

Maria Fernanda Laranjeira da Silva

Relação entre a localização celular da enzima  
arginase de *Leishmania (Leishmania) amazonensis*  
e seu papel na infecção de macrófagos murinos

The relationship between the cellular location of *Leishmania*  
(*Leishmania*) *amazonensis* arginase and its role during murine  
macrophage infection

**São Paulo**

**2010**

## Resumo

da Silva, MFL. Relação entre a localização celular da enzima arginase de *Leishmania (Leishmania) amazonensis* e seu papel na infecção de macrófagos murinos [tese de doutorado]. São Paulo: Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo; 2010.

Nos hospedeiros mamíferos, os parasitas do gênero *Leishmania* vivem nos macrófagos se evadindo de mecanismos microbicidas dessas células, tais como a produção de óxido nítrico (NO). A produção de NO pela enzima óxido nítrico sintase induzida (iNOS) nos macrófagos requer L-arginina como substrato, o mesmo aminoácido utilizado pela arginase para produzir ornitina e uréia. Logo, a arginase pode atuar na sobrevivência de *Leishmania* no hospedeiro competindo com a iNOS, reduzindo a produção de NO, além de seu papel na via de poliaminas, essencial para a replicação dessas células. Com isso, o objetivo desse estudo é elucidar o papel da arginase de *L. (L.) amazonensis* durante o ciclo de vida do parasita, particularmente, sua função no estabelecimento e na manutenção da infecção da célula hospedeira, e como esse papel seria exercido.

Nesse sentido, obtivemos soros policlonais anti-arginase, a partir da arginase recombinante de *L. (L.) amazonensis* purificada, e esses soros foram utilizados na imunomarcação da enzima em preparações com formas promastigotas e macrófagos infectados com amastigotas de *L. (L.) amazonensis*. Assim, determinamos a compartimentalização da arginase nos glicossomos tanto na forma promastigota do parasita como na forma amastigota, durante a infecção.

Além disso, obtivemos diversos mutantes com a expressão de arginase modificada quanto à quantidade e localização que nos permitiram avaliar a importância da compartimentalização dessa enzima nos glicossomos. Entre esses mutantes temos: superexpressores de arginase, com e sem sinal de endereçamento para glicossomo; parasitas com um alelo de arginase nocauteado e o outro substituído pelo cassete contendo o segmento ddFKBP-ARG, que teriam a expressão de arginase regulada pelo

domínio ddFKB sendo nocautes funcionais de arginase; e finalmente, também obtivemos parasitas nocaute nulo de arginase.

A análise desses mutantes permitiu conclusões importantes para o conhecimento da fisiologia do parasita e sua relação com o macrófago, revelando que o papel da arginase de *Leishmania* parece ser muito mais complexo do que o inicialmente postulado, participando na regulação de outras vias metabólicas do próprio parasita e da célula hospedeira. Paralelamente, também determinamos que o sistema ddFKBP é funcional em *L. (L.) amazonensis*, e assim pode ser utilizado no estudo funcional de outras proteínas importantes para esses parasitas.

## **Abstract**

da Silva, MFL. The relationship between the cellular location of *Leishmania* (*Leishmania*) amazonensis arginase and its role during the macrophage infection [thesis]. São Paulo: Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo; 2010.

In the mammal host, *Leishmania* parasites live inside macrophages escaping from their microbicidal mechanisms, such as the nitric oxide (NO) production. The macrophage NO production by inducible nitric oxide synthase (iNOS) requires L-arginine as substrate, the same amino acid required by arginase to generate ornithine and urea. So, arginase may play a dual role in *Leishmania* survival reducing the NO by competing with iNOS, and participating in the polyamines pathway, which is essential for the cells replication. Considering this, the aim of this study is to elucidate the role of *L. (L.) amazonensis* arginase during the parasite life cycle, mainly its function for the establishment and maintenance of the host cell infection, besides to elucidate the way that this enzyme plays its role.

With this in mind, we obtained polyclonal anti-arginase sera using purified recombinant *L. (L.) amazonensis* arginase, these sera were used in immunolabelling assays of *L. (L.) amazonensis* promastigotes and macrophages infected with *L. (L.) amazonensis* amastigotes. These experiments determined that arginase is compartmentalized in the glycosomes of both promastigotes and amastigotes, during infection.

Besides, we obtained several mutants with altered arginase expression, modified in terms of quantity and location, which permitted us to evaluate the importance of glycosome arginase compartmentalization. Among these mutants are: overexpressors of arginase, with and without glycosomal addressing signal; parasites with one arginase allele knocked out and the other one replaced by a sequence containing the ddFKBP-ARG fusion that would allow us to regulate arginase expression, working like a functional arginase knockout; and finally, we also obtained arginase null knockouts parasites.

The mutants analyses lead us to important conclusions for the knowledge of the parasite physiology and its relationship with the host macrophage, revealing that the *Leishmania* arginase role appears to be more complex than previously thought, playing an important role in the regulation of other metabolic pathways, of the own parasite and of the host cell. In the other hand, we also determined that the ddFKBP system is functional in *L. (L.) amazonensis*, and then can be used for functional studies of other important parasite's proteins.

# 1. Introdução

## 1.1. O gênero *Leishmania* e as leishmanioses

Representações de lesões de pele e deformidades faciais encontradas em peças arqueológicas pré-Inca no Equador e no Peru, datadas do começo do século 1 d.C., já evidenciavam a ocorrência das formas cutânea e mucocutânea das leishmanioses no chamado Novo Mundo. Textos do período Inca dos séculos 15 e 16, e depois durante a colonização espanhola, mencionam úlceras de pele apresentadas pelos agricultores sazonais quando retornavam da região dos Andes. Posteriormente, patologias que causavam a desfiguração do nariz e boca ficaram conhecidas como “lepra branca”, graças à similaridade com as lesões causadas por micobactéria. No Oriente, médicos indianos aplicaram o termo kala azar, que significa “febre negra”, a doença definida posteriormente como leishmaniose visceral (WHO).

Mas, uma das primeiras e mais importantes descrições clínicas de leishmaniose cutânea foi feita somente em 1756, por Alexander Russel, em um paciente turco. Em 1901, Leishman identificou certos organismos, em esfregaços provenientes do baço de pacientes mortos pela febre conhecida como “Dum-dum”, inicialmente considerados tripanossomos, mas em 1903 Donovan os descreveu como novos organismos, que posteriormente foram denominados *Leishmania donovani* por Ross (Ross 1903), estabelecendo a conexão entre esses organismos e a doença kala azar, e descrevendo pela primeira vez o gênero *Leishmania* (WHO).

No Brasil, em 1909, Lindenberg, e Carini juntamente com Paranhos, independentemente, demonstraram a presença dos parasitas do gênero *Leishmania* em lesões de paciente brasileiros. Gaspar Vianna deu-lhe o nome de *Leishmania braziliensis* e descobriu a ação curativa do tártaro emético em 1912 (Rey 1992).

Hoje, o gênero *Leishmania*, classificado na ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae, compreende mais de 30 espécies, das quais por volta de 20 causam doenças à espécie humana, patologias essas genericamente conhecidas como Leishmanioses. Em vista de essas doenças

apresentarem manifestações clínicas e epidemiológicas tão diversas em cada área geográfica, dividiu-se a doença em cinco grupos principais (Ashford 2000), causadas por diferentes espécies:

- Leishmaniose cutânea: manifesta-se inicialmente como uma persistente picada de mosquito e, gradualmente, as lesões aumentam, forma-se então um granuloma no fundo da lesão envolvendo a migração de leucócitos que isolam a área infectada, freqüentemente levando à necrose do tecido. Essa forma da doença usualmente é causada por *Leishmania (Leishmania) tropica*, *L. (L.) major*, *L. (L.) amazonensis*, *L. (Viannia) braziliensis* entre outras;

- Leishmaniose mucocutânea: começa com uma lesão no local da picada do mosquito e então aparecem lesões metastáticas nas mucosas do nariz, boca e, eventualmente, faringe e laringe. A propagação dá-se provavelmente por via hematogênica, e as úlceras costumam progredir em extensão e profundidade, levando a perfuração do septo ou palato, e infiltração inflamatória das partes moles contíguas (Rey 1992). Essa forma é geralmente associada a *L. (V.) braziliensis*;

- Leishmaniose cutânea difusa: forma disseminada cutânea, leva ao surgimento de diversas lesões nodulares, espalhadas pelo corpo, e ocorre em indivíduos anérgicos ou, tardiamente, em pacientes que haviam sido tratados de calazar (Rey 1992). Geralmente é causada por *L. (L.) mexicana*, *L. (L.) amazonensis* e *L. (L.) pifanoi*;

- Leishmaniose visceral ou calazar: geralmente inicia-se por uma lesão no local da picada, porém aqui os parasitas apresentam tropismo pelo sistema fagocítico mononuclear alojando-se no baço, fígado, medula óssea e tecidos linfóides (Rey 1992), assim comprometem o funcionamento desses órgãos, freqüentemente levando ao óbito quando não tratada. Essa forma da doença é causada pela *L. (L.) chagasi* e *L. (L.) donovani*;

- Leishmaniose pós-calazar: seqüela da leishmaniose calazar, pode aparecer em até dois anos após a cura dessa forma da doença, e se manifesta como feridas na pele.

