UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ZOOTECNIA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS

JÚLIO ABEL ALFREDO DOS SANTOS SIMONE COME

**Prospecção de novas moléculas naturais e sintéticas na inibição *in vitro*
da arginase recombinante de *Leishmania (Leishmania) amazonensis***

Pirassununga

2019

JÚLIO ABEL ALFREDO DOS SANTOS SIMONE COME

**Prospecção de novas moléculas naturais e sintéticas na inibição *in vitro*
da arginase recombinante de *Leishmania (Leishmania) amazonensis*
(Versão corrigida)**

Tese apresentada à Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências do programa de pós-graduação em Biociência Animal

Área de concentração: Bioagentes patogênicos

Orientador: Prof. Dr. Edson Roberto da Silva

Pirassununga

2019

Ficha catalográfica elaborada pelo
Serviço de Biblioteca e Informação, FZEA/USP, com
os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

C732p Come, Júlio Abel Alfredo dos Santos Simone
Prospecção de novas moléculas naturais e
sintéticas na inibição in vitro da arginase
recombinante de Leishmania (Leishmania) amazonensis
/ Júlio Abel Alfredo dos Santos Simone Come ;
orientador Edson Roberto da Silva. -- Pirassununga,
2019.
102 f.
Tese (Doutorado - Programa de Pós-Graduação em
Biociência Animal) -- Faculdade de Zootecnia e
Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo.
1. Leishmania amazonensis. 2. Arginase. 3.
Inibidores de arginase. 4. Poliaminas. 5.
Tiosemicarbazida. I. da Silva, Edson Roberto,
orient. II. Título.

DEDICATÓRIA

À minha esposa, **Ana Isménia da Conceição Come**, pela sua abnegada firmeza e entrega na condução do leme da nossa pequena-grande família. O Amor é compassivo, tudo crê, tudo espera e tudo suporta.

Aos meus Filhos, **Belton & Hector**, que pouco entenderam esta ausência paterna ao longo destes anos de formação...Filhos, por vezes temos que fazer pequenos sacrifícios para evitar grandes sofrimentos.

**À toda minha família
esta conquista é de todos nós!**

AGRADECIMENTOS

A Deus pelas inúmeras dádivas concedidas e saúde ao longo da minha caminhada.

Ao Ministério de Ciência e Tecnologia, Ensino Superior e Técnico-Profissional de Moçambique (MCTESTP) pela concessão da bolsa de estudos, sem este apoio este sonho não se tornaria realidade.

Ao Prof. Edson Roberto da Silva, por me conceder a oportunidade de trabalhar neste projeto. Agradeço igualmente pelo seu apoio, seus conselhos, sua disponibilidade, sua confiança, sua paciência, sem esquecer o respeito pela minha autonomia durante a realização desta tese. Eu aprendi muito com o Senhor Prof.! Obrigado pela sua “lapidação”.

Aos professores A. Maia, F. Meireles, F. Perecin e J. Silveira, pela partilha do laboratório. A todos colegas e técnicos do laboratório vai o meu muito obrigado pelos ensinamentos, troca de experiência e todo apoio concedido durante a realização de todas as atividades da formação. A todos os amigos professores, funcionários e alunos da FZEA e FMVZ - USP, pela amizade e apoio que sempre me dedicaram.

Aos colegas docentes da FAVET-UEM-Moçambique em especial os Prof. Mohamed Harun, Bentecourt Capece, Nilsa de Deus, Mário Elias, Catarina Tivane, Atanásio Vidane, Rosa Zimba, Emelda Simbine, Niura Bila e Ramos Tseu, pelo apoio concedido.

Aos amig@s brasileiros e de todas as partes do mundo que fui conquistando ao longo deste tempo, primeiro em uma terra estranha que prontamente se transformou num local de harmonia, aprendizagem e troca de experiência sociocultural entre nós.

À minha família, sem vosso incentivo, amor, carinho e compreensão jamais teria conseguido cumprir esta etapa da minha vida.

A todos que contribuíram de forma direta ou indireta para a minha formação e, em especial para a elaboração desta tese, minha sincera gratidão e reconhecimento.

Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de
água no mar, mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota.

(M. Teresa de Calcutá, 1910-1997)

RESUMO

COME, J. A. A. S. S. **Prospecção de novas moléculas naturais e sintéticas na inibição *in vitro* da arginase recombinante de *Leishmania (Leishmania) amazonensis***. 2019. 102 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2019.

As leishmanioses constituem um complexo de doenças causadas por protozoários do gênero *Leishmania*. São transmitidas pela picada de fêmeas parasitadas do gênero *Phlebotomus* e/ou *Lutzomyia*. A leishmaniose é uma doença zoonótica que afeta mais de 12 milhões de pessoas no mundo, e constituem uma preocupação para a saúde pública. A arginase de *Leishmania* é a primeira enzima da via das poliaminas e constitui um importante alvo terapêutico devido ao seu papel ativo na sobrevivência do parasita no hospedeiro. Neste trabalho, 78 moléculas sintéticas e naturais de diferentes grupos químicos foram testadas com objetivo de determinar a sua capacidade de inibição da enzima arginase recombinante de *Leishmania (L.) amazonensis* (ARG-LA). Foram considerados inibidores da ARG-LA os compostos que apresentaram uma inibição $\geq 70\%$ a 100 μM . Os resultados revelaram 28,2 % de compostos com elevado potencial de inibição da ARG-LA, exibindo valores de IC_{50} na faixa micromolar. A cinética de inibição foi determinada pelo método de Dixon e Cornish-Bowden e revelou diferentes mecanismos de inibição enzimática. As moléculas sintéticas com potencial inibitório da ARG-LA correspondem aos ésteres e cinamidas biosintéticos, cinamidas derivados do ácido cafeico e pirazolopirimidinas. Além disso, foram testados 4 compostos naturais estruturalmente relacionados ao ácido caféico: piceatannol e 3 ácidos salvianólicos (A, B e D). Os resultados poderão servir de ponto de partida para o planejamento e síntese de novos fármacos para tratamento da leishmaniose, baseado na inibição da ARG-LA.

Palavras Chaves: *Leishmania amazonensis*, poliaminas, arginase, inibidores de arginase, tiosemicarbazida.

ABSTRACT

COME, J. A. A. S. S. **Prospecting of natural and synthetic compounds *in vitro* inhibition of the recombinant *Leishmania (Leishmania) amazonensis* arginase.** 2019. 102 f. Thesis (Ph. Doctor) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2019.

Leishmaniasis is a complex of diseases caused by *Leishmania* protozoa. They are transmitted by the bite of parasitized females of the *Phlebotomus* and/or *Lutzomyia* genus. Leishmaniasis is essentially a zoonotic disease, affecting more than 12 million people in the world and are a public health concern. *Leishmania* arginase is the first enzyme in the polyamine pathway and constitutes an important therapeutic target due to its active role in the parasite's survival in the host. In this work 78 compounds (synthetic and natural) of different chemical groups were tested to determine their ability to inhibit the recombinant *Leishmania (L.) amazonensis* arginase (LA-ARG). The IC₅₀ and Ki were determined to the compounds that showed inhibition $\geq 70\%$ at 100 μM . The results indicated that 28.2% of the compounds have a high potential for LA-ARG inhibition, with IC₅₀ values in the micromolar range and different enzymatic inhibition mechanisms. The main synthetic groups with the high inhibitory potential of the enzyme corresponding to the caffeic acid derivatives, pyrazolopyrimidines, and the natural compounds piceatannol and salvianolic acids. These results indicate a potential for the synthesis of new drugs for the treatment of leishmaniasis, based on parasite arginase inhibition.

Key words: *Leishmania amazonensis*, polyamines, arginase, arginase inhibitors, thiosemicarbazide.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Ciclo de vida de <i>Leishmania</i>	16
Figura 2 - Metabolismo de poliaminas em <i>Leishmania</i>	27
Figura 3 - Função da tripanotona na detoxificação de hidroperóxidos em <i>Leishmania</i>	28
Figura 4 - Reação catalisada pela enzima arginase.	29
Figura 5 - Funções fisiológicas da arginase.....	30
Figura 6 - Estrutura do centro binuclear da enzima arginase do rato.	31
Figura 7 - Alinhamento da arginase de <i>Leishmania</i> e arginase humana.	32
Figura 8 - Equilíbrio entre a arginase e óxido nítrico sintase e o efeito dos macrófagos em <i>Leishmania</i>	35
Figura 9 - Esquema de reação catalizada por enzimas.	39
Figura 10 - Gráficos e equações usados na determinação da cinética enzimática.	40
Figura 11 - Esquema cinética geral de inibição enzimática reversível.....	42
Figura 12 - Inibição competitiva - esquema cinético, diagrama e representação gráfica.....	43
Figura 13 - Inibição incompetitiva - esquema cinético, diagrama e representação gráfica.....	44
Figura 14 - Inibição não competitiva - esquema cinético, diagrama e representação gráfica.	45
Figura 15 - Inibição mista - esquema cinético, diagrama e representação gráfica.	46
Figura 16 - Representação gráfica da curva sigmoideal logdose-resposta para determinação da IC ₅₀	49
Figura 17 - Representação esquemática da triagem de potenciais inibidores da ARG-LA.	56
Figura 18 - Inibição da ARG-LA pelos compostos biosintéticos.....	58
Figura 19 - Mecanismo de inibição de ARG-LA por compostos biosintéticos.....	59
Figura 20 - Inibição da ARG-LA por cinamidas derivados do ácido cafeico.	63
Figura 21 - Mecanismo de inibição de ARG-LA por cinamidas derivados do ácido cafeico.	64
Figura 22 - Inibição da ARG-LA por pirazolopirimidinas.....	66
Figura 23 - Cinética de inibição da ARG-LA por pirazolopirimidina.	67
Figura 24 - Mecanismo de inibição da ARG-LA pelos compostos naturais	70
Figura 25 - Comparação da relação estrutura-atividade dos compostos ésteres biosintéticos e derivados de cinamidas, inibidores ativos da ARG-LA.	73

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Medicamentos atualmente usados para tratamento da leishmaniose.	21
Tabela 2 - Inibição da arginase de <i>L. mexicana</i> por inibidores sintéticos.	38
Tabela 3 - Inibição da arginase de <i>Leishmania (L.) amazonensis</i> por ésteres.	60
Tabela 4 - Inibição da arginase de <i>Leishmania (L.) amazonensis</i> por cinamidas.	61
Tabela 5 - Inibição da arginase de <i>Leishmania (L.) amazonensis</i> por glicosídeos e xantona. .	62
Tabela 6 - Inibição da ARG-LA por cinamidas derivados do ácido cafeico.	65
Tabela 7 - Inibição da ARG-LA por pirazolopirimidinas.	68
Tabela 8 - Inibição da ARG-LA por compostos naturais.	71
Tabela 9 - Espécies de <i>Leishmania</i> que causam infecções em Humanos	96
Tabela 10 - Estrutura dos compostos da série triazolopirimidona (PLLP).	97
Tabela 11 - Estrutura dos compostos da série tiouréias (PLTU)	100

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	14
2	LEISHMANIOSE	15
2.1	Aspetos históricos e biológicos	15
2.2	Aspetos epidemiológicos	17
2.3	Manifestação clínica e diagnóstico	18
2.4	Tratamento	20
2.5	Reaproveitamento de fármacos para o tratamento da leishmaniose	22
2.6	Potenciais alvos terapêuticos para o tratamento das leishmanioses	23
2.6.1	<i>Cinases .....</i>	24
2.6.2	<i>Via de biossíntese de folato .....</i>	24
2.6.3	<i>Ciclofilinas .....</i>	24
2.6.4	<i>Topoisomerase .....</i>	25
2.6.5	<i>Fosfodiesterase.....</i>	25
2.6.6	<i>Via de síntese de poliaminas .....</i>	26
2.6.7	<i>Enzimas do metabolismo da tripanotiona .....</i>	27
3	A ENZIMA ARGINASE.....	29
4	ARGINASE COMO POTENCIAL ALVO TERAPÊUTICO PARA TRATAMENTO DA LEISHMANIOSE	32
5	INIBIDORES DA ARGINASE DE <i>LEISHMANIA</i>	36
6	CINÉTICA ENZIMÁTICA	39
6.1	Inibição enzimática	41
6.1.1	<i>Inibidores competitivos .....</i>	42
6.1.2	<i>Inibidores incompetitivos .....</i>	43
6.1.3	<i>Inibidores não competitivos .....</i>	44
6.1.4	<i>Inibidores mistos .....</i>	46
6.2	Estudos de cinética enzimática e potencialidades inibitórias de inibidores reversíveis	47
6.2.1	<i>Determinação do tipo de inibição e constante de inibição (K_i).....</i>	47
6.2.2	<i>Concentração que inibe 50% da atividade enzimática (IC_{50}) .....</i>	48

7	OBJETIVOS	50
7.1	Objetivo geral.....	50
7.2	Objetivos específicos.....	50
8	MATERIAL E MÉTODOS	51
8.1	Material	51
8.2	Expressão e purificação da arginase recombinante de <i>Leishmania (L.) amazonensis</i>	52
8.3	Triagem de inibidores.....	52
8.4	Determinação da IC₅₀	53
8.5	Determinação da cinética e mecanismo de inibição.....	54
8.6	Análise de dados de cinética de inibição enzimática.....	54
8.7	Análise estatística.....	55
9	RESULTADOS	56
9.1	Triagem dos inibidores da ARG-LA.....	56
9.2	Cinética de inibição da arginase de <i>Leishmania (L.) amazonensis</i> (ARG-LA) por compostos produzidos via engenharia de síntese em <i>Echerichia coli</i> (compostos biosintéticos).....	57
9.2.1	Ésteres	57
9.2.2	Cinamidas.....	57
9.2.3	Glicosídeos e xantona	58
9.3	Cinética de inibição da ARG-LA por cinamidas derivados do ácido cafeico.....	63
9.4	Cinética de inibição da ARG-LA por compostos da série pirazolopirimidina (PLTS)	66
9.5	Cinética de inibição da ARG-LA pela série de compostos Triazolopirimidona (PLLP), Tiouréias (PLTU) e derivados de Benzonidazol e Megazol (PAMG)	69
9.6	Cinética de inibição da ARG-LA pelos compostos naturais Piceatannol e Ácidos Salvianólico A, B e D.....	69

9.7	Relação estrutura-atividade dos ésteres biosintéticos e cinamidas derivados do ácido caféico.....	72
10	DISCUSSÃO	74
11	CONCLUSÃO.....	80
12	PERSPECTIVAS	81
	REFERÊNCIAS	82
	APÊNDICES	95
	ANEXOS.....	101

1 INTRODUÇÃO

A busca por compostos com atividade biológica para cura de várias enfermidades é uma constante na história da humanidade, sendo os recursos naturais a única fonte para busca de compostos com atividade terapêutica. Com o avanço da ciência e da tecnologia, a síntese de moléculas com atividade terapêutica passou a predominar, o que revolucionou o tratamento das doenças.

Não obstante o sucesso no tratamento de várias doenças e a contínua busca por novas moléculas com atividade terapêutica, algumas enfermidades que não representam um ganho financeiro significativo para a indústria farmacêutica ficaram aquém da investigação de soluções para sua mitigação. Estas doenças constituem as chamadas doenças tropicais negligenciadas (DTN), que afetam as populações economicamente desfavorecidas e representam um entrave para o desenvolvimento de vários países, uma vez que contribuem para a manutenção da desigualdade social. Dentre as várias DTN existentes podemos destacar a malária, a leishmaniose, a tuberculose, a doença de chagas, a dengue, além de diversas parasitoses (LINDOSO; LINDOSO, 2009; VALVERDE, 2013).

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), a leishmaniose é uma das DTN mais importantes e representa um grave problema de saúde mundial com amplo espectro de manifestações clínicas e com um desfecho potencialmente fatal (WHO, 2019).

O tratamento da leishmaniose é feito com antimoniais pentavalentes, medicamentos com diferentes espectros de eficácia dependendo da espécie do parasita envolvida na infecção e estado imunitário do indivíduo. Casos de resistência aos antimoniais em regiões endêmicas e seus efeitos colaterais severos estimularam a introdução de terapias alternativas como são os casos de Anfotericina B lipossomal e miltefosina (CUNHA et al., 2015; MOORE; LOCKWOOD, 2010; SUNDAR et al., 2002).

A enzima arginase de *Leishmania*, a primeira enzima da via metabólica das poliaminas, tem sido explorada como alvo de estudos de novos compostos inibidores desta via. A busca por novos fármacos com potencial leishmanicida baseado na inibição da enzima arginase do parasita justificam a realização do presente trabalho que teve por objetivo realizar a triagem de novas moléculas sintéticas e naturais na inibição da enzima arginase recombinante de *Leishmania (L.) amazonensis* (ARG-LA) para desenvolvimento e identificação de novos compostos que possam servir de base para a síntese de novos fármacos para tratamento da leishmaniose.

2 LEISHMANIOSE

2.1 Aspetos históricos e biológicos

O primeiro observador a visualizar os parasitas pertencentes ao gênero *Leishmania* foi Cunningham em 1885 na Índia, em casos de calazar. Em 1898, o cientista russo Borovsky descreveu com detalhes estes parasitas em um caso de leishmaniose cutânea. Em 1903, Leishman e Donovan publicaram de forma independente a descoberta de corpos ovoides em amostras esplênicas. Leishman sugeriu que estas, eram formas degeneradas do gênero *Trypanossoma*, enquanto que Donovan não concordando com as conclusões de Leishman enviou as amostras para Laveran, que classificou o achado como novo parasita do gênero *Piroplasma* (STEVERDING, 2017). Em 1903, Ross chegou à conclusão de que as formas ovoides não eram formas degeneradas de *Trypanossoma* e discordando com a sugestão de Laveran, criou a espécie *Leishmania donovani* (ROSS, 1903). Em 1908, Nicolle isolou o parasita de lesões cutâneas, estabelecendo a semelhança entre a forma cutânea e visceral da doença em relação ao agente causador (NAGLE et al., 2014; STEVERDING, 2017).

No novo mundo, as primeiras descrições do parasito *Leishmania* foram feitas de forma independente em 1909, por Lindenberg, Carini e Paranhos em pacientes com “úlceras de Bauru” no estado de São Paulo, Brasil. Em 1911, Vianna descobriu que a leishmaniose na América do Sul era causada por uma espécie de *Leishmania* diferente daquela do Velho Mundo, e denominou essa espécie de *Leishmania braziliensis*. Posteriormente outras espécies do parasita foram descritas (Apêndice A), como são os casos de *L. mexicana* em 1953 e *L. amazonensis* em 1972 (LAINSON, 2010).

Em 1937, o agente causador da leishmaniose visceral (LV) no Novo Mundo foi designado como uma espécie distinta, denominada *L. chagasi* (CHAGAS et al., 1938). No entanto, recentes estudos apontaram que esta espécie é indistinguível da *L. infantum*, a espécie causadora da LV no sul da Europa (KUHLS et al., 2011; MAURICIO et al., 1999).

Os parasitas do gênero *Leishmania*, são protozoários pertencentes à ordem kinetoplastida e à família Trypanosomatidae. Mais de 20 espécies demonstraram ser patogênicas em mamíferos, afetando animais domésticos e silvestres. Os parasitas são transmitidos entre os hospedeiros por dois gêneros diferentes de flebotomíneos hematófagos: *Phlebotomus* e *Lutzomyia* no velho e novo mundo, respectivamente (WHO, 2019).

Figura 1 - Ciclo de vida de *Leishmania*.

O parasita apresenta-se sob duas formas: promastigota presente no flebotomíneo e amastigotas presentes nos macrófagos do mamífero hospedeiro. Após inoculação na pele por picada de um flebotomíneo infectado, uma infecção sistêmica pode ocorrer visando principalmente o sistema reticuloendotelial, medula óssea, baço, fígado e gânglios linfáticos.

Fonte: Adaptado de VAN GRIENSVEN, J.; DIRO, E. Visceral leishmaniasis. **Infectious Disease Clinics of North America**, Philadelphia, v. 26, n. 2, p. 309–322, 2012.

O ciclo de vida da *Leishmania* é digenético, caracterizado por duas morfologias distintas: as formas promastigotas que são alongadas, flageladas e extracelulares, habitam o trato intestinal do flebotomíneo; as formas amastigotas são arredondadas, sem movimentos e de localização intracelular, encontram-se nas células do retículo endotelial e na corrente sanguínea do hospedeiro vertebrado. A Figura 1 apresenta sistematicamente o ciclo de vida digenético da *Leishmania*; quando as fêmeas de flebotomíneos infectadas fazem seu repasto sanguíneo regurgitam as formas promastigotas metacíclicas infectantes no local de picada do hospedeiro. Subsequentemente, os parasitas são fagocitados pelas células dendríticas e macrófagos da camada dérmica da pele, onde se transformam em formas amastigotas e se multiplicam por fissão binária dentro do fagolisossoma. Após a lise das células dendríticas e dos macrófagos infectados, os parasitas disseminam-se via corrente sanguínea e linfática, infectando novos macrófagos do sistema reticuloendotelial. Os parasitas persistem em macrófagos do baço, fígado, medula óssea e gânglios linfáticos induzindo a uma inflamação

generalizada e aumento da hematopoiese (COTTERELL; ENGWERDA; KAYE, 2000; SACKS; PERKINS, 1984). Os pacientes infetados servem como reservatórios da doença e podem infectar novos vetores durante o repasto sanguíneo. No vetor, os amastigotas se transformam em promastigotas no intestino médio do inseto, multiplicam-se e migram para a extremidade proximal do intestino, onde permanecem até o próximo ciclo de infecção e transmissão vetor-hospedeiro (CHAPPUIS et al., 2007; VAN GRIENSVEN; DIRO, 2012).

2.2 Aspetos epidemiológicos

A leishmaniose atinge 12 a 15 milhões de pessoas em todo o mundo, e mais de 1 bilhão de pessoas que vivem nas regiões endêmicas estão em risco de contrair a infecção (WHO, 2019). Estima-se que a incidência anual da doença seja de 1,5 a 2 milhões de casos, com cerca de 70.000 mortes por ano nos países endêmicos (ALVAR et al., 2012; TORRES-GUERRERO et al., 2017).

Mais de 1 milhão de casos de leishmaniose cutânea (LC) têm sido reportados nos últimos 5 anos. Em 2015, mais de 90% dos casos de doença foram registrados em 12 países (Afeganistão, Brasil, Iran, Iraque, Síria, Argélia, Colômbia, Marrocos, Peru, Sudão, Tunísia e Iêmen (Anexo 1) (WHO, 2017). Embora a LC seja a forma da doença que apresenta maior número de casos, a leishmaniose visceral (LV) é a forma mais grave e fatal se não for tratada de forma adequada. Anualmente, ocorrem mais de 300.000 novos casos de LV que resultam em aproximadamente 20.000 mortes. Em 2015, cerca de 90% dos casos de LV ocorreram em 7 países (Brasil, Índia, Sudão, Somália, Etiópia, Quênia e Bangladesh) (Anexo1) (WHO, 2017).

