T (ABEBE et al., 2013), mas se este mecanismo é de fato associado com a imunossupressão em LCD ainda precisa ser mais explorado.

A inibição das enzimas da via das poliaminas é eficiente para o modelo experimental de Schistosoma (HESSE et al., 2001), Toxoplasma (LI et al., 2012) e infecção por Trypanosoma e tem sido utilizado no tratamento de pacientes com a doença do sono Africano (VAN NIEUWENHOVE et al., 1985). É bem conhecido que a inibição da arginase e ODC afeta diretamente a produção de poliaminas, que são críticas para a sobrevivência e a replicação da *Leishmania* (BOITZ et al., 2009; INIESTA; GOMEZ-NIETO; CORRALIZA, 2001; RILEY; ROBERTS; ULLMAN, 2011). Portanto, em nosso modelo, o controle da replicação da *L. amazonensis* em macrófagos tratados com NOHA (inibidor arginase) ou DFMO (inibidor de ODC) pode ser explicado pela diminuição das poliaminas. As poliaminas são importantes não só para replicação do parasita como também para a exposição de PS. Bratton e colaboradores mostraram que o tratamento com DFMO de células de linhagem humana (HL60), expostas à radiação ultravioleta, inibe a exposição de PS. Interessantemente, a adição exógena de espermina à cultura restaura a exposição de PS durante a apoptose (BRATTON et al., 1999). Com relação aos nossos dados, o tratamento com NOHA e DFMO deve estar reduzindo os níveis de poliaminas intracitoplasmáticos e com isso inibindo a exposição de PS na *L.*

amazonensis, comprometendo um dos mecanismos de escape do parasita anteriormente descrito como mimetismo apoptótico.

Além das poliaminas, NOHA e DFMO parecem modular a resposta inflamatória. A inibição da arginase e ODC diminuiu os níveis de TGF e PGE, que são cruciais para a sobrevivência e proliferação de parasitas por inibir a ativação do macrófago (RIBEIRO-GOMES et al., 2004). Além disso, o tratamento com nor-NOHA aumentou os níveis de TNF e IL-12, o que poderia ativar macrófagos para produzir óxido nítrico (NO), uma molécula leishmanicida potente. Outra possível explicação para o aumento de NO pode ser que a inibição da atividade da arginase pelo nor-NOHA tenha aumentado a disponibilidade da arginina, o substrato para a iNOS. Assim, o tratamento com o inibidor da arginase nor-NOHA é capaz de modular o perfil de citocinas, sugerindo que o estado funcional dos macrófagos foi alterado da forma clássica para uma ativação alternativa. Interessantemente, o tratamento com DFMO não aumentou as citocinas pró-inflamatórias nem os níveis de NO, embora tenha sido tão eficiente quanto o nor-NOHA no controle da carga parasitária. Estes dados indicam que as poliaminas são suficientes para a sobrevivência e multiplicação da *Leishmania amazonensis* e que sua inibição é determinante para o desfecho da infecção. Além de possuir transportadores que captam L-arginina e poliaminas da célula hospedeira (WANASEN et al., 2007; HEBY; PERSSON; RENTALA, 2007), a *Leishmania* possui as enzimas arginase e ODC que as torna capaz de sintetizar poliaminas (HEBY; PERSSON; RENTALA, 2007). Por isso, o uso de NOHA e DFMO nas culturas pode ter inibido tanto as enzimas do hospedeiro como as da *Leishmania* ou ambas. Se NOHA e/ou DFMO estão de fato inibindo as enzimas do hospedeiro ou do parasita ainda precisa ser mais explorado. Não podemos descartar que a inibição da arginase e ODC afete a viabilidade da *Leishmania* reduzindo a disponibilidade de tripanotona, molécula responsável pela eliminação de radicais livres no parasita, uma vez que a sua síntese depende da espermidina, que é inibida pelo tratamento com NOHA e DFMO. Portanto, a inibição da arginase ou ODC pode agir através de uma variedade de mecanismos:

redução das poliaminas, a mudança no estado funcional da resposta inflamatória, sistema redox do parasita e inibição da exposição de PS, o que significa que a inibição das poliaminas também é eficaz para o tratamento da leishmaniose humana. O conjunto desses dados discutidos até aqui compõe o MANUSCRITO 4 que se encontra em preparação.

Integrados, os dados apresentados nessa tese sugerem que a liberação local e sistêmica de prostaglandinas e poliaminas associadas à via da arginase em LCD deve estar associada com a incapacidade desses pacientes para montar uma resposta imune eficiente contra a infecção por *Leishmania* proporcionando um ambiente favorável para a replicação do parasita e disseminação da doença. Nossos resultados mostram também que este ambiente imunossuprimido pode ser induzido pela exposição de PS na superfície de *L. amazonensis* deflagrando uma resposta anti-inflamatória nos pacientes com LCD. Assim, podemos concluir que a LCD é uma patologia relacionada há uma reação inflamatória desequilibrada e que tal cenário é promovido tanto por fatores da *Leishmania* como do hospedeiro. Dessa forma, este trabalho mostra que as vias metabólicas dos mediadores inflamatórios abordados aqui devem ser exploradas como novos alvos para a intervenção terapêutica no tratamento da leishmaniose.

7. CONCLUSÕES

- Os isolados de *Leishmania amazonensis* diferem na sua capacidade de expor fosfatidilserina no interior de macrófagos murinos infectados, sendo que as formas isoladas de pacientes com LCD têm maior exposição do que as isoladas de pacientes com LCL;
- A diferença de exposição de PS pelas amastigotas de pacientes com LCD e LCL se correlaciona com a porcentagem de macrófagos infectados e o índice de infectividade, bem como com parâmetros clínicos da doença;
- Nossos dados sugerem que o aumento na exposição de PS em isolados de *L. amazonensis* obtidos de pacientes com LCD representa um importante mecanismo de adaptação à sobrevivência e estabelecimento da infecção.
- A produção local e sistêmica de mediadores anti-inflamatório em pacientes com LCD podem estar relacionados com a inabilidade dos pacientes em montar uma resposta imune eficiente contra a infecção por *Leishmania*;
- Arginase I está relacionada com prostaglandina E2 e a via biossintética das poliaminas;
- A inibição da arginase e ODC induzem um perfil anti-inflamatório na infecção por *Leishmania amazonensis* que diminui a carga parasitária;
- Arginase I, ODC ou PGE2 podem ser usados como novos alvos terapêuticos para DCL.