A Organização Mundial da Saúde estima uma prevalência mundial de 12 milhões de casos de leishmaniose, com mortalidade anual de 60.000

peessoas, sendo que a população de risco é de aproximadamente 350 milhões de pessoas em 88 países do mundo. Além disso, apesar de somente serem declarados oficialmente 600.000 novos casos por ano, estima-se que esse número na realidade alcance 1,5 a 2 milhões de pessoas (WHO).

A leishmaniose representa mundialmente um grande problema de saúde pública, sendo a segunda infecção mais importante causada por protozoários, superada somente pela malária (WHO).

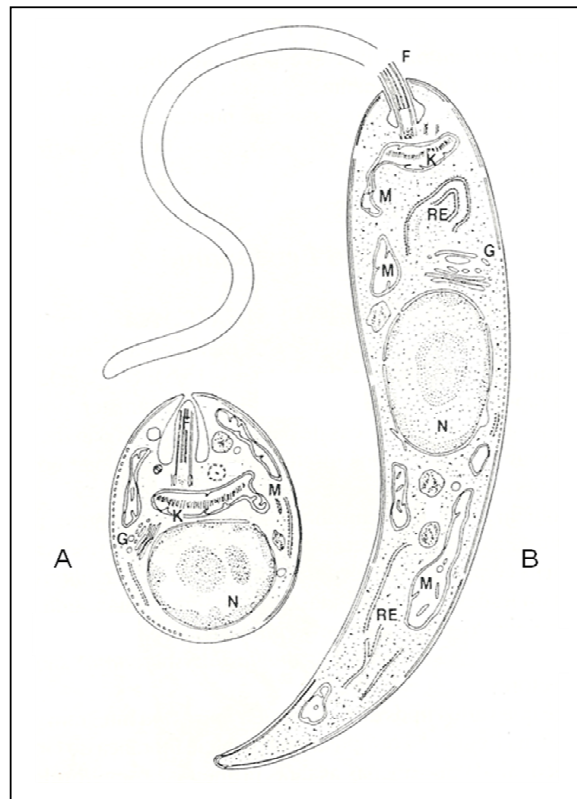
No Brasil, dados do Ministério da Saúde reportam um aumento no número de novos casos de leishmaniose nos últimos anos. Em 1980, o número de casos registrados de leishmaniose cutânea foi 3.000, já em 1995 esse número chegou a 35.748 casos (Saúde. 2007). Além disso, observa-se uma expansão geográfica da leishmaniose cutânea no Brasil, evidenciada pelo aumento de municípios com casos registrados da doença. Em 1994, foram registrados casos em 1.861 municípios do país, em 4 anos houve uma expansão da doença para 2.055 municípios (Saúde 2000). Essa expansão provavelmente ocorre graças a modificações sócio-ambientais, como o desmatamento, que reduz a disponibilidade de animais para servir de fonte de alimentação para o mosquito transmissor, colocando-lhe o cão e o homem como alternativas mais acessíveis. Além desse, outro fator que favorece a expansão geográfica da doença é o processo migratório, que traz para a periferia das cidades populações humana e canina originárias de áreas rurais, onde a doença é endêmica (Saúde 2002).

## **1.2. O ciclo de vida da *Leishmania***

Os protozoários do gênero *Leishmania* são parasitas obrigatórios e caracterizam-se por apresentar apenas duas formas de vida durante seu ciclo de vida, a forma amastigota e a forma promastigota, associadas a dois tipos de hospedeiro. No hospedeiro vertebrado encontra-se a forma amastigota (Fig. 1), parasita intracelular obrigatório de macrófagos. Sua morfologia celular é arredondada ou ovóide, variando de tamanho entre 2 e 6  $\mu\text{m}$  em extensão e 1,5 e 3  $\mu\text{m}$  de largura, com um flagelo muito reduzido. Encontram-se nos vacúolos digestivos (ou fagolisossomos) dos macrófagos que



fagocitam os parasitas, onde se multiplicam por divisão binária, rompendo o macrófago e liberando novos amastigotas aptos a infectar outros macrófagos. Ao picar o indivíduo ou animal parasitado, o hospedeiro invertebrado, um inseto hematófago da família Psychodidae, suga junto com o sangue ou com a linfa macrófagos periféricos infectados com amastigotas de *Leishmania*. Uma vez no tubo digestivo do mosquito, essas formas são liberadas e se diferenciam em promastigotas (Fig. 1), formas delgadas com cerca de 1,5  $\mu\text{m}$  de largura e 20  $\mu\text{m}$  de comprimento, com um flagelo típico que emerge da extremidade anterior. Essas formas se multiplicam intensamente por divisão binária e colonizam o tubo digestório do inseto vetor. De acordo com a posição ocupada no inseto do vetor, foram descritos dois subgêneros: *Leishmania (Leishmania)*, para os parasitas que se aderem ao epitélio do intestino anterior, e *Leishmania (Viannia)*, para os parasitas que se aderem



**Figura 1** – Representação esquemática da ultra-estrutura das formas amastigota (A) e promastigota (B) de uma *Leishmania*. N: núcleo. RE: retículo endoplasmático. M: mitocôndria. G: complexo de Golgi. K: kinetoplasto. F: flagelo. Figura modificada de (Rey 1992).

ao epitélio do intestino posterior. Quando atingem um grande número, diferenciam-se em formas metacíclicas infectivas, de rápido movimento, corpo pequeno e flagelo alongado que invadem as porções anteriores do estômago e proventrículo do mosquito. No próximo repasto sangüíneo, a regurgitação do material aspirado assegura a inoculação das formas infectantes em um novo hospedeiro vertebrado. No tegumento desse novo hospedeiro, os parasitas são fagocitados pelos macrófagos e se diferenciam em amastigotas, completando o ciclo de vida do parasitas e sua propagação (Rey 1992).

Os insetos vetores das leishmanioses são pequenos dípteros, de 2 a 3 mm de comprimento, e pertencem a família Psychodidae, subfamília Phlebotominae. Somente 30 das 500 espécies conhecidas dessa subfamília foram identificadas como vetores da doença, sendo que dois gêneros são realmente importantes vetores, *Lutzomyia* e *Phlebotomus* (Rey 1992). São as fêmeas dessas espécies que se infectam com os parasitas, sugando sangue de mamíferos para obter os nutrientes necessários para o desenvolvimento dos seus ovos, e assim transmitindo a doença (WHO 2010).

É importante ressaltar que o homem participa do ciclo de vida da *Leishmania* como um hospedeiro acidental, os hospedeiros vertebrados naturais desse protozoário são cães, gatos e alguns animais silvestres (roedores, preguiças, tamanduás, marsupiais, raposas, etc), que são considerados reservatórios desses organismos; por isso as leishmanioses são consideradas zoonoses, adquiridas eventualmente quando o homem penetra no ecossistema onde esses organismos circulam (Rey 1992).

### **1.3. Diagnóstico e tratamento das leishmanioses**

Em pacientes procedentes de áreas endêmicas, ou que estiveram em contato com zonas leishmanióticas, tipicamente pode ser feito o diagnóstico clínico, mas esse deve ser confirmado com provas laboratoriais. O exame parasitológico pode ser realizado pela observação microscópica de biópsias, esfregaços de pele ou aspirados de tecidos corados. Outra opção é semear o material obtido de lesões em meios de cultura, o que chega a comprovar 60%

dos casos examinados. Em alguns casos, identifica-se a espécie mediante caracterização eletroforética de isoenzimas por comparação com material de referência (Rey 1992).

Outra possibilidade é o diagnóstico imunológico, feito através da intradermoreação de Montenegro, realizada com o antígeno preparado a partir de culturas. No entanto, a sensibilidade dessa técnica é de apenas 87% com especificidade de 57% (Faber, Oskam et al. 2003), apresentando reatividade cruzada com outras parasitoses, como doença de Chagas (Barrio, Mora et al. 2007).

Alternativas mais sensíveis, porém mais caras que as tradicionais, são os diagnósticos baseados em técnicas imunológicas (imunofluorescência e imunoperoxidase) ou de biologia molecular (hibridação de DNA e PCR) (Rey 1992). Estudos mostram que as técnicas com DNA podem ainda permitir a determinação da espécie de *Leishmania* presente na lesão, sem o risco de reação cruzada (Castilho, Shaw et al. 2003).