O aumento de número de casos da LC pode ser explicado, em parte, pela melhoria no diagnóstico e notificação de casos (YADÓN et al., 2001), controle inadequado de reservatórios ou vetores, aumento da detecção de leishmaniose cutânea associada a infecções oportunistas (como, HIV / SIDA) (MOLINA; GRADONI; ALVAR, 2013) e o surgimento da resistência aos medicamentos usados para o tratamento da enfermidade (CROFT; SUNDAR; FAIRLAMB, 2006). No entanto, como muitas infecções não apresentam sintomas ou são diagnosticadas de forma errada, a ocorrência global da LC provavelmente pode estar subestimada (REITHINGER et al., 2007).

A leishmaniose tem expandido para áreas anteriormente não endêmicas, como resultado da urbanização e do desmatamento (DESJEUX, 2001; ORYAN; AKBARI, 2016) e com a participação dos animais domésticos como potenciais reservatórios (DAVIES et al., 2000; REITHINGER; CANALES ESPINOZA; DAVIES, 2003). Além disso, as dificuldades econômicas, desastres naturais (GUTHMANN et al., 1997), conflitos armados (WEINA et al., 2004), e turismo (BLUM et al., 2004; SHOWLER; BOGGILD, 2015) fazem com que populações suscetíveis migrem para áreas onde a leishmaniose cutânea é endêmica, resultando em epidemias devido à exposição à infecção.

2.3 Manifestação clínica e diagnóstico

A leishmaniose engloba um conjunto de infecções causadas pelo protozoário *Leishmania* em humanos. A gravidade da doença está associada à espécie infecciosa e ao estado imunológico do hospedeiro, variando desde as formas cutâneas menos severas até a síndrome visceral, com alta taxa de mortalidade se não tratada (SAVOIA, 2015). O gênero *Leishmania* compreende um número de mais de 30 espécies e cerca de 20 causam doenças à espécie humana (Apêndice A). As principais doenças conhecidas coletivamente como leishmaniose são cinco: leishmaniose cutânea, leishmaniose visceral ou calazar, leishmaniose mucocutânea, leishmaniose difusa pós-calazar e leishmaniose cutânea difusa (ASHFORD, 2000).

A leishmaniose cutânea (LC) é a forma mais comum da doença com variadas apresentações clínicas dependentes das espécies de *Leishmania* (Apêndice A). Começa com uma pápula eritematosa pré ulcerativa no local da picada do flebotomíneo. As manifestações clínicas da LC incluem a leishmaniose cutânea difusa (LCD) e a leishmaniose mucocutânea (LMC) (NAGLE et al., 2014; TORRES-GUERRERO et al., 2017).

A leishmaniose mucocutânea (LMC) é caracterizada por lesões desfigurantes e destrutivas das membranas mucosas; geralmente é observada meses ou até anos após as lesões de LC, em aproximadamente 1 a 10% dos pacientes (KEVRIC; CAPPEL; KEELING, 2015; KEDZIERSKI, 2011; MARKLE; MAKHOUL, 2004). Além de lesões ulcerativas e eritema ao redor do nariz e lábios, os pacientes com LMC inicialmente apresentam congestão nasal, granulomas nos septos nasais, linfadenopatia, febre, hepatomegalia e cicatrizes de incidência prévia de LC. Posteriormente, podem apresentar edema nasal, perfuração do septo nasal e

periodontite, com eventual destruição da mucosa oro-nasofaríngea e obstrução das vias aéreas (KEVRIC; CAPPEL; KEELING, 2015; TORRES-GUERRERO et al., 2017).

A leishmaniose cutânea difusa (LCD) é caracterizada por anergia (falta de resposta imune celular aos antígenos do parasita), isso permite a sua disseminação por via linfática, sanguínea e tecidual, desenvolvendo lesões na maior parte da pele (orelhas, bochechas e extremidades). A lesão começa com nódulos eritematosos, linfadenopatia e febre (KEVRIC; CAPPEL; KEELING, 2015).

A leishmaniose visceral (LV) é a forma mais grave da doença e normalmente resulta em morte se não for tratada (EJAZI; ALI, 2013). As características clínicas geralmente se manifestam de 2 a 6 meses após a infecção, e incluem febre prolongada, esplenomegalia, hepatomegalia, pancitopenia, anemia progressiva e perda de peso (BERMAN, 2005; CHAPPUIS et al., 2007; VAN GRIENSVEN; DIRO, 2012). Casos latentes podem permanecer não diagnosticados até que o paciente se torne imunocomprometido, com sintomas aparecendo apenas vários anos após a infecção (CHAPPUIS et al., 2007; EJAZI; ALI, 2013; SUNDAR; CHAKRAVARTY, 2015; VAN GRIENSVEN; DIRO, 2012).

A leishmaniose cutânea pós-calazar (LDPC) é uma forma de leishmaniose dérmica que pode aparecer meses a anos após o tratamento efetivo da LV (ZIILSTRA et al., 2003; SUNDAR; CHAKRAVARTY, 2015; VAN GRIENSVEN; DIRO, 2012). Caracteriza-se pela presença de nódulos em todo o corpo que podem se transformar em grandes placas ou úlceras. Esses nódulos demonstraram conter parasitas de *Leishmania*, de modo que os pacientes com LDPC se tornam reservatórios do parasita (ZIILSTRA et al., 2003; SINGH; SHARMA; MISHRA, 2011; VAN GRIENSVEN; DIRO, 2012). Embora a maioria dos casos de LDPC apresente dermatite grave, a disseminação da infecção pode levar à cegueira (via membranas mucosas) e danos nos nervos (RAMESH; MUKHERJEE, 1995).

Os pacientes com LV apresentam alto risco de co-infecção bacteriana, incluindo pneumonia, tuberculose e infecção gastrointestinal (CHAPPUIS et al., 2007). Tanto a *Leishmania* como o HIV têm como alvo o sistema imunológico e co-infecções são encontradas em áreas com endemicidade conjunta de HIV / LV, especificamente na Etiópia, Brasil e Índia (JARVIS; LOCKWOOD, 2013). O risco de desenvolver LV é aproximadamente 100 a 200 vezes maior em pacientes infectados pelo HIV em comparação com indivíduos não HIV (ROSENTHAL et al., 1995). Os pacientes co-infectados com HIV / LV têm uma contagem reduzida de células T CD4⁺ (abaixo de 200 células / μ L) e geralmente apresentam sintomas semelhantes aos observados em pacientes HIV-negativos (febre, esplenomegalia, pancitopenia, linfadenopatia, letargia e problemas gastrointestinais). As co-

infecções também são mais refratárias ao tratamento e, muitas vezes, requerem terapia de LV com um medicamento alternativo (ALEXANDRINO-DE-OLIVEIRA et al., 2010).

Os testes de diagnóstico para as várias formas de LC são semelhantes aos usados para identificar LV incluem: coleta de parasitas (raspagem da pele no centro e margem da úlcera) e posterior visualização microscópica via coloração de giemsa, detecção sorológica de anticorpos por teste de aglutinação direta (DAT), aglutinação rápida (FAST) ou teste de imunofluorescência indireta (IFAT) (CHAPPUIS et al., 2007; MONDAL; BHATTACHARYA; ALI, 2010), e quantificação da carga parasitária por PCR (SCHÖNIAN et al., 2003).

2.4 Tratamento

A possibilidade de tratamento quimioterápico para esta parasitose começou a ser desenvolvido em 1912 quando Vianna observou que o tartarato potássico de antimônio (tártaro emético) era ativo contra a leishmaniose (HALDAR; SEN; ROY, 2011). Em 1937 surgiu o estibogluconato de sódio e em 1942 foi descoberta atividade anti-leishmania do isotionato de pentamidina, sintetizado em 1939 (KOROLKOVAS, 1988).

Atualmente, nenhuma vacina humana segura e confiável está comercialmente disponível para prevenção da leishmaniose (SINGH; SUNDAR, 2012). Até recentemente, os antimoniais pentavalentes (Sb^{5+}), na forma de estibogluconato de sódio (Pentostan) e antimoniato de meglumina (Glucantime) eram a referência do tratamento da leishmaniose, apesar de seus efeitos colaterais severos e aumento da resistência em áreas endêmicas (Tabela 1) (MOORE; LOCKWOOD, 2010). Recentemente, foram introduzidas novas terapias alternativas como anfotericina B lipossomal (CUNHA et al., 2015), miltefosina oral (SUNDAR et al., 2002) e paromomicina (MUSA et al., 2010) (Tabela 1). A insuficiência terapêutica da miltefosina na Índia foi estimada em cerca de 20% (RAMESH et al., 2015). Este medicamento foi introduzido em 2002 como alternativa para a alta taxa de resistência a antimoniais.

Existe um número limitado de novas entidades químicas na linha de desenvolvimento de medicamentos para abordar as limitações dos tratamentos atuais para leishmaniose. A terapia de combinação (MESQUITA; TEMPONE; REIMÃO, 2014; VAN GRIENSVEN et

al., 2010) e reaproveitamento de fármacos (CHONG, 2012) são estratégias de curto e médio prazo para o tratamento da leishmaniose.

O sinergismo de vários fármacos que possuem diferentes mecanismos de ação melhora a eficácia e reduz a toxicidade associada à monoterapia e o risco de indução de resistência (VAN GRIENSVEN et al., 2010). As principais combinações que resultaram efetivas correspondem a combinação de: estibogluconato de sódio (20 mg/kg) e paromomicina (15 mg/kg) com uma taxa de cura de 97% em 17 dias (SEAMAN et al., 1993), infusão única de 5 mg/kg de ambisome, seguida por 7 dias de 50 mg/kg por dia de miltefosina ou 10 dias de 11 mg/kg por dia de paromomicina, resultou em 97,5% de cura, e a coadministração diária de miltefosina e paromomicina (50 mg/kg e 11 mg/kg por dia, respectivamente) por 10 dias que gerou uma taxa de cura de 98,7% (SUNDAR et al., 2012).

Tabela 1 - Medicamentos atualmente usados para tratamento da leishmaniose.

Medicamento	Via	Eficácia	Vantagens	Limitações	Observação
Antimoniais pentavalentes (Estibogluconato de sódio e Antimoniato de meglumina)	IV, IM ou IL	35 – 95%	Baixo custo, usados em combinação com Anfotericina B em pacientes idosos e mulheres grávidas	Resistência (>60%) na Índia, cardiotoxicidade, mialgia, pancreatites hepatotoxicidade, toxicidade elevada em pacientes HIV positivos	1ª linha de tratamento, eficácia variada em diferentes espécies do parasita causadores de LC
Anfotericina B (Fungizone)	IV	>90 - 95%	Efetivo contra estirpes resistentes a Sb5 ⁺	Nefrotoxicidade, miocardites, hipocalcemia, febre elevada; custo elevado	1ª linha de tratamento na Índia, necessidade de hospitalização do paciente
Anfotericina B lipossomal (Ambisome)		~100%			
Miltefosina	VO	Índia (94-97%) África (60-93%)	Efetivo e seguro	Hepatotoxicidade, nefrotoxicidade, teratogenicidade, complicações gastrointestinais	Único fármaco usado por via oral
Paromomicina	IM, tópica	Índia (94%) África (46-85%)	Efetivo, bem tolerado, baixo custo	Hepatotoxicidade, nefrotoxicidade, ototoxicidade	Baixa eficácia na África oriental, formulação tópica para tratamento da LC
Pentamidina	IM	35-96%	Potencial para uso em terapia combinatória em doses baixas	Nefrotoxicidade, miocardites, febre, hipoglicemia, hipotensão, taquicardia	Eficácia varia com a espécie do parasita

Abreviações: IM- intramuscular, IL- intralinfática, IV- intravenosa, VO- via oral, LC- leishmaniose cutânea.

Fonte: adaptado de MENEZES, J. P. B. et al. Advances in development of new treatment for Leishmaniasis. **BioMed Research International**, New York, v. 2015, p. 1–12, 2015; NAGLE, A. S. et al. Recent developments in drug discovery for leishmaniasis and human African trypanosomiasis. **Chemical Reviews**, Washington, v. 114, n. 22, p. 11305–11347, 2014.

2.5 Reaproveitamento de fármacos para o tratamento da leishmaniose

Apesar de uma grande população de pacientes, os fármacos para o tratamento da leishmaniose tiveram fracos retornos econômicos, uma vez que as áreas endêmicas são tipicamente empobrecidas. Consequentemente, tem havido recursos limitados para apoiar a pesquisa e o desenvolvimento de novos tratamentos leishmanicidas. A estratégia de reaproveitamento de fármacos tem se mostrado muito bem sucedida. De fato, vários tratamentos atuais, com a miltefosina, anfotericina B e pentamidina, foram previamente aprovados ou concebidos principalmente para outras indicações (ASHBURN; THOR, 2004; SHAKYA; BAJPAI; GUPTA, 2011). A fim de reforçar esta linha, um esforço significativo tem sido realizado no estudo do reaproveitamento de fármacos usados para diferentes indicações. Assim sendo, embora não efetivamente em uso, alguns fármacos usados para outras indicações demonstraram potencial para tratamento da leishmaniose:

a) **Tamoxifeno** - um antagonista do receptor de estrogênio que tem sido utilizado clinicamente para o tratamento do câncer da mama, tem atividade *in vitro* contra amastigotas intracelulares de *L. braziliensis* e *L. infantum*. O tratamento de camundongos infectados por *L. braziliensis* com tamoxifeno na dose de 20 mg/kg levou à redução significativa do tamanho da lesão e a uma redução de 99% na carga parasitária quando comparado com os controles (veículo). O tratamento de hamsters infectados por *L. infantum* levou a redução significativa na carga parasitária do fígado e uma redução de 95% a 98% da carga parasitária no baço. Embora se tenha observado efeitos significativos no tratamento de animais de laboratório com tamoxifeno, o uso deste, causou efeitos colaterais significativos no sistema reprodutor masculino no modelo do camundongo com leishmaniose cutânea tratados com a dose de 20 mg/kg/dia de tamoxifeno por via oral, por um período de 15 dias (EISSA; AMER; EL SAWY, 2011; MIGUEL et al., 2009).

b) **Nitroimidazóis** – São uma classe de compostos farmacologicamente ativos contra bactérias anaeróbicas (EDWARDS, 1993). O megazol é o principal representante desta classe e potencial candidato tripanocida, cujo desenvolvimento foi interrompido devido a efeitos mutagênicos (ENANGA et al., 2003). A exploração desta classe levou à identificação de fexinidazole como agente tripanocida. Os metabólitos ativos de fexinidazole (sulfóxido e

sulfona) demonstraram ser efetivos contra amastigotas de *L. donovani* em modelos murinos de LV, obtendo cerca de 98,4% de supressão parasitária, uma eficácia semelhante à da miltefosina (WYLLIE et al., 2012). Baseado nos resultados da sua eficácia, esta droga encontra-se em ensaios clínicos de fase II (NAGLE et al., 2014).

c) **Nelfinavir** – pertence ao grupo dos inibidores de proteases, verificou-se que estes inibem significativamente (cerca de 80%) amastigotas de *Leishmania* em modelos *in vitro*. Por outro lado, este fármaco demonstrou ser ativo contra isolados de *L. donovani* resistentes ao tratamento com estibogluconato de sódio e contra macrófagos humanos derivados de monócitos primários co-infectados com HIV, o que sugere que este composto possui um potencial como agente anti-leishmania, bem como para possível uso futuro em co-infecções *Leishmania*-HIV (KUMAR et al., 2010).

d) **Imipramina**

A imipramina é usada para o tratamento da depressão em humanos. Estudos prévios demonstraram que este composto é capaz de reduzir o potencial da transmembrana mitocondrial em promastigotas de *L. donovani* e de amastigotas purificadas, em oposição a miltefosina, onde apenas uma mudança marginal foi observada (ZILBERSTEIN; LIVEANU; GEPSTEIN, 1990). Além disso, verificou-se que a imipramina inibe a tripanotiona redutase, uma enzima que está regulada positivamente em cepas resistentes a antimônio pentavalente (BENSON et al., 1992). Resultados em hamsters infectados, tratados com imipramina na dose de 5 mg/kg demonstraram a redução de 50% da carga parasitária hepática e esplênica (NAGLE et al., 2014).

2.6 Potenciais alvos terapêuticos para o tratamento das leishmanioses

O planejamento de novos fármacos contra um parasita explora diferenças entre vias metabólicas distintas entre o parasita e o hospedeiro ou vias que mesmo coexistindo, sejam essenciais para o parasita. Visualizando o cenário dos fármacos atualmente usados para o tratamento da leishmaniose (Tabela 1), novas entidades farmacológicas consideram-se necessárias para o tratamento desta parasitose. A pesquisa de novos fármacos passa antes pela identificação e validação de alvos terapêuticos para as referidas drogas. Alguns alvos

farmacológicos usados para a pesquisa de novos fármacos para o tratamento das leishmanioses são apresentados a seguir.

2.6.1 Cinases

As cinases dependentes de ciclinas (CDKs) representam potenciais alvos de fármacos devido à sua capacidade de afetar o ciclo celular. A análise do genoma de *L. major* revelou a existência de 11 CDKs. Entre os cinetoplastídeos, apenas *Leishmania* possui a ciclina CYCA, uma proteína cinase relacionada a serina/treonina (cdc-2), que é essencial para a transição através da fase G2-M do ciclo celular de *Leishmania* (CLEGHORN et al., 2011).

2.6.2 Via de biossíntese de folato

Os folatos são cofatores essenciais em uma variedade de vias metabólicas, como a síntese de DNA, RNA e metabolismo de aminoácidos. Duas enzimas que são de particular interesse nesta via são a timidilato sintetase (TS) e a dihidrofolato redutase (DHFR). Nos tripanosomatídeos estas enzimas existem como polipeptídeos únicos (DHFR-TS). A maioria dos inibidores de DHFR conhecidos são inativos contra *Leishmania* e esforços para identificação de inibidores eficazes continuam a ser feitos (VICKERS; BEVERLEY, 2011).

2.6.3 Ciclofilinas

As ciclofilinas são proteínas que se ligam a ciclosporina. As proteínas desta família partilham aminoácidos que são referidos como o domínio do tipo ciclofilina. Este domínio é responsável pela peptidil-prolil isomerase (PPIase) que influencia vários processos biológicos, tais como o enrolamento de proteínas, montagem de complexos multiproteicos e a transdução de sinal. A ciclosporina é conhecida por ter atividade anti-leishmania em macrófagos de camundongos infectados por *L. tropica* e *L. major*. No entanto, o reaproveitamento da ciclosporina não é viável devido ao seu efeito imunossupressor. Vários autores provaram que a ciclosporina atua sobre as ciclofilinas de *Leishmania* e as diferenças estruturais entre os

ortólogos humanos e do parasita, permitem o desenho de compostos que atuem seletivamente contra o parasita (YAU et al., 2010).

2.6.4 *Topoisomerase*

As topoisomerasas são enzimas que desempenham um papel importante em numerosos processos biológicos, como replicação, transcrição, recombinação e reparo do DNA. Embora as topoisomerasas estejam presentes em todos os organismos, estudos mostraram que as topoisomerasas de cinetoplastídeos possuem algumas características distintivas que diferenciam a enzima do parasita de suas contrapartes procarióticas e eucarióticas (DAS et al., 2004). São classificadas em dois tipos: topoisomerasas tipo I e tipo II. A enzima topoisomerase do tipo I é independente do ATP e está presente tanto no cinetoplasto como no núcleo; em contraste, a topoisomerase do tipo II exibe atividade dependente e independente de ATP. Várias moléculas têm sido descritas como sendo inibidores da topoisomerase de *Leishmania*, destacando-se os ácidos graxos 2-alcanóicos (ácido 2-hexadecanóico e ácido 2-octadecanóico) (CARBALLEIRA, 2013), lignanas tipo glicosídeos (SAHA et al., 2013), triterpenos naturais (betulina) (CHOWDHURY et al., 2011) e alcaloides tipo indenoisoquinolina (indotecan e AM13-55) (BALAÑA-FOUCE et al., 2012).

2.6.5 *Fosfodiesterase*

As fosfodiesterases (PDEs) controlam a concentração celular dos segundos mensageiros AMPc e GMPc, reguladores-chave de muitos processos biológicos importantes (SHAKUR et al., 2011). O genoma humano contém vinte e um genes de PDEs que são categorizados em 11 famílias. Em comparação, o genoma do parasita protozoário *L. major* contém cinco genes de PDEs que codificam LmjPDEA, LmjPDEB1, LmjPDEB2, LmjPDEC e LmjPDED. Dois destes, LmjPDEB1 e LmjPDEB2, compartilham extensa similaridade em sua arquitetura geral (JOHNER et al., 2006). Uma comparação entre as estruturas de LmjPDEB1 e PDEs humanas identificou um novo sítio ativo na estrutura LmjPDEB1, que pode ser útil para o planejamento de inibidores seletivos para o tratamento da leishmaniose (WANG et al., 2007). Estudos iniciais mostraram que inibidores da PDE humana (dipiridamol, etazolato e trequinsina)

inibem a proliferação de formas promastigotas de *L. major* e amastigotas de *L. infantum* com valores de concentração que produz 50% do efeito inibitório (EC₅₀) na faixa micromolar (JOHNER et al., 2006).

2.6.6 Via de síntese de poliaminas

A via de síntese de poliaminas é vital para *Leishmania* (JIANG et al., 1999; ROBERTS et al., 2004) e desta forma pode ser explorada para o desenvolvimento de inibidores específicos para as enzimas da via (COLOTTI; ILARI, 2011). As poliaminas (espermidina, putrescina e espermina) são compostos catiônicos que desempenham um papel essencial na proliferação, diferenciação, síntese de macromoléculas na célula e participam do mecanismo antioxidante em *Leishmania* (COLOTTI; ILARI, 2011).

A primeira enzima da via de síntese de poliaminas é a arginase (ARG) que catalisa a conversão de L-arginina em L-ornitina e uréia. A L-ornitina é então convertida pela enzima ornitina descarboxilase (ODC) em putrescina. A putrescina é substrato da síntese de espermidina (Spd) que ao ser conjugada com glutatona resulta na síntese de tripanotiona (T(SH)₂), reação que é catalisada pela tripanotiona sintase (TryS). A tripanotiona é utilizada na eliminação de espécies reativas de oxigênio (ROS) e espécies reativas de nitrogênio como óxido nítrico (NO) produzidos pelos macrófagos para eliminar o parasita (Figura 2) (BOCEDI et al., 2010; FAIRLAMB; CERAMI, 1992). Dado que a *Leishmania* depende de poliaminas para o crescimento e sobrevivência, as enzimas envolvidas na síntese e utilização das poliaminas, isto é, arginase (ARG), ornitina descarboxilase (ODC), S-adenosilmetionina descarboxilase (AdoMetDC), espermidina sintetase (SpdS), tripanotiona sintetase (TryS) e tripanotiona redutase (TryR) são alvos promissores para o desenvolvimento de medicamentos (Figura 2).

