

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA  
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ**

**Curso de Pós-Graduação em Patologia**

**A relação arginase-óxido nítrico na infecção  
experimental por *Leishmania braziliensis***

**RÔMULO CARVALHO SANTIAGO**

**Orientadora: Camila Indiani de Oliveira**

**Dissertação apresentada  
ao curso de Pós  
Graduação em Patologia  
para a obtenção do grau  
de Mestre em Patologia  
Experimental.**

**Salvador-Bahia-Brasil**

**2013**

**A relação arginase-óxido nítrico na infecção  
experimental por *Leishmania braziliensis***

**RÔMULO CARVALHO SANTIAGO**

**FOLHA DE APROVAÇÃO  
COMISSÃO EXAMINADORA**

Dr(a). \_\_\_\_\_

Dr(a). \_\_\_\_\_

---

**Dra. Camila Indiani de Oliveira**

**Pesquisadora**

## **AGRADECIMENTOS**

---

Agradeço:

À prof<sup>a</sup> Camila Indiani de Oliveira pela orientação, pelos ensinamentos, pela dedicação e pela paciência em todos os momentos;

À prof<sup>a</sup> Valeria M. Borges e a Jaqueline França-Costa pelas sugestões enriquecedoras;

À prof<sup>a</sup> Aldina Barral por acolher-me no LIP;

Aos colegas e amigos do LIP e LIMI por estarem sempre presentes e dispostos a ajudar;

À equipe da prof<sup>a</sup> Camila: Márcia, Diego, Fabiana, Sarah, Kyioshi e Rebecca, pela colaboração e amizade;

À Fernanda Novais pelos ensinamentos fundamentais e pela inspiração;

À minha mãe Evanildes, ao meu pai Antônio e, ao meu irmão, Wagner, que sempre acreditaram, apoiaram e torceram por mim;

Aos meus tios e primos pela torcida;

À equipe Saúde Odonto, em especial à Daiane, pela paciência;

Aos professores e funcionários PgPat pela ajuda na minha formação;

Aos amigos conquistados durante o período do mestrado, principalmente: Grazielle, Kleverton, Vinícius, Katrine e Marieta, por toda ajuda e por tornar esta fase ainda mais agradável;

A todos os amigos que estiveram sempre comigo durante este período, em especial, ao Neto, à Soninha, ao João Henrique, à Gardênia e ao Glauco e,

Ao CNPq pelo suporte financeiro

# SUMÁRIO

---

<b>LISTA DE ABREVIATURAS.....</b>	<b>6</b>
<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>7</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>9</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>10</b>
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>11</b>
1.1. Arginase e NOS .....	11
1.2. iNOS e Arginase na Leishmaniose Tegumentar Experimental .....	13
1.3 LT causada por <i>L. braziliensis</i> .....	17
<b>2. OBJETIVO GERAL.....</b>	<b>21</b>
2.1. Objetivos específicos .....	21
<b>3. DESENHO EXPERIMENTAL.....</b>	<b>22</b>
3.1. Infecção experimental por <i>L. braziliensis</i> .....	22
3.2. Efeito da inibição da atividade da arginase <i>in vivo</i> . .....	22
3.3. Efeito da suplementação com L-arginina <i>in vivo</i> . .....	23
3.4. Efeito do IL-4 e IFN-g sobre macrófagos infectados por <i>L. braziliensis</i> ...	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>24</b>
4.1. Camundongos.....	24
4.2. Parasitas .....	24
4.3. Infecção intradérmica.....	24
4.4. Carga parasitária .....	25
4.5. Atividade da arginase .....	25
4.6. Dosagem de NO .....	25
4.7. Imunohistoquímica.....	26
4.8. Dosagem de citocinas.....	27
4.9. Inibição da Arginase .....	28
4.10. Tratamento com L-arginina.....	28
4.11. Obtenção de macrófagos residentes e infecção com <i>L. braziliensis</i> .....	28
4.12. Análise estatística. ....	29
<b>5. RESULTADOS.....</b>	<b>30</b>
5.1. Infecção experimental de camundongos Balb/c por <i>L. braziliensis</i> .....	30
5.2. Atividade da arginase e produção de NO durante a infecção por <i>L. braziliensis</i> .....	31
5.4. Inibição competitiva da arginase durante a infecção por <i>L. braziliensis</i> .....	39

5.5. Atividade da arginase e produção de NO em animais infectados por <i>L. braziliensis</i> e tratados com nor-NOHA.....	41
5.6 Perfil de citocinas no LNd de animais infectados por <i>L. braziliensis</i> e tratados com Nor-NOHA .....	43
5.7. Aumento da disponibilidade de L-arginina durante a infecção por <i>L. braziliensis</i> .....	46
5.8. Atividade da arginase e produção de NO em animais tratados com L-arginina e infectados por <i>L. braziliensis</i> .....	47
5.9. Perfil de citocinas no LNd de camundongos tratados com L-arginina e infectados por <i>L. braziliensis</i> .....	50
5.10. Infecção de macrófagos de camundongos BALB/c por <i>L. braziliensis</i> na presença de citocinas pro e anti-inflamatórias.....	51
<b>6. DISCUSSÃO .....</b>	<b>54</b>
<b>7. CONCLUSÕES .....</b>	<b>60</b>
<b>8. BIBLIOGRAFIA .....</b>	<b>61</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS

---

- HE – Hematoxilina & Eosina
- IFN -g – Interferon - gama
- IL-4 – Interleucina - 4
- IL-10 – Interleucina - 10
- IL-12 – Interleucina - 12
- Lb – *L. braziliensis*
- LCD – Leishmaniose Cutânea Difusa
- LCL – Leishmaniose Cutânea Localizada
- LCM – Leishmaniose Cutâneo Mucosa
- LNd – Linfonodo de drenagem
- LT – Leishmaniose Tegumentar
- LV – Leishmaniose Visceral
- OAT – Ornitina aminotransferase
- ODC – Ornitina descarboxilase
- ROS – espécies reativas de oxigênio (*reactive oxygen species*)
- mRNA – RNA mensageiro
- TGF-b – Fator de crescimento transformante – beta (*Transforming Growth Factor – beta*)
- Th – T auxiliadora (*T helper*)
- TNF-a– Fator de Necrose Tumoral - alfa (*Tumoral Necrosis Factor - alpha*)
- Treg – T reguladora

## **LISTA DE FIGURAS**

---

Figura 1 - **Metabolismo da L-arginina nos macrófagos em resposta às diferentes citocinas.**

Figura 2 – **Infecção experimental por *L. braziliensis*.**

Figura 3 – **Atividade da arginase durante a infecção por *L. braziliensis***

Figura 4 - **Produção de óxido nítrico durante a infecção por *L. braziliensis*.**

Figura 5 - **Presença de iNOS na derme de animais infectados com *L. braziliensis*.**

Figura 6 - **Cinética da produção de citocinas em animais infectados por *L. braziliensis***

Figura 7 - **Razão entre citocinas pró e anti-inflamatórias, durante a infecção por *L. braziliensis*.**

Figura 8 - **Inibição da atividade da arginase na infecção por *L. braziliensis*.**

Figura 9 - **Atividade da arginase em animais infectados com *L. braziliensise* tratados com Nor-NOHA**

Figura 10 - **Produção de NO em animais infectados com *L. braziliensise* tratados com nor-NOHA**

Figura 11 - **Produção de citocinas em animais infectados com *L. braziliensise* tratados com nor-NOHA.**

Figura 12 - **Razão entre citocinas pró e anti-inflamatórias, em animais infectados com *L. braziliensise* tratados com nor-NOHA.**

Figura 13 - **A suplementação com L-arginina exacerba a infecção por *L. braziliensis*.**

Figura 14 - **Atividade da arginase em animais suplementados com L-arginina e infectados com *L. braziliensis***

Figura 15 - **Produção de NO em animais suplementados com L-arginina e infectados com *L. braziliensis*.**

Figura 16 - **Produção de citocinas em animais suplementados com L-arginina, após a infecção por *L. braziliensis*.**

Figura 17 - **Razão entre citocinas pró e anti-inflamatórias, em animais infectados com *L. braziliensis* e suplementados com L-arginina.**

Figura 18 - **Replicação de *L. braziliensis* em macrófagos estimulados com IL-4 ou IFN-g.**

Figura 19 - **Macrófagos peritoneais estimulados com diferentes citocinas respondem de forma desigual à infecção por *L. braziliensis*.**



## RESUMO

---

A RELAÇÃO ARGINASE-ÓXIDO NÍTRICO NA INFECÇÃO EXPERIMENTAL POR LEISHMANIA BRAZILIENSIS. **RÔMULO CARVALHO SANTIAGO**. A arginase é uma importante enzima envolvida no processo de desintoxicação, eliminando amônia via ciclo da ureia, hidrolisando a L-arginina à L-ornitina e ureia. L-ornitina pode ser metabolizada pela ornitina descarboxilase (ODC), dando origem a poliaminas, que são importantes para divisão e proliferação celular. A *L. major* usa esta via metabólica para proliferar dentro do macrófago durante a infecção. Por outro lado, a óxido nítrico sintase (NOS) oxida a L-arginina à citrulina e óxido nítrico, participando, desta forma, da eliminação do parasita. Estas enzimas podem ser moduladas na presença de citocinas. O objetivo deste estudo foi avaliar a relação entre arginase e óxido nítrico durante a infecção experimental causada por *L. braziliensis*. No modelo cutâneo de infecção por *L. braziliensis*, camundongos BALB/c desenvolvem uma lesão que cura espontaneamente na décima semana após infecção. Os parasitas, no entanto, persistem no linfonodo de drenagem (LNd) até 6 meses após a infecção. Camundongos BALB/c foram infectados com *L. braziliensis*, na derme da orelha, e o desenvolvimento da lesão, a carga parasitária, a atividade da arginase e a produção de óxido nítrico (NO) foram avaliados, assim como a produção de citocinas. A atividade da arginase na orelha aumenta com o desenvolvimento da lesão e diminui com a cura da mesma. No LNd, a atividade da arginase foi detectada junto com a persistência do parasita. A presença de NO na orelha foi maior no pico de desenvolvimento da lesão, acompanhando a presença de IFN- $\gamma$ , no LNd. Com a cura da clínica, houve redução dos níveis de NO na orelha, acompanhado de aumento na produção de TGF- $\beta$  no LNd. A inibição da arginase, utilizando Nor-NOHA, reduziu significativamente o tamanho da lesão e a carga parasitária na orelha e no LNd. Curiosamente, este efeito foi associado a uma maior produção de IL-4 e IL-10. Por outro lado, a suplementação com L-arginina, o substrato comum para as enzimas iNOS e arginase exacerbou o tamanho da lesão e elevou a carga parasitária. Nossos dados sugerem que a arginase está envolvida com a multiplicação de *L. braziliensis*, causando a lesão na orelha e, posteriormente, está envolvida com a persistência do parasita no LNd. PALAVRAS CHAVE: *L. braziliensis*, Arginase, NO, persistência.