8. Referência Bibliográfica

- ABEBE, T.; HAILU, A.; WOLDEYES, M.; MEKONEN, W.; BILCHA, K.; CLOKE, T.; FRY, L.; SEICH AL BASATENA, N. K.; CORWARE, K.; MODOLELL, M.; MUNDER, M.; TACCHINI-COTTIER, F.; MULLER, I.; KROPF, P. **Local increase of arginase activity in lesions of patients with cutaneous leishmaniasis in Ethiopia.** PLoS Negl Trop Dis, v. 6, n. 6, p. e1684, 2012.
- ABEBE, T.; TAKELE, Y.; WELDEGEBREAL, T.; CLOKE, T.; CLOSS, E.; CORSET, C.; HAILU, A.; HAILU, W.; SISAY, Y.; CORWARE, K.; CORSET, M.; MODOLELL, M.; MUNDER, M.; TACCHINI-COTTIER, F.; MULLER, I.; KROPF, P. **Arginase activity - a marker of disease status in patients with visceral leishmaniasis in ethiopia.** PLoS Negl Trop Dis, v. 7, n. 3, p. e2134, 2013.
- AFONSO, L.; BORGES, V. M.; CRUZ, H.; RIBEIRO-GOMES, F. L.; DOSREIS, G. A.; DUTRA, A. N.; CLARENCIO, J.; DE OLIVEIRA, C. I.; BARRAL, A.; BARRAL-NETTO, M.; BRODSKYN, C. I. **Interactions with apoptotic but not with necrotic neutrophils increase parasite burden in human macrophages infected with Leishmania amazonensis.** J Leukoc Biol, v. 84, n. 2, p. 389-396, 2008.
- AFONSO, L. C.; SCOTT, P. **Immune responses associated with susceptibility of C57BL/10 mice to Leishmania amazonensis.** Infect Immun, v. 61, n. 7, p. 2952-2959, 1993.
- AKUFFO, H.; SCHURR, E.; ANDERSSON, G.; YAMANEBERHAN, T.; BRITTON, S. **Responsiveness in diffuse versus local cutaneous leishmaniasis is due to parasite differences.** Scand J Immunol, v. 26, n. 6, p. 717-721, 1987.
- ALEXANDER, J.; RUSSELL, D. G. **The interaction of Leishmania species with macrophages.** Adv Parasitol, v. 31, p. 175-254, 1992.
- ALMEIDA, R. P.; BARRAL-NETTO, M.; DE JESUS, A. M.; DE FREITAS, L. A.; CARVALHO, E. M.; BARRAL, A. **Biological behavior of Leishmania amazonensis isolated from humans with cutaneous, mucosal, or visceral leishmaniasis in BALB/C mice.** Am J Trop Med Hyg, v. 54, n. 2, p. 178-184, 1996.
- ALVAR, J.; VELEZ, I. D.; BERN, C.; HERRERO, M.; DESJEUX, P.; CANO, J.; JANNIN, J.; DEN BOER, M. **Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence.** PLoS One, v. 7, n. 5, p. e35671, 2012.
- ANTOINE, J. C.; PRINA, E.; JOUANNE, C.; BONGRAND, P. **Parasitophorous vacuoles of Leishmania amazonensis-infected macrophages maintain an acidic pH.** Infect Immun, v. 58, n. 3, p. 779-787, 1990.
- ANTOINE, J. C.; PRINA, E.; LANG, T.; COURRET, N. **The biogenesis and properties of the parasitophorous vacuoles that harbour Leishmania in murine macrophages.** Trends Microbiol, v. 6, n. 10, p. 392-401, 1998.
- BALANA-FOUCE, R.; CALVO-ALVAREZ, E.; ALVAREZ-VELILLA, R.; PRADA, C. F.; PEREZ-PERTEJO, Y.; REGUERA, R. M. **Role of trypanosomatid's arginase in polyamine biosynthesis and pathogenesis.** Mol Biochem Parasitol, v. 181, n. 2, p. 85-93, 2012.
- BANNENBERG, G.; SERHAN, C. N. **Specialized pro-resolving lipid mediators in the inflammatory response: An update.** Biochim Biophys Acta, v. 1801, n. 12, p. 1260-1273, 2010.
- BANSAL, V.; OCHOA, J. B. **Arginine availability, arginase, and the immune response.** Curr Opin Clin Nutr Metab Care, v. 6, n. 2, p. 223-228, 2003.
- BARATELLI, F.; LEE, J. M.; HAZRA, S.; LIN, Y.; WALSER, T. C.; SCHAU, D.; PAK, P. S.; ELASHOFF, D.; RECKAMP, K.; ZHANG, L.; FISHBEIN, M. C.; SHARMA, S.; DUBINETT, S. M. **PGE(2) contributes to TGF-beta induced T regulatory cell function in human non-small cell lung cancer.** Am J Transl Res, v. 2, n. 4, p. 356-367.
- BARBIERI, C. L.; BROWN, K.; RABINOVITCH, M. **Depletion of secondary lysosomes in mouse macrophages infected with Leishmania mexicana amazonensis: a cytochemical study.** Z Parasitenkd, v. 71, n. 2, p. 159-168, 1985.
- BARRAL-NETTO, M.; BADARO, R.; BARRAL, A.; CARVALHO, E. M. **[Immunology of cutaneous leishmaniasis].** Rev Soc Bras Med Trop, v. 19, n. 3, p. 173-191, 1986.

BARRAL-NETTO, M.; BARRAL, A.; BROWNELL, C. E.; SKEIKY, Y. A.; ELLINGSWORTH, L. R.; TWARDZIK, D. R.; REED, S. G. **Transforming growth factor-beta in leishmanial infection: a parasite escape mechanism.** *Science*, v. 257, n. 5069, p. 545-548, 1992.

BARRAL, A.; COSTA, J. M.; BITTENCOURT, A. L.; BARRAL-NETTO, M.; CARVALHO, E. M. **Polar and subpolar diffuse cutaneous leishmaniasis in Brazil: clinical and immunopathologic aspects.** *Int J Dermatol*, v. 34, n. 7, p. 474-479, 1995.

BARRAL, A.; PEDRAL-SAMPAIO, D.; GRIMALDI JUNIOR, G.; MOMEN, H.; MCMAHON-PRATT, D.; RIBEIRO DE JESUS, A.; ALMEIDA, R.; BADARO, R.; BARRAL-NETTO, M.; CARVALHO, E. M.; ET AL. **Leishmaniasis in Bahia, Brazil: evidence that *Leishmania amazonensis* produces a wide spectrum of clinical disease.** *Am J Trop Med Hyg*, v. 44, n. 5, p. 536-546, 1991.

BASSELIN, M.; COOMBS, G. H.; BARRETT, M. P. **Putrescine and spermidine transport in *Leishmania*.** *Mol Biochem Parasitol*, v. 109, n. 1, p. 37-46, 2000.

BEKEREDJIAN-DING, I.; SCHAFER, M.; HARTMANN, E.; PRIES, R.; PARCINA, M.; SCHNEIDER, P.; GIESE, T.; ENDRES, S.; WOLLENBERG, B.; HARTMANN, G. **Tumour-derived prostaglandin E and transforming growth factor-beta synergize to inhibit plasmacytoid dendritic cell-derived interferon-alpha.** *Immunology*, v. 128, n. 3, p. 439-450, 2009.

BENCHIMOL, M.; DE SOUZA, W. ***Leishmania mexicana amazonensis*: attachment to the membrane of the phagocytic vacuole of macrophages in vivo.** *Z Parasitenkd*, v. 66, n. 1, p. 25-29, 1981.

BETZ, M.; FOX, B. S. **Prostaglandin E2 inhibits production of Th1 lymphokines but not of Th2 lymphokines.** *J Immunol*, v. 146, n. 1, p. 108-113, 1991.

BEVERS, E. M.; COMFURIUS, P.; DEKKERS, D. W.; ZWAAL, R. F. **Lipid translocation across the plasma membrane of mammalian cells.** *Biochim Biophys Acta*, v. 1439, n. 3, p. 317-330, 1999.

BOAVENTURA, V. S.; DE OLIVEIRA, J. G.; COSTA, J. M.; NOVAIS, F. O.; DE OLIVEIRA, C. I.; BARRAL-NETTO, M.; BARRAL, A. **The value of the otorhinolaryngologic exam in correct mucocutaneous leishmaniasis diagnosis.** *Am J Trop Med Hyg*, v. 81, n. 3, p. 384-386, 2009.

BOGDAN, C.; DONHAUSER, N.; DORING, R.; ROLLINGHOFF, M.; DIEFENBACH, A.; RITTIG, M. G. **Fibroblasts as host cells in latent leishmaniosis.** *J Exp Med*, v. 191, n. 12, p. 2121-2130, 2000.

BOITZ, J. M.; YATES, P. A.; KLINE, C.; GAUR, U.; WILSON, M. E.; ULLMAN, B.; ROBERTS, S. C. ***Leishmania donovani* ornithine decarboxylase is indispensable for parasite survival in the mammalian host.** *Infect Immun*, v. 77, n. 2, p. 756-763, 2009.

BOMFIM, G.; NASCIMENTO, C.; COSTA, J.; CARVALHO, E. M.; BARRAL-NETTO, M.; BARRAL, A. **Variation of cytokine patterns related to therapeutic response in diffuse cutaneous leishmaniasis.** *Exp Parasitol*, v. 84, n. 2, p. 188-194, 1996.

BOSE, J.; GRUBER, A. D.; HELMING, L.; SCHIEBE, S.; WEGENER, I.; HAFNER, M.; BEALES, M.; KONTGEN, F.; LENGELING, A. **The phosphatidylserine receptor has essential functions during embryogenesis but not in apoptotic cell removal.** *J Biol*, v. 3, n. 4, p. 15, 2004.

BOUTARD, V.; HAVOUI, R.; FOUQUERAY, B.; PHILIPPE, C.; MOULINOX, J. P.; BAUD, L. **Transforming growth factor-beta stimulates arginase activity in macrophages. Implications for the regulation of macrophage cytotoxicity.** *J Immunol*, v. 155, n. 4, p. 2077-2084, 1995.

BRATTON, D. L.; HENSON, P. M. **Apoptotic cell recognition: will the real phosphatidylserine receptor(s) please stand up?** *Curr Biol*, v. 18, n. 2, p. R76-79, 2008.

BROSNAN, C. F.; BATTISTINI, L.; RAINE, C. S.; DICKSON, D. W.; CASADEVALL, A.; LEE, S. C. **Reactive nitrogen intermediates in human neuropathology: an overview.** *Dev Neurosci*, v. 16, n. 3-4, p. 152-161, 1994.

BRUCH-GERHARZ, D.; SCHNORR, O.; SUSCHEK, C.; BECK, K. F.; PFEILSCHIFTER, J.; RUZICKA, T.; KOLB-BACHOFEN, V. **Arginase 1 overexpression in psoriasis: limitation of inducible nitric oxide**

synthase activity as a molecular mechanism for keratinocyte hyperproliferation. *Am J Pathol*, v. 162, n. 1, p. 203-211, 2003.

BURCHMORE, R. J.; BARRETT, M. P. **Life in vacuoles--nutrient acquisition by *Leishmania amastigotes*.** *Int J Parasitol*, v. 31, n. 12, p. 1311-1320, 2001.

BURCHMORE, R. J.; HART, D. T. **Glucose transport in amastigotes and promastigotes of *Leishmania mexicana mexicana*.** *Mol Biochem Parasitol*, v. 74, n. 1, p. 77-86, 1995.