Figura 2 - Metabolismo de poliaminas em *Leishmania*.

ARG - arginase; NOS - óxido nítrico sintetase; AdoMetDC - S-adenosilmetionina descarboxilase; ODC - ornitina descarboxilase; dAdoMet - adenosilmetionina descarboxilada; SpdS - espermidina sintetase; Spd - espermidina; TryS - tripanotona sintetase; T(SH)₂ – tripanotona; DNTIC - complexo dinitrosil-tripantionil-ferro.

Fonte: adaptado de BIRKHOLTZ, L.-M. et al. Polyamine homeostasis as a drug target in pathogenic protozoa: peculiarities and possibilities. **Biochemical Journal**, London, v. 438, Pt. 2, p. 229-244, 2011; BOCEDI, A. et al. Trypanothione efficiently intercepts nitric oxide as a harmless iron complex in trypanosomatid parasites. **The FASEB Journal**, Bethesda, v. 24, n. 4, p. 1035–1042, 2010.

2.6.7 Enzimas do metabolismo da tripanotona

Foi demonstrado que as enzimas envolvidas no metabolismo da tripanotona: tripanotona sintetase (TryS), tripanotona redutase (TryR) e triparedoxina peroxidase (TP) estão ausentes em hospedeiros humanos e são essenciais para os parasitas (KHAN, 2007).

A síntese de tripanotona é catalisada por duas enzimas chave, a tripanotona sintetase (TryS) e a tripanotona redutase (TryR). A TryS é responsável pela síntese da tripanotona a partir da espermidina e de duas moléculas da glutamina (FYFE et al., 2008). A tripanotona é então mantida em seu estado reduzido pela enzima tripanotona redutase, usando o NADPH como cofator. A tripanotona em forma reduzida reduz a triparedoxina (TXN), seguida pela redução da enzima de reciclagem da triparedoxina, a triparedoxina peroxidase (TP). Enquanto a tripanotona redutase tem semelhança estrutural com a glutatona redutase homóloga humana, o que poderia potencialmente impedir o desenvolvimento de análogos seletivos, as outras duas enzimas, TryS e TP, prometem fornecer inibidores seletivos contra elas (BERNARDES; ZANI; CARVALHO, 2013).

A tripanotiona ($T(SH)_2$) juntamente com a triparedoxina (TXN) são essenciais para a modulação do estresse oxidativo no parasita que são induzidos pelos mecanismos de defesa do hospedeiro. Como demonstrado na Figura 3, a detoxificação de hidroperóxidos em seus respectivos álcoois depende de uma cascata de reações nas quais a tripanotiona, tripanotiona redutase e a triparedoxina desempenham um papel central no transporte de H^+ de NADPH para dois tipos de peroxidases dependentes da triparedoxina [2-cis-peroxiredoxina (Prx) e a glutational-tipo-peroxidase (Px)] (BIRKHOLTZ et al., 2011; KRAUTH-SIEGEL; COMINI, 2008).

Figura 3 - Função da tripanotiona na detoxificação de hidroperóxidos em *Leishmania*.

A reação de conjugação de duas moléculas de glutathione (GSH) e uma de espermidina (Spd) para formar a tripanotiona ($T(SH)_2$) é catalisada pela tripanotiona sintetase (TryS). A detoxificação de hidroperóxidos ($ROOH$) é realizada pelas enzimas 2-cis-peroxiredoxina (Prx) e glutational-tipo-peroxidase (Px), cujos seus H^+ redutores derivam da cascata composta por tripanotiona ($T(SH)_2$), triparedoxina (TXN) e tripanotiona redutase (TryR), sendo que NADPH é o dador primário de elétrons. As expressões entre parênteses “red” e “ox” referem-se ao estado redox ditio ou ponte bissulfeto, respectivamente.

Fonte: Adaptado de BIRKHOLTZ, L.-M. et al. Polyamine homeostasis as a drug target in pathogenic protozoa: peculiarities and possibilities. **Biochemical Journal**, London, v. 438, Pt. 2, p. 229-244, 2011; KRAUTH-SIEGEL, R. L.; COMINI, M. A. Redox control in trypanosomatids, parasitic protozoa with trypanothione-based thiol metabolism. **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**, Amsterdam, v. 1780, n. 11, p. 1236–1248, 2008.

3 A ENZIMA ARGINASE

A arginase (EC 3.5.3.1 L-arginina amino hidrolase) é uma enzima trimérica de manganês (Mn^{2+}), catalisa a hidrólise de L-arginina (1) para produzir L-ornitina (2) e uréia (Figura 4) (ASH, 2004) em uma reação de competição com a óxido nítrico sintase (NOS) pelo substrato L-arginina (Figura 5) (CALDWELL et al., 2018).

Figura 4 - Reação catalisada pela enzima arginase.

Fonte: Adaptado de ASH, D. E. Structure and function of arginases. **The Journal of Nutrition**, Rockville, v. 134, n. 10. Suppl., p. 2765-2767, 2004.

Em microorganismos, plantas e invertebrados, existe uma única forma de arginase localizada na mitocôndria. Os vertebrados e outros animais que metabolizam o excesso de nitrogênio na forma de uréia expressam uma segunda isoforma de localização citosólica (CALDWELL et al., 2018; DZIK, 2014). Estas duas isoenzimas, citosólica e mitocondrial, são respectivamente denominadas arginase I (ARG I) e II (ARG II). Este último é considerado como a forma ancestral porque ARG I é encontrado apenas em um subconjunto das espécies mais avançadas (JENKINSON; GRODY; CEDERBAUM, 1996).

Nos mamíferos, a ARG I encontra-se em alto nível no fígado, enquanto a ARG II é expressa em vários tecidos extra-hepáticos, como rim, próstata, intestino, glândula mamária e cérebro (ILARI et al., 2015; JENKINSON; GRODY; CEDERBAUM, 1996). Ambas isoenzimas utilizam mecanismos semelhantes e possuem o mesmo cofator de manganês e metabólitos idênticos (CALDWELL et al., 2018).

A atividade da arginase tem duas funções fisiológicas primárias: i) desintoxicação de amônia no ciclo da uréia e ii) produção de ornitina necessária para a síntese de prolina e poliaminas (Figura 5). A prolina é produzida pela atividade da ornitina aminotransferase (OAT), e é necessária para a formação de colágeno. As poliaminas são produzidas através da atividade da ornitina descarboxilase (ODC), seguida da putrescina e da espermidina sintase

(Figura 2). As poliaminas têm um papel essencial na proliferação e crescimento celular, também são necessários para inflamação, cicatrização de feridas, reparação de tecidos e desenvolvimento neuronal (CALDWELL et al., 2018).

Figura 5 - Funções fisiológicas da arginase.

(A): Arginase e NOS competem pelo substrato comum L-arginina para a formação de seus produtos.

(B): A elevação da atividade da arginase pela redução da disponibilidade de L-arginina para NOS pode reduzir a formação de óxido nítrico (NO) e desacoplar NOS, fazendo com que produza mais superóxido ($O_2^{\cdot-}$), que rapidamente reage com NO para produzir outro oxidante potente, peroxinitrito ($ONOO^-$). Os níveis elevados de L-ornitina permitem uma maior produção de poliaminas que favorece o crescimento e desenvolvimento do parasita.

Fonte: Adaptado de CALDWELL, R. W. et al. Arginase: a multifaceted enzyme important in health and disease. *Physiological Reviews*, Bethesda, v. 98, n. 2, p. 641–665, 2018. (CALDWELL et al., 2018).

Estruturalmente, a arginase tem um centro binuclear de manganês (Mn_A^{2+} e Mn_B^{2+}) responsável pela ativação de uma molécula de água que é usada para atacar o substrato L-arginina. Estes dois íons de manganês são essenciais para a atividade da enzima, e a dissociação reversível de um deles gera uma enzima com a metade de sua atividade (RECZKOWSKI; ASH, 1992). O cátion Mn^{2+} é o cofator fisiológico das enzimas tipo I (citossólica) e tipo II (mitocondrial) de mamíferos, e cada unidade trimérica contém um local ativo que encontra-se no fundo de uma fenda de 15Å. Os íons Mn_A^{2+} e Mn_B^{2+} estão

localizados nesta fenda separados por 3,3Å (Figura 6), e são ligados por oxigênios derivados de 2 resíduos de ácido aspártico e um hidróxido derivado de água que tem ponte metálica e é possível que seja o nucleófilo que ataca o carbono guanidínio do substrato L-arginina (ASH, 2004). O íon metálico (MnA^{2+}) está localizado na posição mais profunda do sítio ativo, apresenta uma geometria piramidal quadrada, coordenada por HIS 101, ASP 124, ASP 128, ASP 232 e uma molécula de solvente. A molécula de solvente une ambos os íons metálicos e também doa uma ligação de hidrogênio ao ASP 128. O segundo íon metálico (MnB^{2+}) é coordenado por HIS 126, ASP 124, ASP 232, ASP 234 e a molécula de solvente, apresentando uma geometria octaédrica distorcida. Todos os ligandos metálicos, com exceção do ASP 128, interagem por pontes de hidrogênio com outros resíduos de proteínas, sendo que essas interações contribuem para a estabilidade do sítio de ligação do metal (KANYO et al., 1996).

Figura 6 - Estrutura do centro binuclear da enzima arginase do rato.

Fonte: ASH, D. E. Structure and function of arginases. **The Journal of Nutrition**, Rockville, v. 134, n. 10. Suppl., p. 2765-2767, 2004.

A ARG-LA é importante para o crescimento e sobrevivência do parasita devido ao seu papel no metabolismo das poliaminas, mas também pela neutralização do sistema de defesa do hospedeiro contra o parasita invasor, pois suprime a resposta imune, quer pela redução do óxido nítrico (NO) em macrófagos ativados, como pela depleção da concentração de L-arginina no local da infecção (REGUERA et al., 2009).

A L-arginina é um substrato comum do óxido nítrico sintase (NOS) e da arginase (CALDWELL et al., 2018), portanto, há uma competição pelo substrato entre as duas enzimas (Figura 5-A). Em condições fisiológicas, a NOS utiliza a L-arginina como substrato para produzir o óxido nítrico (NO) e L-citrulina. Em altas concentrações, o NO é citotóxico. Fisiologicamente esta citotoxicidade é explorada na resposta de macrófagos contra patógenos, incluindo parasitas do gênero *Leishmania* e *Trypanosoma* (OSWALD et al., 1994).

Em macrófagos, a produção de NO é portanto, regulada pela atividade da arginase; um aumento na atividade da arginase diminui a quantidade de L-arginina disponível para a NOS, levando não só a uma diminuição da quantidade de NO produzido, mas também ao aumento da produção de substâncias reativas de oxigênio (ROS) pelo desacoplamento da NOS, isto é, em condições em que a quantidade de L-arginina necessária para a produção de NO é inadequada, a enzima produz menos NO e usa mais oxigênio molecular para gerar superóxido (O_2^-). Quando NO e O_2^- são formados, eles reagem para produzir peroxinitrito ($ONOO^-$), moléculas altamente reativas com capacidade leishmanicida (Figura 5B) (CALDWELL et al., 2018).

O NO é uma importante molécula efetora da citotoxicidade dos macrófagos contra uma variedade de alvos microbianos, incluindo parasitas protozoários. A produção de NO por macrófagos é dependente de arginina e é catalisada por uma forma induzida da NOS (iNOS). Esta atividade é positivamente controlada por vários estímulos reguladores positivos (incluindo $IFN-\gamma$, $TNF-\alpha$, IL-2) e controlados negativamente por outros (principalmente IL-10, IL-4, $TGF-\beta$). Em modelos murinos de leishmaniose, a síntese de NO *in vivo* correlaciona-se com a imunidade protetora contra a infecção (OSWALD et al., 1994).

Os macrófagos são as principais células efetoras na resposta imune frente a *Leishmania*. Estas células sintetizam o NO, via óxido nítrico sintetase induzida (iNOS), tendo como substrato a L-arginina para produzir peróxidos e superóxidos de hidrogênio e radicais hidroxilas pelo sistema NADPH-oxidase fagocitário, moléculas com capacidade leishmanicida. Outro mecanismo de defesa dos macrófagos é a acidificação das vesículas pela ativação de ATPases o que leva a desnaturação de proteínas, deixando os parasitas suscetíveis à ação de hidrolases ácidas (SILVESTRE et al., 2009).

Graças à presença de moléculas na superfície de membrana, as denominadas moléculas ligantes do parasita (LPG, proteofosfoglicanos), a *Leishmania* é capaz de resistir a ação das enzimas lisossomais por impedir a fusão entre o fagossoma e o endossoma. Por outro lado, estes parasitas possuem mecanismos que diminuem a atividade da iNOS levando a diminuição da produção de NO, principal fator antiproliferativo em macrófagos ativados (MENEZES; SARAIVA; ROCHA-AZEVEDO, 2016; SILVESTRE et al., 2009).

A evolução da infecção depende também do balanço da resposta imune Th1 e Th2 que direcionam o metabolismo da arginina. A resposta Th1 (mediada por IL-12 e IFN γ), implica em resposta imune celular, que resulta na ativação dos macrófagos e à opsonização, enquanto que uma resposta Th2 (mediada por IL-10, IL-4, e TGF- β) direciona o organismo para uma resposta do tipo humoral que não apresenta nenhuma relevância frente à infecção do macrófago pela *Leishmania* (CORRALIZA et al., 1995; SACKS; NOBEN-TRAUTH, 2002; SILVA, 2010).

Durante a resposta Th1, a IFN- γ produzida induz a expressão de iNOS, enquanto que a resposta Th2 produz IL-4 e IL-10 que induzem a expressão da arginase, possibilitando a ocorrência de dois estados metabólicos competitivos onde a indução de uma das enzimas leva a inibição da outra (Figura 8) (HRABÁK et al., 1996; SILVA, 2010).

A susceptibilidade a infecção por *Leishmania* depende do tipo de metabolismo da arginina. A ativação de iNOS dependente de Th1, produz óxido nítrico e ROS e resulta em morte do parasito pelos macrófagos, resultando na melhoria da infecção. A resposta Th2, via expressão de arginase e síntese de poliaminas, favorece a replicação do parasito nos macrófagos e diminui a produção de arginina disponível para a síntese de NO tornando o hospedeiro suscetível à infecção por *Leishmania* (Figura 8) (ILARI et al., 2015; SILVA, 2010).

Figura 8 - Equilíbrio entre a arginase e óxido nítrico sintase e o efeito dos macrófagos em *Leishmania*.

As setas azuis indicam atividade promotora de parasitas nos macrófagos via arginase. As setas vermelhas indicam atividade do óxido nítrico sintase induzida (iNOS) nos macrófagos, que resulta na morte dos parasitas. Os símbolos negativos no lado esquerdo da Figura indicam os efeitos inibitórios de citocinas Th1 na indução de arginase e de citocinas Th2 na indução de iNOS.

Fonte: Adaptado de VINCENDEAU, P. et al. Arginases in parasitic diseases. **Trends in Parasitology**, Oxford, v. 19, n. 1, p. 9–12, 2003.

A importância da arginase em *Leishmania* foi igualmente demonstrada através de mutantes onde o gene da arginase foi nocauteado (ROBERTS et al., 2004). A ARG-LA está localizada no glicossomo e está envolvida em um complexo balanço que define o destino de seu substrato L-arginina, e a deleção da sequência gênica que codifica o sinal de transporte para o glicossomo sustenta a hipótese de que a localização celular é importante na infecção (SILVA et al., 2012). Em experimentos sem adição de L-arginina em meio de cultura foi verificado que *Leishmania* pode regular a expressão de genes para a produção do transportador de L-arginina (CASTILHO-MARTINS et al., 2011).

Recentemente foi observado um aumento da atividade da arginase no sangue de pacientes com leishmaniose visceral (LV) (ABEBE et al., 2013) e em pacientes com HIV co-infectados com LV (TAKELE et al., 2013). A arginase também está aumentada em lesões de pacientes com leishmaniose cutânea (ABEBE et al., 2012). Estas pesquisas reforçam a possibilidade de que tanto a arginase do parasita quanto a arginase do hospedeiro podem ser consideradas alvos para o tratamento da infecção por *Leishmania* (INIESTA; GÓMEZ-NIETO; CORRALIZA, 2001; RILEY; ROBERTS; ULLMAN, 2011). Nos últimos anos, compostos naturais (MANJOLIN et al., 2013; MAQUIAVELI et al., 2016b) e sintéticos (MAQUIAVELI et al., 2016a, 2017) têm sido descritos como sendo inibidores da arginase nas formas promastigotas e amastigotas de *L. amazonensis* de forma seletiva.

5 INIBIDORES DA ARGINASE DE *LEISHMANIA*

Estudos recentes mostraram que a arginase é uma enzima importante para a viabilidade e infectividade da *Leishmania* que se beneficia do aumento da atividade dessa enzima, seja ela própria ou a do hospedeiro (KROPF, 2005; OSORIO et al., 2014). Com efeito, esta enzima é a primeira na via metabólica de síntese de poliaminas, compostos essenciais para a proliferação de células, incluindo as células do parasita. Poliaminas são também os precursores da produção de tripanotona, um composto antioxidante produzido pelo parasita e envolvido na neutralização do NO gerado pelo sistema de defesa da célula hospedeira parasitada (COLOTTI; ILARI, 2011). Um aumento na atividade da arginase nos macrófagos do hospedeiro conduz a uma diminuição na produção de NO, reduzindo ainda mais a capacidade defensiva do hospedeiro e aumentando assim o poder infeccioso do parasita. Esses dados estimularam a busca por novos inibidores da ARG-LA para desenvolver novas drogas antiparasitárias.

Silva e seus colaboradores (2012) identificaram pela primeira vez os inibidores naturais e seletivos da ARG-LA (SILVA; MAQUIAVELI; MAGALHÃES, 2012), um dos quais (isoquercetina) foi identificado como composto secundário em plantas do gênero *Cecropia* (TANAE et al., 2007). A avaliação da atividade inibitória da ARG-LA por extratos etanólicos de *Cecropia pachystachya* resultou em 90% de inibição da enzima a 10 µg/mL do extrato, e observou-se alterações mitocondriais e desorganização do DNA do cinetoplasto de *L. amazonensis*, características da inibição da via de poliaminas (CRUZ et al., 2013).

Uma série de flavonoides foi testada para avaliar sua capacidade inibitória sobre a ARG-LA: oito compostos, de um total de treze flavonoides apresentaram atividade inibitória significativa com porcentagens de inibição variando de 50% a 87% a 125 µM e IC₅₀ entre 1,4 e 16 µM (MANJOLIN et al., 2013). A relação estrutura-atividade destes compostos naturais, evidenciaram a importância do grupo catecol a partir da estrutura da quercetina (3,3',4',5,7-penta-hidróxi-flavonoide) e que sua ausência diminuiu fortemente a inibição de ARG-LA (MANJOLIN et al., 2013). A modelagem molecular dos compostos através do “docking” sugeriu que o grupo catecol pode interagir com o aminoácido Asp129 presente no centro binuclear formado por dois íons Mn²⁺ do sítio ativo da ARG-LA (MANJOLIN et al., 2013; SILVA; MAQUIAVELI; MAGALHÃES, 2012). Estas moléculas interagem de modo semelhante à inibidores sintéticos (Tabela 2) ácido 2(S)-amino-6-borono hexanoico (ABH), S-(2-boronoetil)-L-cisteína (BEC), N-hidroxi-nor-arginina (nor-NOHA) e ao inibidor

endógeno N^o-hidroxi-L-arginina (NOHA), intermediário da produção de óxido nítrico a partir do aminoácido L-arginina (RILEY; ROBERTS; ULLMAN, 2011). Os compostos naturais acima descritos como inibidores da arginase são ativos contra *L. donovani* (MITTRA et al., 2000; TASDEMIR et al., 2006) e *L. amazonensis* (MUZITANO et al., 2006).

O composto verbascosídeo, um glicosídeo feniletanoide presente em *Stachytarpheta cayennensis*, utilizada na Amazônia brasileira para o tratamento da leishmaniose tegumentar, teve efeito inibidor sobre a ARG-LA. A análise da cinética de inibição revelou que este é um inibidor competitivo da ARG-LA ($K_i = 0,7 \mu\text{M}$) (MAQUIAVELI et al., 2016a). Os valores da concentração inibitória média (IC_{50}) deste composto foram de $19 \mu\text{M}$ e $32 \mu\text{M}$ quando testado contra promastigotas e amastigotas de *L. amazonensis*, respectivamente (MAQUIAVELI et al., 2016a, 2017).

Embora os dados na literatura sobre a inibição da arginase sugiram que o desenvolvimento de inibidores da arginase é de grande relevância terapêutica em várias doenças, apenas alguns inibidores sintéticos estão atualmente disponíveis como patentes farmacêuticas, havendo necessidade de busca de inibidores da arginase com propriedades mais efetivas, uma vez que a maioria dos compostos descritos na literatura apresentam perfis farmacocinéticos e seletividade relativamente fraca (IVANENKOV; CHUFAROVA, 2014).

Tabela 2 - Inibição da arginase de *L. mexicana* por inibidores sintéticos.

Inibidor	Arginase <i>L. mexicana</i> Ki (μM)	Tipo de inibição
 ABH	1,3	Competitiva
 BEC	~10	Competitiva
 nor-NOHA	~50	Competitiva
 NOHA	85	Competitiva

ABH: ácido 2(S)-amino-6-borono hexanoico, BEC: S-(2-boronoetil)-L-cisteína, nor-NOHA: N-hidroxi-nor-arginina, NOHA: Nω-hidroxi-L-arginina.

Fonte: Adaptado de RILEY, E.; ROBERTS, S. C.; ULLMAN, B. Inhibition profile of *Leishmania mexicana* arginase reveals differences with human arginase I. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v. 41, n. 5, p. 545-552, 2011.

6 CINÉTICA ENZIMÁTICA

As enzimas são catalisadores biológicos cruciais para reações das vias metabólicas dos organismos vivos. Suas propriedades são avaliadas por estudos de cinética enzimática examinando as velocidades de reações catalisadas por elas. Estes estudos fornecem informações indiretas sobre a especificidade e mecanismo catalítico das enzimas (HORTON et al., 2008). Em geral, uma reação enzimática pode ser descrita pela equação descrita na Figura 9 abaixo:

Figura 9 - Esquema de reação catalizada por enzimas.

As constantes de velocidade k_1 e k_2 no primeiro passo correspondem respectivamente as taxas de associação do substrato (S) com a enzima (E) e dissociação de (S) do complexo enzima-substrato (ES). O substrato ligado à enzima é transformado em um produto (P) que se dissocia da enzima, um processo que também é reversível (constantes de velocidade k_3 e k_4).

Fonte: ENGELKING, L. R. Enzyme kinetics. In: ENGELKING, L. R. **Textbook of veterinary physiological chemistry**. 3rd. ed. London: Academic Press, 2015. p. 32–38.