## ABSTRACT

---

ARGINASE-NITRIC OXIDE INTERPLAY IN EXPERIMENTAL INFECTION WITH LEISHMANIA BRAZILIENSIS. **RÔMULO CARVALHO SANTIAGO.** Arginase is an important enzyme involved in the detoxification process, eliminating ammonia via the urea cycle, hydrolyzing L-arginine to L-ornithine and urea. L-ornithine can be metabolized by ornithine decarboxylase (ODC) to give polyamines, which are important for cellular division and proliferation. It has been demonstrated that *L. major* uses this pathway to proliferate within macrophages during infection. On the other hand, nitric oxide synthase (iNOS) oxidizes L-arginine to citrulline and nitric oxide, participating in the elimination of parasites. These enzymes can be modulated in presence of cytokines. The aim of this work was to study the relationship between arginase and nitric oxide during the experimental infection caused by *L. braziliensis*. In the cutaneous model of infection with *L. braziliensis*, there is a development of a lesion that heals spontaneously in the second month of infection. The parasites, however, persist in draining lymph nodes (dLN) until 6 months after infection. BALB/c mice were infected with *L. braziliensis* in the ear dermis and the lesion development, parasite load, arginase activity and the nitric oxide (NO) production were evaluated, as well as cytokine production. Arginase activity in the ear increased with lesion development and decreased at the time of lesion healing. In dLNs, arginase activity was detected in parallel to the persisting parasites. The presence of NO in the ear was higher at the peak of lesion development, accompanying the presence of IFN- $\gamma$  in dLNs. With clinical cure, decreased NO levels were detected in the ear paralleled by an increase in the production of TGF- $\beta$  in the dLNs. The competitive inhibition of arginase, using Nor-NOHA, significantly reduced lesion size and parasite load in the ear and in dLNs. Interestingly, this effect was associated with increased production of IL-4 and IL-10. Furthermore, supplementation with L-arginine, the common substrate for both enzymes, iNOS and arginase, exacerbated lesion size and the parasite load. Our data suggest that arginase is involved with the multiplication of *L. braziliensis*, causing injury in the ear and it is involved with the persistence of the parasite in the dLN.[KEYWORDS] *L. braziliensis*, Arginase, NO, persistence

# 1. INTRODUÇÃO

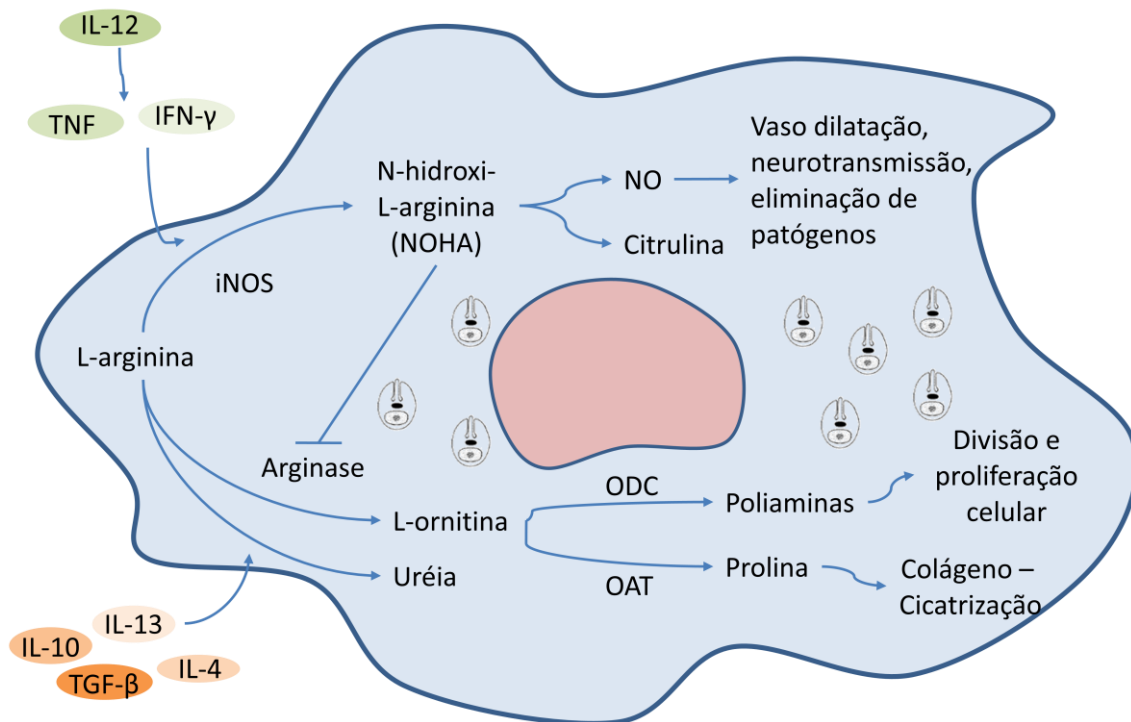
---

## 1.1. Arginase e NOS

Kossel e Dakin, em 1904, identificaram no fígado de animais uma enzima responsável pela hidrólise do aminoácido arginina à ornitina e uréia, a qual fora denominada arginase. Entretanto, somente apenas com a descoberta do ciclo da ureia, em 1932, por Krebs e Henseleit, foi possível evidenciar o importante papel da arginase nas vias metabólicas e fisiológicas.

A arginase catalisa o último passo do ciclo da ureia, envolvido na eliminação da amônia (Wu e Morris, 1998). Nos mamíferos existem duas isoformas da arginase: I e II. Ambas têm 60% (sessenta por cento) de similaridade na sequência de aminoácidos, mas são codificadas por genes diferentes, estão localizadas em compartimentos distintos da célula e também têm distribuição tecidual desiguais (Grody, et al., 1987; Jenkinson, et al., 1996). A arginase I, presente no citosol, é muito expressa no fígado e sua principal função é a desintoxicação. A arginase II é uma enzima mitocondrial, expressa em níveis menores no rim, cérebro, intestino delgado e glândula mamária, com pouca ou nenhuma expressão no fígado (Grody, et al., 1987; Jenkinson, et al., 1996).

A L-ornitina, fruto da ação da arginase sobre a L-arginina, pode ser descarboxilada pela ornitina descarboxilase (ODC), formando poliaminas (putrecina, spermina, spermidina). Estas são importantes para a síntese de ácidos nucléicos, transportadores de membrana e para a proliferação celular. A L-ornitina também pode sofrer a ação da ornitina aminotransferase (OAT), originando a prolina, um importante aminoácido para síntese de colágeno durante o processo de cicatrização (Morris, 2002) (Figura 1).



**Figura 1 – Metabolismo da L-arginina nos macrófagos em resposta às diferentes citocinas** (adaptado de Pearce e MacDonald 2002).

Uma das enzimas que compete com a arginase pela L-arginina é a óxido nítrico sintase (NOS). Há três tipos de óxido nítrico sintase: NOS induzível (iNOS), NOS neural (nNOS) e NOS endotelial (eNOS). As duas últimas são constitutivas e dependentes de cálcio. A iNOS, por outro lado, não é expressa constitutivamente, mas é fortemente induzida por lipopolissacarídeo (LPS) e ácido lipoteicóico (LTA). A NOS catalisa a formação de óxido nítrico (NO) a partir da L-arginina e, o NO, por sua vez, participa de vários processos fisiológicos, como vasodilatação, neurotransmissão e eliminação de patógenos (Wu e Morris, 1998).

Como exposto na Figura 1, citocinas do tipo Th2, como IL-4, IL-10, TGF- $\beta$  e IL-13, promovem a expressão da arginase I em macrófagos - resultando na ativação alternativa (Munder et al., 1999; Pearce e MacDonald, 2002) - em

células dendríticas (Da Silva et al., 2008; Munder et al., 1999) e em fibroblastos (Lindemann and Racké, 2003). Em polimorfonucleares humanos, esta enzima é expressa constitutivamente, e não se altera em função de estímulos pro ou anti-inflamatórios (Munder et al., 2005). Ao contrário, citocinas do tipo Th1, tais como IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ , induzem a iNOS, que metaboliza a L-arginina, gerando citrulina e NO (Goerdt e Orfanos, 1999; Munder, Eichmann e Modolell, 1998), caracterizando a ativação clássica de macrófagos. A presença da iNOS está associada ao aumento da atividade microbicida e, um metabólito intermediário desta enzima, o N<sup>G</sup>-hidroxi-L-arginina (NOHA), impede a ação da arginase, conseqüentemente aumenta a disponibilidade da L-arginina para a produção de NO (Hecker et al., 1995). Vale salientar que, tanto a arginase, quanto a iNOS utilizam a L-arginina como substrato.