Com relação ao tratamento das leishmanioses, o mais recomendado é a utilização de antimoniais pentavalentes, devido à rápida eliminação renal e limitada acumulação desses compostos nos tecidos. Dentre os antimoniais, os mais utilizados são o Glucantime e o Pentostan, que interferem na glicólise e  $\beta$ -oxidação de ácidos graxos (Balana-Fouce, Reguera et al. 1998), e devem ser administrados por via intravenosa, levando a necessidade de internação do paciente. Outra opção é a utilização de pentaminidinas, com poder curativo inferior e maior toxicidade com relação aos antimoniais, e ainda podem-se utilizar alguns antibióticos na falência dos antimoniais e pentaminidinas, como Anfotericina B e Rifampicina. No entanto, de maneira geral, a alta toxicidade de todas essas drogas e a resistência desenvolvida por algumas cepas de parasitas a esses produtos, exige a pesquisa sobre novos agentes terapêuticos (Rey 1992).

Um alvo potencial para o desenvolvimento de novas drogas antiparasitárias é a via de transporte e biossíntese de poliaminas desses parasitas, que parece ser essencial em *Leishmania* (Roberts, Tancer et al. 2004). Diferenças entre as vias metabólicas do parasita e do hospedeiro

podem ser consideradas alvos potenciais na interferência do processo proliferativo do parasita (Reguera, Tekwani et al. 2005).

Nesse sentido, foi desenvolvido um inibidor da ornitina descarboxilase (ODC), enzima que catalisa a conversão da ornitina para putrescina e representa o primeiro passo limitante na biossíntese de poliaminas, conhecido como DFMO (D,L- $\alpha$ -difluorometilornitina) (Pegg 1986). Esse inibidor se mostrou altamente eficaz contra a fase cerebral da doença do sono, causada por *Trypanosoma gambiense* (Van Nieuwenhove, Schechter et al. 1985), no entanto, se mostrou ineficaz no tratamento de outras parasitoses, como a doença de Chagas, leishmanioses e malária (Reguera, Tekwani et al. 2005).

#### **1.4. Metabolismo de L-arginina em *Leishmania***

A L-arginina é um dos aminoácidos mais versáteis metabolicamente, servindo como precursor não só na síntese de proteínas, como também na síntese de óxido nítrico (NO), uréia, ornitina, citrulina, creatinina, agmatina, glutamato, prolina e poliaminas (Wu e Morris 1998).

Esse aminoácido foi primeiramente isolado de sementes de lupulus, em 1886 (Schulze e Steiger 1886), e em seguida foi identificado como um componente protéico em animais (Hedin 1895). Em 1897, Schulze e Winterstein estabeleceram a estrutura da L-arginina por hidrólise alcalina, que levou a liberação de ornitina e uréia, e sua síntese foi descrita em 1910, a partir de benzoilornitina, por Sorensen. Em 1904, Kossel e Dakin identificaram no fígado de animais a enzima que hidrolisa arginina em ornitina e uréia, denominada arginase, mas foi a descoberta do ciclo da uréia, por Krebs e Henseleit em 1932 (Krebs e Henseleit 1932), que levou à elucidação dos papéis proeminentes da arginina em importantes vias metabólicas e fisiológicas (Wu e Morris 1998).

Logo, uma das enzimas envolvidas no catabolismo de L-arginina é a arginase, uma metaloenzima que utiliza esse aminoácido como substrato para produzir L-ornitina e uréia, dependente de  $Mn^{2+}$  (Reczkowski e Ash 1992; da Silva, da Silva et al. 2008), e pode funcionar como enzima

regulatória modulando a disponibilidade de arginina nas células onde é expressa (Wu e Morris 1998). Um dos produtos dessa via, a L-ornitina, é precursor na síntese de poliaminas, logo essa enzima também parece pode participar na regulação da síntese de poliaminas (Wu e Morris 1998). Corroborando, foi observado que a atividade de arginase geralmente é coinduzida com a de ODC, e que células deficientes em arginase não proliferam em meio de cultura sem soro, se não for adicionado ornitina ou poliaminas a esse (Holttta e Pohjanpelto 1982).

Os mamíferos possuem dois genes de arginase que codificam duas distintas isoenzimas, tipo I e II, similares quanto às propriedades enzimáticas, porém diferentes com relação à localização subcelular, distribuição tecidual, regulação de expressão e reatividade imunológica (Grody, Dizikes et al. 1987; Jenkinson, Grody et al. 1996). A arginase tipo I, citosólica, é altamente expressa no fígado como componente do ciclo da uréia; já a arginase tipo II, mitocondrial, é expressa nos rins, cérebro, intestino delgado, glândulas mamárias e macrófagos (Wu e Morris 1998). Células endoteliais de aorta de rato e macrófagos murinos expressam ambos os tipos de arginase, e provavelmente outros tipos celulares também expressem as duas isoenzimas (Wu e Morris 1998).

Nos protozoários de vida aquática, o excesso de nitrogênio pode ser eliminado diretamente na forma de amônia. No entanto, os organismos da família Trypanosomatidae apresentam uma interessante organização quanto à atividade de enzimas do ciclo da uréia, ou ciclo de Krebs-Heiselet (Krebs e Henseleit 1932). Inclusive, a expressão específica de algumas enzimas desse ciclo pode ser utilizada na identificação de organismos da família (Camargo, Sbravate et al. 1992; Camargo 1999). A arginase é uma das enzimas integrante desse ciclo nos animais ureotélicos cuja atividade se encontra expressa em alguns tripanosomatídeos, entre eles *Leishmania*. Inicialmente seu papel funcional foi associado somente aos processos metabólicos envolvidos na interconversão arginina-ornitina-citrulina (Camargo 1979).

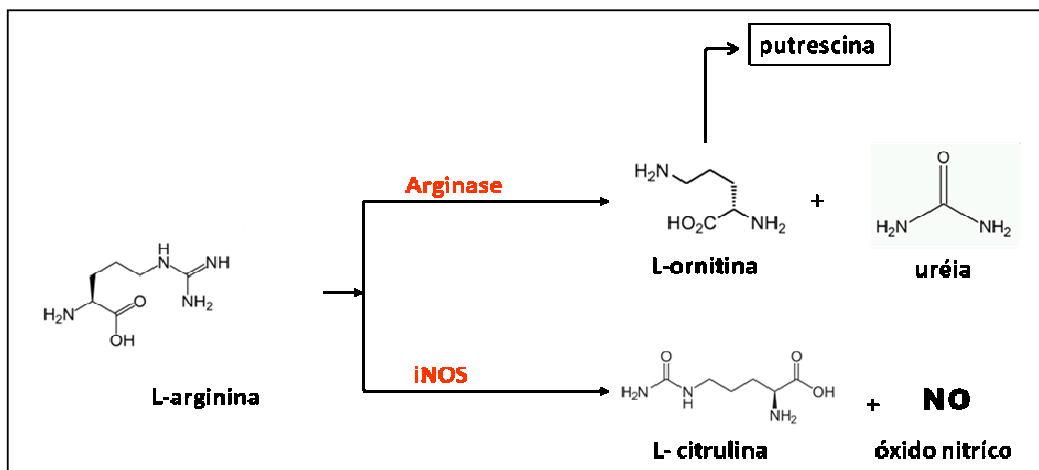
Por outro lado, em 1987, descobertas importantes mostraram que a arginina é também o aminoácido precursor na síntese de nitrito e nitrato em

mamíferos (Hibbs, Taintor et al. 1987), e paralelamente que o óxido nítrico (NO) é o fator de relaxamento derivado do endotélio (Palmer, Ferrige et al. 1987; Ignarro, Buga et al. 1987), descrito desde 1980 (Furchgott e Zawadzki 1980). Em seguida, o NO foi identificado como o intermediário ativo da via arginina-nitrito-nitrato em macrófagos (Hibbs, Taintor et al. 1988) (Marletta, Yoon et al. 1988) e células endoteliais (Palmer, Ashton et al. 1988). Atualmente, sabe-se que diversos tipos celulares utilizam a arginina na síntese de NO, que executa papéis importantes em diversos processos, como vasodilatação, resposta imune, neurotransmissão e adesão de plaquetas e leucócitos (Bredt e Snyder 1994; Moncada e Higgs 1995).