Tipicamente, a cinética de uma reação catalisada por uma enzima que consome um único substrato para dar um produto é descrita pela equação de Michaelis-Menten (Figura 10A); esta, descreve a relação entre a velocidade inicial de uma reação e a concentração do substrato.

Os parâmetros importantes de uma reação enzimática para estudar a especificidade e o mecanismo de reação são a constante de Michaelis (K_m), a velocidade máxima da reação (V_{max}) e constante catalítica (K_{cat}). K_m e V_{max} podem ser deduzidas pelo gráfico Lineweaver-Burk, também chamado de gráfico de duplo-recíproco (Figura 10B), que permite determinar o valor de $-1/K_m$ da interseção com o eixo “x” e o valor de $1/V_{max}$ da interseção com o eixo “y” (HORTON et al., 2008).

Para constante catalítica (k_{cat}), esta pode ser calculada usando a equação:

$K_{cat} = V_{max} / [E]_{Total}$. A constante catalítica (K_{cat}) indica a quantidade máxima de moléculas de substrato que são convertidas em produto a cada segundo, por cada sítio ativo da enzima. Deste modo, a constante catalítica mede a rapidez com que uma determinada enzima pode

catalisar uma reação específica, sendo assim, uma forma útil para descrever a eficácia da enzima (HORTON et al., 2008).

A constante de Michaelis (K_m) é a constante de dissociação do complexo enzima-substrato (ES) em enzima (E) e substrato (S), e é definida como a concentração de substrato quando a velocidade inicial (V_0) é igual a metade da velocidade máxima (V_{max}) (Figura 10A). A constante K_m determina a afinidade de (E) para (S), quanto menor a K_m , mais estreitamente o substrato está relacionado a enzima (HORTON et al., 2008).

Figura 10 - Gráficos e equações usados na determinação da cinética enzimática.

Curva hiperbólica da velocidade inicial (V_0) em função da concentração de substrato ($[S]$) em uma reação enzimática. A concentração do substrato correspondente à metade da velocidade máxima ($V_{max} / 2$) é denominada constante de Michaelis-Menten (K_m), e a enzima encontra-se 50% saturada quando $[S] = K_m$. B: gráfico de duplo-recíproco (Lineweaver-Burk), obtido pela transformação linear da equação de Michaelis-Menten. Os valores de $1/V_0$ são traçados em função dos valores de $1/[S]$. As equações para cada gráfico estão acima representadas.

Fonte: HORTON, H. et al. Propriedade de las enzimas. In: HORTON, H. et al. **Pincipios de la bioquímica**. 4. ed. México: Pearson Educación, 2008. p. 129–146.

6.1 Inibição enzimática

Inibidores de enzimas são moléculas que interferem com a catálise, diminuindo ou interrompendo as reações enzimáticas, são usados como ferramentas para o estudo de enzimas e como fármacos para o tratamento de certos transtornos, uma vez que novos agentes farmacêuticos quase sempre são feitos para inibir a atividade enzimática (ENGELKING, 2015). Existem vários mecanismos de inibição enzimática, caracterizado por estudos cinéticos. Os inibidores enzimáticos podem ser classificados em reversíveis ou irreversíveis, de acordo com a estabilidade gerada pela sua ligação com a enzima.

Um inibidor irreversível forma um complexo estável com a enzima. Como resultado, a enzima é permanentemente inativada ou, reativada lentamente. Normalmente, o inibidor irreversível forma uma ligação covalente com a enzima. Isso normalmente envolve uma reação do inibidor com um resíduo de aminoácido no sítio ativo da enzima (ENGELKING, 2015; ROSKOSKI, 2007).

Inibidores reversíveis ligam-se a enzima alvo através de uma combinação de interações não covalentes, tais como ligações de hidrogênio ou interações iônicas, hidrofóbicas e de Van der Waals e geralmente não sofrem nenhuma transformação química enquanto ligados à enzima (DOUGALL; UNITT, 2015).

Em geral, existem duas espécies enzimáticas básicas às quais um inibidor pode se ligar para produzir inibição enzimática; a enzima não ligada ao substrato ou enzima livre (E) e as espécies ligadas ao substrato (ES) (Figura 11). Combinações de afinidades para estas duas espécies levam aos quatro comportamentos gerais dos inibidores enzimáticos reversíveis a saber: competitiva, incompetitiva, não competitiva e mista.

Figura 11 - Esquema cinética geral de inibição enzimática reversível.

Esquema da ligação de inibidores a várias formas da enzima; enzima livre [E] ou o complexo enzima-substrato [ES]. O K_i e o K_{is} descrevem as interações do inibidor com E e ES respectivamente. As relações entre K_i e o K_{is} levam a quatro mecanismos básicos de inibição enzimática: competitiva; incompetitiva, não competitiva e mista. (I) indica o inibidor, (EI) o complexo enzima-inibidor e (EIS) o complexo trimérico enzima-inibidor-substrato.

Fonte: adaptado de KENAKIN, T. P. Enzymes as drug targets. In: KENAKIN, T. P. **Pharmacology in drug discovery and development**. 2nd. ed. London: Academic Press, 2017. p. 131–156.

6.1.1 Inibidores competitivos

Inibidores competitivos são análogos estruturais do substrato, assim sendo, competem pelo sítio ativo da enzima. Devido a esta competição, se for fornecido substrato suficiente, o efeito do inibidor competitivo pode ser ultrapassado, isto é, o substrato acabará por ocupar todos os locais de ligação. Os inibidores competitivos praticamente não têm afinidade pela espécie (ES) (Figura 12A) (ENGELKING, 2015; KENAKIN, 2017).

Quando o substrato e o inibidor estão presentes em uma solução, a proporção da enzima que pode formar complexos (ES) depende das concentrações do (S) e (I), e também de suas afinidades relativas à enzima (HORTON et al., 2008). A formação do complexo (EI) pode ser reduzido aumentando a [S] e se o último é elevado o suficiente a enzima pode ser saturada com o substrato. Portanto, a constante de Michaelis (K_m) para o substrato é aumentado, uma vez que é necessária uma maior concentração de substrato para superar os efeitos inibitórios do competidor, mas a velocidade máxima (V_{max}) da reação catalisada por enzima na presença de um inibidor competitivo permanece inalterado em relação ao normal (ENGELKING, 2015; KENAKIN, 2017). O efeito de um inibidor competitivo é apresentado no modelo de Dixon e de Cornish-Bowden, graficamente representados na Figura 12 B e C, respectivamente.

Figura 12 - Inibição competitiva - esquema cinético, diagrama e representação gráfica.

A: Inibidores competitivos: ligam-se ao sítio ativo da enzima, K_i é a constante de equilíbrio da ligação do inibidor a enzima. (B) - gráfico de Dixon ($[i] \times 1/V$) e (C) - gráfico de Cornish-Bowden ($[i] \times [S]/V$). O ponto de intersecção no gráfico de Dixon fornece uma medida de K_i .

Fonte: Adaptado de CORNISH-BOWDEN, A. A simple graphical method for determining the inhibition constants of mixed, uncompetitive and non-competitive inhibitors. **The Biochemical Journal**, London, v. 137, n. 1, p. 143–4, 1974; NELSON, D. L.; COX, M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. 6. ed. Porto Alegre: Artes Médicas, 2014.

6.1.2 Inibidores incompetitivos

Os inibidores incompetitivos apenas reconhecem e interagem com o complexo (ES), sem ligação à enzima livre (E) para impedir ou retardar a formação do produto. Neste tipo de inibição, a V_{max} é diminuída pela transformação de algumas moléculas de (E) na forma inativa (ESI). Quando o complexo (ES) se liga ao (I), a diminuição da V_{max} é irreversível, mesmo adicionando mais substrato (S). O inibidor também diminui o valor de K_m , já que os equilíbrios de formação de ES e ESI são deslocados pela união do Inibidor (HORTON et al., 2008).

Em essência, a ligação do substrato cria o local de ligação para o inibidor; portanto, a ligação do inibidor é promovida pela presença do substrato (Figura 13A). Este modo de ação é atraente para o desenho de fármacos, uma vez que os inibidores se ligam ao alvo enzimático apenas quando o alvo está ativo e o substrato está presente. Os inibidores incompetitivos diminuem o K_m , V_{max} , e exibem maior inibição com o aumento da $[S]$ (DOUGALL; UNITT,

2015; ENGELKING, 2015; KENAKIN, 2017). As Figuras 13B e 13C, mostram os modelos gráficos de Dixon e de Cornish-Bowden, respectivamente, para uma inibição incompetitiva.

Figura 13 - Inibição incompetitiva - esquema cinético, diagrama e representação gráfica.

A: Inibidores incompetitivos ligam-se a sítios diferentes, mas o inibidor se liga apenas ao complexo (ES), K_{is} é a constante de equilíbrio para a ligação a (ES). (B) - gráfico de Dixon ($[i] \times 1/V$) e (C) - gráfico de Cornish-Bowden ($[i] \times [S]/V$). O ponto de intersecção no gráfico de Cornish-Bowden fornece uma medida de K_{is} .

Fonte: Adaptado de CORNISH-BOWDEN, A. A simple graphical method for determining the inhibition constants of mixed, uncompetitive and non-competitive inhibitors. **The Biochemical Journal**, London, v. 137, n. 1, p. 143–4, 1974; NELSON, D. L.; COX, M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. 6. ed. Porto Alegre: Artes Médicas, 2014.

6.1.3 Inibidores não competitivos

Um inibidor não competitivo (I) pode ligar-se em paralelo e com a mesma afinidade a enzima livre (E) e a enzima ligada ao substrato (ES) para formar os complexos inativos (EI) ou (ESI), respectivamente (Figura 14A). De fato, (I) e (S) não competem pelo mesmo sítio, ou seja, (S) liga-se ao sítio ativo e (I) a outro local de ligação. A fixação do (I) provoca uma alteração na conformação do sítio ativo, o que impede a reação enzimática, mas não afeta o reconhecimento do (S) pela (E) (HORTON et al., 2008). Estes inibidores não são análogos do substrato porque não se ligam ao mesmo sítio ativo que (S). A ligação de um inibidor não competitivo diminui a velocidade máxima (V_{max}) da reação, mas não modifica a afinidade da enzima (K_m) pelo seu substrato, já que este se liga tanto a enzima livre (E) quanto ao

complexo enzima-inibidor (EI), com a mesma afinidade ($K_i = K_{is}$) (Figura 11) (HORTON et al., 2008).

Devido a sua ação alostérica, o inibidor geralmente distorce os locais ativos alterando assim a conformação de seus resíduos catalíticos, o que reduz a eficácia do complexo enzima-substrato (ES), assim, o efeito de um inibidor não competitivo não pode ser revertido aumentando as concentrações de substrato, (DOUGALL; UNITT, 2015; ENGELKING, 2015; KENAKIN, 2017). Os modelos de Dixon (B) e de Cornish-Bowden (C) para um inibidor não competitivo são mostrados na Figura 14 abaixo.

Figura 14 - Inibição não competitiva - esquema cinético, diagrama e representação gráfica.

A: Inibidores não competitivos ligam-se a sítios separados, mas podem se ligar tanto a (E) quanto a (ES). A enzima se inativa quando se liga ao (I). Embora o (EI) possa se unir ao (S), não há formação do produto. K_i e K_{is} representam as constantes de equilíbrio para a ligação do (I) a (E) e (ES) respectivamente. (B) - gráfico de Dixon ($[i] \times 1/V$) e (C) - gráfico de Cornish-Bowden ($[i] \times [S]/V$). O ponto de intersecção no gráfico de Dixon fornece uma medida de K_i , enquanto o ponto de intersecção no gráfico de Cornish-Bowden fornece uma medida de K_{is} .

Fonte: Adaptado de CORNISH-BOWDEN, A. A simple graphical method for determining the inhibition constants of mixed, uncompetitive and non-competitive inhibitors. **The Biochemical Journal**, London, v. 137, n. 1, p. 143–4, 1974; NELSON, D. L.; COX, M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. 6. ed. Porto Alegre: Artes Médicas, 2014.

6.1.4 Inibidores mistos

A maioria das enzimas não obedece ao tipo de inibição não competitiva clássica apresentado anteriormente, em que K_m permanece inalterado, mas sim ao tipo de inibição mista em que V_{max} e K_m são afetados porque a afinidade do (I) para (E) é diferente daquele para (ES) (HORTON et al., 2008). De fato, a inibição mista é uma combinação de inibições descritas acima para as quais (I) pode ligar tanto com (E) e com (ES) (Figura 15A), mas com diferentes afinidades, $K_i \neq K_{is}$ (Figura 11). Os inibidores mistos interferem com a ligação do substrato (aumentando assim a K_m) e também dificultam a catálise (diminuindo V_{max}) (KENAKIN, 2017). A Figura 15, mostra o efeito de um antagonista misto no modelo de Dixon (B) e de Cornish-Bowden (C).

Figura 15 - Inibição mista - esquema cinético, diagrama e representação gráfica.

A: Inibidores mistos ligam-se a sítios separados, mas podem se ligar tanto a (E) quanto a (ES). A enzima se inativa quando se liga ao (I). Embora o (EI) possa se unir ao (S), não há formação do produto. K_i e K_{is} representam as constantes de equilíbrio para a ligação do (I) a (E) e (ES) respectivamente. (B) - gráfico de Dixon ($[i] \times 1/V$) e (C) - gráfico de Cornish-Bowden ($[i] \times [S]/V$). O ponto de intersecção no gráfico de Dixon fornece uma medida de K_i , enquanto o ponto de intersecção no gráfico de Cornish-Bowden fornece uma medida de K_{is} .

Fonte: Adaptado de CORNISH-BOWDEN, A. A simple graphical method for determining the inhibition constants of mixed, uncompetitive and non-competitive inhibitors. *The Biochemical Journal*, London, v. 137, n. 1, p. 143–4, 1974; NELSON, D. L.; COX, M. *Princípios de bioquímica de Lehninger*. 6. ed. Porto Alegre: Artes Médicas, 2014.

O mecanismo de inibição enzimática é importante, uma vez que pode definir a relação entre as concentrações de inibidor necessárias para produzir o bloqueio e o nível de substrato presente no compartimento enzimático. Por exemplo, níveis elevados de substrato tornam um inibidor competitivo menos potente, mas um inibidor incompetitivo mais potente.

6.2 Estudos de cinética enzimática e potencialidades inibitórias de inibidores reversíveis

Na pesquisa de novos inibidores enzimáticos, é necessário avaliar quantitativamente o potencial inibitório e os comportamentos cinéticos dos compostos estudados na enzima de interesse. O mecanismo de inibição, o efeito de inibidores reversíveis, a constante de inibição (K_i) e a concentração que inibe 50% da atividade enzimática (IC_{50}) são os parâmetros frequentemente estudados.

6.2.1 Determinação do tipo de inibição e constante de inibição (K_i)

Vários métodos gráficos descritos na literatura são utilizados para determinar o tipo de inibição e o K_i dos inibidores reversíveis. Em 1934, Hans Lineweaver e Dean Burk descreveram a cinética enzimática usando uma equação nomeada em sua homenagem a equação de Lineweaver-Burk (LINEWEAVER; BURK, 1934), derivada da equação de Michaelis-Menten (Figura 10). Usando este método, pode-se determinar V_{max} e K_m , e também distinguem os diferentes tipos de inibição (BERG; TYMOCZKO; STRYER, 2004).

Para completar a curva de duplo-recíproco, Dixon propôs em 1952 um método gráfico simples para determinar o K_i , construindo o gráfico $1/v$ em função da $[I]$ e usando pelo menos duas concentrações do substrato, Dixon foi capaz de determinar o K_i nos casos de inibição competitiva (Figura 12B) e não competitiva (Figura 14B) (DIXON, 1953).

O método de Dixon, no entanto, é limitado pelo fato de não permitir distinguir inequivocamente os inibidores competitivos dos inibidores mistos (PURICH; FROMM, 1972), e para os inibidores mistos e incompetitivos este método não fornece nenhuma medida da constante de dissociação (K_{is}) do complexo (ESI). Para resolver este problema, Cornish-Bowden propôs uma curva complementar à de Dixon, construindo o gráfico $[S]/V$ em função da $[I]$ (CORNISH-BOWDEN, 1974). Deste modo, o ponto de intersecção da curva de Dixon permite deduzir (K_i), enquanto o ponto de intersecção da curva de Cornish-Bowden

fornece uma medida de (K_i). Portanto, o uso concomitante desses dois métodos torna possível determinar o conjunto das constantes de inibição.

6.2.2 Concentração que inibe 50% da atividade enzimática (IC_{50})

A IC_{50} especifica a concentração necessária para um composto inibir metade do efeito biológico máximo da enzima de interesse (SITTAMPALAM et al., 2016). Na estratégia de busca de novos inibidores enzimáticos, a IC_{50} determinada pela avaliação biológica *in vitro* é frequentemente usada para analisar a potencialidade e seletividade dos compostos estudados em relação às enzimas de interesse. Os valores de IC_{50} são, portanto, importantes para a análise de relações estruturais (relação estrutura-atividade), para identificar compostos e prosseguir com o processo de farmacomodulação com o objetivo de desenvolver um novo candidato à fármaco.

A IC_{50} de um inibidor é determinada examinando-se o efeito de diferentes concentrações de inibidores sobre a atividade da enzima e, em seguida, construindo-se uma curva sigmoide log concentração-resposta (Figura 16) (BECK et al., 2004).

Ao contrário da constante K_i , a IC_{50} não é um indicador direto da afinidade entre o inibidor e a enzima; a IC_{50} é uma medida quantitativa de eficácia de um composto para inibir uma função biológica ou bioquímica específica, tal como função enzimática, por exemplo. Os valores de IC_{50} são muito usados, contudo, são muito dependentes das condições da reação enzimática. De modo geral, a IC_{50} aumenta com a concentração da enzima. Além disso, dependendo do tipo de inibição, outros fatores como concentração de substrato, pH, temperatura ou força iônica (HORTON et al., 2008), podem influenciar o valor da IC_{50} . Por esta razão, é importante avaliar os compostos estudados nas mesmas condições e usar um inibidor de referência para que a IC_{50} obtida seja comparável (GIRARD-THERNIER; PHAM; DEMOUGEOT, 2015).

Figura 16 - Representação gráfica da curva sigmoidal logdose-resposta para determinação da IC_{50} .

Fonte: Própria autoria.

Em virtude do exposto com relação à leishmaniose e a descoberta da ARG-LA como alvo de inibidores com potencial terapêutico para tratamento da leishmaniose, o presente trabalho apresenta os resultados da triagem de diferentes compostos naturais e sintéticos com potencial inibidor da ARG-LA, sob a hipótese de que as novas moléculas naturais e sintéticas inibem a enzima arginase recombinante de *Leishmania (L.) amazonensis* e são potenciais candidatos para desenvolvimento de fármacos.

7 OBJETIVOS

7.1 Objetivo geral

Realizar a prospecção de novos compostos naturais e sintéticos na inibição da arginase recombinante de *Leishmania (L.) amazonensis*.

7.2 Objetivos específicos

- Testar o potencial de inibição da arginase de *Leishmania (L.) amazonensis* por novos compostos naturais e sintéticos;
- Determinar a IC₅₀ dos compostos naturais e sintéticos,
- Determinar o mecanismo de inibição enzimática dos compostos em estudo;
- Determinar a constante de associação (K_i) para complexo enzima-inibidor (EI) e/ou constante de associação (K_{is}) para o complexo enzima-substrato-inibidor (ESI).
- Determinar a relação estrutura-atividade dos compostos sintéticos ativos na inibição da arginase de *Leishmania (L.) amazonensis*.

8 MATERIAL E MÉTODOS

O desenvolvimento do projeto baseou-se na inibição da enzima arginase recombinante de *Leishmania (L.) amazonensis* (ARG-LA) para triagem de compostos naturais e sintéticos. Todos os produtos químicos usados ao longo da presente pesquisa foram de pureza adequada para as análises realizadas.

8.1 Material

Um total de setenta e oito (78) compostos foram testados quanto a sua capacidade de inibição da ARG-LA, sendo, vinte (20) compostos produzidos por engenharia de síntese em *Escherichia coli* (engenharia genética), a partir da conjugação de diferentes moléculas que serviram de doadores e receptores de grupos ativos (HE et al., 2017; JIANG et al., 2016; ZHUANG et al., 2016). Estes, foram disponibilizados pelo Instituto de Biotecnologia de Tianjin – China e serão denominados de compostos biosintéticos no presente estudo.

O composto natural piceatannol (trans-3,4,3',5'-tetrahidroxiestilbeno) e a série de dez (10) cinamidas derivadas do ácido caféico foram produzidos e disponibilizados pela Université Bourgogne – Franche-Comté (PHAM et al., 2016).

Seis (6) compostos da série pirazolopirimidina (1-fenil-1*H*-pirazolo[3,4-*d*]pirimidina) (PLTS) foram planejados pela troca dos anéis quinolínico, presente na cloroquina e primaquina (medicamentos utilizados para o tratamento da malária) pelo anel 1*H*-pirazolo[3,4-*d*]pirimidínico, por isosterismo de anel. Na posição 4- do anel pirazolopirimidínico foi ligado um grupo alquilamino análogo aos grupos presentes na cloroquina e na primaquina (SILVEIRA et al., 2015). Os compostos da série PLTS, dezessete (17) compostos da série triazolopirimidona (PLLP) (Apêndice B), seis (6) compostos da série tiouréias (PLTU) (Apêndice C) e quinze (15) compostos derivados de benzonidazol e megazol (PAMG) foram sintetizados e disponibilizados pelo Instituto de Tecnologia em Fármacos (Farmanguinhos-Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Rio de Janeiro – Brasil. Os compostos naturais ácidos salvianólico A, B e D foram adquiridos na PhytoLab GmbH & Co. KG, Vestenbergsgreuth, Alemanha.