O NO, além de atuar na eliminação de patógenos, participa do processo de cicatrização tecidual, assim como a arginase: o NO atua na fase inicial e, a arginase atua na fase mais tardia (Stechmiller, Childress e Cowan, 2005). O NO estimula a expressão gênica, a proliferação e a diferenciação celular, principalmente dos queratinócitos, promovendo a re-epitelização (Witte e Barbul, 2002). Durante o processo de cicatrização, a produção de NO é acompanhada pela deposição de colágeno (Witte e Barbul, 2002). A cicatrização é seguida pela re-epitelização e pela localização de miofibroblastos sob o epitélio da ferida (Kavalukas et al., 2012).

## 1.2. iNOS e Arginase na Leishmaniose Tegumentar Experimental.

A Leishmaniose é causada pelo protozoário *Leishmania*. Esta doença pode manifestar-se como Leishmaniose Tegumentar (LT) ou Leishmaniose Visceral (LV). A LT apresenta um amplo espectro de manifestações clínicas,

desde uma úlcera única localizada (LCL), até lesões mucosas desfigurantes (leishmaniose mucosa - LM). Nas Américas, a LT é causada por uma variedade de espécies, sendo seus principais agentes etiológicos a *L. braziliensis*, a *L. amazonensis* e a *L. guyanensis*, enquanto que, no continente europeu, as espécies responsáveis pela LT são, entre outras, a *L. major* e a *L. tropica*. Estima-se o surgimento de dois milhões de novos casos anualmente e cerca de 12 milhões de pessoas encontram-se atualmente infectadas, enquanto 350 milhões de indivíduos vivem em área de risco de transmissão (World Health Organization, Leishmaniasis Control - Disponível em: <http://www.who.int/leishmaniasis/burden/en/> Acesso em 13/10/12).

O modelo mais bem estudado de LT experimental é o de infecção por *L. major*. A resposta imune do camundongo infectado com *L. major* segue dois padrões (resistência ou susceptibilidade), a depender da linhagem do camundongo em questão. Na resistência, há resposta imune dos linfócitos Tauxiliares é do tipo 1 (Th1), com predomínio de IL-12 e IFN-g. A resistência à infecção é conferida pela ativação do macrófago, através do IFN-g, com aumento da expressão de iNOS e produção de NO (Shiloh e Nathan, 2000). Essa resposta é observada em camundongos C57BL/6. Na susceptibilidade, observada em camundongos BALB/c, os linfócitos T auxiliares são do tipo 2 (Th2) e produzem IL-4 e IL-10, citocinas que desativam os macrófagos e aumentam a expressão de arginase I (Gordon, 2003), inibindo, por sua vez, a morte parasitária, favorecendo a replicação.

Portanto, durante a infecção por *L. major*, a resposta do tipo Th2 promove a indução de arginase (Wanasen e Soong, 2008) e, em camundongos

C57BL/6, resistentes à infecção, a resposta é dominada por IFN-g e indução de iNOS (Locksleye Scott, 1991). (Figura 1).

Camundongos deficientes para iNOS são mais susceptíveis à infecção por *L. major* (Wei *et al.*, 1995), assim como acontece com *L. braziliensis* (Rocha *et al.*, 2007). A importância da iNOS se dá, não somente na fase inicial da infecção, mas também na fase crônica, uma vez que, os animais clinicamente curados apresentam reativação da lesão ao serem tratados com um inibidor dessa enzima (Stenger *et al.*, 1996). A expressão de iNOS durante a infecção por *L. major* acontece principalmente nas células dendríticas (DC), as quais normalmente são mais infectadas, tanto no sítio da lesão, quanto no linfonodo de drenagem (LNd) (Trez, De *et al.*, 2009) e é suprimida por citocinas do tipo Th2 como IL-4 (Bogdan, 2001) e TGF- $\beta$  (Vodovotz *et al.*, 1993).

Na infecção por *L. major*, o tratamento com o inibidor competitivo da arginase I, nor-NOHA, retarda o aparecimento da lesão (Iniesta *et al.*, 2005). No entanto, o controle do crescimento parasitário, observado durante a inibição da arginase I, não é acompanhado pelo aumento de NO (Iniesta, Gómez-Nieto, e Corraliza, 2001; Kropf *et al.*, 2005). Entretanto, a suplementação com ornitina aumenta a expressão da arginase I e a susceptibilidade, pois incrementa os níveis de poliaminas (Iniesta *et al.*, 2005). A indução de arginase I diminui a disponibilidade de arginina no local da inflamação e também impede a produção de IFN-g no sítio de infecção, favorecendo a sobrevivência do parasita. No LNd destes animais, as funções dos linfócitos se mantêm normais. Com a disponibilização da L-arginina, este quadro se inverte e os animais desenvolvem lesões menores (Modolell *et al.*, 2009).

A disponibilidade da arginina no micro ambiente inflamatório pode diminuir também em função da liberação da arginase I pelos neutrófilos (Munder et al., 2006) e pelos eritrócitos (Kim *et al.*, 2002). Abebe et al. (2012) demonstraram a presença marcante de neutrófilos expressando arginase I em biópsias de pacientes com LT. Este aumento da atividade da arginase, em relação à pele normal e ao sangue periférico, estaria diminuindo a disponibilidade da L-arginina no meio extracelular, induzindo a supressão dos linfócitos T através da diminuição da expressão da cadeia zeta do CD3.

O excesso de nitrogênio pode ser eliminado diretamente na forma de amônios em protozoários de vida aquática. No entanto, os organismos da família Trypanosomatidea apresentam atividade de enzimas do ciclo da ureia.

No início, o papel funcional da arginase foi associado somente ao processo conversão de arginina-ornitina-citrulina (Camargo, 1979). Todavia, o gene que codifica a arginase na *Leishmania* é essencial para a sua sobrevivência, uma vez que, sem esta enzima, a *Leishmania* torna-se incapaz de produzir poliaminas (Muleme *et al.*, 2009; Roberts *et al.*, 2004). A arginase da *Leishmania* encontra-se localizada no glicossomo (da Silva et al., 2012; Roberts et al., 2004), uma organela similar ao peroxissomos, onde são encontradas diversas enzimas, que atuam na via glicolítica. Na *L. amazonensis*, a localização da arginase no glicossomo é importante (da Silva et al., 2012), pois ali há uma concentração ótima de L-arginina, que favorece a produção de poliaminas e a proliferação do parasita. A síntese de poliaminas na *Leishmania* acontece via Arginase-ODC (Boitz *et al.*, 2009; Muleme *et al.*, 2009). Porém, uma *L. major* deficiente para arginase I causa uma lesão menor em camundongos susceptíveis, apesar de permanecer infectiva. Isso se deve à



capacidade da *Leishmania* de utilizar as poliaminas produzidas pela célula hospedeira (Muleme *et al.*, 2009). O mesmo acontece durante a infecção por *L. mexicana* (Roberts *et al.*, 2004), porém a menor infectividade deste parasita parece estar relacionada ao aumento de NO pelo macrófago (Gaur *et al.*, 2007), o que não acontece com a *L. major* (Muleme *et al.*, 2009).

A arginase também está envolvida na sobrevivência e multiplicação do parasita na fase inicial da infecção natural. Isso acontece pelo aumento da atividade da arginase I induzida pelos proteofosfolipídios, formados durante a multiplicação do parasita no vetor, o qual é regurgitado juntamente com o parasita durante o repasto sanguíneo (Rogers *et al.*, 2009).

Na infecção experimental por *L. major*, a sobrevivência do parasita em camundongos suscetíveis deve-se, em parte a atividade das citocinas do tipo Th2, que inibem a expressão de iNOS e aumentam a expressão e atividade da arginase I, e ao próprio parasita, que possui esta enzima. A arginase I, por sua vez, limita a disponibilidade de arginina para a enzima iNOS, diminuindo a produção de NO, e para os linfócitos Th1, tornando-os hiporresponsivos. Em paralelo, aumenta a quantidade de poliaminas e, conseqüentemente, a proliferação da *Leishmania*.

### 1.3 LT causada por *L. braziliensis*

Os camundongos BALB/c infectados na derme da orelha por *L. braziliensis*, desenvolvem uma lesão dérmica que cura espontaneamente e, nesses animais, há produção de IFN- $\gamma$ , tanto por células T CD4<sup>+</sup> quanto por células T CD8<sup>+</sup>, além de IL-4 e IL-10 (Moura *et al.*, 2005). Todavia, a produção

de IL-4 nesses camundongos é menor do que nos animais infectados por *L. major* (DeKrey, Lima and Titus, 1998).

O IFN-g é importante para o controle do parasita durante a infecção por *L. braziliensis*, uma vez que, animais deficientes em IFN-g, desenvolvem uma lesão que não cura (DeKrey, Lima and Titus, 1998).

Assim, a dicotomia na resposta de linfócitos T auxiliares (polarização Th1 x Th2) não é tão evidente quanto à observada em *L. major*. Camundongos C57BL/6 deficientes em MyD88 têm menor produção de IL-12 e IFN-g, conseqüentemente, têm lesão maior e, por sua vez, a cura é postergada (Vargas-Inchaustegui *et al.*, 2009). Camundongos deficientes na produção de IL-12 desenvolvem uma lesão crônica em função da menor produção de IFN-g pelos linfócitos destes animais (Rocha *et al.*, 2007; Souza-Neto *et al.*, 2004), assim como camundongos deficientes em STAT4. Isso demonstra a importância da IL-12 na produção de IFN-g e controle da infecção (Rocha *et al.*, 2007). Além disso, *L. braziliensis* isoladas de pacientes resistentes ao tratamento com antimonial induzem maior lesão em camundongos e maior expressão de arginase I, quando comparado com os isolados susceptíveis (Costa *et al.*, 2011).