CARNEIRO, F. P.; DE MAGALHAES, A. V.; DE JESUS ABREU ALMEIDA COUTO, M.; BOCCA, A. L.; MUNIZ-JUNQUEIRA, M. I.; RIBEIRO SAMPAIO, R. N. **Foxp3 expression in lesions of the different clinical forms of American tegumentary leishmaniasis.** *Parasite Immunol*, v. 31, n. 10, p. 646-651, 2009.

CARVALHO, E. M.; BARRAL, A.; COSTA, J. M.; BITTENCOURT, A.; MARSDEN, P. **Clinical and immunopathological aspects of disseminated cutaneous leishmaniasis.** *Acta Trop*, v. 56, n. 4, p. 315-325, 1994.

CASTES, M.; TRUJILLO, D.; ROJAS, M. E.; FERNANDEZ, C. T.; ARAYA, L.; CABRERA, M.; BLACKWELL, J.; CONVIT, J. **Serum levels of tumor necrosis factor in patients with American cutaneous leishmaniasis.** *Biol Res*, v. 26, n. 1-2, p. 233-238, 1993.

CASTRO, R.; SCOTT, K.; JORDAN, T.; EVANS, B.; CRAIG, J.; PETERS, E. L.; SWIER, K. **The ultrastructure of the parasitophorous vacuole formed by *Leishmania major*.** *J Parasitol*, v. 92, n. 6, p. 1162-1170, 2006.

CEDERBAUM, S. D.; YU, H.; GRODY, W. W.; KERN, R. M.; YOO, P.; IYER, R. K. **Arginases I and II: do their functions overlap?** *Mol Genet Metab*, v. 81 Suppl 1, p. S38-44, 2004.

CHINETTI-GBAGUIDI, G.; STAELS, B. **Macrophage polarization in metabolic disorders: functions and regulation.** *Curr Opin Lipidol*, v. 22, n. 5, p. 365-372, 2011

CIKALA, M.; ALEXANDROVA, O.; DAVID, C. N.; PROSCHEL, M.; STIENING, B.; CRAMER, P.; BOTTGER, A. **The phosphatidylserine receptor from *Hydra* is a nuclear protein with potential Fe(II) dependent oxygenase activity.** *BMC Cell Biol*, v. 5, p. 26, 2004.

CLOKE, T. E.; GARVEY, L.; CHOI, B. S.; ABEBE, T.; HAILU, A.; HANCOCK, M.; KADOLSKY, U.; BANGHAM, C. R.; MUNDER, M.; MULLER, I.; TAYLOR, G. P.; KROPF, P. **Increased level of arginase activity correlates with disease severity in HIV-seropositive patients.** *J Infect Dis*, v. 202, n. 3, p. 374-385, 2010.

CONNOR, J.; PAK, C. C.; SCHROIT, A. J. **Exposure of phosphatidylserine in the outer leaflet of human red blood cells. Relationship to cell density, cell age, and clearance by mononuclear cells.** *J Biol Chem*, v. 269, n. 4, p. 2399-2404, 1994.

CONVIT, J.; PINARDI, M. E.; RONDON, A. J. **Diffuse cutaneous leishmaniasis: a disease due to an immunological defect of the host.** *Trans R Soc Trop Med Hyg*, v. 66, n. 4, p. 603-610, 1972.

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

COSTA, J. M.; SALDANHA, A. C.; SILVA, C. M.; BRANCO MDOS, R.; BARRAL, A.; CARVALHO, E. M.; BITTENCOURT, A. L. **Spontaneous regional healing of extensive skin lesions in diffuse cutaneous Leishmaniasis (DCL).** *Rev Soc Bras Med Trop*, v. 28, n. 1, p. 45-47, 1995.

COURRET, N.; FREHEL, C.; GOUHIER, N.; POUCHELET, M.; PRINA, E.; ROUX, P.; ANTOINE, J. C. **Biogenesis of *Leishmania*-harbouring parasitophorous vacuoles following phagocytosis of the metacyclic promastigote or amastigote stages of the parasites.** *J Cell Sci*, v. 115, n. Pt 11, p. 2303-2316, 2002.

CUI, P.; QIN, B.; LIU, N.; PAN, G.; PEI, D. **Nuclear localization of the phosphatidylserine receptor protein via multiple nuclear localization signals.** *Exp Cell Res*, v. 293, n. 1, p. 154-163, 2004.

DAMATTA, R. A.; SEABRA, S. H.; DEOLINDO, P.; ARNHOLDT, A. C.; MANHAES, L.; GOLDENBERG, S.; DE SOUZA, W. **Trypanosoma cruzi** exposes phosphatidylserine as an evasion mechanism. *FEMS Microbiol Lett*, v. 266, n. 1, p. 29-33, 2007.

DANIEL, P. T.; STURM, I.; RITSCHER, S.; FRIEDRICH, K.; DORKEN, B.; BENDZKO, P.; HILLEBRAND, T. **Detection of genomic DNA fragmentation during apoptosis (DNA ladder) and the simultaneous isolation of RNA from low cell numbers.** *Anal Biochem*, v. 266, n. 1, p. 110-115, 1999.

DAS, P.; LAHIRI, A.; LAHIRI, A.; CHAKRAVORTTY, D. **Modulation of the arginase pathway in the context of microbial pathogenesis: a metabolic enzyme moonlighting as an immune modulator.** *PLoS Pathog*, v. 6, n. 6, p. e1000899, 2010.

DE FREITAS BALANCO, J. M.; MOREIRA, M. E.; BONOMO, A.; BOZZA, P. T.; AMARANTE-MENDES, G.; PIRMEZ, C.; BARCINSKI, M. A. **Apoptotic mimicry by an obligate intracellular parasite downregulates macrophage microbicidal activity.** *Curr Biol*, v. 11, n. 23, p. 1870-1873, 2001.

DE SOUZA LEAO, S.; LANG, T.; PRINA, E.; HELLIO, R.; ANTOINE, J. C. **Intracellular Leishmania amazonensis amastigotes internalize and degrade MHC class II molecules of their host cells.** *J Cell Sci*, v. 108 (Pt 10), p. 3219-3231, 1995.

DESJEUX, P. **Leishmaniasis: current situation and new perspectives.** *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, v. 27, n. 5, p. 305-318, 2004.

DIAZ, C.; SCHROIT, A. J. **Role of translocases in the generation of phosphatidylserine asymmetry.** *J Membr Biol*, v. 151, n. 1, p. 1-9, 1996.

DIAZ, N. L.; ZERPA, O.; PONCE, L. V.; CONVIT, J.; RONDON, A. J.; TAPIA, F. J. **Intermediate or chronic cutaneous leishmaniasis: leukocyte immunophenotypes and cytokine characterisation of the lesion.** *Exp Dermatol*, v. 11, n. 1, p. 34-41, 2002.

DUMONT, J.; ZUREIK, M.; COTTEL, D.; MONTAYE, M.; DUCIMETIERE, P.; AMOUYEL, P.; BROUSSEAU, T. **Association of arginase 1 gene polymorphisms with the risk of myocardial infarction and common carotid intima media thickness.** *J Med Genet*, v. 44, n. 8, p. 526-531, 2007.

EL KASMI, K. C.; QUALLS, J. E.; PESCE, J. T.; SMITH, A. M.; THOMPSON, R. W.; HENAO-TAMAYO, M.; BASARABA, R. J.; KONIG, T.; SCHLEICHER, U.; KOO, M. S.; KAPLAN, G.; FITZGERALD, K. A.; TUOMANEN, E. I.; ORME, I. M.; KANNEGANTI, T. D.; BOGDAN, C.; WYNN, T. A.; MURRAY, P. J. **Toll-like receptor-induced arginase 1 in macrophages thwarts effective immunity against intracellular pathogens.** *Nat Immunol*, v. 9, n. 12, p. 1399-1406, 2008.

ELEFTHERIADIS, T.; LIAKOPOULOS, V.; ANTONIADI, G.; STEFANIDIS, I.; GALAKTIDOU, G. **Arginase type I as a marker of coronary heart disease in hemodialysis patients.** *Int Urol Nephrol*, v. 43, n. 4, p. 1187-1194.

ELGUN, S.; KUMBASAR, H. **Increased serum arginase activity in depressed patients.** *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, v. 24, n. 2, p. 227-232, 2000.

FADEEL, B.; ORRENIUS, S. **Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in human disease.** *J Intern Med*, v. 258, n. 6, p. 479-517, 2005.

FADOK, V. A.; BRATTON, D. L.; KONOWAL, A.; FREED, P. W.; WESTCOTT, J. Y.; HENSON, P. M. **Macrophages that have ingested apoptotic cells in vitro inhibit proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF-beta, PGE2, and PAF.** *J Clin Invest*, v. 101, n. 4, p. 890-898, 1998.

FADOK, V. A.; BRATTON, D. L.; ROSE, D. M.; PEARSON, A.; EZEKEWITZ, R. A.; HENSON, P. M. **A receptor for phosphatidylserine-specific clearance of apoptotic cells.** *Nature*, v. 405, n. 6782, p. 85-90, 2000.

FADOK, V. A.; VOELKER, D. R.; CAMPBELL, P. A.; COHEN, J. J.; BRATTON, D. L.; HENSON, P. M. **Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages.** *J Immunol*, v. 148, n. 7, p. 2207-2216, 1992.