8.2 Expressão e purificação da arginase recombinante de *Leishmania (L.) amazonensis*

A expressão e purificação da arginase recombinante de *Leishmania (L.) amazonensis* (ARG-LA) foi realizada de acordo com a descrição prévia (SILVA et al., 2008). Resumidamente consistiu em cultivar o clone de arginase [*E. coli* (BL21 (DE3) pLysS)] contendo plasmídeo com o gene da arginase (pRSET-Arg)] em meio SOB. A cultura de células foi mantida em crescimento até atingir uma absorbância de 0.6 a 0.8 medida a 600 nm, e a expressão da enzima recombinante foi induzida durante um período de 3 h por adição de 1 mM de IPTG (isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosídeo) a 37 °C. Para maximizar a ativação da arginase foram adicionados 10 mM de MnSO₄ na cultura simultaneamente à adição do IPTG. Posteriormente, as células foram coletadas por centrifugação durante 15 min a 4500 *xg*, o sobrenadante foi descartado e as células foram armazenadas a -20 °C. A lise foi realizada usando 1 mL de tampão MOPS (ácido 4-morfolino propanosulfônico) a 100 mM, pH 7.2, contendo 500 mM NaCl, 1 mM PMSF (fluoreto de fenilmetilsulfonil), 10% reagente de lise “celllytic™ B” (Sigma-Aldrich) e 0,5 μ L de benzonase® nuclease (Merck). As células foram ressuspensas e gentilmente agitadas durante 15 min à temperatura ambiente, e a mistura foi centrifugada a 12000 *xg* por 15 min a 4 °C. A arginase contida no sobrenadante foi purificada usando a cromatografia de afinidade a metal imobilizado (IMAC), utilizando uma coluna do tipo “GE Healthcare HiTrap™ Chelating HP Columns” carregada com níquel. Após equilibrar a coluna com o tampão A (100 mM MOPS pH 7,2; 500 mM NaCl; 5 mM de imidazol), foi injetado o extrato proteico e a seguir a ativação da arginase foi realizada na coluna à temperatura ambiente (25 °C), pela passagem do tampão B (100 mM MOPS pH 7,2; 500 mM NaCl, 50 mM MnSO₄), e aproximadamente 10 mL do tampão C (100 mM MOPS pH 7,2; 500 mM NaCl; 50 mM de imidazol) foram usados para eluir a arginase coletando-se 10 frações de 1,5 mL. As frações foram testadas e as que possuíam alta atividade de arginase foram reunidas e então foi adicionado um volume de glicerol para conservação a -20 °C (SILVA; MAQUIAVELI; MAGALHÃES, 2012).

8.3 Triagem de inibidores

A solução estoque de 70 mM de cada inibidor foi previamente preparada utilizando como solvente DMSO (dimetilsulfóxido), antes da realização de cada experimento e posteriormente conservada a -20 °C, devido a possibilidade de instabilidade das moléculas.

A triagem dos compostos quanto à capacidade de inibição da ARG-LA foi realizada usando 100 μM de cada composto na solução de 50 mM de tampão CHES (ácido 2-(ciclohexilamino)etanossulfônico), pH 9,5 e 50 mM de L-arginina (pH 9,5).

Cada unidade experimental (50 mM L-arginina, 50 mM tampão CHES, 0,3 a 0,4 μL de ARG-LA, e 100 μM do composto inibidor), no volume de 100 μL , foi incubada a 37 °C durante 15 minutos, e a quantificação de uréia produzida foi determinada pelo método enzimático colorimétrico de Berthelot (FAWCETT; SCOTT, 1960), usando reagentes comerciais. A atividade catalítica da arginase foi interrompida por transferência de 2 μL da mistura da reação de cada unidade experimental para 150 μL do reagente A (20 mM de tampão fosfato, pH 7,5 contendo 60 mM de salicilato de sódio, 1 mM de nitroprussiato de sódio e > 500 UI de urease). Esta mistura foi incubada durante 5 minutos a 37 °C. Posteriormente, foram adicionados 150 μL do reagente B (hipoclorito de sódio 10 mM e hidróxido de sódio 150 mM) e a mistura foi incubada a 37 °C durante 5 minutos. A absorvância foi medida a 600 nm em espectrofotômetro de microplaca (Epoch™ 2, BioTek Instruments, Inc.).

O sistema foi previamente testado com a molécula quercetina como controle positivo. O controle negativo contendo apenas o solvente DMSO e o controle positivo foram testados nas mesmas condições que as unidades experimentais. Para cada inibidor foram realizados dois experimentos independentes em triplicata.

Foram considerados inibidores da ARG-LA os compostos que apresentaram uma inibição superior ou igual a 70%, e compostos inativos, os que apresentaram uma inibição igual ou inferior a 10%, a uma concentração de 100 μM do inibidor.

8.4 Determinação da IC_{50}

A concentração que inibe 50% da atividade catalítica da enzima (IC_{50}) foi determinada variando as concentrações do inibidor por diluição seriada em água (fator de diluição de 1:4). Dois experimentos em triplicata foram realizados para se obter um coeficiente de regressão não linear $R^2 \geq 0,95$. A reação foi realizada em pH 9,5 usando 50 mM de tampão CHES na presença de 50 mM do substrato L-arginina. As unidades experimentais foram incubadas a 37 °C por 15 minutos e a formação de uréia foi determinada como previamente descrito para a triagem dos compostos ativos. Para a determinação da IC_{50} , usou-se o modelo curva dose-

resposta de quatro parâmetros-4PL (equação 1), no programa GraphPad-Prism 6.0, San Diego, CA, USA.

$$Y = \text{Inferior} + (\text{Superior} - \text{Inferior}) / (1 + 10^{((\text{LogIC}_{50} - X) * \text{Inclinação}))} \quad (1)$$

8.5 Determinação da cinética e mecanismo de inibição

As reações para determinação do mecanismo de inibição e constante de inibição para formação do complexo enzima-inibidor (K_i) ou enzima-inibidor-substrato (K_{is}) foram realizadas variando simultaneamente as concentrações dos inibidores e do substrato.

O experimento foi realizado em tampão CHES, pH 9,5, contendo concentrações variadas do substrato L-arginina (25, 50 e 100 mM), pH 9,5. Foram utilizadas três concentrações do inibidor próximas do valor da IC_{50} . As diferentes concentrações do substrato assim como do inibidor foram obtidas por diluição seriada (fator de diluição de 1:2).

A reação foi realizada durante 15 min a 37 °C e a formação de uréia foi determinada pelo método enzimático colorimétrico de Berthelot (FAWCETT; SCOTT, 1960) como foi anteriormente descrito. As reações foram realizadas em triplicata em dois experimentos independentes.

Os dados foram usados para obter os valores de K_i e K_{is} , assim como os gráficos de Dixon ($[i] \times 1/V$) e Cornish-Bowden ($[i] \times [S]/V$) (CORNISH-BOWDEN, 1974) por meio de regressão linear no programa Microsoft Excel 2016.

8.6 Análise de dados de cinética de inibição enzimática

Os dados de velocidade relativa na presença do inibidor foram utilizados para a construção das curvas do inverso da velocidade em função da concentração de inibidor (DIXON, 1953). A constante K_i foi determinada para os inibidores que apresentaram mecanismo de inibição competitiva e inibição mista e a constante K_{is} para os inibidores que apresentaram mecanismo de inibição incompetitiva e inibição mista (CORNISH-BOWDEN, 1974).

O cálculo das constantes K_i e K_{is} para inibidores não competitivos ($K_i = K_{is}$) foi feito utilizando as equações das retas obtidas por regressão linear. Foram encontrados os pontos de

intersecção das curvas igualando as equações duas a duas, considerado $y = 0$ para encontrar o valor de K_i e K_{is} . Porque $x = i$, $K_i = -x$ (gráfico de Dixon), $K_{is} = -x$ (Cornish-Bowden), as equações usadas para calcular as constantes de dissociação K (K_i ou K_{is}) foram similares; ambos usam "a" (o coeficiente angular) e "b" (o coeficiente linear) de duas linhas retas distintas, como indica a equação (2) (REIS et al., 2013). Os valores das constantes e o desenho gráfico foram determinados usando o programa Microsoft Excel 2016.

$$K = \frac{b(1) - b(2)}{a(2) - a(1)} \quad (2)$$

Onde $b(1)$ e $b(2)$ são os coeficientes lineares e $a(1)$ e $a(2)$ são os coeficientes angulares, respectivamente das retas 1 e 2.

8.7 Análise estatística

A avaliação da concentração que inibe 50% da atividade da ARG-LA foi realizada usando a análise de variância (ANOVA), seguida do teste de Tukey para comparação das médias. Todas as análises foram feitas no programa GraphPad Prism 6.0 para Windows (GraphPad Software, São Diego, California, USA). A diferenças entre as médias foram consideradas significativas a um nível $p < 0,05$.

9 RESULTADOS

9.1 Triagem dos inibidores da ARG-LA

Um total de setenta e oito (78) compostos foram testados quanto a sua potencialidade inibitória sobre a arginase recombinante de *Leishmania (L.) amazonensis* (ARG-LA). Foram considerados inibidores da enzima, os compostos que no processo de triagem inibiram cerca de 70% da enzima a uma concentração de 100 μ M. A estes, procedeu-se a determinação da concentração que inibe 50% da atividade enzimática (IC_{50}), mecanismo de inibição e das constantes de inibição K_i e K_{is} . Os compostos que apresentaram uma inibição da enzima igual ou inferior a 10%, foram considerados inativos.

Os resultados revelaram vinte e dois (22) compostos ativos, o que corresponde a 28,2 % de compostos inibidores da ARG-LA. Os grupos de compostos que apresentaram melhor atividade inibitória sobre enzima foram: dez (10) cinamidas derivados do ácido caféico, seis (6) compostos biossintéticos (dos quais 5 são ésteres e 1 cinamida); quatro (4) compostos naturais e dois (2) compostos da série pirazolopirimidina (1-fenil-1*H*-pirazolo[3,4-*d*]pirimidina) (PLTS). A Figura 17 apresenta de forma esquemática o resultado da avaliação dos compostos quanto a sua capacidade de inibição da ARG-LA.

Figura 17 - Representação esquemática da triagem de potenciais inibidores da ARG-LA.

Fonte: Própria autoria.

9.2 Cinética de inibição da arginase de *Leishmania (L.) amazonensis* (ARG-LA) por compostos produzidos via engenharia de síntese em *Echerichia coli* (compostos biosintéticos)

Vinte (20) moléculas biosintéticas produzidas por engenharia de síntese em *E. coli*, foram avaliadas quanto a sua capacidade de inibição da ARG-LA. Estes compostos foram agrupados de acordo com sua função química em ésteres, cinamidas, glicosídeos e xantona.

9.2.1 Ésteres

Os ésteres (8 compostos) apresentaram valores da IC_{50} que variaram de $1,9 \pm 0,7 \mu M$ (composto 5) a $36,2 \pm 6 \mu M$ (composto 8). O composto 6 apresentou um valor de IC_{50} superior a $200 \mu M$, e os compostos 2 e 7 foram inativos na inibição da ARG-LA (Tabela 3).

A Figura 18 mostra curvas logdose-resposta, usadas para determinar a IC_{50} em três concentrações diferentes do substrato (25, 50 e 100 mM). Não foram observadas diferenças significativas entre elas ($p > 0.05$), indicando um mecanismo de inibição não competitivo dos compostos. Os compostos apresentaram uma média de 80% de inibição da enzima.

Estudos da cinética enzimática foram usados para confirmar o mecanismo de inibição e determinar as constantes de associação enzima-inibidor (K_i) para os compostos ativos (Figura 19). As constantes de inibição K_i e K_{is} referentes ao equilíbrio entre a enzima (E) e substrato (S) na presença do inibidor (I) foram determinadas (Tabela 3).

Com a exceção do composto 5 que apresentou um mecanismo de inibição misto com valores de K_i ($2,0 \pm 0,6 \mu M$) e K_{is} ($6,9 \pm 1,4 \mu M$), os outros compostos ativos desta série (compostos 1, 3, 4 e 8) mostraram ser inibidores não competitivos ($K_i = K_{is}$) da ARG-LA, o que sugere a afinidade destes compostos para ambos complexos EI e ESI.

9.2.2 Cinamidas

Nesta série foram agrupadas seis (6) compostos biosintéticos que apresentam em comum a função amida ($R-CO-NH-R'$). Destaca-se nesta série o composto 12 (Figuras 18 e 19) que apresentou um mecanismo de inibição competitivo ($K_i = 4,6 \pm 1,7 \mu M$), e valor de

$IC_{50} = 5,5 \pm 0,5 \mu M$. Os outros compostos desta série (compostos 9, 10, 11, 13 e 14) foram inativos na inibição da ARG-LA quando testados a uma concentração de 500 μM (Tabela 4).

9.2.3 Glicosídeos e xantona

O potencial inibidor da xantona biosintética e dos compostos fenólicos glicosilados foi determinado a 500 e 1000 μM respectivamente de acordo com a solubilidade dos mesmos. Os potenciais inibidores da ARG-LA foram: composto 18 (honokiol glicosídeo) com 94,8% de inibição a 1000 μM , e o composto 20 (xantona) com 46,4% de atividade inibitória a 500 μM . Os glicosídeos 17 e 19 inibiram 35,8% e 38,5% da enzima, respectivamente, enquanto que os compostos 15 e 16 foram inativos (Tabela 5). O composto 18 inibiu aproximadamente 50% da atividade de ARG-LA a 500 μM e a inibição diminui acentuadamente em concentrações mais baixas.

Figura 18 - Inibição da ARG-LA pelos compostos biosintéticos.

As concentrações do substrato L-arginina foram: 25 mM (▲), 50 mM (■) e 100 mM (●). Cada ponto representa a média de dois experimentos independentes realizados em triplicata. As barras de erro indicam o desvio padrão.
Fonte: Própria autoria

Figura 19 - Mecanismo de inibição de ARG-LA por compostos biosintéticos.

Gráficos de Dixon (A e C) e de Cornish-Bowden (B e D) foram usados para a determinar os valores das constantes K_i e K_{is} respectivamente. Compostos 1, 3, 4 e 8 são inibidores não competitivos ($K_i = K_{is}$), composto 5 é um inibidor misto ($K_i \neq K_{is}$) e o composto 12 é um inibidor competitivo ($K_i \ll K_{is}$) da ARG-LA. As concentrações de L-arginina foram de 25 mM ($\blacktriangle$), 50 mM ($\blacksquare$) e 100 mM ($\bullet$). Cada ponto representa a média de dois experimentos independentes realizados em triplicata. As barras de erro indicam o erro padrão da média.

Fonte: Própria autoria.

Tabela 3 - Inibição da arginase de *Leishmania (L.) amazonensis* por ésteres.

Composto	Estrutura PM (g/mol)	IC ₅₀ (μ M)*	Ki (μ M)** Mecanismo de inibição
Ácido Rosmarínico	 360,31	$2,1 \pm 0,3^a$	$1,8 \pm 0,3$ Competitivo#
1	 360,08	$3,5 \pm 0,3^a$	$7,7 \pm 0,3$ Não competitivo
2	 312,10	Inativo***	-
3	 330,11	$2,8 \pm 0,9^a$	$5,7 \pm 0,7$ Não competitivo
4	 362,10	$3,0 \pm 0,2^a$	$3,9 \pm 0,4$ Não competitivo
5	 346,11	$1,9 \pm 0,7^a$	$2,0 \pm 0,6$ Misto
6	 330,11	> 200	-
7	 314,12	Inativo***	-
8	 296,05	36 ± 6^b	$73,5 \pm 7,8$ Não competitivo

*Resultados da IC₅₀ apresentados como média $\pm$ erro padrão da média. **Valores de Ki apresentados como média $\pm$ desvio padrão. *** inativo: compostos que apresentam uma inibição da ARG-LA $\leq 10\%$ testados a 1000 μ M. ^{a, b} letras diferentes na mesma coluna diferem significativamente ($p < 0.05$) pelo teste de Tukey. # Inibidor de referência (SILVA et al, 2018).

Fonte: Própria autoria.

Tabela 4 - Inibição da arginase de *Leishmania (L.) amazonensis* por cinamidas.

Composto	Estrutura PM (g/mol)	IC ₅₀ (μM)*	Ki (μM)** Mecanismo de inibição
9	 297,10	Inativo***	-
10	 317,05	Inativo***	-
11	 319,07	Inativo***	-
12	 335,06	5,5 ± 0,5	4,6 ± 1,7 Competitivo
13	 321,08	Inativo***	-
14	 319,06	Inativo***	-

*Resultados da IC₅₀ apresentados como média ± erro padrão da média. ** Valor de Ki apresentado como média ± desvio padrão. *** Inativo: compostos que apresentam uma inibição da ARG-LA ≤ 10% testado a 500 μM.
Fonte: Própria autoria.

Tabela 5 - Inibição da arginase de *Leishmania (L.) amazonensis* por glicosídeos e xantona.

Composto	Estrutura PM (g/mol)	Inibição da ARG-LA (%)*
15	 300,12	Inativo**
16	 286,11	Inativo**
17	 300,12	35,8 ± 1,3
18	 428,18	94,8 ± 1,3
19	 590,24	38,5 ± 4,5
20	 288,06	46,4 ± 5,4***

*Resultados do potencial de inibição da ARG-LA apresentados como média ± erro padrão da média.

** Inativo: compostos que apresentam uma inibição da ARG-LA ≤ 10% testado a 1000 µM. ***Xantona testada a 500 µM.

Fonte: Própria autoria.

9.3 Cinética de inibição da ARG-LA por cinamidas derivados do ácido cafeico

Uma série de dez cinamidas derivadas do ácido cafeico foi testada como inibidores da ARG-LA. Os valores de IC_{50} , as constantes de dissociação da enzima (K_i e K_{is}) e o mecanismo de inibição foram determinados para avaliar o potencial inibidor dos compostos sobre a ARG-LA, conforme resultados apresentados nas Figuras 20 e 21.

Os compostos 7, 3, 6 e 5 apresentam os melhores valores de IC_{50} , segundo a ordem apresentada; contudo, estes não diferiram significativamente ($p < 0,005$) dos compostos 1, 2, 4 e 9. Os compostos 8 e 10 foram os que apresentaram menor potencial de inibição da enzima dentro desta série.

A análise da cinética de inibição mostrou que os compostos apresentaram diferentes comportamentos na inibição da ARG-LA. Os resultados indicaram os compostos 1, 2, 5, 6 e 8 como inibidores competitivos; compostos 7, 9 e 10, inibidores mistos; composto 3, inibidor incompetitivo e composto 4 como inibidor não competitivo da ARG-LA. Estes resultados estão sumarizados na Tabela 6.

Figura 20 - Inibição da ARG-LA por cinamidas derivados do ácido cafeico.

As concentrações do substrato L-arginina foram: 25 mM ($\blacktriangle$), 50 mM ($\blacksquare$) e 100 mM ($\bullet$). Cada ponto representa a média de dois experimentos independentes realizados em triplicata. As barras de erro indicam o desvio padrão.
Fonte: Própria autoria.

Figura 21 - Mecanismo de inibição de ARG-LA por cinamidas derivadas do ácido cafeico.

Gráficos de Dixon (A e C) e de Cornish-Bowden (B e D) foram usados para a determinar os valores das constantes K_i e K_{is} respectivamente. Os compostos 1, 2, 5, 6 e 8 são inibidores competitivos ($K_i \lll K_{is}$); compostos 7, 9 e 10 inibidores mistos ($K_i \neq K_{is}$); composto 3 inibidor incompetitivo ($K_i \ggg K_{is}$) e composto 4 inibidor não competitivo ($K_i = K_{is}$) da ARG-LA. As concentrações de L-arginina foram de 25 mM (■), 50 mM (▲) e 100 mM (●). Os dados representam a média de três experimentos realizados em duplicata. As barras de erro indicam o desvio padrão da média.

Fonte: Própria autoria.

Tabela 6 - Inibição da ARG-LA por cinamidas derivados do ácido cafeico.

Composto						IC ₅₀ (μM)*	K _i (μM)*	K _{is} (μM)**	Mecanismo
	R1	R2	R3	R4	R5				
1	OH	OH	H	H	H	6,9 ± 0,7 ^{b, c}	3,9 ± 1,0	-	Competitivo
2	OH	OH	H	OH	H	5,6 ± 0,4 ^{b, c}	4,4 ± 1,1	-	Competitivo
3	OH	OH	H	OH	OH	1,8 ± 0,1 ^c	-	2,5 ± 0,2	Incompetitivo
4	OCH ₃	OH	H	OH	OH	6,5 ± 1,4 ^{b, c}	9,6 ± 0,7	9,6 ± 0,7	Não competitivo
5	H	OH	H	OH	OH	2,5 ± 0,2 ^c	1,6 ± 0,2	-	Competitivo
6	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	OH	OH	2,4 ± 0,9 ^c	1,2 ± 0,3	-	Competitivo
7	H	H	H	OH	OH	1,3 ± 0,1 ^c	1,4 ± 0,2	5,1 ± 1,0	Misto
8						17,8 ± 3,2 ^a	11,4 ± 0,7	-	Competitivo
9						4,2 ± 1,1 ^{b, c}	3,9 ± 0,4	26,5 ± 7,5	Misto
10						9,3 ± 1,2 ^b	6,6 ± 0,3	27,9 ± 3,9	Misto

*Resultados da IC₅₀ apresentados como média ± erro padrão da média. **Valores de K_i e K_{is} apresentados como média ± desvio padrão. Os dados representam a média de dois experimentos realizados em triplicata. ^{a, b, c} Médias seguidas com mesma letra na mesma coluna não diferem significativamente (p > 0,05) pelo teste de Tukey.

Fonte: Própria autoria.

9.4 Cinética de inibição da ARG-LA por compostos da série pirazolopirimidina (PLTS)

Na tentativa de produzir inibidores de arginase, seis derivados de 1-fenil-1H-pirazolo [3,4-d] pirimidina com diferentes substituintes na posição 4 do grupo fenil foram sintetizados. Todos os compostos foram testados na inibição da ARG-LA a 100 μM , mostrando uma atividade inibitória que varia de 36 a 74% (Tabela 7). Dois compostos 1 ($R = \text{H}$) e 2 ($R = \text{CF}_3$) mostraram inibição da ARG-LA maior que 70% e valores IC_{50} de $11,2 \pm 2,2 \mu\text{M}$ e $53,6 \pm 11,8 \mu\text{M}$, respectivamente (Figura 22). Assim, a cinética de inibição de ARG-LA foi realizada para 1 e 2 (Figura 23), e revelou que esses compostos inibem a enzima por mecanismo incompetitivo, mostrando valores da constante de dissociação (K_{is}) de $8,5 \pm 0,9 \mu\text{M}$ e $28,9 \pm 5,3 \mu\text{M}$, respectivamente.

Figura 22 - Inibição da ARG-LA por pirazolopirimidinas.

As concentrações do substrato L-arginina foram: 25 mM (■), 50 mM (▲) e 100 mM (●). Cada ponto representa a média de três experimentos independentes realizados em duplicata. As barras de erro indicam o desvio padrão. Fonte: Própria autoria.

Figura 23 - Cinética de inibição da ARG-LA por pirazolopirimidina.

O mecanismo de inibição foi determinado por análise dos gráficos de Dixon (A) e Cornish-Bowden (B). A constante K_{is} foi determinada através do gráfico de Cornish-Bowden (B). As concentrações de L-arginina usadas foram de: 25 mM (■), 50 mM (▲) e 100 mM (●). A concentração dos inibidores foram de 6, 12 e 24 μM para o composto **1** e de 27, 54 e 108 μM para o composto **2**. Cada ponto representa a média de três experimentos independentes realizados em duplicata. As barras de erro indicam o desvio da média.

Fonte: Própria autoria.

Tabela 7 - Inibição da ARG-LA por pirazolopirimidinas.