Outra citocina importante durante a infecção por *L. braziliensis* é o TGF- $\beta$ . A administração de TGF- $\beta$ , uma citocina anti-inflamatória, aumenta a susceptibilidade de camundongos, enquanto que o tratamento com anti-TGF- $\beta$  atenua a infecção, em função do aumento da expressão de IL-10 e IFN-g, respectivamente (Barral-Netto e Barral, 1994). Foi postulado ainda que, o tratamento de camundongos com TGF- $\beta$  é capaz de aumentar a virulência de determinadas cepas de *L. braziliensis*, o que estaria relacionado à maior

síntese de mRNA de IL-10 e menor síntese de mRNA de IFN-g (Barral *et al.*, 1993). Já foi demonstrado que o TGF-b produzido por células T CD4 reguladoras (Treg), fora o contato direto, é, igualmente, capaz de suprimir a proliferação de linfócitos T CD4+ efetores (Baecher-Allan e Hafler, 2006). Em lesões causadas por *L. braziliensis* ou por *L. amazonensis*, as células Treg sintetizam IL-10, suprimem a proliferação e a produção de citocinas por linfócitos efetores, promovendo a persistência (Carneiro *et al.*, 2009). Neste sentido, durante a infecção por *L. braziliensis* já foi demonstrada a presença de células Treg produtoras de TGF-b e IL-10, acumulando-se na lesão, principalmente, após a cura clínica (Falcão *et al.*, 2012; Campanelli *et al.*, 2006; Costa *et al.*, 2011). Além disso, mediado pelo TGF-b, os macrófagos apoptóticos induzem a expressão de arginase, diminuindo a produção de NO (Freire-de-Lima *et al.*, 2006).

Nos animais infectados com *L. braziliensis* (Moura *et al.*, 2005) e, em pacientes (Mendonça *et al.*, 2004), é possível observar a persistência de pequenas quantidades de parasitas, apesar da cura clínica. Na infecção por *L. mjaor*, animais que apresentam cura estéril, ou seja, que eliminam completamente os parasitas, são susceptíveis à reinfecção, sugerindo que a persistência do parasita é importante para manutenção da resposta de memória anti-leishmania (Belkaid *et al.*, 2001; Okwor & Uzonna, 2008; Uzonna, Wei e Yurkowski, 2002). Neste sentido, é possível que a arginase esteja envolvida com a persistência de pequeno número de parasitas no local da infecção e no linfonodo de drenagem, levando a uma constante estimulação do sistema imune.

Diante do exposto, nossa hipótese é que existe uma relação entre a atividade da arginase, o desenvolvimento da lesão e a persistência do parasita, na LT experimental causada por *L. braziliensis*.

## 2. OBJETIVO GERAL

---

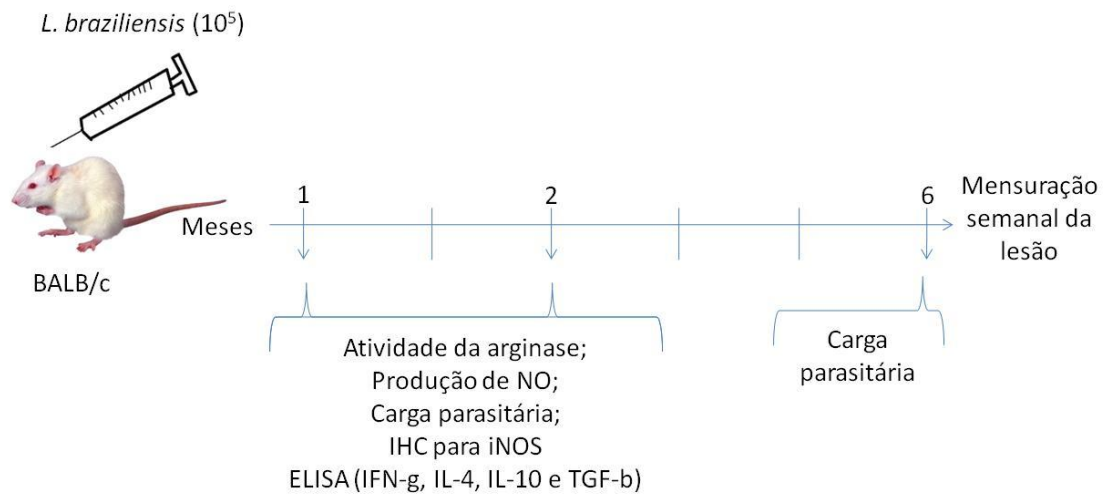
Determinar o papel da arginase e NO durante a infecção por *L. braziliensis*

### 2.1. Objetivos específicos

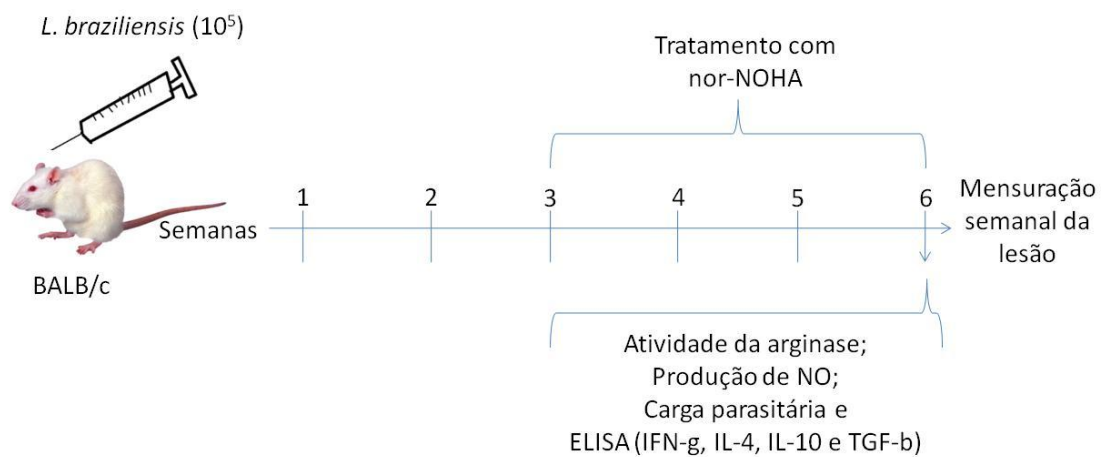
- Avaliar a atividade da arginase e a produção de NO durante a infecção por *L. braziliensis*.
- Investigar o efeito da inibição da arginase com nor-NOHA.
- Determinar o papel da L-arginina por meio da suplementação.
- Verificar a ação do IFN- $\gamma$  e IL-4 em macrófagos infectados por *L. braziliensis*.

### 3. DESENHO EXPERIMENTAL

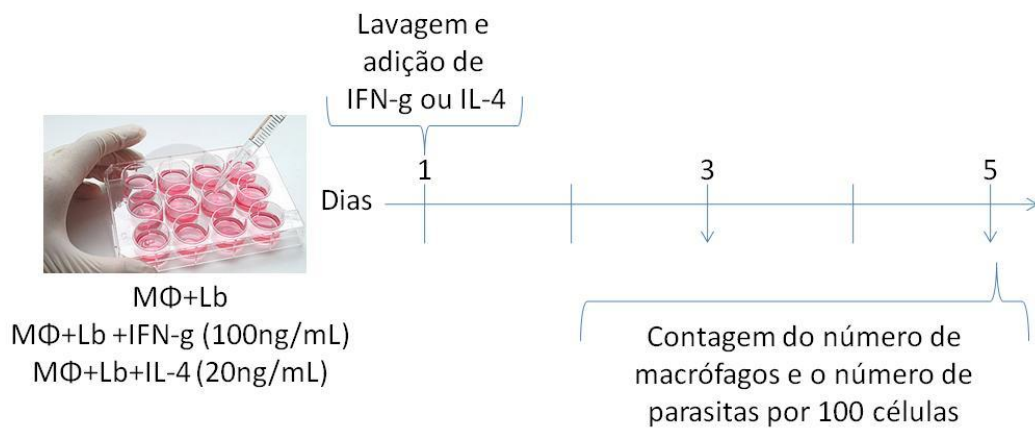
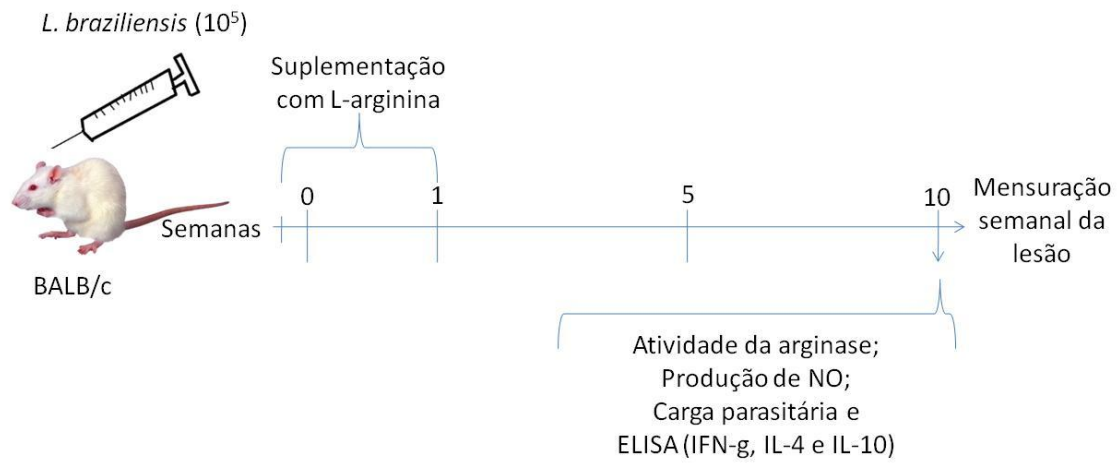
#### 3.1. Infecção experimental por *L. braziliensis*.