- FANG, M.; ZHANG, H. Q.; XUE, S. B. [Apoptosis of HL-60 cells induced by Harringtonine: membrane blebs, nucleus blebs and chromatin condensation]. *Shi Yan Sheng Wu Xue Bao*, v. 29, n. 3, p. 221-233, 1996.
- FARRELL, J. P.; KIRKPATRICK, C. E. **Experimental cutaneous leishmaniasis. II. A possible role for prostaglandins in exacerbation of disease in Leishmania major-infected BALB/c mice.** *J Immunol*, v. 138, n. 3, p. 902-907, 1987.
- FREEMAN, G. J.; CASASNOVAS, J. M.; UMETSU, D. T.; DEKRUYFF, R. H. **TIM genes: a family of cell surface phosphatidylserine receptors that regulate innate and adaptive immunity.** *Immunol Rev*, v. 235, n. 1, p. 172-189, 2010.
- FREIRE-DE-LIMA, C. G.; NASCIMENTO, D. O.; SOARES, M. B.; BOZZA, P. T.; CASTRO-FARIA-NETO, H. C.; DE MELLO, F. G.; DOSREIS, G. A.; LOPES, M. F. **Uptake of apoptotic cells drives the growth of a pathogenic trypanosome in macrophages.** *Nature*, v. 403, n. 6766, p. 199-203, 2000.
- FREIRE-DE-LIMA, C. G.; XIAO, Y. Q.; GARDAL, S. J.; BRATTON, D. L.; SCHIEMANN, W. P.; HENSON, P. M. **Apoptotic cells, through transforming growth factor-beta, coordinately induce anti-inflammatory and suppress pro-inflammatory eicosanoid and NO synthesis in murine macrophages.** *J Biol Chem*, v. 281, n. 50, p. 38376-38384, 2006.
- FRUTH, U.; SOLIOZ, N.; LOUIS, J. A. **Leishmania major interferes with antigen presentation by infected macrophages.** *J Immunol*, v. 150, n. 5, p. 1857-1864, 1993.
- FUNK, C. D. **Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology.** *Science*, v. 294, n. 5548, p. 1871-1875, 2001.
- GIL, L. H.; BASANO, S. A.; SOUZA, A. A.; SILVA, M. G.; BARATA, I.; ISHIKAWA, E. A.; CAMARGO, L. M.; SHAW, J. J. **Recent observations on the sand fly (Diptera: Psychodidae) fauna of the State of Rondonia, Western Amazonia, Brazil: the importance of Psychodopygus davisi as a vector of zoonotic cutaneous leishmaniasis.** *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v. 98, n. 6, p. 751-755, 2003.
- GLASER, T. A.; MUKKADA, A. J. **Proline transport in Leishmania donovani amastigotes: dependence on pH gradients and membrane potential.** *Mol Biochem Parasitol*, v. 51, n. 1, p. 1-8, 1992.
- GOBERT, A. P.; DAULOUEDE, S.; LEPOIVRE, M.; BOUCHER, J. L.; BOUTEILLE, B.; BUGUET, A.; CESPUGLIO, R.; VEYRET, B.; VINCENDEAU, P. **L-Arginine availability modulates local nitric oxide production and parasite killing in experimental trypanosomiasis.** *Infect Immun*, v. 68, n. 8, p. 4653-4657, 2000.
- GORDON, S. **Alternative activation of macrophages.** *Nat Rev Immunol*, v. 3, n. 1, p. 23-35, 2003.
- GUIMARAES, E. T.; SANTOS, L. A.; RIBEIRO DOS SANTOS, R.; TEIXEIRA, M. M.; DOS SANTOS, W. L.; SOARES, M. B. **Role of interleukin-4 and prostaglandin E2 in Leishmania amazonensis infection of BALB/c mice.** *Microbes Infect*, v. 8, n. 5, p. 1219-1226, 2006.
- GUMY, A.; LOUIS, J. A.; LAUNOIS, P. **The murine model of infection with Leishmania major and its importance for the deciphering of mechanisms underlying differences in Th cell differentiation in mice from different genetic backgrounds.** *Int J Parasitol*, v. 34, n. 4, p. 433-444, 2004.
- HANDMAN, E.; BULLEN, D. V. **Interaction of Leishmania with the host macrophage.** *Trends Parasitol*, v. 18, n. 8, p. 332-334, 2002.
- HARRIS SG, PADILLA J, KOUMAS L, RAY D, PHIPPS RP. **Prostaglandins as modulators of immunity.** *Trends Immunol*, v. 23, n. 3, p. 144-150, 2002.
- HATA, A. N.; BREYER, R. M. **Pharmacology and signaling of prostaglandin receptors: multiple roles in inflammation and immune modulation.** *Pharmacol Ther*, v. 103, n. 2, p. 147-166, 2004.
- HEBY, O.; PERSSON, L.; RENTALA, M. **Targeting the polyamine biosynthetic enzymes: a promising approach to therapy of African sleeping sickness, Chagas' disease, and leishmaniasis.** *Amino Acids*, v. 33, n. 2, p. 359-366, 2007.

- HEINZEL, F. P.; SADICK, M. D.; HOLADAY, B. J.; COFFMAN, R. L.; LOCKSLEY, R. M. **Reciprocal expression of interferon gamma or interleukin 4 during the resolution or progression of murine leishmaniasis. Evidence for expansion of distinct helper T cell subsets.** J Exp Med, v. 169, n. 1, p. 59-72, 1989.
- HESSE, M.; MODOLELL, M.; LA FLAMME, A. C.; SCHITO, M.; FUENTES, J. M.; CHEEVER, A. W.; PEARCE, E. J.; WYNN, T. A. **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, n. 11, p. 6533-6544, 2001.
- HOFFMANN, P. R.; KENCH, J. A.; VONDRACEK, A.; KRUK, E.; DALEKE, D. L.; JORDAN, M.; MARRACK, P.; HENSON, P. M.; FADOK, V. A. **Interaction between phosphatidylserine and the phosphatidylserine receptor inhibits immune responses in vivo.** J Immunol, v. 174, n. 3, p. 1393-1404, 2005.
- HUYNH, C.; SACKS, D. L.; ANDREWS, N. W. **A Leishmania amazonensis ZIP family iron transporter is essential for parasite replication within macrophage phagolysosomes.** J Exp Med, v. 203, n. 10, p. 2363-2375, 2006.
- ILIES, M.; DI COSTANZO, L.; DOWLING, D. P.; THORN, K. J.; CHRISTIANSON, D. W. **Binding of alpha,alpha-disubstituted amino acids to arginase suggests new avenues for inhibitor design.** J Med Chem, v. 54, n. 15, p. 5432-5443, 2011.
- INIESTA, V.; CARCELEN, J.; MOLANO, I.; PEIXOTO, P. M.; REDONDO, E.; PARRA, P.; MANGAS, M.; MONROY, I.; CAMPO, M. L.; NIETO, C. G.; CORRALIZA, I. **Arginase I induction during Leishmania major infection mediates the development of disease.** Infect Immun, v. 73, n. 9, p. 6085-6090, 2005.
- INIESTA, V.; GOMEZ-NIETO, L. C.; CORRALIZA, I. **The inhibition of arginase by N(omega)-hydroxy-L-arginine controls the growth of Leishmania inside macrophages.** J Exp Med, v. 193, n. 6, p. 777-784, 2001.
- INIESTA, V.; GOMEZ-NIETO, L. C.; MOLANO, I.; MOHEDANO, A.; CARCELEN, J.; MIRON, C.; ALONSO, C.; CORRALIZA, I. **Arginase I induction in macrophages, triggered by Th2-type cytokines, supports the growth of intracellular Leishmania parasites.** Parasite Immunol, v. 24, n. 3, p. 113-118, 2002.
- JACQUES, I.; ANDREWS, N. W.; HUYNH, C. **Functional characterization of LIT1, the Leishmania amazonensis ferrous iron transporter.** Mol Biochem Parasitol, v. 170, n. 1, p. 28-36, 2010.
- Jl, J.; SUN, J.; QI, H.; SOONG, L. **Analysis of T helper cell responses during infection with Leishmania amazonensis.** Am J Trop Med Hyg, v. 66, n. 4, p. 338-345, 2002.
- Jl, J.; SUN, J.; SOONG, L. **Impaired expression of inflammatory cytokines and chemokines at early stages of infection with Leishmania amazonensis.** Infect Immun, v. 71, n. 8, p. 4278-4288, 2003.
- KAISER, D. **Control of multicellular development: Dictyostelium and Myxococcus.** Annu Rev Genet, v. 20, p. 539-566, 1986.
- KAISER, D.; LOSICK, R. **How and why bacteria talk to each other.** Cell, v. 73, n. 5, p. 873-885, 1993.
- KALINSKI, P. **Regulation of immune responses by prostaglandin E2.** J Immunol, v. 188, n. 1, p. 21-28, 2012.
- KANE, M. M.; MOSSER, D. M. **Leishmania parasites and their ploys to disrupt macrophage activation.** Curr Opin Hematol, v. 7, n. 1, p. 26-31, 2000.
- _____. **The role of IL-10 in promoting disease progression in leishmaniasis.** J Immunol, v. 166, n. 2, p. 1141-1147, 2001.
- KAUL, V.; VAN KAER, L.; DAS, G.; DAS, J. **Prostanoid receptor 2 signaling protects T helper 2 cells from BALB/c mice against activation-induced cell death.** J Biol Chem, v. 287, n. 30, p. 25434-25439, 2012.
- KIM, O. Y.; LEE, S. M.; CHUNG, J. H.; DO, H. J.; MOON, J.; SHIN, M. J. **Arginase I and the very low-density lipoprotein receptor are associated with phenotypic biomarkers for obesity.** Nutrition, v. 28, n. 6, p. 635-639, 2012.