Composto	R	Inibição da Arginase de <i>L. (L.) amazonensis</i>			
		(%) (100 μ M)	IC ₅₀ (μ M)*	Kis (μ M)**	Mecanismo
(1) PLTS-4001-16	-H	74,3 $\pm$ 1,4	11,2 $\pm$ 2,2	8,5 $\pm$ 0,9	Incompetitivo
(2) PLTS-T-4001-16R2	CF3	73,8 $\pm$ 7,5	53,6 $\pm$ 11,8	28,9 $\pm$ 5,3	Incompetitivo
(3) PLTS-C-4002-16	-CN	59,8	~100	nd ***	Nd
(4) PLTC-L-4001-17-R	-Cl	46,0	>100	nd	Nd
(5) PLTS-M-4001-17-R	CH3	42,2	>100	nd	Nd
(6) PLTS-F-4001-16-R	-F	36,4	>100	nd	Nd

*Resultados da IC₅₀ apresentados como média $\pm$ erro padrão da média e **valores de Kis como média $\pm$ desvio padrão. *** nd: cinética de inibição não determinado. Os dados representam a média de dois experimentos realizados em triplicata.

Fonte: Própria autoria.

9.5 Cinética de inibição da ARG-LA pela série de compostos Triazolopirimidona (PLLP), Tiouréias (PLTU) e derivados de Benzonidazol e Megazol (PAMG)

A análise do potencial de inibição da ARG-LA por dezessete (17) compostos da série das triazolopirimidona (PLLP) (Apêndice B), seis (6) compostos da série das tiouréias (PLTU) (Apêndice C) e quinze (15) compostos derivados de benzonidazol e megazol (PAMG), demonstrou que estes são ineficazes na inibição da ARG-LA, com valores inferiores a 10% de inibição enzimática na concentração de 500 μM e/ou 200 μM .

9.6 Cinética de inibição da ARG-LA pelos compostos naturais Piceatannol e Ácidos Salvianólico A, B e D

Os resultados da cinética de inibição da ARG-LA por compostos naturais estão representados graficamente (Figura 24). A Tabela 8 apresenta os resultados da inibição da ARG-LA pelos compostos naturais. O composto ácido salvianólico B foi o mais potente da série, apresentando valores de $\text{IC}_{50} = 0,5 \pm 0,03 \mu\text{M}$ e uma inibição não competitiva ($K_i = 0,7 \pm 0,08 \mu\text{M}$).

Os valores das constantes de inibição (K_i) para piceatannol, ácido salvianólico A e D, foram de 1,6 μM , indicando uma afinidade similar destes compostos para a enzima independente do mecanismo de ação.

Figura 24 - Mecanismo de inibição da ARG-LA pelos compostos naturais.

Gráficos de Dixon (A) e de Cornish-Bowden (B) foram usados para a determinar os valores das constantes K_i e K_{is} dos compostos naturais. Compostos ácido salvianólico A e B são inibidores competitivos, Piceatannol e ácido salvianólico D são inibidores misto da ARG-LA. As concentrações de L-arginina foram de 100 mM (●), 50 mM (▲) e 25 mM (■). Cada ponto representa a média de três experimentos realizados em duplicata. As barras de erro indicam o desvio da média.

Fonte: Própria autoria.

Tabela 8 - Inibição da ARG-LA por compostos naturais.

Composto	Estrutura PM (g/mol)	IC ₅₀ (μ M)*	K _i (μ M)**	K _{is} (μ M)**	Mecanismo
Piceatannol	 244.24	1,7 $\pm$ 0,4	1,6 $\pm$ 0,02	3,8 $\pm$ 0,5	Misto
Ácido Salvianólico A	 494.46	1,3 $\pm$ 0,1	1,6 $\pm$ 0,4	1,6 $\pm$ 0,4	Não competitivo
Ácido Salvianólico B	 718.63	0,5 $\pm$ 0,03	0,7 $\pm$ 0,08	0,7 $\pm$ 0,08	Não competitivo
Ácido Salvianólico D	 418.36	1,3 $\pm$ 0,1	1,6 $\pm$ 0,3	3,8 $\pm$ 0,07	Misto

*Resultados da IC₅₀ apresentados como média $\pm$ erro padrão da média. **Valores de K_i e K_{is} apresentados como média $\pm$ desvio padrão. Os dados representam a média de três experimentos realizados em duplicata.

Fonte: Própria autoria.

9.7 Relação estrutura-atividade dos ésteres biosintéticos e cinamidas derivados do ácido caféico

A atividade inibitória da ARG-LA foi avaliada pelos compostos da série ésteres, compostos estruturalmente relacionados com o ácido rosmarínico. Os ésteres ativos 1, 3, 4, 5 e 8 (Tabela 3) apresentam pelo menos um grupo catecol na sua estrutura.

Da análise dos ésteres ativos contra a ARG-LA, destaca-se que o radical catecol é fundamental para a inibição da enzima, e é independente da ligação dupla presente na porção cafeoil (3,4 dihidroxi-cinamica) (Figura 25). Em compostos onde o grupo catecol foi substituído pelo radical fenil (compostos 2, 6 e 7, Tabela 3) a inibição da enzima decresceu pelo menos 100 vezes (composto 5 vs composto 6) ou resultou em compostos inativos (compostos 2 e 7). Por outro lado, na porção 3,4 dihidroxifenil ácida, a substituição do radical catecol por radicais benzil (composto 3), fenil (composto 5), não alterou a inibição da enzima, contudo a substituição por um radical carboxil (composto 8) reduziu consideravelmente a atividade enzimática.

Os derivados cinamidas do ácido caféico apresentaram diferentes potenciais de inibição da ARG-LA (Tabela 6). O composto 1 ((E) -N- (2-feniletil) -3,4-di-hidroxicinamida) igualmente denominado fenilamida de ácido caféico (CAPA) foi tido como a estrutura básica para esta série de inibidores a partir do qual outros compostos foram sintetizados.

A relação estrutura-atividade das cinamidas (Figura 25) demonstrou que de igual forma ao que ocorre com os ésteres biosintéticos, o radical catecol é imprescindível para inibição da enzima. A presença de mais de um grupo catecol na molécula contribui consideravelmente para o aumento da atividade dos compostos (compostos 1 e 2 vs composto 3). A metilação de um ou mais grupos hidroxila da função catecol não altera a capacidade inibitória dos compostos (compostos 4 e 6 vs composto 7). A retirada da ligação dupla do esqueleto (redução da cadeia carbônica) da molécula reduz consideravelmente (3 vezes) a atividade do composto sobre a atividade da enzima (composto 2 vs composto 8), assim como a substituição do grupo aromático no fragmento fenetilamina da molécula pelo radical sulfidrilato reduz consideravelmente (5 vezes) a atividade inibitória dos compostos sobre a ARG-LA (composto 3 vs composto 10); contudo, a incorporação do radical metilcarboxilato (composto 9) na porção fenetilamina da molécula não altera a atividade inibitória.

Os ésteres biosintéticos e os derivados cinamidas do ácido cafeico foram os compostos que apresentaram melhores resultados de inibição da ARG-LA. Uma análise conjunta das

estruturas das duas séries mostra que a presença do grupo catecol é o fator determinante para atividade inibitória das moléculas sobre a enzima, sendo pouco relevante se o composto em questão é uma cinamida ou um éster (Figura 25).

Figura 24 - Comparação da relação estrutura-atividade dos compostos ésteres biosintéticos e derivados de cinamidas, inibidores ativos da ARG-LA.

Retirando das estruturas as funções éster (verde) e amida (rosa), os esqueletos de carbono entre estes dois grupos de compostos são similares. A presença do grupo farmacofórico catecol (Azul) é determinante para atividade do composto na inibição da ARG-LA independentemente da função química presente.

Fonte: Própria autoria.

10 DISCUSSÃO

A leishmaniose é a segunda doença tropical negligenciada com elevados índices de morbidade e mortalidade (KEVRIC; CAPPEL; KEELING, 2015). A gravidade da doença está associada à espécie infecciosa e ao estado de defesa do hospedeiro (SAVOIA, 2015). O tratamento para as leishmanioses é limitado pela eficácia, toxicidade e resistência aos medicamentos que são usados para o tratamento da enfermidade, com ênfase para os antimoniais pentavalentes (MOORE; LOCKWOOD, 2010).

A presente pesquisa apresentou resultados da prospecção de 78 moléculas de variados grupos químicos, na inibição da arginase recombinante de *Leishmania (L.) amazonensis* (ARG-LA). Os resultados indicaram que 28,2% dos compostos testados são ativos na inibição da enzima (Figura 17), apresentando valores de IC₅₀ abaixo de 10 µM aceitos pela Organização Mundial da Saúde (OMS). A seleção de moléculas que apresentaram o grupo catecol na sua constituição (compostos biosintéticos e cinamidas derivados do ácido cafeico) foi fundamental na identificação de moléculas ativas na inibição da ARG-LA. Alguns compostos da série pirazolopirimidinas (PLTS) que apresentam o grupo tiosemicarbazida destacaram-se na inibição da ARG-LA, porém; outros compostos da série das triazolopirimidonas (PLLP), tioureias (PLTU), derivados de benzonidazol e megazol (PAMG) foram testados e revelaram-se incapazes de inibir a ARG-LA.

Os compostos biosintéticos foram produzidos em *E. coli* por conjugação de diferentes moléculas doadoras e receptoras que apresentavam em comum grupos hidroxilas e catecol na sua constituição (HE et al., 2017; JIANG et al., 2016; ZHUANG et al., 2016).

Os ésteres biosintéticos (compostos 1 a 8, Tabela 3) foram inéditos na inibição da ARG-LA, e apresentaram maior capacidade inibitória da ARG-LA quando comparados com outros grupos químicos de compostos biosintéticos (glicosídeos e xantona), uma vez que não são estruturalmente relacionados com os ésteres e não apresentaram o grupo catecol na sua estrutura. Os valores de IC₅₀ para os ésteres variaram de $1,9 \pm 0,7$ µM (composto 5) a 36 ± 6 µM (composto 8) e não apresentaram diferenças significativas entre si ($p > 0,05$) com exceção do composto 8 ($p < 0,001$). A análise da cinética de inibição revelou que, excetuando-se o composto 5 que apresentou inibição mista ($K_i = 2,0 \pm 0,6$ µM), todos os ésteres apresentaram inibição não competitiva da ARG-LA, indicando afinidade tanto para a enzima livre (E) como para a enzima complexada ao substrato (ES). Os compostos que não possuem o grupo catecol (compostos 2 e 7) foram inativos, ou apresentaram um fraco potencial inibitório da enzima

(composto 6), o que confirma a relevância do grupo catecol para inibição da enzima. A importância do catecol na inibição da ARG-LA já foi demonstrado em estudos feitos em vários compostos naturais (MANJOLIN et al., 2013; REIS et al., 2013; SILVA; MAQUIAVELI; MAGALHÃES, 2012), e que a ausência deste diminui drasticamente a capacidade inibitória dos compostos (MANJOLIN et al., 2013). O estudo das cinamidas biosintéticas (Tabela 4), revelou o composto 12, como única molécula ativa na inibição da ARG-LA ($IC_{50} = 5,5 \pm 0,5 \mu M$), apresentando-se como um inibidor competitivo da enzima ($K_i = 4,6 \pm 1,7 \mu M$); este composto apresenta na sua estrutura o grupo farmacofórico (catecol) para ARG-LA, ao invés do grupo fenil como os restantes compostos da série. Os compostos glicosídicos e xantona (Tabela 5) apresentaram um baixo potencial de inibição da ARG-LA, sendo os compostos 18 e 20 os mais ativos com 94 e 46% de inibição da enzima, quando testados a uma concentração de 1000 e 500 μM respectivamente. A nova abordagem de produção de compostos em *E. coli* revelou ser promissora para síntese de moléculas ativas na inibição da ARG-LA, o que sugere a possibilidade de planejar a síntese de novos compostos de variada natureza química que sejam ativos na inibição da enzima alimentando as culturas de *E. coli* com moléculas doadoras e receptoras que tenham o grupo catecol na sua estrutura, servindo como uma ferramenta para uma biosíntese dirigida de compostos com atividade biológica.

As cinamidas derivadas do ácido cafeico (Tabela 6) revelaram ser potentes inibidores da ARG-LA, e embora apresentassem uma estrutura similar entre si, estes compostos apresentaram diferentes mecanismos de inibição enzimática. O composto 7 foi o mais potente da série ($IC_{50} = 1,3 \pm 0,1 \mu M$), e um inibidor misto da ARG-LA ($K_i = 1,4 \pm 0,2 \mu M$; $K_{is} = 5,1 \pm 1,0 \mu M$). A análise estatística mostrou que os valores da IC_{50} foram similares entre o composto 7 e os demais compostos da série, apresentando diferenças significativas ($p < 0,05$) apenas para os compostos 10 ($IC_{50} = 9,3 \pm 1,2 \mu M$) e 8 ($IC_{50} = 17,8 \pm 3,2 \mu M$), os menos potentes da série. As cinamidas apresentadas no presente trabalho foram previamente avaliadas na inibição *in vitro* da arginase bovina (ARG-b) e arginase humana (ARG-h) em trabalhos recentes (PHAM et al., 2016). Os resultados descreveram que estes compostos tem capacidade de inibir a arginase de mamíferos, pois 11 de um total de 19 moléculas estudadas tiveram potencial de inibição da ARG-b acima de 50% quando testadas a 100 μM . Os resultados da cinética de inibição revelaram que apenas o composto CAPA ((E)-N-(2-feniletil)-3,4-dihidroxicinamida) foi ativo na inibição da ARG-b com valores de $IC_{50} = 6,9 \pm 1,3 \mu M$, e um mecanismo de inibição competitiva ($K_i = 5,5 \pm 1,0 \mu M$). Porém, quando testado na inibição da ARG-h, o composto CAPA foi um inibidor relativamente fraco ($IC_{50} = 60,3 \pm 7,8 \mu M$) (PHAM et al., 2016). A molécula CAPA foi testada na inibição da ARG-LA

(Composto 1, Tabela 6), e os resultados de potencia de inibição ($IC_{50} = 6,9 \pm 0,7 \mu M$) e modelo de inibição (competitivo) foram similares para inibição da ARG-b e ARG-L; contudo, este composto teve maior afinidade com a enzima do parasita ($K_i = 3,9 \pm 1,0 \mu M$), apresentando um índice de seletividade estimado ($IC_{50}\text{-ARG-h} / IC_{50} \text{ ARG-LA}$) maior que 8, denotando que estes compostos são mais ativos na inibição da enzima do parasito e menos efetivos na inibição da enzima dos mamíferos, pelo que podemos considerar como sendo moléculas seguras para o planejamento de fármacos efetivos para o tratamento da leishmaniose.

O estudo da relação estrutura atividade de ésteres e cinamidas ativas na inibição da ARG-LA (Figura 25) mostrou que a inibição enzimática por estes depende da presença do grupo farmacofórico (catecol) na molécula, independentemente de este ser um éster ou uma amida. Uma análise do potencial de inibição da enzima (IC_{50}) pelos ésteres (Tabela 3) e amidas (Tabela 6), mostrou um certo grau de similaridade de potencial de inibição entre os mesmos na inibição da ARG-LA, desde que o grupo farmacofórico esteja presente. De fato, estudos recentes realizados com ácidos hidroxicinâmicos (ácido caféico, ácido rosmarínico e ácido clorogênico) precursores de síntese dos ésteres e amidas analisados, mostraram atividade inibitória competitiva sobre ARG-LA. O ácido cafeico teve a menor constante de dissociação ($K_i = 0,5 \pm 0,1 \mu M$), seguida pelo ácido rosmarínico ($K_i = 1,8 \pm 0,3 \mu M$) e ácido clorogênico ($K_i = 5 \pm 1 \mu M$) (SILVA et al., 2018). Estes compostos são entre outros, os maiores constituintes fenólicos de *Pluchea carolinensis* uma espécie utilizada na etnomedicina cubana para tratamento de infecções da pele (GARCÍA et al., 2012). Estudos com extratos de diferentes espécies de *Pluchea* (GARCÍA et al., 2011) e compostos puros de *P. carolinensis* mostraram atividade anti-leishmania, e inibiram o crescimento de promastigotas ($IC_{50} = 0,2 - 0,9 \mu g/mL$) e amastigotas intracelulares ($IC_{50} = 1,7 - 2,9 \mu g/mL$), e os ácidos rosmarínico e cafeico controlaram o desenvolvimento do tamanho da lesão e a carga parasitária de camundongos BALB/c experimentalmente infectados com *L. amazonensis* (MONTRIEUX et al., 2014).

Os compostos da série pirazolopirimidinas (1-fenil-1*H*-pirazolo[3,4-*d*]pirimidina), contendo tiosemicarbazida como grupo farmacofórico foram sintetizados com diferentes substituintes na posição 4 da subunidade fenilo, e avaliamos sua capacidade de inibição contra ARG-LA. O composto 1 ($R = H$) ($IC_{50} = 11,2 \pm 2,2 \mu M$) foi 4,8 vezes mais potente que o composto 2 ($R_1 = CF_3$) ($IC_{50} = 53,6 \pm 11,8 \mu M$), e a caracterização da cinética de inibição da ARG-LA indicou que estes são inibidores incompetitivos da enzima, apresentando valores da constante de inibição (K_i s) estimados em $8,5 \pm 0,9 \mu M$ e $28,9 \pm 5,3 \mu M$ para os compostos 1 e

2, respectivamente, o que indica afinidade destas moléculas pelo complexo enzima-substrato (ES). De princípio, os compostos da série PLTS foram planejados para inibir a atividade de *Plasmodium falciparum* (SILVEIRA et al., 2015), dando seguimento aos trabalhos no qual outros compostos triazolopirimidinas com substituintes na posição 5- ([1,2,4] triazolo [1,5-a] pirimidina) apresentaram resultados excelentes de inibição *in vitro* contra *P. falciparum* (BOECHAT et al., 2012). Visto que a triazolo-pirimidina é o bioisostero da quinolina e a cloroquina; usada para o tratamento da malária, tem capacidade de inibir arginase (IYAMU; EKEKEZIE; WOODS, 2007), os compostos da série [1,2,4] triazolo [1,5-a] pirimidinas, foram testados contra a ARG-LA. O novo composto 2- (5-metil-2- (trifluorometil) - [1,2,4] triazolo [1,5- a] pirimidin-7-il) hidrazinacarbotoamida (protótipo V) contendo uma tiossemicarbazida como grupo farmacofórico foi o inibidor mais potente da ARG-LA, com um mecanismo de inibição não competitivo, e com $K_i = 17 \pm 1 \mu\text{M}$ e $\text{IC}_{50} = 16,5 \pm 0,5 \mu\text{M}$ (SILVA et al., 2015). Os dados da cinética mostraram que o composto 1 (R = H) apresentou 1,5 vezes mais potência que o protótipo V ($K_i = 17 \pm 1 \mu\text{M}$) contra ARG-LA. Este resultado sugere que o anel trocado, proposto neste trabalho, pode alterar o mecanismo de inibição da ARG-LA de não competitivo (protótipo V) para incompetitivo (compostos 1 e 2), onde o composto 1 (R = H) foi um inibidor mais potente do que o composto 2 (R = CF₃), apresentando valores menores de IC_{50} e K_i .

Os compostos da série triazolopirimidona (PLLP), tiouréias (PLTU) e derivados de benzonidazol e megazol (PAMG) não foram efetivos na inibição da ARG-LA, apresentando potencial de inibição da enzima inferiores a 10% quando testados a 200 e 500 μM . Vários estudos já elucidaram um uso eficiente de benzonidazol no combate a tripanosomatídeos causadores de doença de chagas (*T. Cruzi*) (FERREIRA, 1976; SILVA et al., 2010). O megazol foi largamente usado para o combate da tripanossomíase africana humana causada por *T. brucei* (BODA et al., 2004; ENANGA et al., 2003); contudo, devido a uma série de efeitos tóxicos que incluem mutagenicidade (FERREIRA; FERREIRA, 1986), citotoxicidade e genotoxicidade (POLI et al., 2002) e aberrações cromossômicas observados tanto *in vitro* como *in vivo* (NESSLANY et al., 2004), os trabalhos de desenvolvimento desta molécula fossem descontinuados. Trabalhos recentes identificaram derivados de tiouréias com potencial atividade anti-leishmania contra promastigotas e amastigotas de *L. amazonensis*; essas moléculas apresentaram baixa citotoxicidade em macrófagos de camundongos, indicando o potencial destes compostos como base para o estudo de novos compostos para o tratamento da leishmaniose (VIANA et al., 2017).

Os compostos naturais piceatannol, ácido salvianólico A, B e D foram potentes inibidores da ARG-LA, sendo que o ácido salvianólico B foi o composto mais potente da série ($IC_{50} = 0,50 \pm 0,03 \mu M$), seguido dos compostos ácido salvianólico A e D que apresentaram um semelhante potencial de inibição da enzima ($IC_{50} = 1,3 \pm 0,1 \mu M$), e finalmente o piceatannol apresentou um valor de IC_{50} de $1,7 \pm 0,4 \mu M$. A caracterização da cinética de inibição revelou que o piceatannol e ácido salvianólico D foram inibidores mistos, apresentando valores semelhantes para constantes de dissociação K_i ($1,6 \mu M$) e K_{is} ($3,8 \mu M$), enquanto que os compostos ácido salvianólico A e B foram inibidores não competitivos com $K_i = 1,6 \pm 0,4 \mu M$ e $0,7 \pm 0,08 \mu M$ respectivamente. O piceatannol (trans-3,4,3',5'-tetra hidroxil-estilbeno) é um análogo de resveratrol um polifenol que pode ser encontrado em frutos variados como maracujá, uvas e em vinho tinto (PIOTROWSKA; KUCINSKA; MURIAS, 2012); apresenta uma variedade de propriedades farmacológicas, que incluem propriedades antiinflamatórias, antioxidante, anticancerígenas, antidiabéticas, cardioprotetiva, para citar algumas (MOON et al., 2017). O estudo do efeito de piceatannol e outros polifenóis indicaram piceatannol como um inibidor competitivo da arginase bovina apresentando uma IC_{50} de $12,1 \mu M$, e os dados estruturais identificaram a importância da porção cafeoil (3,4-dihidroxicinamoil) e da função catecol na atividade inibitória dos compostos testados (BORDAGE et al., 2017). Em trabalhos realizados com análogos de trans-resveratrol (pterostilbeno, piceatannol, polidatina e oxiresveratrol) contra *L. amazonensis*, o piceatannol, apresentou atividade anti promastigota e anti amastigota com valores de IC_{50} de $65 \mu M$ e $45 \mu M$ respectivamente, também foi a única molécula que alterou o ciclo celular e o potencial da membrana mitocondrial do parasita, destacando-se entre os análogos testados como o candidato mais promissor para futuros estudos sobre o tratamento da leishmaniose (PASSOS et al., 2015). A análise dos resultados do presente estudo e do trabalho realizado por Passos e colaboradores (2015) indicam que os resultados da inibição da viabilidade das células do parasita possivelmente estejam relacionados com a inibição da enzima arginase, sendo necessário estudos que confirmem esta hipótese.