Em mamíferos, foram descritas 3 isoenzimas de óxido nítrico sintase (NOS), codificadas por diferentes genes: NOS neuronal (nNOS, tipo I), NOS induzida (iNOS, tipo II) e NOS endotelial (eNOS, tipo III). A maioria dos animais expressam a nNOS e a eNOS constitutivamente, em baixos níveis e em diversos tecidos, e essas isoenzimas são reguladas pelo complexo  $Ca^{2+}$ /calmodulina; já a iNOS, normalmente não é expressa na maioria das células, mas é altamente induzida por endotoxinas e citocinas inflamatórias em macrófagos (Wu e Morris 1998), e o principal efeito do NO produzido por essa via é antiproliferativo (Boucher, Moali et al. 1999).

Com isso, a arginase pode ser essencial na regulação da atividade de iNOS de macrófagos modulando a concentração de L-arginina (Fig. 2), conforme observado em estudos mostrando que a indução de arginase II leva à diminuição da produção de NO (Wang, Jenkinson et al. 1995), comprometendo o papel de defesa do macrófago. Corroborando com essa hipótese, ao utilizar um inibidor de arginase,  $N^0$ -hydroxyl-L-arginina, se observou uma diminuição na capacidade de *L. (L.) major* em estabelecer a infecção em macrófagos (Iniesta, Gomez-Nieto et al. 2001).

Curiosamente, enquanto o NO tem sido indicado como uma das principais moléculas microbicidas produzida pelos macrófagos contra parasitas como *Leishmania* (Boucher, Moali et al. 1999), demonstrou-se a existência de uma via de síntese de NO em alguns tripanossomatídeos, como *T. cruzi* (Paveto, Pereira et al. 1995) e diversas espécies de *Leishmania* (Basu, Kole et al. 1997; Genestra, de Souza et al. 2003). Estudos em *L. (L.)*



**Figura 2** – Esquema da metabolização de L-arginina pelas vias enzimáticas de arginase e iNOS.

*donovani* indicam que a NOS expressa por esses parasitas seria similar a isoforma I dos mamíferos (Basu, Kole et al. 1997). O papel do NO produzido parece ser muito importante biologicamente para o parasita, pois foi descrita uma relação direta entre a quantidade de NO produzido e a quantidade de formas metacíclicas infectivas em culturas de promastigotas de *L. (L.) amazonensis*, sugerindo a associação dessa via com a diferenciação e infectividade desses parasitas (Genestra, Souza et al. 2006).

Logo, a disponibilidade de L-arginina deve ser um ponto crítico em diversos organismos, regulando o sistema composto pelas diversas isoformas de arginase e NOS. Inclusive, durante a infecção de macrófagos por *Leishmania* esse sistema teria todas as suas variáveis presentes, a arginase II e a iNOS do macrófago, e a arginase e a NOS do parasita, assim a regulação desse sistema pela ativação ou inibição dessas enzimas e disponibilidade de L-arginina pode ser fundamental para a definição do destino da infecção.

### **1.5. A invasão do macrófago pela *Leishmania* e a resposta imune de mamíferos**

Conforme colocado no capítulo 1.2. (O ciclo de vida da *Leishmania*), no hospedeiro vertebrado esses parasitas se diferenciam em formas amastigotas que habitam os vacúolos digestivos que se fundem aos

lisossomos de macrófagos, formando os fagolisossomos (Rey 1992). Os macrófagos são justamente células de defesa dos mamíferos que, junto com os monócitos que os originam, entre outras células, constituem o sistema de fagócitos profissionais do organismo. Assim, os parasitas escapam da resposta humoral residindo dentro dos fagolisossomos dos macrófagos, e a resposta imunológica contra *Leishmania* é do tipo celular (Rey 1992).

Como células do sistema imune, uma das estratégias dos macrófagos no combate aos invasores é o “burst” oxidativo induzido com a fagocitose desses organismos. Para isso, a NADPH oxidase é ativada levando à transferência de prótons para moléculas de oxigênio, formando diversas moléculas altamente reativas, como superóxidos, peróxido de hidrogênio e radicais hidroxila, que interagem então com a membrana do patógeno (Cunningham 2002). Outro mecanismo de defesa dos macrófagos é a acidificação das vesículas pela ativação de próton ATPases, o que leva à desnaturação das proteínas, deixando os parasitas suscetíveis à ação de hidrolases ácidas (Cunningham 2002). A iNOS é outra enzima muito importante de resposta do macrófago, quando ativada, a iNOS produz citrulina e NO a partir da oxidação da L-arginina, sendo que o NO é uma molécula altamente reativa, efetora no combate a microorganismos invasores (Qadoumi, Becker et al. 2002).

Logo, para viver nos macrófagos, os parasitas do gênero *Leishmania* são capazes de se evadir desses mecanismos de defesa, resistindo ao pH ácido e às enzimas dos lisossomos. Nesse sentido, sabe-se que, primeiramente, as formas metacíclicas são resistentes a lise mediada pelo sistema complemento, principalmente pela presença de longas moléculas de lipofosfoglicanos (LPG) em sua superfície (Sacks, Pimenta et al. 1995). Já dentro dos macrófagos, graças às moléculas de LPG, esses parasitas inibem a fusão entre o fagossomo e o endossomo, e resistem às enzimas lisossomais (Descoteaux e Turco 1999). Além desses mecanismos de escape, sabe-se também que esses parasitas possuem mecanismos para a diminuição da atividade da enzima iNOS, responsável pela produção de NO, que, como já colocado, é o principal efetor do efeito antiproliferativo exercido por macrófagos ativados (Bogdan e Rollinghoff 1999).

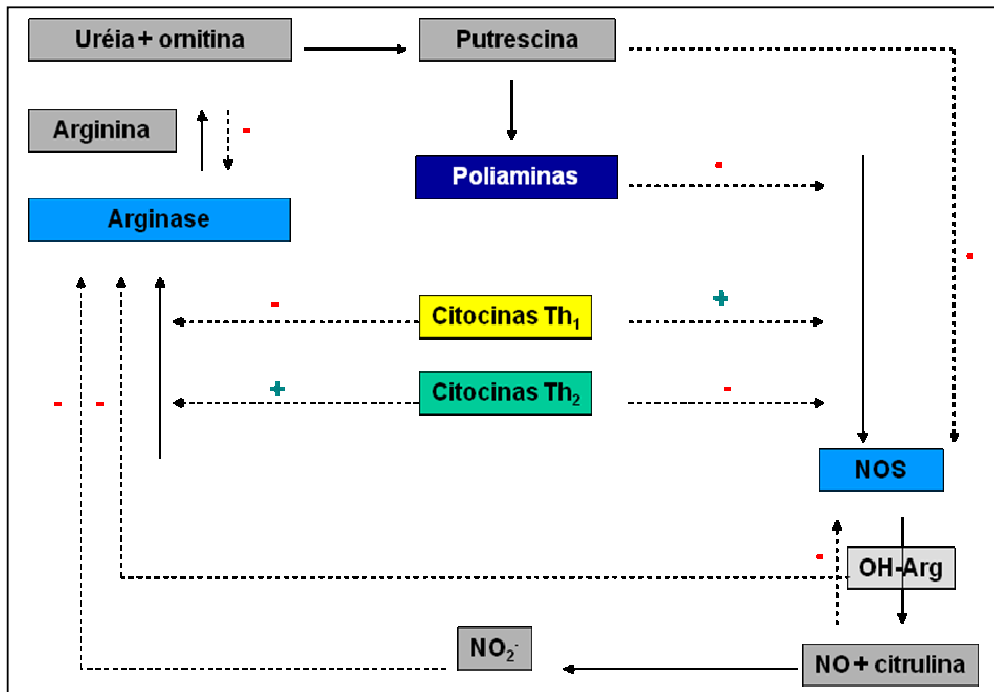


Assim, a regulação precisa da produção de NO é crucial para o hospedeiro, e a evolução da infecção depende também do balanço das respostas imune do tipo Th1 e Th2 que direcionam o metabolismo de arginina. A resposta Th1 implica em resposta imune celular, levando à ativação dos macrófagos e à opsonização; já a resposta Th2 direciona a defesa do organismo para resposta imune humoral, que, conforme colocamos previamente, não tem efeito sobre a infecção de macrófagos por *Leishmania* (Abbas, Lichtman et al. 2007). O balanço dessas respostas regula o metabolismo de L-arginina durante a infecção, como representado na figura 3, direcionando esse aminoácido para ser utilizado na via metabólica da arginase ou da iNOS. A citocina IFN- $\gamma$ , produzida durante a resposta Th1, induz a expressão de iNOS, enquanto isso, as citocinas IL-4 e IL-10, produzidas durante a resposta Th2, induzem a expressão de arginase (Corraliza, Soler et al. 1995). Também, foi verificada a ocorrência de dois estados metabólicos competitivos, onde a indução de uma dessas enzimas leva a inibição da outra (Hrabak, Bajor et al. 1996; Munder, Eichmann et al. 1998) (Fig. 3).