KRIESER, R. J.; MOORE, F. E.; DRESNEK, D.; PELLOCK, B. J.; PATEL, R.; HUANG, A.; BRACHMANN, C.; WHITE, K. **The Drosophila homolog of the putative phosphatidylserine receptor functions to inhibit apoptosis.** *Development*, v. 134, n. 13, p. 2407-2414, 2007.

KROPF, P.; BAUD, D.; MARSHALL, S. E.; MUNDER, M.; MOSLEY, A.; FUENTES, J. M.; BANGHAM, C. R.; TAYLOR, G. P.; HERATH, S.; CHOI, B. S.; SOLER, G.; TEOH, T.; MODOLELL, M.; MULLER, I. **Arginase activity mediates reversible T cell hyporesponsiveness in human pregnancy.** *Eur J Immunol*, v. 37, n. 4, p. 935-945, 2007.

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

KUCHROO, V. K.; MEYERS, J. H.; UMETSU, D. T.; DEKRUYFF, R. H. **TIM family of genes in immunity and tolerance.** *Adv Immunol*, v. 91, p. 227-249, 2006.

KUNISAKI, Y.; MASUKO, S.; NODA, M.; INAYOSHI, A.; SANUI, T.; HARADA, M.; SASAZUKI, T.; FUKUI, Y. **Defective fetal liver erythropoiesis and T lymphopoiesis in mice lacking the phosphatidylserine receptor.** *Blood*, v. 103, n. 9, p. 3362-3364, 2004.

LAINSON, R.; RYAN, L.; SHAW, J. J. **Infective stages of Leishmania in the sandfly vector and some observations on the mechanism of transmission.** *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v. 82, n. 3, p. 421-424, 1987.

LAINSON, R.; SHAW, J. J.; SILVEIRA, F. T. **Dermal and visceral leishmaniasis and their causative agents.** *Trans R Soc Trop Med Hyg*, v. 81, n. 4, p. 702-703, 1987.

LANG, T.; DE CHASTELLIER, C.; FREHEL, C.; HELLIO, R.; METEZEAU, P.; LEO SDE, S.; ANTOINE, J. C. **Distribution of MHC class I and of MHC class II molecules in macrophages infected with Leishmania amazonensis.** *J Cell Sci*, v. 107 (Pt 1), p. 69-82, 1994.

LANG, T.; HELLIO, R.; KAYE, P. M.; ANTOINE, J. C. **Leishmania donovani-infected macrophages: characterization of the parasitophorous vacuole and potential role of this organelle in antigen presentation.** *J Cell Sci*, v. 107 (Pt 8), p. 2137-2150, 1994.

LASKAY, T.; VAN ZANDBERGEN, G.; SOLBACH, W. **Neutrophil granulocytes as host cells and transport vehicles for intracellular pathogens: apoptosis as infection-promoting factor.** *Immunobiology*, v. 213, n. 3-4, p. 183-191, 2008.

LAWRENCE, T.; WILLOUGHBY, D. A.; GILROY, D. W. **Anti-inflammatory lipid mediators and insights into the resolution of inflammation.** *Nat Rev Immunol*, v. 2, n. 10, p. 787-795, 2002.

LI, H.; ROMIEU, I.; SIENRA-MONGE, J. J.; RAMIREZ-AGUILAR, M.; ESTELA DEL RIO-NAVARRO, B.; KISTNER, E. O.; GJESSING, H. K.; LARA-SANCHEZ IDEL, C.; CHIU, G. Y.; LONDON, S. J. **Genetic polymorphisms in arginase I and II and childhood asthma and atopy.** *J Allergy Clin Immunol*, v. 117, n. 1, p. 119-126, 2006.

LI, M. O.; SARKISIAN, M. R.; MEHAL, W. Z.; RAKIC, P.; FLAVELL, R. A. **Phosphatidylserine receptor is required for clearance of apoptotic cells.** *Science*, v. 302, n. 5650, p. 1560-1563, 2003.

LISSBRANT, I. F.; STATTIN, P.; WIKSTROM, P.; DAMBER, J. E.; EGEVAD, L.; BERGH, A. **Tumor associated macrophages in human prostate cancer: relation to clinicopathological variables and survival.** *Int J Oncol*, v. 17, n. 3, p. 445-451, 2000.

LIU, M.; YANG, S. C.; SHARMA, S.; LUO, J.; CUI, X.; PEEBLES, K. A.; HUANG, M.; SATO, M.; RAMIREZ, R. D.; SHAY, J. W.; MINNA, J. D.; DUBINETT, S. M. **EGFR signaling is required for TGF-beta 1 mediated COX-2 induction in human bronchial epithelial cells.** *Am J Respir Cell Mol Biol*, v. 37, n. 5, p. 578-588, 2007.

LOUZIR, H.; MELBY, P. C.; BEN SALAH, A.; MARRAKCHI, H.; AOUN, K.; BEN ISMAIL, R.; DELLAGI, K. **Immunologic determinants of disease evolution in localized cutaneous leishmaniasis due to Leishmania major.** *J Infect Dis*, v. 177, n. 6, p. 1687-1695, 1998.

- MARCHESINI, N.; DOCAMPO, R. **A plasma membrane P-type H(+)-ATPase regulates intracellular pH in *Leishmania mexicana amazonensis***. *Mol Biochem Parasitol*, v. 119, n. 2, p. 225-236, 2002.
- MATSUMURA, T.; SUZUKI, T.; AIZAWA, K.; SAWAKI, D.; MUNEMASA, Y.; ISHIDA, J.; NAGAI, R. **Regulation of transforming growth factor-beta-dependent cyclooxygenase-2 expression in fibroblasts**. *J Biol Chem*, v. 284, n. 51, p. 35861-35871, 2009.
- MATTE, C.; MAION, G.; MOURAD, W.; OLIVIER, M. ***Leishmania donovani*-induced macrophages cyclooxygenase-2 and prostaglandin E2 synthesis**. *Parasite Immunol*, v. 23, n. 4, p. 177-184, 2001.
- MCDONALD, P. P.; FADOK, V. A.; BRATTON, D.; HENSON, P. M. **Transcriptional and translational regulation of inflammatory mediator production by endogenous TGF-beta in macrophages that have ingested apoptotic cells**. *J Immunol*, v. 163, n. 11, p. 6164-6172, 1999.
- MERCER, J.; HELENIUS, A. **Vaccinia virus uses macropinocytosis and apoptotic mimicry to enter host cells**. *Science*, v. 320, n. 5875, p. 531-535, 2008.
- MILLER, D. K. **The role of the Caspase family of cysteine proteases in apoptosis**. *Semin Immunol*, v. 9, n. 1, p. 35-49, 1997.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Manual de Vigilância Tegumentar Americana**. 2009 3ª edição atualizada Ministério da Saúde – Portal da Saúde, acessado em março de 2013 (http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/visualizar_texto.cfm?idtxt=31927)
- MITCHELL, J. E.; CVETANOVIC, M.; TIBREWAL, N.; PATEL, V.; COLAMONICI, O. R.; LI, M. O.; FLAVELL, R. A.; LEVINE, J. S.; BIRGE, R. B.; UCKER, D. S. **The presumptive phosphatidylserine receptor is dispensable for innate anti-inflammatory recognition and clearance of apoptotic cells**. *J Biol Chem*, v. 281, n. 9, p. 5718-5725, 2006.
- MODOLELL, M.; CHOI, B. S.; RYAN, R. O.; HANCOCK, M.; TITUS, R. G.; ABEBE, T.; HAILU, A.; MULLER, I.; ROGERS, M. E.; BANGHAM, C. R.; MUNDER, M.; KROPF, P. **Local suppression of T cell responses by arginase-induced L-arginine depletion in nonhealing leishmaniasis**. *PLoS Negl Trop Dis*, v. 3, n. 7, p. e480, 2009.
- MODOLELL, M.; CORRALIZA, I. M.; LINK, F.; SOLER, G.; EICHMANN, K. **Reciprocal regulation of the nitric oxide synthase/arginase balance in mouse bone marrow-derived macrophages by TH1 and TH2 cytokines**. *Eur J Immunol*, v. 25, n. 4, p. 1101-1104, 1995.
- MOREIRA, M. E.; BARCINSKI, M. A. **Apoptotic cell and phagocyte interplay: recognition and consequences in different cell systems**. *An Acad Bras Cienc*, v. 76, n. 1, p. 93-115, 2004.
- MOREIRA, M. E.; DEL PORTILLO, H. A.; MILDNER, R. V.; BALANCO, J. M.; BARCINSKI, M. A. **Heat shock induction of apoptosis in promastigotes of the unicellular organism *Leishmania (Leishmania) amazonensis***. *J Cell Physiol*, v. 167, n. 2, p. 305-313, 1996.
- MORI, M.; GOTOH, T. **Regulation of nitric oxide production by arginine metabolic enzymes**. *Biochem Biophys Res Commun*, v. 275, n. 3, p. 715-719, 2000.
- MORRIS, S. M., JR. **Regulation of enzymes of the urea cycle and arginine metabolism**. *Annu Rev Nutr*, v. 22, p. 87-105, 2002.
- MORRIS, S. M., JR.; KEPKA-LENHART, D.; CHEN, L. C. **Differential regulation of arginases and inducible nitric oxide synthase in murine macrophage cells**. *Am J Physiol*, v. 275, n. 5 Pt 1, p. E740-747, 1998.
- MUNDER, M. **Arginase: an emerging key player in the mammalian immune system**. *Br J Pharmacol*, v. 158, n. 3, p. 638-651, 2009.
- MUNDER, M.; EICHMANN, K.; MORAN, J. M.; CENTENO, F.; SOLER, G.; MODOLELL, M. **Th1/Th2-regulated expression of arginase isoforms in murine macrophages and dendritic cells**. *J Immunol*, v. 163, n. 7, p. 3771-3777, 1999.