#### 3.2. Efeito da inibição da atividade da arginase *in vivo*.



### 3.3. Efeito da suplementação com L-arginina *in vivo*.



## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

---

### 4.1. Camundongos

Os camundongos BALB/c foram obtidos do biotério CPqGM/FIOCRUZ e mantidos em condições livre de patógenos. Todos os protocolos de experimentação utilizados neste trabalho foram aprovados pelo Comitê de Ética Animal do CPqGM/FIOCRUZ – protocolo 024/2011.

### 4.2. Parasitas

A cepa de *L. braziliensis* (MHOM/BR/01/BA788) utilizada foi obtida de paciente com LT e sua caracterização foi feita por PCR (Castilho et al., 2003) e anticorpo monoclonal (McMahon-Pratt et al., 1982). As promastigotas foram mantidas em meio de cultura Schneider (SIGMA) suplementado com 10% de soro bovino fetal inativo, 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomicina e 20 mM Hepes (todos da Invitrogen).

### 4.3. Infecção intradérmica

Os animais foram anestesiados com Avertina (2,2,2 tribromoe-thanol, Aldrich T4,840.2) na concentração de 20mg/ml, via intraperitoneal, com uma dose de 0,4-0,8ml/animal e então,  $10^5$  parasitas em fase estacionária foram inoculados na derme da orelha esquerda, utilizando-se agulhas de 29G em um volume de 10µl de solução salina estéril.



#### 4.4. Carga parasitária

A carga parasitária dos animais infectados por *L. braziliensis* foi estimada por meio de diluição limitante, como descrito por Tituset al. (1985). Os animais infectados por *L.braziliensis* foram eutanasiados em diferentes períodos após infecção e, os LN de as orelhas foram coletados e homogeneizados em 1mL de meio Schneider (LGC) suplementado. A partir do homogeneizado inicial, foram realizadas 12 diluições seriadas em placas de 96 poços. O número de parasitas viáveis foi determinado pela máxima diluição em que se encontrou parasita, após uma semana de incubação a 25°C.

#### 4.5. Atividade da arginase

A atividade da arginase foi determinada utilizando-se o protocolo descrito por Corraliza (1994). Brevemente, foram utilizados 20ul do homogeneizado da orelha ou  $10^6$  células do LN<sub>d</sub> solubilizado com tampão contendo 0.1% Triton X-100/10mM MnCl/ 25mM Tris-HCl. A enzima foi ativada por calor durante 10 min a 55°C. A hidrólise da arginina foi ativada através da incubação de 50ul do lisado com 25ul de L-arginina (SIGMA) 0.5M (pH 9.7) a 37°C por 60 min. A reação foi parada com 400ul de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (96%)/ H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (85%)/ H<sub>2</sub>O (1/3/7, v/v/v). A concentração da ureia foi mensurada em leitor de ELISA a 540nm, após adição de 20ul de  $\alpha$ -isonitrosopropiophenone (dissolvido em etanol 100%), seguido por aquecimento a 95°C por 45 min. Uma unidade de atividade da enzima foi definida como a quantidade de enzima que catalisa a formação de 1mM de ureia por minuto.

#### 4.6. Dosagem de NO

Os sobrenadante da cultura do LNd ( $5 \times 10^6$  células em 1mL de DEMEM completo) ou da orelha (200ul do macerado em 1mL de DMEM completo) foram analisados quanto à produção de nitrito pela reação de Griess, como uma medida indireta da produção de NO (Green et al., 1982). Para medir a produção de nitrito, alíquotas 50ul das amostras foram incubadas com 50ul dos reagentes (25ul da solução de sulfanilamida 1% e 25ul de solução de N-naphthylenediaminedihydrochloridre 0,1% em 2,5% de  $H_3PO_4$ ). A leitura foi realizada em leitor de ELISA em 570nm.

#### 4.7. Imunohistoquímica

Os animais infectados por *L. braziliensis* foram eutanasiados em diferentes meses após infecção (1, 2 e 6 meses). Após os meses referidos, o linfonodo de drenagem da lesão (LNd) e orelhas foram coletados e preservados em formol 10%. Em seguida, os órgãos foram incluídos em parafina, cortados e corados por hematoxilina e eosina (H&E) para análise histopatológica. Para a imunohistoquímica, os cortes histológicos foram desparafinizados por meio de incubação em xilol: a primeira etapa de 20 minutos em estufa a  $56^\circ C$ , a segunda e a terceira de 20 e 2 minutos, respectivamente, em temperatura ambiente. A reidratação foi realizada por meio de banhos de álcool em concentrações decrescentes, seguido por banhos em água corrente e destilada. A inibição da peroxidase endógena foi realizada com solução de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) a 3%, por 30 minutos, seguida de lavagem com PBS. Em seguida, foi realizada a recuperação antigênica, em panela de vapor, em tampão citrato pH 6,0: os cortes foram incubados a  $95^\circ C$  por 30 minutos e foram posteriormente resfriados a temperatura ambiente. Os

cortes foram embebidos em solução de leite em pó molico 30%, por 40 min, a temperatura ambiente, para inibição das ligações inespecíficas. Posteriormente, foi realizada a aplicação do anticorpo primário (anti-iNOS; BD bioscience – diluído 1:50), e os cortes foram incubados em câmara úmida, *overnight*, a 4°C. Após a incubação, os cortes foram lavados três vezes em temperatura ambiente, com PBS, para remoção mecânica dos anticorpos não aderidos. Em seguida, foi aplicado o anticorpo secundário biotinilado universal (DAKO LSAB+ System Kit, Dako Corporation), por 30 minutos, em temperatura ambiente. Os cortes foram novamente lavados e foi aplicado o complexo estreptavidina-biotina-peroxidase (DAKO LSAB + System kit) por 30 minutos, em temperatura ambiente. Os cortes foram novamente lavados e a revelação foi realizada com DAB (diaminobenzidina) (DAKO Corporation). A reação foi interrompida com água destilada. Os cortes foram contra corados com hematoxilina de Harris, desidratados com banhos sequenciais em álcool a concentrações crescentes e xilol, e as lâminas foram montadas com lamínula e bálsamo do Canadá.

#### 4.8. Dosagem de citocinas

Os animais infectados por *L. braziliensis* foram eutanasiados em diferentes períodos após infecção e, os LNd foram coletados. Os LNd foram macerados em um homogeneizador de vidro com 1 mL de DMEM (Invitrogen), suplementado com 10% de soro bovino fetal, 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomicina e 20 mM HEPES (todos da Invitrogen) e, as células presentes na suspensão foram contadas. Em uma placa de 24 poços, foram plaqueadas  $5 \times 10^6$  células por poço, com 1 mL de DMEM completo, na presença ou

ausência de *L. braziliensis* vivas (5 parasitas para 1 célula). Culturas controle foram mantidas na ausência de estímulo. As culturas foram incubadas a 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, por 48h. Após o período de incubação, a placa foi centrifugada a 1500 RPM por 10 min e o sobrenadante da cultura foi utilizado para a dosagem de citocinas (IL-10, IL-4, IFN-γ e TGF-β) por ELISA (eBioscience), segundo instruções do fabricante.

#### 4.9. Inibição da Arginase

Camundongos BALB/c foram infectados como descrito anteriormente. Após 3 semanas de infecção, os animais foram tratados, perilesionalmente, com N<sup>o</sup>-hydroxy-nor-L-arginine (nor-NOHA – Calbiochem), 1ug/animal/dia, como realizado por Iniesta et al., 2005, por três semanas. E os animais controle foram tratados com salina

#### 4.10. Tratamento com L-arginina

Camundongos BALB/c receberam, via intraperitoneal, 1,1mg/ de L-arginina (Sigma) dois dias antes da infecção. O tratamento foi mantido durante uma semana após infecção, totalizando dez dias de tratamento. E os animais controle receberam salina.

#### 4.11. Obtenção de macrófagos residentes e infecção com *L. braziliensis*

Os macrófagos residentes foram obtidos após lavagem do peritônio dos camundongos com 5mL de meio RPMI 1640 (Invitrogen), utilizando-se uma agulha 22 G. As células obtidas foram lavadas com salina e um total de  $3 \times 10^5$

células foi adicionado a cada poço de placas de cultura de 24 poços (Costar), previamente recobertos com lamínulas redondas (Glasstécnica). A aderência dos macrófagos foi feita por meio do cultivo em meio DMEM suplementado por 4 horas em estufa a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub>. Após a aderência, os macrófagos foram colocados em contato com promastigotas estacionárias de *L. braziliensis* em uma proporção de 10 parasitas para 1 célula, na presença de IL-4 (20ng/mL; PeproTech) ou IFN-g (100ng/mL; PeproTech). A infecção foi feita por 24 horas, a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub> e, em seguida, os poços foram lavados extensivamente com salina para retirar as promastigotas livres. Após lavagem, as células foram mantidas em cultura com DMEM suplementado mais IL-4 ou IFN-g. A taxa de infecção foi determinada por meio da coloração das lamínulas com H&E. Para tal, as lamínulas foram removidas após 3 e 5 dias em cultura. As contagens foram realizadas no microscópio ótico em lente de imersão. Pelo menos dez campos, escolhidos aleatoriamente, foram contados por cada lamínula e determinados, tanto o número de macrófagos infectados, quanto o número de amastigotas presentes em 100 células.