Com o estudo da regulação das respostas Th1/Th2 na leishmaniose, demonstrou-se que a suscetibilidade a infecção por *Leishmania* é mediada pela resposta Th2, via expressão de arginase e síntese de poliaminas, que favorece a replicação dos parasitas no macrófago e diminui a quantidade de arginina disponível para síntese de NO (Iniasta, Carcelen et al. 2005). Já a resposta Th1 ativa a iNOS e promove a morte dos parasitas pelos macrófagos, levando a resolução da infecção pelo hospedeiro vertebrado (Alexander e Bryson 2005; Wanasen e Soong 2008).

## **1.6. Glicossomos**

Uma característica das células eucarióticas é a compartimentalização de funções celulares em organelas, que em determinados protozoários podem ser desenvolvidas como estruturas altamente especializadas como resposta a ambientes inóspitos dos seus hospedeiros. Nesse contexto, os tripanossomatídeos desenvolveram os glicossomos, organelas únicas que



**Figura 3** – Esquema dos possíveis efeitos regulatórios no metabolismo de L-arginina em macrófagos. As citocinas das respostas imune Th1 e Th2 regulam a indução de óxido nítrico sintase (NOS) e arginase, respectivamente. Os produtos de cada enzima regulam reciprocamente a atividade da outra enzima. Os produtos finais de cada via, óxido nítrico (NO) e ornitina, inibem a enzima da própria via (NOS e arginase, respectivamente). As rotas metabólicas estão representadas por setas contínuas e as rotas regulatórias por setas descontínuas. + e – denotam ativação ou inibição, respectivamente. Modificado de (Hrabak, Bajor et al. 1996).

representam uma das principais diferenças entre parasita e hospedeiro, e por isso são muito estudadas como possíveis alvos de quimioterápicos (Smith e Parsons 1996).

Os glicossomos são organelas globulares com 0,2 a 0,3  $\mu\text{m}$ , envolvidas por uma bicamada fosfolipídica, sem material genético ou ribossomos (Opperdoes, Baudhuin et al. 1984). Encontra-se entre 10 e 100 glicossomos por célula em todos os organismos da ordem kinetoplastida (Smith e Parsons 1996).

Dentre as enzimas que compõem essa organela, a compartimentalização das sete primeiras enzimas da via glicolítica, e de duas enzimas que metabolizam glicerol nos glicossomos, permite a esses parasitas aumentar significativamente a taxa de glicólise e,

conseqüentemente, a produção de ATP. Com isso, os parasitas conseguem contornar a baixa produção de energia da conversão de glicose em piruvato durante a fase sanguínea do seu ciclo de vida (Smith e Parsons 1996).

Além das funções relacionadas à produção de energia, outras vias bioquímicas estão pelo menos parcialmente associadas aos glicossomos nesses parasitas, como a  $\beta$ -oxidação de ácidos graxos, a biossíntese de pirimidinas, entre outras (Smith e Parsons 1996).

As proteínas glicossomais são sintetizadas em ribossomos livres no citoplasma e então são transferidas para os glicossomos (Hart, Baudhuin et al. 1987), sem a necessidade de nenhuma modificação pós-tradução para a importação (Moyersoen, Choe et al. 2003).

Evolutivamente, estudos moleculares confirmaram que os glicossomos são derivados de uma organela ancestral relacionada aos peroxissomos, e a importação de proteínas com sinal peroxissomal ao glicossomo confirma a conservação do mecanismo de endereçamento de proteínas com um determinado sinal na terminação carboxila (Smith e Parsons 1996). Além disso, o mecanismo de importação de proteínas para o glicossomo, assim como no caso dos peroxissomos, envolve diversas proteínas PEX, fatores protéicos da biogênese de peroxissomos, que se mostraram essenciais para os tripanossomatídeos (Guerra-Giraldez, Quijada et al. 2002; Moyersoen, Choe et al. 2003; Krazy e Michels 2006).

Para identificar os sinais de endereçamento das proteínas glicossomais, diversos estudos realizaram fusões de proteínas repórter a seqüências de proteínas glicossomais que foram então expressas *in vivo* e analisadas quanto à localização celular (Smith e Parsons 1996).

Foi verificado que a maioria das enzimas peroxissomais apresentam o sinal PTS1 na terminação carboxila, que consiste em apenas 3 aminoácidos – SKL – ou uma variante conservativa desses. Algumas enzimas apresentam o sinal PTS2 na terminação amino, sendo que esse consiste em um sinal bipartido com a seqüência consenso [RK]-[LVI]-x5-[HQ]-[LA], e ainda há algumas proteínas que não possuem esses sinais canônicos (Opperdoes e Szikora 2006).

A análise computacional do genoma dos tripanossomatídeos *L. (L.) major*, *T. brucei* e *T. cruzi*, rastreando a presença dos sinais PTS1 e PTS2, identificou 191 proteínas putativas com o sinal PTS1 e 68 com o sinal PTS2, ou seja, aproximadamente 75% do total das proteínas endereçadas teriam o sinal PTS1 (Opperdoes e Szikora 2006).

Um importante mecanismo adaptativo desses parasitas é a regulação do conteúdo protéico glicossomal expresso durante o ciclo de vida dos kinetoplastídeos. No caso do *T. brucei*, durante a fase sanguínea esses parasitas encontram alta disponibilidade de glicose, e estão altamente adaptados para obter energia pela via glicolítica, e com isso as funções mitocondriais estão suprimidas; já na forma procíclica, dentro do inseto, a via mitocondrial de fosforilação oxidativa se torna a principal via de geração de ATP (Smith e Parsons 1996). Além disso, foi mostrado que a compartimentalização glicossomal da glicólise protege a forma sanguínea desses parasitas contra o acúmulo de intermediários tóxicos que, dada a disponibilidade constante de glicose para essa via autocatalítica, poderiam se acumular levando à morte desses organismos (Haanstra, van Tuijl et al. 2008).

### **1.7. Manipulação genética para o estudo de genes em tripanossomatídeos**

Diversas ferramentas moleculares permitiram o progresso do conhecimento de diferentes aspectos dos tripanossomatídeos, e a eficiência dessas novas ferramentas nesses parasitas tem conduzido a evolução de diferentes estudos da biologia desses organismos. Esses métodos permitem a investigação da função gênica, com a perda ou ganho de funções, e o estudo da localização das proteínas produzidas, com o uso de diversos “tags”, como a proteína fluorescente verde (GFP) (Beverley 2003).

Focando nas abordagens utilizadas neste trabalho, uma das ferramentas disponíveis são os vetores que permitem a expressão de proteínas heterólogas. Essas moléculas podem ser episomos circulares contendo os sinais de regulação de expressão específicos de

tripanossomatídeos (Papageorgiou e Soteriadou 2002; Smirlis, Bisti et al. 2006), ou cromossomos artificiais lineares, que são expressos quando integrados ao genoma desses organismos. Esses vetores podem ser introduzidos de forma transiente, ou estabilizados com o uso de marcas de seleção, positivas ( timidina quinase) ou negativas (antibióticos) (Beverley 2003).

Outra alternativa, muito usada em tripanossomatídeos, é a substituição gênica por recombinação homóloga, que deve ser realizada em dois passos para a obtenção de nocautes nulos, dado que esses organismos são diplóides. Para isso, em cada etapa, é introduzida no parasita uma molécula linear de DNA contendo uma marca seletiva flanqueada por regiões complementares às regiões à montante e à jusante do segmento alvo. Com isso é possível substituir a fase aberta de leitura (ORF) de genes e avaliar a função desse gene dado o impacto causado pela sua ausência (Cruz, Coburn et al. 1991).

A obtenção de nocautes nulos é geralmente simples quando o alvo é um gene não essencial, porém a tentativa de nocautear genes essenciais em *Leishmania* leva à geração de parasitas aneuplóides e poliplóides (Cruz, Titus et al. 1993). Essa questão pode ser contornada com o uso de moléculas que suplementem a ausência desse gene, como produtos posteriores da via metabólica afetada (Roberts, Tancer et al. 2004), ou com a expressão heteróloga ectópica do gene alvo ou de uma enzima que faça parte de uma via metabólica alternativa, contornando a ausência do alvo (Balana-Fouce, Garcia-Estrada et al. 2008; Murta, Vickers et al. 2009).