- NADERER, T.; MCCONVILLE, M. J. **The Leishmania-macrophage interaction: a metabolic perspective.** Cell Microbiol, v. 10, n. 2, p. 301-308, 2008.
- NARUMIYA, S. **Prostanoids and inflammation: a new concept arising from receptor knockout mice.** J Mol Med (Berl), v. 87, n. 10, p. 1015-1022, 2009.
- NORTH, M. L.; KHANNA, N.; MARSDEN, P. A.; GRASEMANN, H.; SCOTT, J. A. **Functionally important role for arginase 1 in the airway hyperresponsiveness of asthma.** Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, v. 296, n. 6, p. L911-920, 2009.
- OBERHAMMER, F. A.; HOCHEGGER, K.; FROSCHL, G.; TIEFENBACHER, R.; PAVELKA, M. **Chromatin condensation during apoptosis is accompanied by degradation of lamin A+B, without enhanced activation of cdc2 kinase.** J Cell Biol, v. 126, n. 4, p. 827-837, 1994.
- OTSUKA, M.; NEGISHI, Y.; ARAMAKI, Y. **Involvement of phosphatidylinositol-3-kinase and ERK pathways in the production of TGF-beta1 by macrophages treated with liposomes composed of phosphatidylserine.** FEBS Lett, v. 581, n. 2, p. 325-330, 2007.
- OZER, L.; ELGUN, S.; OZDEMIR, B.; PERVANE, B.; OZMERIC, N. **Arginine-nitric oxide-polyamine metabolism in periodontal disease.** J Periodontol, v. 82, n. 2, p. 320-328.
- PARK, G. Y.; CHRISTMAN, J. W. **Involvement of cyclooxygenase-2 and prostaglandins in the molecular pathogenesis of inflammatory lung diseases.** Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, v. 290, n. 5, p. L797-805, 2006.
- PERANZONI, E.; MARIGO, I.; DOLCETTI, L.; UGEL, S.; SONDA, N.; TASCHIN, E.; MANTELLI, B.; BRONTE, V.; ZANOVELLO, P. **Role of arginine metabolism in immunity and immunopathology.** Immunobiology, v. 212, n. 9-10, p. 795-812, 2007.
- PEREZ, G.; OLIVARES, I. M.; RODRIGUEZ, M. G.; CEBALLOS, G. M.; GARCIA SANCHEZ, J. R. **Arginase activity in patients with breast cancer: an analysis of plasma, tumors, and its relationship with the presence of the estrogen receptor.** Onkologie, v. 35, n. 10, p. 570-574, 2012.
- PERROTTA, I.; BRUNELLI, E.; SCIANGULA, A.; CONFORTI, F.; PERROTTA, E.; TRIPEPI, S.; DONATO, G.; CASSESE, M. **iNOS induction and PARP-1 activation in human atherosclerotic lesions: an immunohistochemical and ultrastructural approach.** Cardiovasc Pathol, v. 20, n. 4, p. 195-203, 2011.
- PESCE, J. T.; RAMALINGAM, T. R.; MENTINK-KANE, M. M.; WILSON, M. S.; EL KASMI, K. C.; SMITH, A. M.; THOMPSON, R. W.; CHEEVER, A. W.; MURRAY, P. J.; WYNN, T. A. **Arginase-1-expressing macrophages suppress Th2 cytokine-driven inflammation and fibrosis.** PLoS Pathog, v. 5, n. 4, p. e1000371, 2009.
- PETERS-GOLDEN, M.; CANETTI, C.; MANCUSO, P.; COFFEY, M. J. **Leukotrienes: underappreciated mediators of innate immune responses.** J Immunol, v. 174, n. 2, p. 589-594, 2005.
- PETERS-GOLDEN, M.; HENDERSON, W. R., JR. **Leukotrienes.** N Engl J Med, v. 357, n. 18, p. 1841-1854, 2007.
- PETERS, C.; STIERHOF, Y. D.; ILG, T. **Proteophosphoglycan secreted by Leishmania mexicana amastigotes causes vacuole formation in macrophages.** Infect Immun, v. 65, n. 2, p. 783-786, 1997.
- PETERS, N. C.; EGEN, J. G.; SECUNDINO, N.; DEBRABANT, A.; KIMBLIN, N.; KAMHAWI, S.; LAWYER, P.; FAY, M. P.; GERMAIN, R. N.; SACKS, D. **In vivo imaging reveals an essential role for neutrophils in leishmaniasis transmitted by sand flies.** Science, v. 321, n. 5891, p. 970-974, 2008.
- PETERSEN, E. A.; NEVA, F. A.; OSTER, C. N.; BOGAERT DIAZ, H. **Specific inhibition of lymphocyte-proliferation responses by adherent suppressor cells in diffuse cutaneous leishmaniasis.** N Engl J Med, v. 306, n. 7, p. 387-392, 1982.
- PINHEIRO, R. O.; NUNES, M. P.; PINHEIRO, C. S.; D'AVILA, H.; BOZZA, P. T.; TAKIYA, C. M.; CORTE-REAL, S.; FREIRE-DE-LIMA, C. G.; DOSREIS, G. A. **Induction of autophagy correlates with increased parasite load of Leishmania amazonensis in BALB/c but not C57BL/6 macrophages.** Microbes Infect, v. 11, n. 2, p. 181-190, 2009.