#### 4.12. Análise estatística.

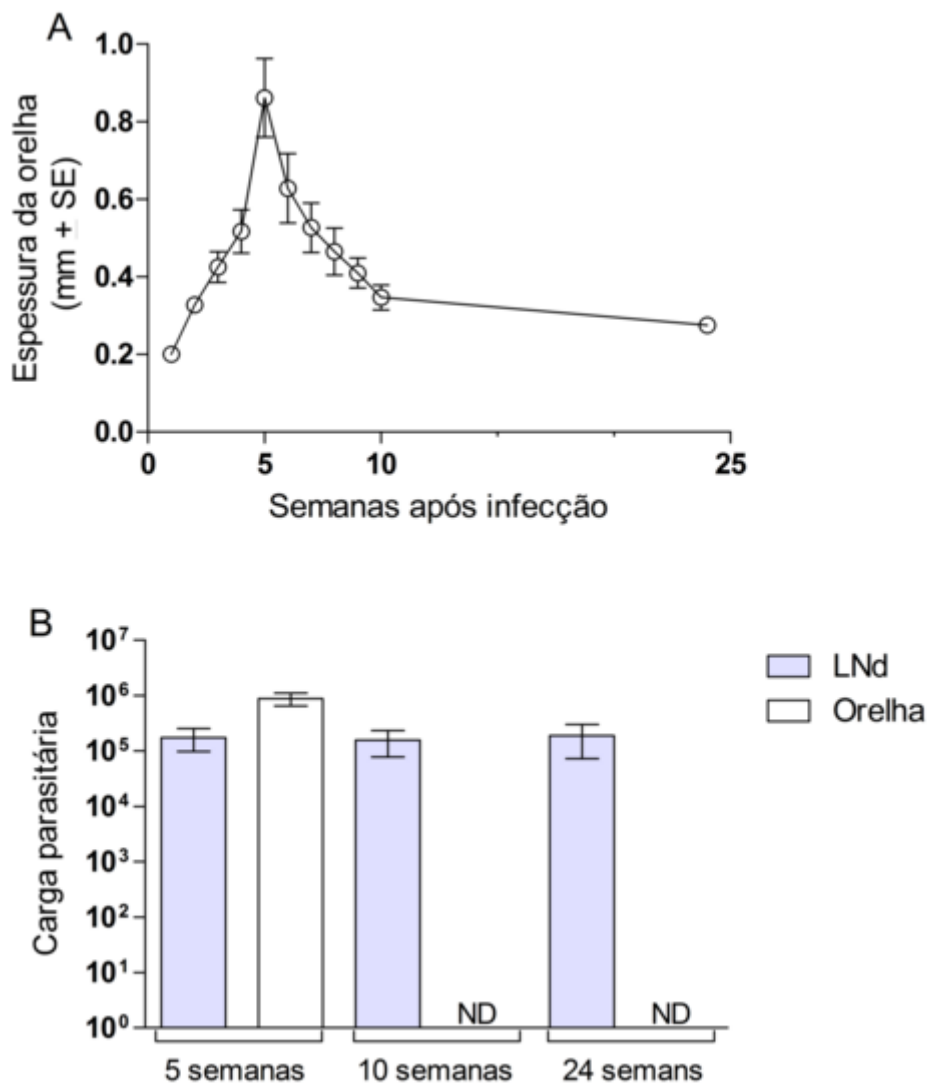
Os resultados obtidos foram avaliados quanto às diferenças estatísticas, utilizando distintos testes. Para múltiplas comparações foi utilizado Kruskal-Wallis e/ou, para comparações entre dois grupos foi realizado Teste t de Student, com intervalo de confiança de 95%, sendo os valores considerados estatisticamente significantes quando  $p < 0.05$ .

## 5. RESULTADOS

---

### 5.1. Infecção experimental de camundongos Balb/c por *L. braziliensis*.

Camundongos BALB/c foram infectados na derme da orelha com  $10^5$  parasitas na fase estacionária. Como descrito por nosso grupo (de Moura et al., 2005), os animais infectados por *L. braziliensis* apresentaram uma lesão com o máximo de desenvolvimento por volta da quinta semana após infecção, que apresentou regressão espontânea e completamente após 10 semanas (Figura 2A). Apesar da cura clínica, foi possível notar a persistência do parasita, em números constantes, no linfonodo de drenagem (LNd) até 6 meses – 24 semanas - após infecção (Figura 2B), ao contrário do que acontece na orelha, onde não foi possível detectar parasitas viáveis após dez semanas de infecção. Estes dados mostram que, na infecção experimental, os parasitas persistem no LNd por longos períodos após a cura clínica.



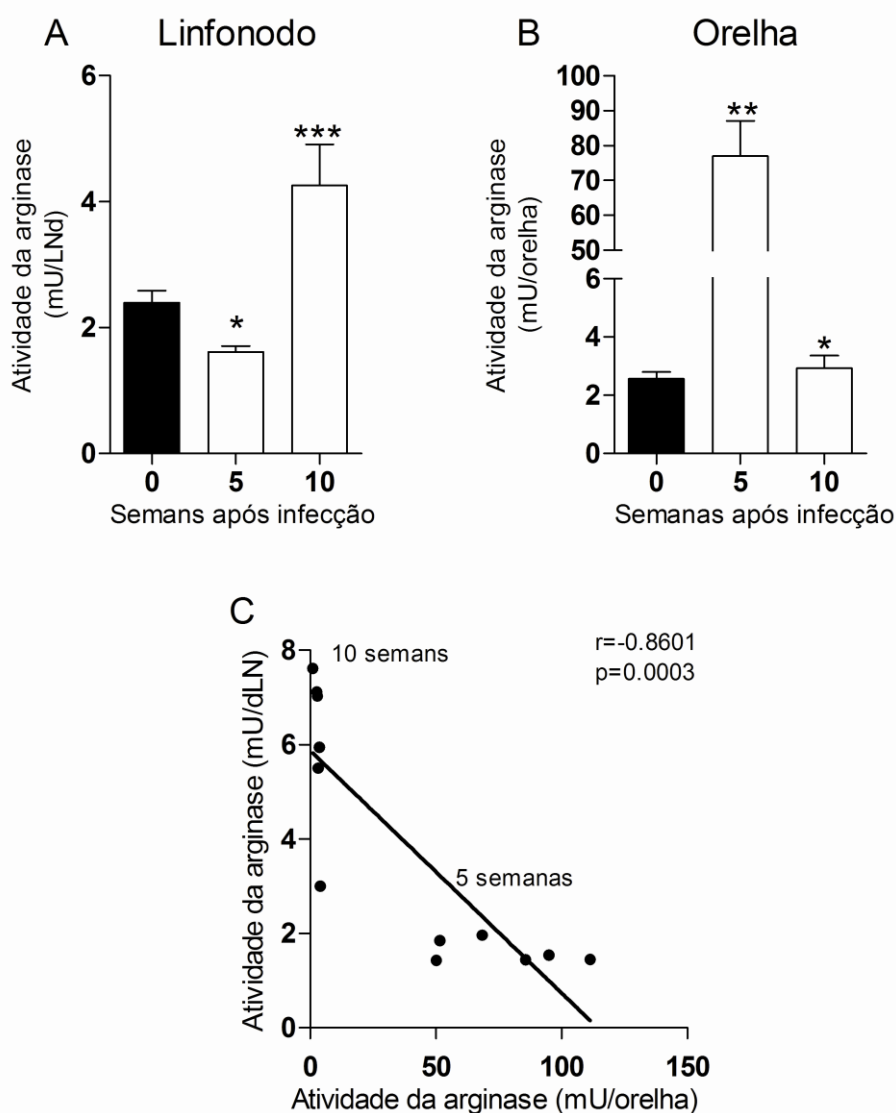
**Figura 2 – Infecção experimental por *L. braziliensis*.** Camundongos BALB/c foram infectados com 10<sup>5</sup> parasitas na derme da orelha e, o tamanho da lesão, foi mensurado semanalmente com o auxílio de um paquímetro digital (A). O número de parasitas na orelha e LNd foi determinado pelo método de diluição limitante 5, 10 e 24 semanas, após a infecção dos camundongos (B). Os resultados são representativos de dois experimentos realizados separadamente e, apresentam a média e desvio padrão de pelo menos 5 animais por grupo. *ND*- não detectado.

## 5.2. Atividade da arginase e produção de NO durante a infecção por *L. braziliensis*.

Resolvemos, então, determinar a atividade da arginase na orelha e no LN<sub>d</sub> pelo método descrito por Corraliza et al. (1994). Cinco semanas após a infecção, a atividade da arginase no LN<sub>d</sub> foi significativamente menor quando comparada à observada nos animais não infectados (Figura 3A). Com dez semanas de infecção, houve maior atividade da arginase no LN<sub>d</sub> (Figura 3A), novamente comparado aos animais não infectados. Este aumento na atividade da arginase, 10 (dez) semanas após infecção, pode explicar a manutenção do parasita no linfonodo até o sexto mês de infecção (Figura 2B).