Recentemente, uma nova técnica foi descrita capaz de regular a função gênica em nível protéico, o que é especialmente interessante considerando as particularidades dos tripanossomatídeos com relação à expressão gênica. Banaszynski e colaboradores descreveram um sistema onde os níveis protéicos são controlados pela degradação regulada de um domínio *cis* ligado à proteína de interesse, sendo que esse domínio consiste em uma seqüência modificada da proteína humana FKBP12, que se liga seletivamente a FK506 (análogo da rapamicina) e Shld1. Na presença desses ligantes específicos, o domínio de desestabilização (dd) FKBP é

estável, conferindo estabilidade à proteína fundida a ele; no entanto, na ausência desses ligantes a estrutura do dd é desestabilizada, endereçando a proteína fundida para rotas de degradação (Banaszynski, Chen et al. 2006). Esse novo método já foi aplicado, com sucesso, aos parasitas *Plasmodium falciparum* (Armstrong e Goldberg 2007), *Toxoplasma gondii* (Herm-Gotz, Agop-Nersesian et al. 2007), *L. major* e *L. braziliensis* (Madeira da Silva, Owens et al. 2009).

## 2. Objetivos

Tendo em vista a contribuição no esclarecimento do papel da arginase de *L. (L.) amazonensis* no mecanismo de subversão desse parasita durante a infecção, elucidando a função da arginase de *L. (L.) amazonensis* no ciclo de vida do parasita, este trabalho tem por objetivos gerais:

- Localizar por imunofluorescência a arginase na forma promastigota de *L. (L.) amazonensis*.
- Verificar se ocorre redirecionamento da arginase durante a infecção pelo parasita.
- Verificar a importância fisiológica da compartimentalização da arginase para o parasita.

### 2.1. Objetivos específicos

- Expressar e purificar arginase recombinante de *L. (L.) amazonensis*.
- Produzir soros policlonais anti-arginase de *L. (L.) amazonensis* em camundongo e coelho.
- Imunolocalizar a arginase de *L. (L.) amazonensis* na forma promastigota e na forma amastigota, durante a infecção de macrófagos.
- Superexpressar a arginase com e sem o sinal de endereçamento para glicosomo em *L. (L.) amazonensis*.
- Obter parasitas *L. (L.) amazonensis* com um alelo do gene da arginase nocauteado.
- Obter um nocaute funcional de arginase em *L. (L.) amazonensis*, cuja expressão de arginase, endereçada ou não para o glicosomo, ocorra exclusivamente na presença de um ligante específico.
- Obter parasitas *L. (L.) amazonensis* com os dois alelos do gene da arginase nocauteado.
- Avaliar a expressão de arginase e verificar o poder infectivo de todos os mutantes obtidos.

### 3. Conclusões

- Pelo menos um dos dois átomos de  $Mn^{2+}$ , presente em cada monômero da arginase, está fortemente associado a essa, mas o fracionamento em SDS-PAGE sempre produz um "doublet" de bandas.
- A arginase de *L. (L.) amazonensis* apresenta localização compartimentalizada no glicossomo tanto na forma promastigota como amastigota.
- Em mutantes de *L. (L.) amazonensis* superexpressores de arginase, com o sinal de endereçamento para o glicossomo (SKL), observamos aumento na quantidade de mRNA transcrito de arginase, aumento na massa protéica e atividade enzimática relativa à arginase, mas diminuição na concentração celular atingida na fase estacionária de crescimento, e diminuição da infectividade, quando comparados aos parasitas selvagens.
- Em mutantes de *L. (L.) amazonensis* superexpressores de arginase sem sinal de endereçamento para glicossomo (SKL), observamos aumento na quantidade de mRNA transcrito de arginase, manutenção ou diminuição na massa protéica e atividade enzimática relativa à arginase, manutenção ou diminuição na concentração celular atingida na fase estacionária de crescimento, e diminuição da infectividade, quando comparados aos parasitas selvagens.
- Obtivemos mutantes de *L. (L.) amazonensis* com um alelo do gene da arginase nocauteado por recombinação homóloga. Esses foram utilizados em uma segunda etapa de transfecção com construções para obtenção de mutantes nulos funcionais, com o domínio de degradação ddFKBP, ou nocaute dos dois alelos. Para isso foi



necessário complementar a cultura com putrescina, o que indica que a arginase desempenha papel essencial no parasita.

- Os parasitas heterozigotos, com um alelo da arginase nocauteado, apresentaram diminuição na massa protéica e atividade enzimática relativa à arginase, quando comparados com os parasitas selvagens.
- Os mutantes de *L. (L.) amazonensis* ARG-/kiddARG, com um alelo do gene da arginase nocauteado e o segundo alelo substituído por um cassete contendo o segmento ddFKP-ARG, não foram funcionais, ou seja, a presença de ligantes para estabilização do domínio ddFKBP não estabilizou a fusão. Em ensaios de “Western blot” com extrato protéico desses mutantes, não foi possível detectar marcação relativa à arginase.
- A construção obtida contendo a fusão ddFKBP-ARG não é funcional, pois não é capaz de regular a expressão de arginase nos mutantes de *L. (L.) amazonensis* ARG-/kiddARG, e também não foi capaz de suplementar a ausência de arginase nativa em *L. (L.) major* com o gene de arginase nocauteado.
- O sistema ddFKBP é funcional em *L. (L.) amazonensis*.
- Mutantes de *L. (L.) amazonensis* com os dois alelos do gene da arginase nocauteado por recombinação homóloga mostraram em seu fenótipo ausência de arginase detectável em “Western blot”, e ausência de atividade enzimática relativa à arginase, quanto à produção de uréia.
- A arginase de *L. (L.) amazonensis* pode desempenhar um papel regulador de resposta imune Th1/Th2, modulando a disponibilidade de arginina e/ ou modulando as atividades da arginase do macrófago e NOS, tanto do parasita como do macrófago, ao mesmo tempo em que

promove ou diminui o crescimento do parasita, produzido mais ou menos poliaminas.

## Bibliografia

- Abbas, A. K., A. H. Lichtman, et al. (2007). Cellular and molecular immunology. Philadelphia, Saunders Elsevier.
- Alexander, J. and K. Bryson (2005). "T helper (h)1/Th2 and Leishmania: paradox rather than paradigm." Immunol Lett **99**(1): 17-23.
- Armstrong, C. M. and D. E. Goldberg (2007). "An FKBP destabilization domain modulates protein levels in Plasmodium falciparum." Nat Methods **4**(12): 1007-1009.
- Ashford, R. W. (2000). "The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses." Int J Parasitol **30**(12-13): 1269-1281.
- Balana-Fouce, R., C. Garcia-Estrada, et al. (2008). "Gene disruption of the DNA topoisomerase IB small subunit induces a non-viable phenotype in the hemoflagellate Leishmania major." BMC Microbiol **8**: 113.
- Balana-Fouce, R., R. M. Reguera, et al. (1998). "The pharmacology of leishmaniasis." Gen Pharmacol **30**(4): 435-443.
- Banaszynski, L. A., L. C. Chen, et al. (2006). "A rapid, reversible, and tunable method to regulate protein function in living cells using synthetic small molecules." Cell **126**(5): 995-1004.
- Barrio, A., M. C. Mora, et al. (2007). "Use of kDNA-based polymerase chain reaction as a sensitive and differentially diagnostic method of American Tegumentary Leishmaniasis in disease-endemic areas of northern Argentina." Am J Trop Med Hyg **77**(4): 636-639.
- Basu, N. K., L. Kole, et al. (1997). "Isolation of a nitric oxide synthase from the protozoan parasite, Leishmania donovani." FEMS Microbiol Lett **156**(1): 43-47.
- Beverley, S. M. (2003). "Protozoomics: trypanosomatid parasite genetics comes of age." Nat Rev Genet **4**(1): 11-19.
- Birk, Y. (1985). "The Bowman-Birk inhibitor. Trypsin- and chymotrypsin-inhibitor from soybeans." Int J Pept Protein Res **25**(2): 113-131.
- Birnboim, H. C. and J. Doly (1979). "A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA." Nucleic Acids Res **7**(6): 1513-1523.