- POLAT, M. F.; TAYSI, S.; POLAT, S.; BOYUK, A.; BAKAN, E. **Elevated serum arginase activity levels in patients with breast cancer.** Surg Today, v. 33, n. 9, p. 655-661, 2003.
- POPOVIC, P. J.; POPOVIC, P. J.; ZEH, H. J., 3RD; OCHOA, J. B. **Arginine and immunity.** J Nutr, v. 137, n. 6 Suppl 2, p. 1681S-1686S, 2007.
- PRINA, E.; ANTOINE, J. C.; WIEDERANDERS, B.; KIRSCHKE, H. **Localization and activity of various lysosomal proteases in Leishmania amazonensis-infected macrophages.** Infect Immun, v. 58, n. 6, p. 1730-1737, 1990.
- PRINA, E.; JOUANNE, C.; DE SOUZA LAO, S.; SZABO, A.; GUILLET, J. G.; ANTOINE, J. C. **Antigen presentation capacity of murine macrophages infected with Leishmania amazonensis amastigotes.** J Immunol, v. 151, n. 4, p. 2050-2061, 1993.
- PROTO, W. R.; COOMBS, G. H.; MOTTRAM, J. C. **Cell death in parasitic protozoa: regulated or incidental?** Nat Rev Microbiol, v. 11, n. 1, p. 58-66.
- QI, H.; JI, J.; WANASEN, N.; SOONG, L. **Enhanced replication of Leishmania amazonensis amastigotes in gamma interferon-stimulated murine macrophages: implications for the pathogenesis of cutaneous leishmaniasis.** Infect Immun, v. 72, n. 2, p. 988-995, 2004.
- QUEIROZ, A.; SOUSA, R.; HEINE, C.; CARDOSO, M.; GUIMARAES, L. H.; MACHADO, P. R.; CARVALHO, E. M.; RILEY, L. W.; WILSON, M. E.; SCHRIEFER, A. **Association between an emerging disseminated form of leishmaniasis and Leishmania (Viannia) braziliensis strain polymorphisms.** J Clin Microbiol, v. 50, n. 12, p. 4028-4034, 2012.
- REAL, F.; POUCHELET, M.; RABINOVITCH, M. **Leishmania (L.) amazonensis: fusion between parasitophorous vacuoles in infected bone-marrow derived mouse macrophages.** Exp Parasitol, v. 119, n. 1, p. 15-23, 2008.
- REINER, N. E.; MALEMUD, C. J. **Arachidonic acid metabolism by murine peritoneal macrophages infected with Leishmania donovani: in vitro evidence for parasite-induced alterations in cyclooxygenase and lipoxygenase pathways.** J Immunol, v. 134, n. 1, p. 556-563, 1985.
- _____. **Arachidonic acid metabolism in murine leishmaniasis (Donovani): ex-vivo evidence for increased cyclooxygenase and 5-lipoxygenase activity in spleen cells.** Cell Immunol, v. 88, n. 2, p. 501-510, 1984.
- REINER, N. E.; NG, W.; MA, T.; MCMASTER, W. R. **Kinetics of gamma interferon binding and induction of major histocompatibility complex class II mRNA in Leishmania-infected macrophages.** Proc Natl Acad Sci U S A, v. 85, n. 12, p. 4330-4334, 1988.
- REINER, N. E.; SCHULTZ, L. A.; MALEMUD, C. J. **Eicosanoid metabolism by Leishmania donovani-infected macrophages: mouse strain responses in prostanoid synthesis.** Am J Trop Med Hyg, v. 38, n. 1, p. 59-64, 1988.
- RIBEIRO-GOMES, F. L.; MONIZ-DE-SOUZA, M. C.; BORGES, V. M.; NUNES, M. P.; MANTUANO-BARRADAS, M.; D'AVILA, H.; BOZZA, P. T.; CALICH, V. L.; DOSREIS, G. A. **Turnover of neutrophils mediated by Fas ligand drives Leishmania major infection.** J Infect Dis, v. 192, n. 6, p. 1127-1134, 2005.
- RIBEIRO-GOMES, F. L.; OTERO, A. C.; GOMES, N. A.; MONIZ-DE-SOUZA, M. C.; CYSNE-FINKELSTEIN, L.; ARNHOLDT, A. C.; CALICH, V. L.; COUTINHO, S. G.; LOPES, M. F.; DOSREIS, G. A. **Macrophage interactions with neutrophils regulate Leishmania major infection.** J Immunol, v. 172, n. 7, p. 4454-4462, 2004.
- RIESER, C.; BOCK, G.; KLOCKER, H.; BARTSCH, G.; THURNHER, M. **Prostaglandin E2 and tumor necrosis factor alpha cooperate to activate human dendritic cells: synergistic activation of interleukin 12 production.** J Exp Med, v. 186, n. 9, p. 1603-1608, 1997.
- RILEY, E.; ROBERTS, S. C.; ULLMAN, B. **Inhibition profile of Leishmania mexicana arginase reveals differences with human arginase I.** Int J Parasitol, v. 41, n. 5, p. 545-552, 2011.

- RITTER, U.; FRISCHKNECHT, F.; VAN ZANDBERGEN, G. **Are neutrophils important host cells for Leishmania parasites?** Trends Parasitol, v. 25, n. 11, p. 505-510, 2009.
- RODRIGUEZ-MANZANET, R.; DEKRUYFF, R.; KUCHROO, V. K.; UMETSU, D. T. **The costimulatory role of TIM molecules.** Immunol Rev, v. 229, n. 1, p. 259-270, 2009.
- RODRIGUEZ, P. C.; HERNANDEZ, C. P.; QUICENO, D.; DUBINETT, S. M.; ZABALETA, J.; OCHOA, J. B.; GILBERT, J.; OCHOA, A. C. **Arginase I in myeloid suppressor cells is induced by COX-2 in lung carcinoma.** J Exp Med, v. 202, n. 7, p. 931-939, 2005.
- RODRIGUEZ, P. C.; QUICENO, D. G.; ZABALETA, J.; ORTIZ, B.; ZEA, A. H.; PIAZUELO, M. B.; DELGADO, A.; CORREA, P.; BRAYER, J.; SOTOMAYOR, E. M.; ANTONIA, S.; OCHOA, J. B.; OCHOA, A. C. **Arginase I production in the tumor microenvironment by mature myeloid cells inhibits T-cell receptor expression and antigen-specific T-cell responses.** Cancer Res, v. 64, n. 16, p. 5839-5849, 2004.
- SACKS, D.; NOBEN-TRAUTH, N. **The immunology of susceptibility and resistance to Leishmania major in mice.** Nat Rev Immunol, v. 2, n. 11, p. 845-858, 2002.
- SACKS, D.; SHER, A. **Evasion of innate immunity by parasitic protozoa.** Nat Immunol, v. 3, n. 11, p. 1041-1047, 2002.
- SACKS, D. L.; PERKINS, P. V. **Identification of an infective stage of Leishmania promastigotes.** Science, v. 223, n. 4643, p. 1417-1419, 1984.
- SANTIAGO, C.; BALLESTEROS, A.; TAMI, C.; MARTINEZ-MUNOZ, L.; KAPLAN, G. G.; CASASNOVAS, J. M. **Structures of T Cell immunoglobulin mucin receptors 1 and 2 reveal mechanisms for regulation of immune responses by the TIM receptor family.** Immunity, v. 26, n. 3, p. 299-310, 2007.
- SAVILL, J.; DRANSFIELD, I.; GREGORY, C.; HASLETT, C. **A blast from the past: clearance of apoptotic cells regulates immune responses.** Nat Rev Immunol, v. 2, n. 12, p. 965-975, 2002.
- SAVILL, J.; FADOK, V. **Corpse clearance defines the meaning of cell death.** Nature, v. 407, n. 6805, p. 784-788, 2000.
- SAVILL, J.; HASLETT, C. **Granulocyte clearance by apoptosis in the resolution of inflammation.** Semin Cell Biol, v. 6, n. 6, p. 385-393, 1995.
- SCOTT, P.; SHER, A. **A spectrum in the susceptibility of leishmanial strains to intracellular killing by murine macrophages.** J Immunol, v. 136, n. 4, p. 1461-1466, 1986.
- SEABRA, S. H.; DE SOUZA, W.; DAMATTA, R. A. **Toxoplasma gondii exposes phosphatidylserine inducing a TGF-beta1 autocrine effect orchestrating macrophage evasion.** Biochem Biophys Res Commun, v. 324, n. 2, p. 744-752, 2004.
- SEREZANI, C. H.; CHUNG, J.; BALLINGER, M. N.; MOORE, B. B.; ARONOFF, D. M.; PETERS-GOLDEN, M. **Prostaglandin E2 suppresses bacterial killing in alveolar macrophages by inhibiting NADPH oxidase.** Am J Respir Cell Mol Biol, v. 37, n. 5, p. 562-570, 2007.
- SERHAN, C. N. **Novel lipid mediators and resolution mechanisms in acute inflammation: to resolve or not?** Am J Pathol, v. 177, n. 4, p. 1576-1591, 2010.
- SERHAN, C. N.; CHIANG, N.; VAN DYKE, T. E. **Resolving inflammation: dual anti-inflammatory and pro-resolution lipid mediators.** Nat Rev Immunol, v. 8, n. 5, p. 349-361, 2008.
- SHENG, H.; SHAO, J.; DIXON, D. A.; WILLIAMS, C. S.; PRESCOTT, S. M.; DUBOIS, R. N.; BEAUCHAMP, R. D. **Transforming growth factor-beta1 enhances Ha-ras-induced expression of cyclooxygenase-2 in intestinal epithelial cells via stabilization of mRNA.** J Biol Chem, v. 275, n. 9, p. 6628-6635, 2000.
- SHWEASH, M.; ADRIENNE MCGACHY, H.; SCHROEDER, J.; NEAMATALLAH, T.; BRYANT, C. E.; MILLINGTON, O.; MOTTRAM, J. C.; ALEXANDER, J.; PLEVIN, R. **Leishmania mexicana promastigotes inhibit macrophage IL-12 production via TLR-4 dependent COX-2, iNOS and arginase-1 expression.** Mol Immunol, v. 48, n. 15-16, p. 1800-1808.

SILVEIRA, F. T.; LAINSON, R.; CORBETT, C. E. **Clinical and immunopathological spectrum of American cutaneous leishmaniasis with special reference to the disease in Amazonian Brazil: a review.** Mem Inst Oswaldo Cruz, v. 99, n. 3, p. 239-251, 2004.

SIPPEL, T. R.; WHITE, J.; NAG, K.; TSVANKIN, V.; KLAASSEN, M.; KLEINSCHMIDT-DEMASTERS, B. K.; WAZIRI, A. **Neutrophil degranulation and immunosuppression in patients with GBM: restoration of cellular immune function by targeting arginase I.** Clin Cancer Res, v. 17, n. 22, p. 6992-7002, 2011.

SOONG, L. **Subversion and Utilization of Host Innate Defense by Leishmania amazonensis.** Front Immunol, v. 3, p. 58, 2012.

SOONG, L.; CHANG, C. H.; SUN, J.; LONGLEY, B. J., JR.; RUDDLE, N. H.; FLAVELL, R. A.; MCMAHON-PRATT, D. **Role of CD4+ T cells in pathogenesis associated with Leishmania amazonensis infection.** J Immunol, v. 158, n. 11, p. 5374-5383, 1997.