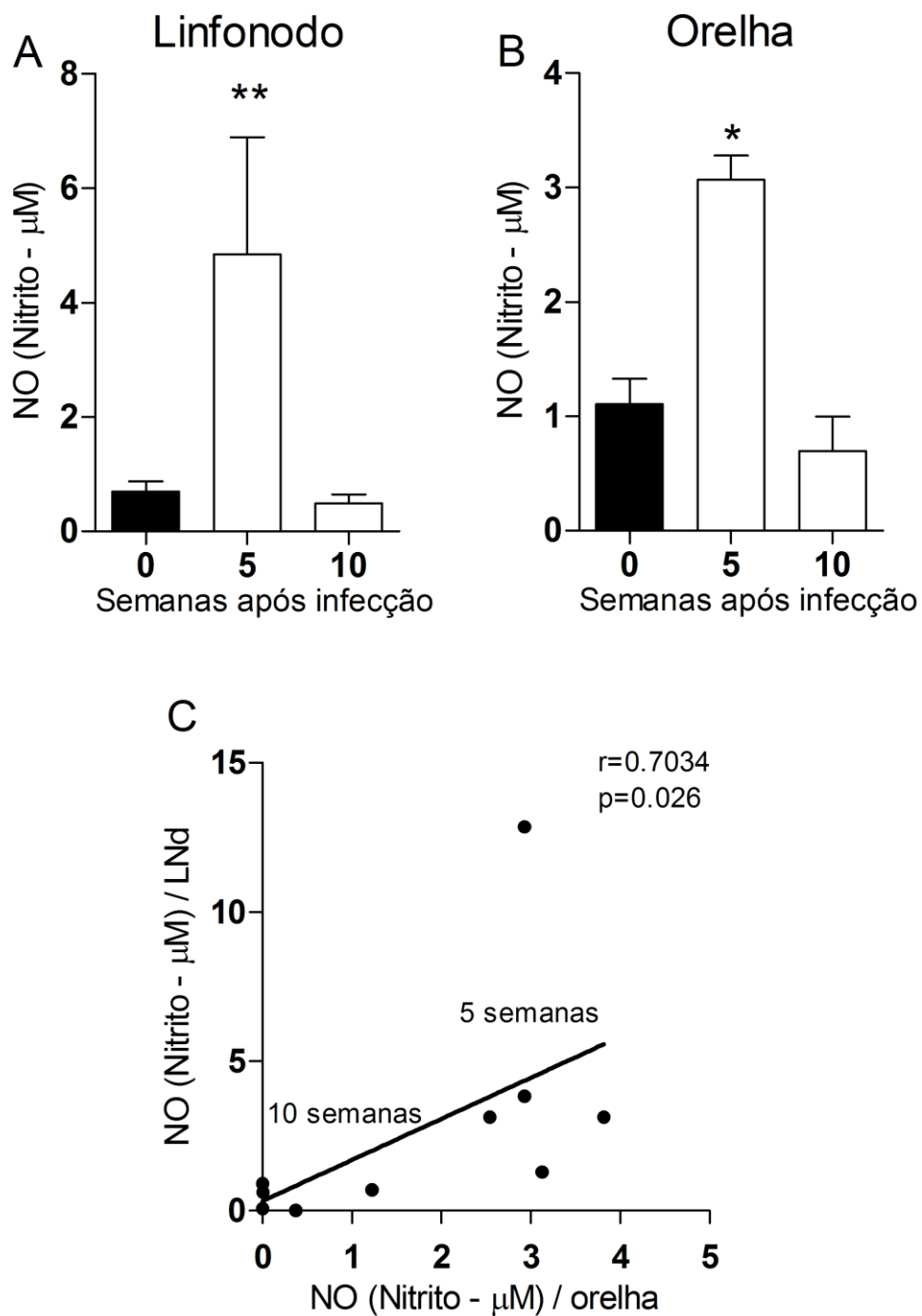
Na orelha, a atividade da arginase aumentou significativamente na 5<sup>a</sup> (quinta) semana (Figura 3B) e, diminuiu para os níveis basais após 10 (dez) semanas, comparando com animais não infectados. Esta mudança na atividade da arginase, ao longo das semanas, acompanha o desenvolvimento e a cura da lesão, respectivamente (Figura 2A), assim como a presença do parasita (Figura 2B). Observamos uma correlação negativa ( $r=-0.8601$ ) entre a atividade da arginase na orelha e no LN<sub>d</sub> ao longo da infecção (Figura 3C).





**Figura 3 – Atividade da arginase durante a infecção por *L. braziliensis*.** Camundongos BALB/c foram infectados com  $10^5$  parasitas na derme da orelha. Cinco e dez semanas após a infecção, os LNd (A) e as orelhas (B) infectadas foram maceradas e utilizados para medir a atividade da arginase. O gráfico de correlação (C) foi construído a partir dos valores obtidos em (A) e em (B). Os resultados são representativos de dois experimentos realizados separadamente, e representam a média e desvio padrão de 5 (cinco) animais por grupo. \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$  e \*\*\*  $p < 0.001$ .

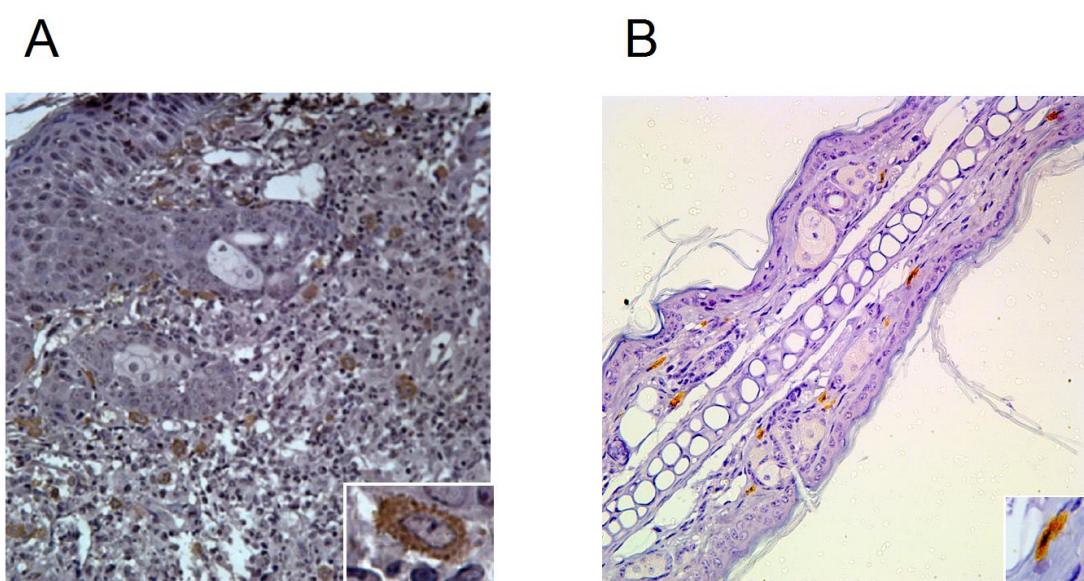
Com relação à produção de NO, observamos um fenômeno diferente: tanto no LN<sub>d</sub> (Figura 4A), quanto na orelha (Figura 4B), o pico da produção de NO aconteceu na 5<sup>a</sup> (quinta) semana após à infecção. Com 10 (dez) semanas de infecção, esta produção diminuiu em ambos os sítios, tornando-se similar aos níveis encontrados em animais não infectados (Figura 4A e B). Nesse momento (10 semanas após a infecção), observamos a cicatrização da lesão e a persistência do parasita no LN<sub>d</sub> (Figura 1). Observamos, portanto, uma correlação positiva entre a produção de NO na orelha e no dLN (Figura 4C).



**Figura 4 – Produção de óxido nítrico durante a infecção por *L. braziliensis*.** Camundongos Balb/c foram infectados com  $10^5$  parasitas na derme da orelha. Após 5 e 10 semanas de infecção, os LNd (A) e as orelhas (B) infectadas foram macerados e utilizados para medir a produção de nitrito, pela reação de Griess, como uma medida indireta da produção de NO. O gráfico de correlação (C) foi construído a partir dos valores obtidos em (A) e em (B). Os

resultados são representativos de dois experimentos realizados separadamente e, apresentam a média e desvio padrão de 5 (cinco) animais por grupo. \* $p < 0.05$  e \*\* $p < 0.01$ .

A produção de NO na orelha infectada foi comprovada por imunohistoquímica. Como mostra a Figura 5A, detectamos uma ampla marcação para a enzima iNOS na derme da orelha dos animais, após 5 semanas de infecção, principalmente em células mononucleares. Na décima semana, essa marcação diminuiu consideravelmente (Figura 5B).