- Bogdan, C. and M. Rollinghoff (1999). "How do protozoan parasites survive inside macrophages?" Parasitol Today **15**(1): 22-28.
- Boucher, J. L., C. Moali, et al. (1999). "Nitric oxide biosynthesis, nitric oxide synthase inhibitors and arginase competition for L-arginine utilization." Cell Mol Life Sci **55**(8-9): 1015-1028.
- Bredt, D. S. and S. H. Snyder (1994). "Nitric oxide: a physiologic messenger molecule." Annu Rev Biochem **63**: 175-195.
- Camargo, E. P. (1979). Enzimas do ciclo ornitina-arginina em tripanosomatídeos: significado fisiológico e valor taxonômico. Instituto de Química. São Paulo, Universidade de São Paulo.
- Camargo, E. P. (1999). "Phytomonas and other trypanosomatid parasites of plants and fruit." Adv Parasitol **42**: 29-112.
- Camargo, E. P., C. Sbravate, et al. (1992). "Ribosomal DNA restriction analysis and synthetic oligonucleotide probing in the identification of genera of lower trypanosomatids." J Parasitol **78**(1): 40-48.
- Carvajal, N., M. Salas, et al. (1999). "Manganese-dependent inhibition of human liver arginase by borate." J Inorg Biochem **77**(3-4): 163-167.
- Castilho, T. M., J. J. Shaw, et al. (2003). "New PCR assay using glucose-6-phosphate dehydrogenase for identification of Leishmania species." J Clin Microbiol **41**(2): 540-546.
- Corraliza, I. M., G. Soler, et al. (1995). "Arginase induction by suppressors of nitric oxide synthesis (IL-4, IL-10 and PGE2) in murine bone-marrow-derived macrophages." Biochem Biophys Res Commun **206**(2): 667-673.
- Cruz, A., C. M. Coburn, et al. (1991). "Double targeted gene replacement for creating null mutants." Proc Natl Acad Sci U S A **88**(16): 7170-7174.
- Cruz, A. K., R. Titus, et al. (1993). "Plasticity in chromosome number and testing of essential genes in Leishmania by targeting." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(4): 1599-1603.
- Cunningham, A. C. (2002). "Parasitic adaptive mechanisms in infection by leishmania." Exp Mol Pathol **72**(2): 132-141.
- da Silva, E. R. (2001). Caracterização do gene da arginase de Leishmania Leishmania amazonensis e sua expressão em Escherichia coli. .

Instituto de Ciencias Biomedicas. Sao Paulo, Universidade de Sao Paulo. **doutorado**.

- da Silva, E. R., T. M. Castilho, et al. (2002). "Genomic organisation and transcription characterisation of the gene encoding Leishmania (Leishmania) amazonensis arginase and its protein structure prediction." Int J Parasitol **32**(6): 727-737.
- da Silva, E. R., M. F. da Silva, et al. (2008). "Biochemical and biophysical properties of a highly active recombinant arginase from Leishmania (Leishmania) amazonensis and subcellular localization of native enzyme." Mol Biochem Parasitol **159**(2): 104-111.
- da Silva, R. and D. L. Sacks (1987). "Metacyclogenesis is a major determinant of Leishmania promastigote virulence and attenuation." Infect Immun **55**(11): 2802-2806.
- de Andrade Stempliuk, V. and L. M. Floeter-Winter (2002). "Functional domains of the rDNA promoter display a differential recognition in Leishmania." Int J Parasitol **32**(4): 437-447.
- Descoteaux, A. and S. J. Turco (1999). "Glycoconjugates in Leishmania infectivity." Biochim Biophys Acta **1455**(2-3): 341-352.
- Faber, W. R., L. Oskam, et al. (2003). "Value of diagnostic techniques for cutaneous leishmaniasis." J Am Acad Dermatol **49**(1): 70-74.
- Franke, E. D., P. B. McGreevy, et al. (1985). "Growth cycle-dependent generation of complement-resistant Leishmania promastigotes." J Immunol **134**(4): 2713-2718.
- Fung, K. and C. Clayton (1991). "Recognition of a peroxisomal tripeptide entry signal by the glycosomes of Trypanosoma brucei." Mol Biochem Parasitol **45**(2): 261-264.
- Furchgott, R. F. and J. V. Zawadzki (1980). "The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine." Nature **288**(5789): 373-376.
- Gaur, U., S. C. Roberts, et al. (2007). "An effect of parasite-encoded arginase on the outcome of murine cutaneous leishmaniasis." J Immunol **179**(12): 8446-8453.

- Genestra, M., W. J. de Souza, et al. (2003). "Comparative analysis of the nitric oxide production by *Leishmania* sp." Med Microbiol Immunol **192**(4): 217-223.
- Genestra, M., W. J. Souza, et al. (2006). "Nitric oxide biosynthesis by *Leishmania amazonensis* promastigotes containing a high percentage of metacyclic forms." Arch Microbiol **185**(5): 348-354.
- Grody, W. W., G. J. Dizikes, et al. (1987). "Human arginase isozymes." Isozymes Curr Top Biol Med Res **13**: 181-214.
- Guerra-Giraldez, C., L. Quijada, et al. (2002). "Compartmentation of enzymes in a microbody, the glycosome, is essential in *Trypanosoma brucei*." J Cell Sci **115**(Pt 13): 2651-2658.
- Ha, D. S., J. K. Schwarz, et al. (1996). "Use of the green fluorescent protein as a marker in transfected *Leishmania*." Mol Biochem Parasitol **77**(1): 57-64.
- Haanstra, J. R., A. van Tuijl, et al. (2008). "Compartmentation prevents a lethal turbo-explosion of glycolysis in trypanosomes." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(46): 17718-17723.
- Hall, T.A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucl. Acids. Symp. Ser. **41**: 95-98.
- Hart, D. T., P. Baudhuin, et al. (1987). "Biogenesis of the glycosome in *Trypanosoma brucei*: the synthesis, translocation and turnover of glycosomal polypeptides." EMBO J **6**(5): 1403-1411.
- Hedin, S. G. (1895). "Eine Methode das Lysin zu isoliren, nebst einigen Bemerkungen uber das Lysatinin. ." Z Physiol Chem **21**: 297-305.
- Herm-Gotz, A., C. Agop-Nersesian, et al. (2007). "Rapid control of protein level in the apicomplexan *Toxoplasma gondii*." Nat Methods **4**(12): 1003-1005.
- Hibbs, J. B., Jr., R. R. Taintor, et al. (1987). "Macrophage cytotoxicity: role for L-arginine deiminase and imino nitrogen oxidation to nitrite." Science **235**(4787): 473-476.

- Hibbs, J. B., Jr., R. R. Taintor, et al. (1988). "Nitric oxide: a cytotoxic activated macrophage effector molecule." Biochem Biophys Res Commun **157**(1): 87-94.
- Holtta, E. and P. Pohjanpelto (1982). "Polyamine dependence of Chinese hamster ovary cells in serum-free culture is due to deficient arginase activity." Biochim Biophys Acta **721**(4): 321-327.
- Hrabak, A., T. Bajor, et al. (1996). "The inhibitory effect of nitrite, a stable product of nitric oxide (NO) formation, on arginase." FEBS Lett **390**(2): 203-206.
- Ignarro, L. J., G. M. Buga, et al. (1987). "Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide." Proc Natl Acad Sci U S A **84**(24): 9265-9269.
- Iniesta, V., J. Carcelen, et al. (2005). "Arginase I induction during Leishmania major infection mediates the development of disease." Infect Immun **73**(9): 6085-6090.
- Iniesta, V., L. C. Gomez-Nieto, et al. (2001). "The inhibition of arginase by N(omega)-hydroxy-L-arginine controls the growth of Leishmania inside macrophages." J Exp Med **193**(6): 777-784.
- Ivens, A. C., C. S. Peacock, et al. (2005). "The genome of the kinetoplastid parasite, Leishmania major." Science **309**(5733): 436-442.
- Jeffcoate, S. L. and N. White (1974). "Use of benzamidine to prevent the destruction of thyrotropin-releasing hormone (TRH) by blood." J Clin Endocrinol Metab **38**(1): 155-157.
- Jenkinson, C. P., W. W. Grody, et al. (1996). "Comparative properties of arginases." Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol **114**(1): 107-132.
- Kapler, G. M., C. M. Coburn, et al. (1990). "Stable transfection of the human parasite Leishmania major delineates a 30-kilobase region sufficient for extrachromosomal replication and expression." Mol Cell Biol **10**(3): 1084-1094.
- Krazy, H. and P. A. Michels (2006). "Identification and characterization of three peroxins--PEX6, PEX10 and PEX12--involved in glycosome

- biogenesis in *Trypanosoma brucei*." Biochim Biophys Acta **1763**(1): 6-17.
- Krebs, H. A. and K. Henseleit (1932). "Studies on urea formation in the animal organism." Z. Physiol. Chem. **210**: 33-66.
- Kuge, O. and M. Nishijima (1997). "Phosphatidylserine synthase I and II of mammalian cells." Biochim Biophys Acta **1348**(1-2): 151-156.
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." Nature **227**(5259): 680-685.
- Louassini, M., M. Foulquie, et al. (1999). "Citric-acid cycle key enzyme activities during in vitro growth and metacyclogenesis of *Leishmania infantum* promastigotes." J Parasitol **85**(4): 595-602.
- Madeira da Silva, L., K. L. Owens, et al. (2009). "Regulated expression of the *Leishmania major* surface virulence factor lipophosphoglycan using conditionally destabilized fusion proteins." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(18): 7583-7588.
- Marletta, M. A., P. S. Yoon, et al. (1988). "Macrophage oxidation of L-arginine to nitrite and nitrate: nitric oxide is an intermediate." Biochemistry **27**(24): 8706-8711.
- Medina-Acosta, E. and G. A. Cross (1993). "Rapid isolation of DNA from trypanosomatid protozoa using a simple 'mini-prep' procedure." Mol Biochem Parasitol **59**(2): 327-329.
- Moncada, S. and E. A. Higgs (1995). "Molecular mechanisms and therapeutic strategies related to nitric oxide." FASEB J **9**(13): 1319-1330.
- Moss, D. E. and D. Fahrney (1978). "Kinetic analysis of differences in brain acetylcholinesterase from fish or mammalian sources." Biochem Pharmacol **27**(23): 2693-2698.
- Moyersoen, J., J. Choe, et al. (2003). "Characterization of *Trypanosoma brucei* PEX14 and its role in the import of glycosomal matrix proteins." Eur J Biochem **270**(9): 2059-2067.
- Mullis, K., F. Faloona, et al. (1986). "Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction." Cold Spring Harb Symp Quant Biol **51 Pt 1**: 263-273.