Os ácidos salvianólicos A, B e D são compostos bioativos polifenólicos extraídos de *Salvia spp*, uma planta abundantemente usada na medicina chinesa. Estes compostos apresentam uma variedade de propriedades farmacológicas, a destacar, atividade antioxidante, hepatoprotetora, cardioprotetora, hipoglicêmica, antihipertensivo e antitumoral (LI et al., 2013; WANG et al., 2019), bem como atividade antiprotozoária (MONTESINO; SCHMIDT, 2018). Resultados de estudos que avaliaram efeitos imunomoduladores e atividade antileishmanial *in vitro*, de vários compostos fenólicos, indicaram que os ácidos salvianólicos

K e L, e o éster metílico do ácido salvianólico I mostraram atividade antileishmanial contra amastigota intracelular em macrófagos RAW 264.7 (IC₅₀ 13 - 175 nM), e não apresentaram citotoxicidade contra as células hospedeiras; contudo não foram eficazes na inibição do crescimento de promastigotas de um painel de parasitas de *Leishmania* (*L. major*, *L. donovani*, *L. guyanensis* e *L. killicki*) (MONTESINO; SCHMIDT, 2018; RADTKE et al., 2003). Os resultados da inibição da ARG-LA pelos ácidos salvianólicos A, B e D revelaram uma grande potência de inibição destes compostos sobre a enzima do parasita; contudo, foram relativamente menores quando comparados com outros ácidos salvianólicos (K, L e I) que apresentaram ser potentes inibidores de formas celulares de outras espécies de *Leishmania* em escala nanomolar. Embora os estudos não tenham sido conduzidos sobre a arginase ou outro alvo específico do parasita, acreditamos que estes compostos interajam e inibam outros alvos terapêuticos importantes para a viabilidade da *Leishmania*.

Os resultados de inibição da ARG-LA pelos compostos sintéticos e naturais testados no presente trabalho realçam a importância dos grupos farmacofóricos catecol e tiosemicarbazida na atividade inibitória da enzima ARG-LA, indicando que os presentes compostos podem ser usados como base para síntese de fármacos ativos no combate da leishmaniose.

11 CONCLUSÃO

Um total de 22 compostos apresentaram atividade contra arginase recombinante de *L. amazonensis*, e destacou-se a importância da função catecol e tiosemicarbazida na atividade inibitória da enzima pelos compostos ativos.

Os ésteres e cinamidas biosintéticos foram inéditos na inibição da ARG-LA, caracterizando-se como inibidores não competitivos e apresentando valores de IC_{50} que variaram de $1,9 \pm 0,7 \mu M$ a $36 \pm 6 \mu M$.

Os compostos sintéticos da série pirazolopirimidinas (PLTS) foram inibidores incompetitivos da ARG-LA, e as cinamidas derivados do ácido cafeico inibiram a ARG-LA com valores de IC_{50} que variaram de $1,3 \pm 0,1 \mu M$ a $17,8 \pm 3,2 \mu M$.

Os compostos naturais piceatannol e ácidos salvianólicos A, B e D foram caracterizados como inibidores mistos e não competitivos com elevada afinidade para ARG-LA, apresentando valores de IC_{50} que variaram de $0,5 \pm 0,03 \mu M$ a $1,7 \pm 0,4 \mu M$.

A análise da relação estrutura-atividade sugere que os compostos ativos com a função amida e função éster apresentam o mesmo padrão na atividade inibitória da ARG-LA, desde que esteja presente o grupo farmacofórico.

Os compostos da série PLTU, PLLP e PAMG não inibiram a ARG-LA, pelo fato de não possuírem um grupo farmacofórico que possa ser explorado na inibição desta enzima.

12 PERSPECTIVAS

Avaliar os inibidores da ARG-LA em cultura de promastigotas e amastigotas intracelulares de *L. amazonensis*;

Testar a inibição da arginase nas duas formas do parasito através da suplementação do meio de cultura com L-ornitina;

Realizar a modelagem molecular por “docking” dos compostos ativos na inibição da ARG-L para planejamento e síntese de novos inibidores baseados nos inibidores da ARG-LA.

REFERÊNCIAS

- ABEBE, T. et al. Local increase of arginase activity in lesions of patients with cutaneous leishmaniasis in Ethiopia. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 6, n. 6, e1684, 2012.
- ABEBE, T. et al. Arginase activity - a marker of disease status in patients with visceral leishmaniasis in Ethiopia. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 7, n. 3, 2013.
- ALEXANDRINO-DE-OLIVEIRA, P. et al. HIV/AIDS-associated visceral leishmaniasis in patients from an endemic area in central-west Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 105, n. 5, p. 692–697, 2010.
- ALVAR, J. et al. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 7, n. 5, e35671, 2012.
- ASH, D. E. Structure and function of arginases. **The Journal of Nutrition**, Rockville, v. 134, n. 10. Suppl., p. 2765-2767, 2004.
- ASHBURN, T. T.; THOR, K. B. Drug repositioning: identifying and developing new uses for existing drugs. **Nature Reviews Drug Discovery**, London, v. 3, n. 8, p. 673–683, 2004.
- ASHFORD, R. W. The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v. 30, n. 12-13, p. 1269-1281, 2000.
- BALANÍA-FOUCE, R. et al. Role of trypanosomatid's arginase in polyamine biosynthesis and pathogenesis. **Molecular and Biochemical Parasitology**, Amsterdam, v. 181, n. 2, p. 85–93, 2012.
- BECK, B. et al. Assay operations for SAR support. In: SITTAMPALAN, G. S. **Assay guidance manual**. Bethesda: Eli Lilly & Company; National Center for Advancing Translational Sciences, 2004. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK91994/>>. Acesso em: 04 de abril de 2019.
- BENSON, T. J. et al. Rationally designed selective inhibitors of trypanothione reductase: phenothiazines and related tricyclics as lead structures. **The Biochemical Journal**, London, v. 286, Pt. 1, n. 1, p. 9–11, 1992.
- BERG, J. M.; TYMOCZKO, J. L.; STRYER, L. Vmax e Km podem ser determinadas por gráficos de dupla-recíproca. In: **Bioquímica**. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. p. 233.
- BERMAN, J. Recent developments in leishmaniasis: epidemiology, diagnosis, and treatment. **Current Infectious Disease Reports**, Athens, v. 7, n. 1, p. 33–38, 2005.
- BERNARDES, L. S. C.; ZANI, C. L.; CARVALHO, I. Trypanosomatidae diseases: from the current therapy to the efficacious role of trypanothione reductase in drug discovery. **Current**

Medicinal Chemistry, Amsterdam, v. 20, n. 21, p. 2673–2696, 2013.

BIRKHOLTZ, L.-M. et al. Polyamine homeostasis as a drug target in pathogenic protozoa: peculiarities and possibilities. **Biochemical Journal**, London, v. 438, Pt. 2, p. 229–244, 2011.

BLUM, J. et al. Treatment of cutaneous leishmaniasis among travellers. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, Oxford, v. 53, n. 2, p. 158–166, 2004.

BOCEDI, A. et al. Trypanothione efficiently intercepts nitric oxide as a harmless iron complex in trypanosomatid parasites. **The FASEB Journal**, Bethesda, v. 24, n. 4, p. 1035–1042, 2010.

BODA, C. et al. Plasma kinetics and efficacy of oral meglumine treatment in *Trypanosoma brucei* brucei-infected sheep. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 121, n. 3–4, p. 213–223, 2004.

BOECHAT, N. et al. New trifluoromethyl triazolopyrimidines as anti-plasmodium falciparum agents. **Molecules**, Basel, v. 17, n. 7, p. 8285–8302, 2012.

BORDAGE, S. et al. Investigation of mammal arginase inhibitory properties of natural ubiquitous polyphenols by using an optimized colorimetric microplate assay. **Planta Medica**, Stuttgart, v. 83, n. 7, p. 647–653, 2017.

CALDWELL, R. W. et al. Arginase: a multifaceted enzyme important in health and disease. **Physiological Reviews**, Bethesda, v. 98, n. 2, p. 641–665, 2018.

CARBALLEIRA, N. M. Recent developments in the antiprotozoal and anticancer activities of the 2-alkynoic fatty acids. **Chemistry and Physics of Lipids**, Limerick, v. 172–173, p. 58–66, 2013.

CASTILHO-MARTINS, E. A. et al. Axenic leishmania amazonensis promastigotes sense both the external and internal arginine pool distinctly regulating the two transporter-coding genes. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 6, n. 11, e27818, 2011.

CHAGAS, E. et al. Leishmaniose visceral americana: relatório dos trabalhos realizados pela comissão encarregada do estudo da leishmaniose visceral americana em 1937. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 33, n. 1, p. 89–229, 1938.

CHAPPUIS, F. et al. Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? **Nature Reviews Microbiology**, London, v. 5, n. 11, p. 873–882, 2007.

CHONG, C. R. Repurposing drugs for tropical diseases: case studies and open-source screening initiatives. In: BARRATT, M. J.; FRAIL, D. E. (Ed.). **Drug repositioning bringing new life to shelved assets and existing drugs**. Harvard: John Wiley, 2012. p. 347–373.

CHOWDHURY, S. et al. Novel betulin derivatives as antileishmanial agents with mode of action targeting type IB DNA topoisomerase. **Molecular Pharmacology**, Bethesda, v. 80, n. 4, p. 694–703, 2011.

CLEGHORN, L. A. T. et al. Identification of inhibitors of the leishmania cdc2-related protein kinase CRK3. **ChemMedChem**, Weinheim, v. 6, n. 12, p. 2214–2224, 2011.

COLOTTI, G.; ILARI, A. Polyamine metabolism in leishmania: from arginine to trypanothione. **Amino Acids**, Wien, v. 40, n. 2, p. 269–285, 2011.

CORNISH-BOWDEN, A. A simple graphical method for determining the inhibition constants of mixed, uncompetitive and non-competitive inhibitors. **The Biochemical Journal**, London, v. 137, n. 1, p. 143–4, 1974.

CORRALIZA, I. M. et al. Arginase induction by suppressors of nitric oxide synthesis (IL-4, IL-10 and PGE2) in murine bone-marrow-derived macrophages. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, San Diego, v. 206, n. 2, p. 667–673, 1995.

COTTERELL, S. E. J.; ENGWERDA, C. R.; KAYE, P. M. Leishmania donovani infection of bone marrow stromal macrophages selectively enhances myelopoiesis, by a mechanism involving GM-CSF and TNF-alpha. **Blood**, New York, v. 95, n. 5, p. 1642–1651, 2000.

CROFT, S. L.; SUNDAR, S.; FAIRLAMB, A. H. drug resistance in leishmaniasis. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 19, n. 1, p. 111–126, 2006.

CRUZ, E. M. et al. Leishmanicidal activity of cecropia pachystachya flavonoids: arginase inhibition and altered mitochondrial DNA arrangement. **Phytochemistry**, Oxford, v. 89, p. 71–77, 2013.

CUNHA, M. A. et al. Efficacy and safety of liposomal amphotericin B for the treatment of mucosal leishmaniasis from the New World: a retrospective study. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Northbrooke, v. 93, n. 6, p. 1214–1218, 2015.

DAS, A. et al. Topoisomerases of kinetoplastid parasites as potential chemotherapeutic targets. **Trends in Parasitology**, Oxford, v. 20, n. 8, p. 381–387, 2004.

DAVIES, C. R. et al. The epidemiology and control of leishmaniasis in Andean countries. **Cadernos de Saúde Pública**, São Paulo, v. 16, n. 4, p. 925–950, 2000.

DESJEUX, P. The increase in risk factor for leishmaniasis worldwide. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, Northbrook, v. 95, n. 3, p. 239–243, 2001.

DIXON, M. The determination of enzyme inhibitor constants. **The Biochemical Journal**, London, v. 55, n. 1, p. 170–1, 1953.

DOUGALL, I. G.; UNITT, J. Evaluation of the biological activity of compounds : techniques and mechanism of action studies. In: WERMUTH, C. G. et al. (Ed.). **The practice of medicinal chemistry**. 4th. ed. Amsterdam: Elsevier, 2015.

DZIK, J. M. Evolutionary roots of arginase expression and regulation. **Frontiers in Immunology**, Lausanne, v. 5, p. 554, 2014. DOI: 10.3389/fimmu.2014.00544

EDWARDS, D. I. Nitroimidazole drugs-action and resistance mechanisms I.: mechanism of

action. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, Oxford, v. 31, n. 1, p. 9–20, 1993.

EISSA, M. M.; AMER, E. I.; EL SAWY, S. M. F. Leishmania major: activity of tamoxifen against experimental cutaneous leishmaniasis. **Experimental Parasitology**, Orlando, v. 128, n. 4, p. 382–390, 2011.

EJAZI, S. A.; ALI, N. Developments in diagnosis and treatment of visceral leishmaniasis during the last decade and future prospects. **Expert Review of Anti-Infective Therapy**, London, v. 11, n. 1, p. 79–98, 2013.

ENANGA, B. et al. Activity of meglazol, a trypanocidal nitroimidazole, is associated with DNA damage. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v. 47, n. 10, p. 3368–3370, 2003.

ENGELKING, L. R. Enzyme kinetics. In: ENGELKING, L. R. **Textbook of veterinary physiological chemistry**. 3rd. ed. London: Academic Press, 2015. p. 32–38.

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

FAWCETT, J. K.; SCOTT, J. E. A rapid and precise method for the determination of urea. **Journal of Clinical Pathology**, London, v. 13, n. 2, p. 156–159, 1960.

FERREIRA, H. Clinical trial of benznidazole for treatment of Chagas disease. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, São Paulo, v. 18, n. 5, p. 357–364, 1976.

FERREIRA, R. C. C.; FERREIRA, L. C. S. Mutagenicity of CL 64 855, a potent anti-Trypanosoma cruzi drug. **Mutation Research. Genetic Toxicology Testing**, Amsterdam, v. 171, n. 1, p. 11–15, 1986.

FYFE, P. K. et al. Leishmania trypanothione synthetase-amidase structure reveals a basis for regulation of conflicting synthetic and hydrolytic activities. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 283, n. 25, p. 17672–17680, 2008.

GARCÍA, M. et al. Antileishmanial assessment of leaf extracts from Pluchea carolinensis, Pluchea odorata and Pluchea rosea. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, Mumbai, v. 4, n. 10, p. 836–840, 2011.

GARCÍA, M. et al. Activity of cuban plants extracts against Leishmania amazonensis. **ISRN Pharmacology**, Cairo, v. 2012, e 104540, 2012.

GIRARD-THERNIER, C.; PHAM, T.-N.; DEMOUGEOT, C. The promise of plant-derived substances as inhibitors of arginase. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, Hilversum, v. 15, n. 10, p. 798–808, 2015.

GOLDLIST, B. J. An update on pharmacotherapy for dementia. **Geriatrics and Aging**, Toronto, v. 10, n. 3, p. 143, 2007.

GUTHMANN, J. P. et al. Patients' associations and the control of leishmaniasis in Peru. **Bulletin of the World Health Organization**, Geneve, v. 75, n. 1, p. 39–44, 1997.

- HALDAR, A. K.; SEN, P.; ROY, S. Use of antimony in the treatment of leishmaniasis: current status and future directions. **Molecular Biology International**, New York, v. 2011, p. 1–23, 2011.
- HE, Q. et al. Fermentative production of phenolic glucosides by *Escherichia coli* with an engineered glucosyltransferase from *Rhodiola sachalinensis*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 65, n. 23, p. 4691–4697, 2017.
- HORTON, H. et al. Propriedade de las enzimas. In: HORTON, H. et al. **Pincipios de la bioquímica**. 4. ed. México: Pearson Educación, 2008. p. 129–146.
- HRABÁK, A. et al. The inhibitory effect of nitrite, a stable product of nitric oxide (NO) formation, on arginase. **FEBS Letters**, West Sussex, v. 390, n. 2, p. 203–206, 1996.
- ILARI, A. et al. Targeting polyamine metabolism for finding new drugs against leishmaniasis: a review. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, Hilversum, v. 15, n. 3, p. 243–252, 2015.
- INIESTA, V.; GÓMEZ-NIETO, L. C.; CORRALIZA, I. The inhibition of arginase by N(omega)-hydroxy-L-arginine controls the growth of *Leishmania* inside macrophages. **The Journal of Experimental Medicine**, New York, v. 193, n. 6, p. 777–784, 2001.
- IVANENKOV, Y. A.; CHUFAROVA, N. V. Small-molecule arginase inhibitors. **Pharmaceutical Patent Analyst**, London, v. 3, n. 1, p. 65–85, 2014.
- IYAMU, E. W.; EKEKEZIE, C.; WOODS, G. M. In vitro evidence of the inhibitory capacity of chloroquine on arginase activity in sickle erythrocytes. **British Journal of Haematology**, Oxford, v. 139, n. 2, p. 337–343, 2007.
- JARVIS, J. N.; LOCKWOOD, D. N. Clinical aspects of visceral leishmaniasis in HIV infection. **Current Opinion in Infectious Diseases**, London, v. 26, n. 1, p. 1–9, 2013.
- JENKINSON, C. P.; GRODY, W. W.; CEDERBAUM, S. D. Comparative properties of arginases. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v. 114, n. 1, p. 107–132, 1996.
- JIANG, J. et al. Engineered synthesis of rosmarinic acid in *Escherichia coli* resulting production of a new intermediate, caffeoyl-phenyllactate. **Biotechnology Letters**, Dordrecht, v. 38, n. 1, p. 81–88, 2016.
- JIANG, Y. et al. Ornithine decarboxylase gene deletion mutants of *Leishmania donovani*. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 274, n. 6, p. 3781–3788, 1999.
- JOHNER, A. et al. Cyclic nucleotide specific phosphodiesterases of *Leishmania major*. **BMC Microbiology**, London, v. 6, n. 6, p. 25, 2006.
- KANYO, Z. F. et al. Structure of a unique binuclear manganese cluster in arginase. **Nature**, London, v. 383, n. 6600, p. 554–557, 1996.

- KEDZIERSKI, L. Leishmaniasis. **Human Vaccines**, Georgetown, v. 7, n. 11, p. 1204–1214, 2011.
- KENAKIN, T. P. Enzymes as drug targets. In: KENAKIN, T. P. **Pharmacology in drug discovery and development**. 2nd. ed. London: Academic Press, 2017. p. 131–156.
- KEVRIC, I.; CAPPEL, M. A.; KEELING, J. H. New world and old world leishmania infections: a practical review. **Dermatologic Clinics**, Philadelphia, v. 33, n. 3, p. 579–593, 2015.
- KHAN, O. M. F. Trypanothione reductase: a viable chemotherapeutic target for antitrypanosomal and antileishmanial drug design. **Drug Target Insights**, Thousand Oaks, v. 2, p. 129, 2007.
- KOROLKOVAS, A. **Essentials of medicinal chemistry**. 2nd. ed. New York: Wiley-Interscience, 1988.
- KRAUTH-SIEGEL, R. L.; COMINI, M. A. Redox control in trypanosomatids, parasitic protozoa with trypanothione-based thiol metabolism. **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**, Amsterdam, v. 1780, n. 11, p. 1236–1248, 2008.
- KROPF, P. Arginase and polyamine synthesis are key factors in the regulation of experimental leishmaniasis in vivo. **The FASEB Journal**, Bethesda, v. 19, n. 8, p. 1000–1002, 2005.
- KUHLS, K. et al. Comparative microsatellite typing of new world *Leishmania infantum* reveals low heterogeneity among populations and its recent old world origin. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 5, n. 6, p. 1155, 2011.
- KUMAR, P. et al. Nelfinavir, an HIV-1 protease inhibitor, induces oxidative stress-mediated, caspase-independent apoptosis in leishmania amastigotes. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 4, n. 3, p. 642, 2010.
- LAINSON, R. The neotropical leishmania species: a brief historical review of their discovery, ecology and taxonomy. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, Ananindeua, v. 1, n. 2, p. 13–32, jun. 2010.
- LI, M. et al. An ethnopharmacological investigation of medicinal *Salvia* plants (Lamiaceae) in China. **Acta Pharmaceutica Sinica B**, Amsterdam, v. 3, n. 4, p. 273–280, 2013.
- LINDOSO, J. A.; LINDOSO, A. A. Neglected tropical diseases in Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, São Paulo, v. 51, n. 5, p. 247–253, 2009.
- LINEWEAVER, H.; BURK, D. The determination of enzyme dissociation constants. **Journal of the American Chemical Society**, Washington, v. 56, n. 3, p. 658–666, 1934.
- MANJOLIN, L. C. et al. Dietary flavonoids fisetin, luteolin and their derived compounds inhibit arginase, a central enzyme in *Leishmania (Leishmania) amazonensis* infection. **Food Chemistry**, Amsterdam, v. 141, n. 3, p. 2253–2262, 2013.

MAQUIAVELI, C. C. et al. Verbascoside inhibits promastigote growth and arginase activity of *Leishmania amazonensis*. **Journal of Natural Products**, Gorakhpur, v. 79, n. 5, p. 1459–1463, 2016a.

MAQUIAVELI, C. C. et al. Stachytarpheta cayennensis extract inhibits promastigote and amastigote growth in *Leishmania amazonensis* via parasite arginase inhibition. **Journal of Ethnopharmacology**, Limerick, v. 192, p. 108–113, 2016b.

MAQUIAVELI, C. C. et al. Antileishmanial activity of verbascoside: selective arginase inhibition of intracellular amastigotes of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* with resistance induced by LPS plus IFN- γ . **Biochemical Pharmacology**, Oxford, v. 127, p. 28–33, 2017.

MARKLE, W. H.; MAKHOUL, K. Cutaneous leishmaniasis: recognition and treatment. **American Family Physician**, Kansas City, v. 69, n. 6, p. 1455–1460, 2004.

MAURICIO, I. L. et al. Genomic diversity in the *Leishmania donovani* complex. **Parasitology**, London, v. 119, n. 3, p. 237–246, 1999.

MENEZES, J. P. B. et al. Advances in development of new treatment for Leishmaniasis. **BioMed Research International**, New York, v. 2015, p. 1–12, 2015.

MENEZES, J. P.; SARAIVA, E. M.; ROCHA-AZEVEDO, B. The site of the bite: *Leishmania* interaction with macrophages, neutrophils and the extracellular matrix in the dermis. **Parasites & Vectors**, London, v. 9, n. 1, p. 264, 2016.

MESQUITA, J. T.; TEMPONE, A. G.; REIMÃO, J. Q. Combination therapy with nitazoxanide and amphotericin B, Glucantime®, miltefosine and sitamaquine against *Leishmania (Leishmania) infantum* intracellular amastigotes. **Acta Tropica**, Basel, v. 130, p. 112–116, 2014.