STUART, K. **Kinetoplast DNA, mitochondrial DNA with a difference.** 1983. 93-104 f. (9) - Mol Biochem Parasitol, 1983.

SUGIMOTO, Y.; NARUMIYA, S. **Prostaglandin E receptors.** J Biol Chem, v. 282, n. 16, p. 11613-11617, 2007.

TAIT, J. F.; GIBSON, D. **Phospholipid binding of annexin V: effects of calcium and membrane phosphatidylserine content.** Arch Biochem Biophys, v. 298, n. 1, p. 187-191, 1992.

TAKELE, Y.; ABEBE, T.; WELDEGEBREAL, T.; HAILU, A.; HAILU, W.; HURISSA, Z.; ALI, J.; DIRO, E.; SISAY, Y.; CLOKE, T.; MODOLELL, M.; MUNDER, M.; TACCHINI-COTTIER, F.; MULLER, I.; KROPF, P. **Arginase activity in the blood of patients with visceral leishmaniasis and HIV infection.** PLoS Negl Trop Dis, v. 7, n. 1, p. e1977.

TEKTAS, A. K.; USLU, S.; YALCIN, A. U.; SAHIN, G.; TEMIZ, G.; KARA, M.; TEMEL, H. E.; DEMIRKAN, E. S.; COLAK, E.; COLAK, O. **Effects of lipoprotein-associated phospholipase A2 on arginase/nitric oxide pathway in hemodialysis patients.** Ren Fail, v. 34, n. 6, p. 738-743, 2012.

TEPPER, A. D.; RUURS, P.; WIEDMER, T.; SIMS, P. J.; BORST, J.; VAN BLITTERSWIJK, W. J. **Sphingomyelin hydrolysis to ceramide during the execution phase of apoptosis results from phospholipid scrambling and alters cell-surface morphology.** J Cell Biol, v. 150, n. 1, p. 155-164, 2000.

TOUNEKTI, O.; BELEHRADEK, J., JR.; MIR, L. M. **Relationships between DNA fragmentation, chromatin condensation, and changes in flow cytometry profiles detected during apoptosis.** Exp Cell Res, v. 217, n. 2, p. 506-516, 1995.

VAN DEN EIJNDE, S. M.; BOSCHART, L.; BAEHRECKE, E. H.; DE ZEEUW, C. I.; REUTELINGSPERGER, C. P.; VERMEIJ-KEERS, C. **Cell surface exposure of phosphatidylserine during apoptosis is phylogenetically conserved.** Apoptosis, v. 3, n. 1, p. 9-16, 1998.

VAN NIEUWENHOVE, S.; SCHECHTER, P. J.; DECLERCQ, J.; BONE, G.; BURKE, J.; SJOERDSMA, A. **Treatment of gambiense sleeping sickness in the Sudan with oral DFMO (DL-alpha-difluoromethylornithine), an inhibitor of ornithine decarboxylase; first field trial.** Trans R Soc Trop Med Hyg, v. 79, n. 5, p. 692-698, 1985.

VAN ZANDBERGEN, G.; BOLLINGER, A.; WENZEL, A.; KAMHAWI, S.; VOLL, R.; KLINGER, M.; MULLER, A.; HOLSCHER, C.; HERRMANN, M.; SACKS, D.; SOLBACH, W.; LASKAY, T. **Leishmania disease development depends on the presence of apoptotic promastigotes in the virulent inoculum.** Proc Natl Acad Sci U S A, v. 103, n. 37, p. 13837-13842, 2006.

VERAS, P. S.; DE CHASTELLIER, C.; RABINOVITCH, M. **Transfer of zymosan (yeast cell walls) to the parasitophorous vacuoles of macrophages infected with Leishmania amazonensis.** J Exp Med, v. 176, n. 3, p. 639-646, 1992.

VERHOVEN, B.; SCHLEGEL, R. A.; WILLIAMSON, P. **Mechanisms of phosphatidylserine exposure, a phagocyte recognition signal, on apoptotic T lymphocytes.** J Exp Med, v. 182, n. 5, p. 1597-1601, 1995.

- VINCENDEAU, P.; GOBERT, A. P.; DAULOUEDE, S.; MOYNET, D.; MOSSALAYI, M. D. **Arginases in parasitic diseases.** Trends Parasitol, v. 19, n. 1, p. 9-12, 2003.
- VOLL, R. E.; HERRMANN, M.; ROTH, E. A.; STACH, C.; KALDEN, J. R.; GIRKONTAITE, I. **Immunosuppressive effects of apoptotic cells.** Nature, v. 390, n. 6658, p. 350-351, 1997.
- WANASEN, N.; SOONG, L. **L-arginine and cationic amino acid transporter 2B regulate growth and survival of Leishmania amazonensis amastigotes in macrophages.** Infect Immun, v. 75, n. 6, p. 2802-2810, 2007.
- WANASEN, N.; SOONG, L. **L-arginine metabolism and its impact on host immunity against Leishmania infection.** Immunol Res, v. 41, n. 1, p. 15-25, 2008.
- WANDERLEY, J. L.; BENJAMIN, A.; REAL, F.; BONOMO, A.; MOREIRA, M. E.; BARCINSKI, M. A. **Apoptotic mimicry: an altruistic behavior in host/Leishmania interplay.** Braz J Med Biol Res, v. 38, n. 6, p. 807-812, 2005.
- WANDERLEY, J. L.; MOREIRA, M. E.; BENJAMIN, A.; BONOMO, A. C.; BARCINSKI, M. A. **Mimicry of apoptotic cells by exposing phosphatidylserine participates in the establishment of amastigotes of Leishmania (L) amazonensis in mammalian hosts.** J Immunol, v. 176, n. 3, p. 1834-1839, 2006.
- WANDERLEY, J. L.; PINTO DA SILVA, L. H.; DEOLINDO, P.; SOONG, L.; BORGES, V. M.; PRATES, D. B.; DE SOUZA, A. P.; BARRAL, A.; BALANCO, J. M.; DO NASCIMENTO, M. T.; SARAIVA, E. M.; BARCINSKI, M. A. **Cooperation between apoptotic and viable metacyclics enhances the pathogenesis of Leishmaniasis.** PLoS One, v. 4, n. 5, p. e5733, 2009.
- World Health Organization (WHO). **Control of the leishmaniasis: report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniasis, Geneva, 22-26 March 2010**
- WU, G.; MORRIS, S. M., JR. **Arginine metabolism: nitric oxide and beyond.** Biochem J, v. 336 (Pt 1), p. 1-17, 1998.
- XIAO, Y. Q.; FREIRE-DE-LIMA, C. G.; JANSSEN, W. J.; MORIMOTO, K.; LYU, D.; BRATTON, D. L.; HENSON, P. M. **Oxidants selectively reverse TGF-beta suppression of proinflammatory mediator production.** J Immunol, v. 176, n. 2, p. 1209-1217, 2006.
- YACHIMOVICH-COHEN, N.; EVEN-RAM, S.; SHUFARO, Y.; RACHMILEWITZ, J.; REUBINOFF, B. **Human embryonic stem cells suppress T cell responses via arginase I-dependent mechanism.** J Immunol, v. 184, n. 3, p. 1300-1308.
- YANG, M. Y.; CHUANG, H.; CHEN, R. F.; YANG, K. D. **Reversible phosphatidylserine expression on blood granulocytes related to membrane perturbation but not DNA strand breaks.** J Leukoc Biol, v. 71, n. 2, p. 231-237, 2002.
- YURCHENKO, V.; KOLESNIKOV, A. A.; LUKES, J. **Phylogenetic analysis of Trypanosomatina (Protozoa: Kinetoplastida) based on minicircle conserved regions.** Folia Parasitol (Praha), v. 47, n. 1, p. 1-5, 2000.
- ZABALETA, J.; MCGEE, D. J.; ZEA, A. H.; HERNANDEZ, C. P.; RODRIGUEZ, P. C.; SIERRA, R. A.; CORREA, P.; OCHOA, A. C. **Helicobacter pylori arginase inhibits T cell proliferation and reduces the expression of the TCR zeta-chain (CD3zeta).** J Immunol, v. 173, n. 1, p. 586-593, 2004.
- ZAMBONI, D. S.; RABINOVITCH, M. **Phagocytosis of apoptotic cells increases the susceptibility of macrophages to infection with Coxiella burnetii phase II through down-modulation of nitric oxide production.** Infect Immun, v. 72, n. 4, p. 2075-2080, 2004.
- ZEA, A. H.; RODRIGUEZ, P. C.; ATKINS, M. B.; HERNANDEZ, C.; SIGNORETTI, S.; ZABALETA, J.; MCDERMOTT, D.; QUICENO, D.; YOUMANS, A.; O'NEILL, A.; MIER, J.; OCHOA, A. C. **Arginase-producing myeloid suppressor cells in renal cell carcinoma patients: a mechanism of tumor evasion.** Cancer Res, v. 65, n. 8, p. 3044-3048, 2005.