- Munder, M., K. Eichmann, et al. (1998). "Alternative metabolic states in murine macrophages reflected by the nitric oxide synthase/arginase balance: competitive regulation by CD4+ T cells correlates with Th1/Th2 phenotype." J Immunol **160**(11): 5347-5354.
- Murta, S. M., T. J. Vickers, et al. (2009). "Methylene tetrahydrofolate dehydrogenase/cyclohydrolase and the synthesis of 10-CHO-THF are essential in *Leishmania major*." Mol Microbiol **71**(6): 1386-1401.
- Nourbakhsh, F., S. R. Uliana, et al. (1996). "Characterisation and expression of a stage-regulated gene of *Leishmania major*." Mol Biochem Parasitol **76**(1-2): 201-213.
- Opperdoes, F. R., P. Baudhuin, et al. (1984). "Purification, morphometric analysis, and characterization of the glycosomes (microbodies) of the protozoan hemoflagellate *Trypanosoma brucei*." J Cell Biol **98**(4): 1178-1184.
- Opperdoes, F. R. and J. P. Szikora (2006). "In silico prediction of the glycosomal enzymes of *Leishmania major* and trypanosomes." Mol Biochem Parasitol **147**(2): 193-206.
- Palmer, R. M., D. S. Ashton, et al. (1988). "Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine." Nature **333**(6174): 664-666.
- Palmer, R. M., A. G. Ferrige, et al. (1987). "Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor." Nature **327**(6122): 524-526.
- Papageorgiou, F. T. and K. P. Soteriadou (2002). "Expression of a novel *Leishmania* gene encoding a histone H1-like protein in *Leishmania major* modulates parasite infectivity in vitro." Infect Immun **70**(12): 6976-6986.
- Paveto, C., C. Pereira, et al. (1995). "The nitric oxide transduction pathway in *Trypanosoma cruzi*." J Biol Chem **270**(28): 16576-16579.
- Pegg, A. E. (1986). "Recent advances in the biochemistry of polyamines in eukaryotes." Biochem J **234**(2): 249-262.
- Penha, L. L., C. B. Sant'Anna, et al. (2009). "Sorting of phosphoglucomutase to glycosomes in *Trypanosoma cruzi* is mediated by an internal domain." Glycobiology **19**(12): 1462-1472.

- Qadoumi, M., I. Becker, et al. (2002). "Expression of inducible nitric oxide synthase in skin lesions of patients with american cutaneous leishmaniasis." Infect Immun **70**(8): 4638-4642.
- Reczkowski, R. S. and D. E. Ash (1992). "EPR Evidence for Binuclear Mn(II) Centers in Rat Liver Arginase." J Am Chem Soc **114**: 10992-10994.
- Reguera, R. M., R. Balana-Fouce, et al. (2009). "Leishmania major lacking arginase (ARG) are auxotrophic for polyamines but retain infectivity to susceptible BALB/c mice." Mol Biochem Parasitol **165**(1): 48-56.
- Reguera, R. M., B. L. Tekwani, et al. (2005). "Polyamine transport in parasites: a potential target for new antiparasitic drug development." Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol **140**(2): 151-164.
- Reinach, F. C. and R. Karlsson (1988). "Cloning, expression, and site-directed mutagenesis of chicken skeletal muscle troponin C." J Biol Chem **263**(5): 2371-2376.
- Rey, L. (1992). Bases da parasitologia médica. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan.
- Roberts, S. C., M. J. Tancer, et al. (2004). "Arginase plays a pivotal role in polyamine precursor metabolism in Leishmania. Characterization of gene deletion mutants." J Biol Chem **279**(22): 23668-23678.
- Ross, R. (1903). "(a) Note on the bodies recently described by Leishman and Donovan." British Medical Journal **2**: 1261.
- Sacks, D. L., P. F. Pimenta, et al. (1995). "Stage-specific binding of Leishmania donovani to the sand fly vector midgut is regulated by conformational changes in the abundant surface lipophosphoglycan." J Exp Med **181**(2): 685-697.
- Salas, M., R. Rodriguez, et al. (2002). "Insights into the reaction mechanism of Escherichia coli agmatinase by site-directed mutagenesis and molecular modelling." Eur J Biochem **269**(22): 5522-5526.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch, et al. (1989). Molecular Cloning: a laboratory manual. New York, Cold Spring Harbour Laboratory Press.
- Sanger, F. and A. R. Coulson (1975). "A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase." J Mol Biol **94**(3): 441-448.

- Saúde, F.-M. d. (2002) "Leishmanioses." Boletim Eletronico Epidemiologico **06**.
- Saúde, M. r. d. (2000). Manual de Controle da Leishmaniose Tegumentar Americana. Brasília.
- Saúde., B. M. r. d. S. d. S. d. V. n. e. (2007). Manual de Vigilaçāncia da Leishmaniose Tegumentar Americana. Brasília, Editora do Ministério da Saúde.
- Schulze, E. and E. Steiger (1886). "Ueber das Arginin." Z Physiol Chem **11**: 43-65.
- Scolnick, L. R., Z. F. Kanyo, et al. (1997). "Altering the binuclear manganese cluster of arginase diminishes thermostability and catalytic function." Biochemistry **36**(34): 10558-10565.
- Shapiro, S. Z., J. Naessens, et al. (1984). "Analysis by flow cytometry of DNA synthesis during the life cycle of African trypanosomes." Acta Trop **41**(4): 313-323.
- Shih, S., H. Y. Hwang, et al. (1998). "Localization and targeting of the Leishmania donovani hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase to the glycosome." J Biol Chem **273**(3): 1534-1541.
- Simao, R. C. and S. L. Gomes (2001). "Structure, expression, and functional analysis of the gene coding for calmodulin in the chytridiomycete Blastocladiella emersonii." J Bacteriol **183**(7): 2280-2288.
- Smirlis, D., S. N. Bisti, et al. (2006). "Leishmania histone H1 overexpression delays parasite cell-cycle progression, parasite differentiation and reduces Leishmania infectivity in vivo." Mol Microbiol **60**(6): 1457-1473.
- Smith, D. F. and M. Parsons (1996). Molecular biology of parasitic protozoa. Oxford ; New York, IRL Press at Oxford University Press.
- Towbin, H., T. Staehelin, et al. (1979). "Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications." Proc Natl Acad Sci U S A **76**(9): 4350-4354.
- Uliana, S.R., Affonso, M. H., Camargo, E. P., Floeter-Winter, L. M. (1991). "Leishmania: genus identification based on a specific sequence of the 18S ribosomal RNA sequence." Exp Parasitol. **72**(2):157-63.

- Van Nieuwenhove, S., P. J. Schechter, et al. (1985). "Treatment of gambiense sleeping sickness in the Sudan with oral DFMO (DL-alpha-difluoromethylornithine), an inhibitor of ornithine decarboxylase; first field trial." Trans R Soc Trop Med Hyg **79**(5): 692-698.
- Vincendeau, P., A. P. Gobert, et al. (2003). "Arginases in parasitic diseases." Trends Parasitol **19**(1): 9-12.
- Wanasen, N. and L. Soong (2008). "L-arginine metabolism and its impact on host immunity against Leishmania infection." Immunol Res **41**(1): 15-25.
- Wang, W. W., C. P. Jenkinson, et al. (1995). "Co-induction of arginase and nitric oxide synthase in murine macrophages activated by lipopolysaccharide." Biochem Biophys Res Commun **210**(3): 1009-1016.
- WHO. (2010). "<http://www.who.int/topics/leishmaniasis/en/>." Retrieved 10 de janeiro, 2010.
- Wu, G. and S. M. Morris, Jr. (1998). "Arginine metabolism: nitric oxide and beyond." Biochem J **336 ( Pt 1)**: 1-17.