MIGUEL, D. C. et al. Tamoxifen as a potential antileishmanial agent: efficacy in the treatment of *Leishmania braziliensis* and *Leishmania chagasi* infections. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, Oxford, v. 63, p. 365–368, 2009.

MITTRA, B. et al. Luteolin, an abundant dietary component is a potent anti-leishmanial agent that acts by inducing topoisomerase II-mediated kinetoplast DNA cleavage leading to apoptosis. **Molecular Medicine**, Cambridge, v. 6, n. 6, p. 527–541, 2000.

MOLINA, R.; GRADONI, L.; ALVAR, J. HIV and the transmission of *Leishmania*. **Annals of Tropical Medicine & Parasitology**, Abingdom, v. 97, n. 1, p. 29–45, 2013.

MONDAL, S.; BHATTACHARYA, P.; ALI, N. Current diagnosis and treatment of visceral leishmaniasis. **Expert Review of Anti-Infective Therapy**, London, v. 8, n. 8, p. 919–944, 2010.

MONTESINO, N. L.; SCHMIDT, T. J. Salvia species as sources of natural products with antiprotozoal activity. **International Journal of Molecular Sciences**, Basel, v. 19, n. 1, p. 264, 2018.

- MONTRIEUX, E. et al. In vitro and in vivo activity of major constituents from *Pluchea carolinensis* against *Leishmania amazonensis*. **Parasitology Research**, Berlin, v. 113, n. 8, p. 2925–2932, 2014.
- MOON, I. et al. Synthesis, anti-inflammatory, and arginase inhibitory activity of piceatannol and its analogs. **Bulletin of the Korean Chemical Society**, v. 38, n. 3, p. 342–349, 2017.
- MOORE, E.; LOCKWOOD, D. Treatment of visceral leishmaniasis. **Journal of Global Infectious Diseases**, Mumbai, v. 2, n. 2, p. 151–158, 2010.
- MUSA, A. M. et al. Paromomycin for the treatment of visceral leishmaniasis in Sudan: a randomized, open-label, dose-finding study. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 4, n. 10, e885, 2010.
- MUZITANO, M. F. et al. Quercitrin: an antileishmanial flavonoid glycoside from *Kalanchoe pinnata*. **Planta Medica**, Stuttgart, v. 72, n. 1, p. 81–83, 2006.
- NAGLE, A. S. et al. Recent developments in drug discovery for leishmaniasis and human African trypanosomiasis. **Chemical Reviews**, Washington, v. 114, n. 22, p. 11305–11347, 2014.
- NELSON, D. L.; COX, M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. 6. ed. Porto Alegre: Artes Médicas, 2014.
- NESSLANY, F. et al. In vitro and in vivo chromosomal aberrations induced by megazol. **Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, Amsterdam, v. 560, n. 2, p. 147–158, 2004.
- ORYAN, A.; AKBARI, M. Worldwide risk factors in leishmaniasis. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, Mumbai, v. 9, n. 10, p. 925–932, 2016.
- OSORIO, E. Y. et al. Growth factor and Th2 cytokine signaling pathways converge at STAT6 to promote arginase expression in progressive experimental visceral leishmaniasis. **PLoS Pathogens**, San Francisco, v. 10, n. 6, p. e1004165, 2014.
- OSWALD, I. P. et al. NO as an effector molecule of parasite killing: modulation of its synthesis by cytokines. **Comparative Biochemistry and Physiology. Part C: Pharmacology**, Oxford, v. 108, n. 1, p. 11–18, 1994.
- PASSOS, C. L. A. et al. Leishmanicidal effect of synthetic trans-resveratrol analogs. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 10, n. 10, p. 1–16, 2015.
- PHAM, T.-N. et al. Cinnamide derivatives as mammalian arginase inhibitors: synthesis, biological evaluation and molecular docking. **International Journal of Molecular Sciences**, Basel, v. 17, n. 10, p. 1656, 2016.
- PIOTROWSKA, H.; KUCINSKA, M.; MURIAS, M. Biological activity of piceatannol: leaving the shadow of resveratrol. **Mutation Research - Reviews in Mutation Research**, Amsterdam, v. 750, n. 1, p. 60–82, 2012.

POLI, P. et al. Cytotoxic and genotoxic effects of megazol, an anti-Chagas' disease drug, assessed by different short-term tests. **Biochemical Pharmacology**, Oxford, v. 64, n. 11, p. 1617-1627, 2002.

PURICH, D. L.; FROMM, H. J. Limitations in the use of Dixon plots to evaluate enzyme inhibition. **Biochimica et Biophysica Acta. Enzymology**, Amsterdam, v. 268, n. 1, p. 1-3, 1972.

RADTKE, O. A. et al. Evaluation of sage phenolics for their antileishmanial activity and modulatory effects on interleukin-6, interferon and tumour necrosis factor- α -release in RAW 264.7 cells. **Zeitschrift fur Naturforschung - Section C, Journal of Biosciences**, Berlin, v. 58, n. 5-6, p. 395-400, 2003.

RAMESH, V. et al. Decline in clinical efficacy of oral miltefosine in treatment of post Kala-azar Dermal Leishmaniasis (PKDL) in India. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 9, n. 10, e0004093, 2015.

RAMESH, V.; MUKHERJEE, A. Post-Kala-Azar dermal leishmaniasis. **International Journal of Dermatology**, Oxford, v. 34, n. 2, p. 85-91, 1995.

RECZKOWSKI, R. S.; ASH, D. E. EPR evidence for binuclear Mn(II) centers in rat liver arginase. **Journal of the American Chemical Society**, Washington, v. 114, n. 27, p. 10992-10994, 1992.

REGUERA, R. M. et al. Leishmania major lacking arginase (ARG) are auxotrophic for polyamines but retain infectivity to susceptible BALB/c mice. **Molecular and Biochemical Parasitology**, Amsterdam, v. 165, p. 48-56, 2009.

REIS, M. B. G. et al. Inhibition of Leishmania (Leishmania) amazonensis and rat arginases by green tea EGCG, (+)-catechin and (-)-epicatechin: a comparative structural analysis of enzyme-inhibitor interactions. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 8, n. 11, e78387, 2013.

REITHINGER, R.; CANALES ESPINOZA, J.; DAVIES, C. R. The transmission dynamics of canine American cutaneous leishmaniasis in Huánuo, Peru. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Northbrook, v. 69, n. 5, p. 473-480, 2003.

REITHINGER, R. et al. Cutaneous leishmaniasis. **The Lancet Infectious Diseases**, New York, v. 7, n. 9, p. 581-596, 2007.

RILEY, E.; ROBERTS, S. C.; ULLMAN, B. Inhibition profile of Leishmania mexicana arginase reveals differences with human arginase I. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v. 41, n. 5, p. 545-552, 2011.

ROBERTS, S. C. et al. Arginase plays a pivotal role in polyamine precursor metabolism in *Leishmania*. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 279, n. 22, p. 23668-23678, 2004.

ROSENTHAL, E. et al. Visceral leishmaniasis and HIV-1 co-infection in southern France. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, Northbrook, v. 89, n. 2, p. 159-162, 1995.

ROSKOSKI, R. Modulation of enzyme activity. In: ENNA, S. J.; BYLUND, D. B. (Ed.). **xPharm: the comprehensive pharmacology reference**. Amsterdam: Elsevier, 2007.

ROSS, R. Note on the bodies recently describes by Leishman and Donovan. **British Medical Journal**, London, v. 2, n. 2237, p. 1261–1262, 1903.

SACKS, D.; NOBEN-TRAUTH, N. The immunology of susceptibility and resistance to Leishmania major in mice. **Nature Reviews Immunology**, London, v. 2, n. 11, p. 845–858, 2002.

SACKS, D. L.; PERKINS, P. V. Identification of an infective stage of Leishmania promastigotes. **Science**, Washington, v. 223, n. 4643, p. 1417–1419, 1984.

SAHA, S. et al. The lignan glycosides lyoniside and saracoside poison the unusual type IB topoisomerase of Leishmania donovani and kill the parasite both in vitro and in vivo. **Biochemical Pharmacology**, Oxford, v. 86, p. 1673–1687, 2013.

SAVOIA, D. Recent updates and perspectives on leishmaniasis. **The Journal of Infection in Developing Countries**, [Italy], v. 9, n. 6, p. 588–596, 2015.

SCHÖNIAN, G. et al. PCR diagnosis and characterization of Leishmania in local and imported clinical samples. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, New York, v. 47, n. 1, p. 349–358, 2003.

SEAMAN, J. et al. Epidemic visceral leishmaniasis in Sudan: a randomized trial of aminosidine plus sodium stibogluconate versus sodium stibogluconate alone. **Journal of Infectious Diseases**, Oxford, v. 168, n. 3, p. 715–720, 1993.

SHAKUR, Y. et al. Therapeutic potential of phosphodiesterase inhibitors in parasitic diseases. **Handbook of Experimental Pharmacology**, Berlin, v. 204, p. 487–510, 2011.

SHAKYA, N.; BAJPAI, P.; GUPTA, S. Therapeutic switching in leishmania chemotherapy: a distinct approach towards unsatisfied treatment needs. **Journal of Parasitic Diseases**, Lucknow, v. 35, n. 2, p. 104–112, 2011.

SHOWLER, A. J.; BOGGILD, A. K. Cutaneous leishmaniasis in travellers: a focus on epidemiology and treatment in 2015. **Current Infectious Disease Reports**, Athens, v. 17, n. 7, p. 489, 2015.

SILVA, A. E. et al. Acute Chagas' disease in postrenal transplant and treatment with benznidazole. **Annals of Diagnostic Pathology**, Philadelphia, v. 14, p. 199–203, 2010.

SILVA, E. R.; MAQUIAVELI, C. C.; MAGALHÃES, P. P. The leishmanicidal flavonols quercetin and quercitrin target Leishmania (Leishmania) amazonensis arginase. **Experimental Parasitology**, Orlando, v. 130, n. 3, p. 183–188, 2012.

SILVA, E. R. et al. Biochemical and biophysical properties of a highly active recombinant arginase from Leishmania (Leishmania) amazonensis and subcellular localization of native enzyme. **Molecular and Biochemical Parasitology**, Amsterdam, v. 159, n. 2, p. 104–111,

2008.

SILVA, E. R. et al. Novel selective inhibitor of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* arginase. **Chemical Biology & Drug Design**, Oxford, v. 86, n. 5, p. 969–978, 2015.

SILVA, E. R. et al. Cinnamic acids derived compounds with antileishmanial activity target *Leishmania amazonensis* arginase. **Chemical Biology & Drug Design**, Oxford, v. 93, n. 2, p. 139-146, 2018.

SILVA, M. F. L. **Relação entre a localização celular da enzima arginase de Leishmania (Leishmania) amazonensis e seu papel na infecção de macrófagos murinos**. 2010. 36 p. Tese (Doutorado) – Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

SILVA, M. F. L. et al. *Leishmania amazonensis* arginase compartmentalization in the glycosome is important for parasite infectivity. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 7, n. 3, p. e34022, 2012.

SILVEIRA, F. F. et al. **Síntese de derivados do sistema 1H-pirazolo[3,4-d]pirimidina como potencial atividade anti-Plasmodium falciparum**. In: REUNIÃO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, 38, 2015, Águas de Lindóia. Resumos. São Paulo: SBQ, 2015. Disponível em: <<http://www.sbq.org.br/38ra/cdrom/resumos/T0569-1.pdf>>. Acesso em: 4 abr. 2019.

SILVESTRE, R. et al. Recognition of *Leishmania* parasites by innate immunity. **Immunology, Endocrine and Metabolic Agents in Medicinal Chemistry**, Sharjah, v. 9, n. 2, p. 106–127, 2009.

SINGH, B.; SUNDAR, S. Leishmaniasis: vaccine candidates and perspectives. **Vaccine**, Amsterdam, v. 30, n. 26, p. 3834-3842, 2012.

SINGH, S.; SHARMA, U.; MISHRA, J. Post-kala-azar dermal leishmaniasis: recent developments. **International Journal of Dermatology**, Oxford, v. 50, n. 9, p. 1099–1108, 2011.

SITTAMPALAM, G. S. et al. **Assay guidance manual**. Bethesda: Eli Lilly; NCATS, 2016.

STEVERDING, D. The history of leishmaniasis. **Parasites and Vectors**, London, v. 10, n. 1, p. 82, 2017.

SUNDAR, S. et al. Oral miltefosine for Indian visceral leishmaniasis. **New England Journal of Medicine**, Boston, v. 347, n. 22, p. 1739-1746, 2002.

SUNDAR, S. et al. Efficacy of miltefosine in the treatment of visceral leishmaniasis in India after a decade of use. **Clinical Infectious Diseases**, Oxford, v. 55, n. 4, p. 543–550, 2012.

SUNDAR, S.; CHAKRAVARTY, J. An update on pharmacotherapy for leishmaniasis. **Expert opinion on pharmacotherapy**, London, v. 16, n.2, p. 237-252, 2015.

TAKELE, Y. et al. Arginase activity in the blood of patients with visceral leishmaniasis and HIV infection. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 7, n. 1, e1977, 2013.

TANAE, M. M. et al. Chemical standardization of the aqueous extract of *Cecropia glaziovii* Sneth endowed with antihypertensive, bronchodilator, antiacid secretion and antidepressant-like activities. **Phytomedicine**, Stuttgart, v. 14, n. 5, p. 309–313, 2007.

TASDEMIR, D. et al. Antitrypanosomal and antileishmanial activities of flavonoids and their analogues: in vitro, in vivo, structure-activity relationship, and quantitative structure-activity relationship studies. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v. 50, n. 4, p. 1352-1364, 2006.

TORRES-GUERRERO, E. et al. Leishmaniasis: a review. **F1000Research**, London, v. 6, p. 750, 2017.

VALVERDE, R. **Doenças negligenciadas**. Rio de Janeiro: Agência Fiocruz de Notícias, 2013. Disponível em: <<https://agencia.fiocruz.br/doencas-negligenciadas>>. Acesso em: 24 mar. 2019.

VAN GRIENSVEN, J.; DIRO, E. Visceral leishmaniasis. **Infectious Disease Clinics of North America**, Philadelphia, v. 26, n. 2, p. 309–322, 2012.

VAN GRIENSVEN, J. et al. Combination therapy for visceral leishmaniasis. **The Lancet Infectious Diseases**, New York, v. 10, n. 3, p. 184–94, 2010.

VIANA, G. M. et al. Antileishmanial thioureas: synthesis, biological activity and in silico evaluations of new promising derivatives. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, Tokyo, v. 65, n. 10, p. 911-919, 2017.

VICKERS, T. J.; BEVERLEY, S. M. Folate metabolic pathways in *Leishmania*. **Essays in Biochemistry**, London, v. 51, p. 63–80, 2011.

VINCENDEAU, P. et al. Arginases in parasitic diseases. **Trends in Parasitology**, Oxford, v. 19, n. 1, p. 9–12, 2003.

WANG, H. et al. Crystal structure of the *Leishmania* major phosphodiesterase LmjPDEB1 and insight into the design of the parasite-selective inhibitors. **Molecular Microbiology**, Oxford, v. 66, n. 4, p. 1029–1038, 2007.

WANG, J. et al. Biosynthesis, chemistry, and pharmacology of polyphenols from chinese salvia species: a review. **Molecules**, Basel, v. 24, n. 1, p. 155, 2019.

WEINA, P. J. et al. Old world leishmaniasis: an emerging infection among deployed US military and civilian workers. **Clinical Infectious Diseases**, Oxford, v. 39, n. 11, p. 1674–1680, 2004.

WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO. Global leishmaniasis update, 2006–2015: a turning point in leishmaniasis surveillance. **Weekly Epidemiological Record**, Karachi, v. 92, n. 38, p. 557–565, 2017.

WORLD HEALTH ORGANIZATION – WHO. **Leishmaniasis**. Disponível em: <<https://www.who.int/leishmaniasis/en/>>. Acesso em: 10 mar. 2019.

WYLLIE, S. et al. The anti-trypanosome drug fexinidazole shows potential for treating visceral leishmaniasis. **Science Translational Medicine**, Washington, v. 4, n. 119, p. 119re1, 2012.

YADÓN, Z. E. et al. Assessment of leishmaniasis notification system in Santiago del Estero, Argentina, 1990-1993. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Northbrook, v. 65, n. 1, p. 27–30, 2001.

YAU, W.-L. et al. Cyclosporin: a treatment of *Leishmania donovani* reveals stage-specific functions of cyclophilins in parasite proliferation and viability. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 4, n. 6, p. e729, 2010.

ZHUANG, Y. et al. Synthesis of rosmarinic acid analogues in *Escherichia coli*. **Biotechnology Letters**, Dordrecht, v. 38, n. 4, p. 619-627, 2016.

ZILBERSTEIN, D.; LIVEANU, V.; GEPSTEIN, A. Tricyclic drugs reduce proton motive force in *Leishmania donovani* promastigotes. **Biochemical Pharmacology**, Oxford, v. 39, n. 5, p. 935–940, 1990.

ZIJLSTRA, E. E. et al. Post-kala-azar dermal leishmaniasis. **The Lancet Infectious Diseases**, New York, v. 3, n. 2, p. 87–98, 2003.

APÊNDICES

APÊNDICE A - Espécies de *Leishmania* que causam infecções em Humanos

Tabela 9 - Espécies de *Leishmania* que causam infecções em Humanos

Espécie	Apresentação clínica	Distribuição	Sintomas
<i>L. donovani</i> (Antropozoonótica)	LV LDPC	África Central; Sul de Ásia; Médio Oriente; Índia; China.	•Febre prolongada, esplenomegalia, pancitopenia, anemia progressiva, perda de peso, escurecimento da pele, dermatite severa
<i>L. infantum</i> (Syn. <i>L. chagasi</i>) (Zoonótica)	LV LC	Países mediterrâneos (norte de África e Europa); Sul da Europa; Médio Oriente; Ásia Central. México, Venezuela, Brasil, Bolívia.	•Febre prolongada, esplenomegalia, pancitopenia, anemia progressiva, perda de peso, pápulas eritematosas no local de picada de flebotômíneos, potencial para se tornar severa e difusa.
<i>L. siamensis</i> (Zoonótica)	LV	Tailândia	•Febre prolongada, esplenomegalia, pancitopenia, anemia progressiva, perda de peso.
<i>L. aethiopica</i> <i>L. major</i> <i>L. tropica</i>	LC	Sul da Europa, Oriente Médio, Sul de Ásia e África	•Pápulas eritematosas no local da picada de flebotômíneos; potencialmente severas e difusas.
<i>L. amazonensis</i> <i>L. braziliensis</i> <i>L. colombiensis</i> <i>L. guyanensis</i> <i>L. mexicana</i> <i>L. panamensis</i> <i>L. peruviana</i> <i>L. venezuelensis</i>	LC	América do Sul e Central (Brasil, Colômbia, Costa Rica, Peru)	•Pápulas eritematosas no local de picada de flebotômíneos (<i>L. mexicana</i>) • Lesões metastáticas podem resultar em LMC (<i>L. braziliensis</i>) ou LDC (<i>L. amazonensis</i>) • LDC e LMC são complicações que ocorrem 90% de casos em Brasil, Bolívia e Peru.
<i>L. aethiopica</i> <i>L. brasiliensis</i> <i>L. guyanensis</i> <i>L. panamensis</i>	LMC	Etiópia América do Sul e Central	•Destruição da mucosa nasofaríngea, lesões destrutivas e desfigurantes da mucosa ocorre em 1 - 10% de pacientes

Abreviações: LC- Leishmaniose cutânea, LDC – Leishmaniose difusa cutânea, LDPC -Leishmaniose difusa pós calazar, LMC – Leishmaniose muco-cutânea, LV- Leishmaniose visceral.

Fonte: Adaptado de NAGLE, A. S. et al. Recent developments in drug discovery for leishmaniasis and human african trypanosomiasis. **Chemical Reviews**, Washington, v. 114, n. 22, p. 11305–11347, 2014; STEVERDING, D. The history of leishmaniasis. **Parasites and Vectors**, London, v. 10, n. 1, p. 82, 2017.

APÊNDICE B – Estrutura dos compostos da série triazolopirimidona (PLLp)

Tabela 10 - Estrutura dos compostos da série triazolopirimidona (PLLp)

Composto	Estrutura	Fórmula química Massa (g/mol)
PLLp 1		$C_{16}H_{12}F_3N_7O$ (375,10)
PLLp 2		$C_{17}H_{14}F_3N_7O$ (389,12)
PLLp 3		$C_{17}H_{14}F_3N_7O$ (389,12)
PLLp 4		$C_{17}H_{14}F_3N_7O_2$ (405,11)
PLLp 5		$C_{17}H_{12}F_3N_7O_2$ (403,10)
PLLp 6		$C_{17}H_{14}F_3N_7O_2$ (405,11)
PLLp 7		$C_{16}H_{11}F_3N_8O_3$ (420,09)

Continua...

PLL 8		$C_{17}H_{13}F_3N_7O_3$ (434,11)
PLL 9		$C_{16}H_{10}Cl_2F_3N_7O$ (443,03)
PLL 10		$C_{16}H_{10}Cl_2F_3N_7O$ (443,03)
PLL 11		$C_{17}H_{11}F_6N_7O$ (443,09)
PLL 12		$C_{16}H_{12}F_3N_7O_2$ (391,10)
PLL 13		$C_{16}H_{12}F_3N_7O_2$ (391,10)
PLL 14		$C_{16}H_{11}ClF_3N_7O$ (409,07)
PLL 15		$C_{16}H_{11}ClF_3N_7O$ (409,07) Continua...

PLL

16

$C_{17}H_{11}F_3N_8O$
(400,32)

PLL

17

$C_{10}H_7F_3N_4O$
(256,06)

Fim

Fonte: Própria autoria.

APÊNDICE C – Estrutura dos compostos da série tiouréias (PLTU)

Tabela 11 - Estrutura dos compostos da série tiouréias (PLTU)

Composto	Estrutura	Fórmula química Massa (g/mol)
PLTU 01.009/17C		$C_{11}H_8F_3N_5OS$ (315,04)
PLTU 04.010/16A		$C_{12}H_{12}F_3N_4OS$ (260,07)
PLTU 06.008/17A		$C_{15}H_{11}F_3N_2OS$ (324,05)
PLTU 07.007/17A		$C_{21}H_{21}ClN_4OS$ (412,11)
PLTU 09.001/17B		$C_{19}H_{17}ClN_4OS$ (384,08)
PLTU 10.012/17 ppto		$C_{18}H_{16}N_4OS$ (336,10)

Fonte: Própria autoria.

ANEXOS

ANEXO A - Endemicidade da Leishmaniose cutânea (LC) em 2015

Fonte: WHO, 2019 (http://gamapserver.who.int/mapLibrary/Files/Maps/Leish_CL_2015_rev.png)

ANEXO B - Endemicidade da Leishmaniose visceral (LV) em 2015

Fonte: WHO, 2019 (http://gamapserver.who.int/mapLibrary/Files/Maps/Leish_VL_2015_rev.png).