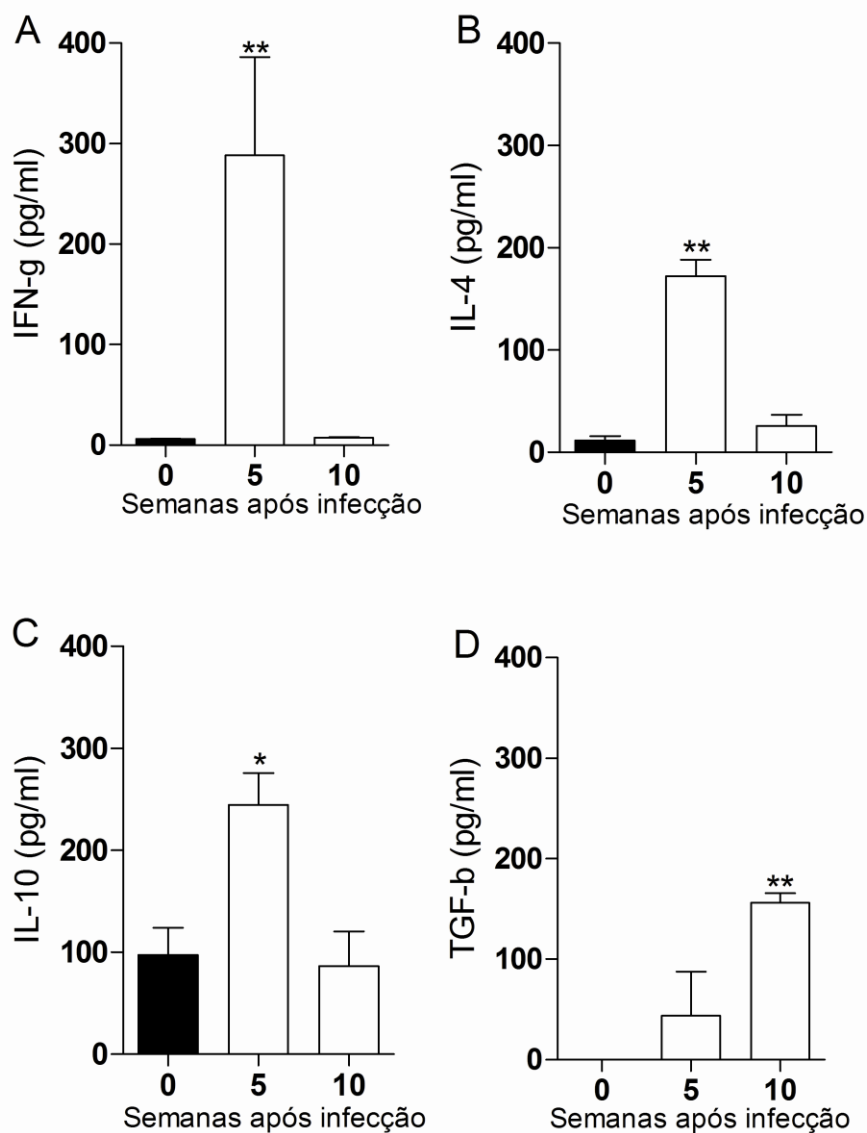


**Figura 5 - Presença de iNOS na derme de animais infectados com *L. braziliensis*.** A presença de iNOS foi determinada por imunohistoquímica na orelha dos camundongos Balb/c após 5 (A) e 10 (B) semanas de infecção por *L. braziliensis*. O detalhe mostra a marcação em células mononuclear. Magnificação x 400 (imagem maior) e x1000 (detalhe).

### 5.3. Perfil de citocinas no LNd de camundongos infectados por *L. braziliensis*

Sabendo que a resposta imune pode modular a atividade da arginase e da iNOS, avaliamos a produção de citocinas em diferentes tempos após a infecção. Cinco semanas após a infecção, houve um aumento significativo na

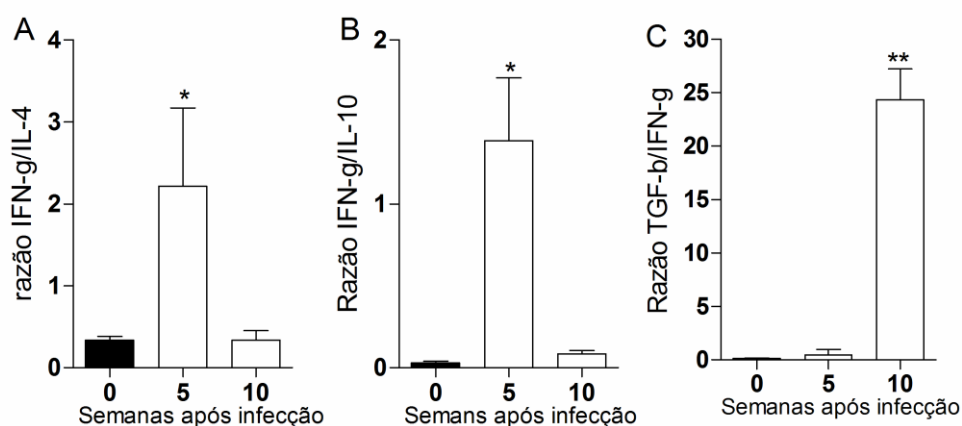
quantidade IFN-g (Figura 6A), quando comparado com o camundongo não infectado. Com 10 semanas, a produção de IFN-g foi similar à observada nos animais controles. Fenômeno similar foi notado com relação à produção de IL-4 (Figura 6B) e de IL-10 (Figura 6C). Por outro lado, notamos um acúmulo acentuado de TGF-b na 10ª semana de infecção (Figura 6D).



**Figura 6 – Cinética da produção de citocinas em animais infectados por *L. braziliensis*.** Camundongos Balb/c foram infectados com  $10^5$  parasitas na derme da orelha. Em diferentes tempos após a infecção, as células do LNd foram re-

estimuladas com promastigotas e, osobrenadante da cultura foi utilizado para dosagem IFN-g (A), IL-4 (B), IL-10 (C) e TGF-b (D) por ELISA. Os resultados são representativos de dois experimentos realizados separadamente e, apresentam a média e desvio padrão de 5 (cinco) animais por grupo.  $*p < 0.05$  e  $**p < 0.001$ .

Quando calculamos a razão IFN-g/IL-4 e IFN-g/IL-10, notamos que na quinta semana após a infecção, há mais IFN-g do que IL-4 ou IL-10 (Figuras 7A e 7B) e, esse padrão se inverte na décima semana. O mesmo padrão foi seguido quanto à razão entre IFN-g/TGF-b (Figura 7C). Pelo perfil de citocinas, confirmamos que há um predomínio de IFN-g na quinta semana de infecção e, podemos relacionar estes dados com a produção de NO elevada, no LNd (Figura 4A). Essa situação se altera na décima semana, quando há predomínio de IL-4, IL-10 e TGF-b, caracterizando um perfil anti-inflamatório, com maior atividade da arginase (Figura 3A), também no LNd.



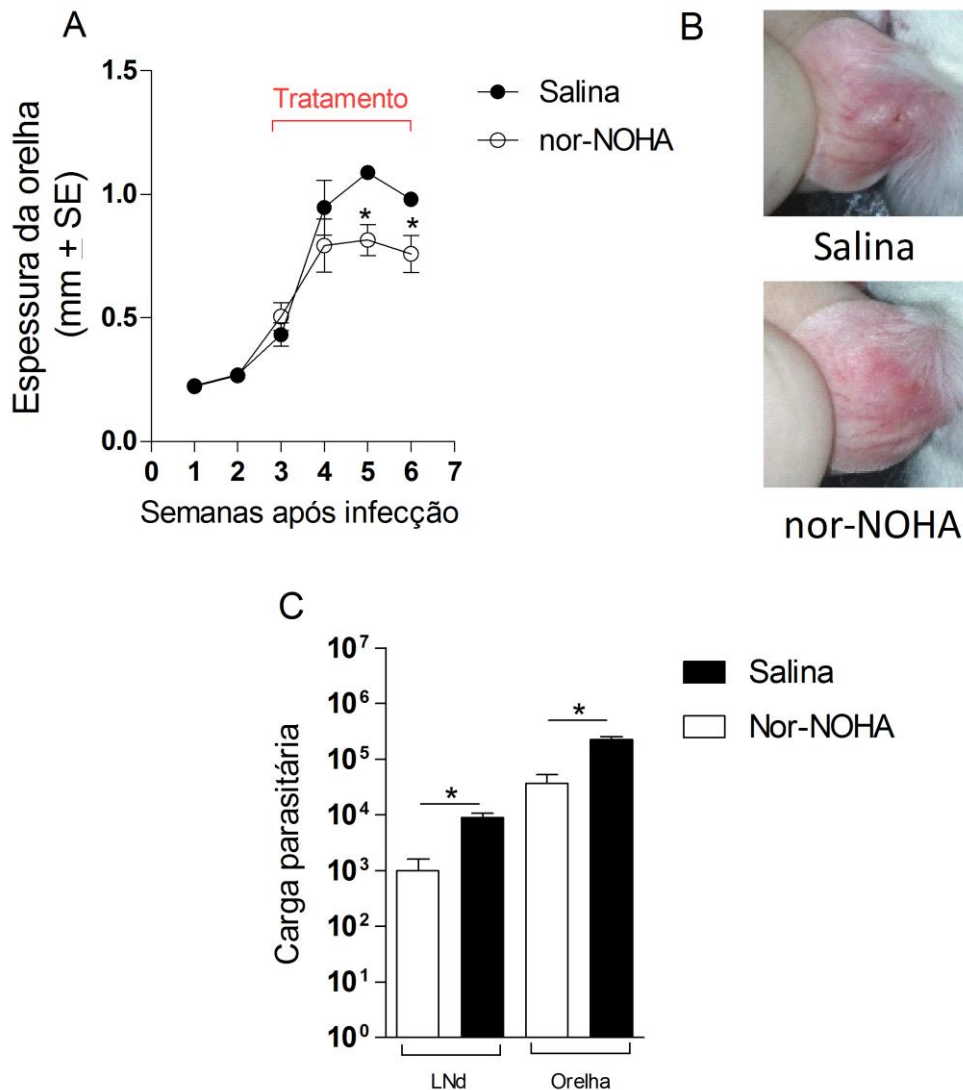
**Figura 7 – Razão entre citocinas pró e anti-inflamatórias, durante a infecção por *L. braziliensis*.** As razões IFN-g/IL-4 (A), IFN-g/IL-10 (B) e TGF-b/IFN-g (C) foram calculadas com base nos valores de produção de citocinas obtidos em diferentes tempos após a infecção (Figura 5). Os resultados são representativos de dois experimentos realizados separadamente e apresentam a média e desvio padrão de 5 animais por grupo. \* $p < 0.05$  e \*\* $p < 0.001$ .

#### 5.4. Inibição competitiva da arginase durante a infecção por *L. braziliensis*

Nossos dados mostram uma relação entre a atividade da arginase, o desenvolvimento da lesão na orelha e a persistência dos parasitas no LNd. Para aprofundarmos nestes achados, camundongos BALB/c foram infectados e, após três semanas de infecção, os animais foram tratados com nor-NOHA, um inibidor competitivo da arginase, durante três semanas.

Com a inibição competitiva da arginase, houve menor desenvolvimento da lesão (Figura 8A), evidenciado pela imagem das orelhas no momento da eutanásia (sexta semana após a infecção) (Figura 8B). Além disso, observamos, nesse mesmo tempo, uma diminuição significativa no número de parasitas, tanto na orelha quanto no LNd dos animais tratados (Figura 8C).

Estes resultados sugerem que, na orelha, a atividade da arginase está associada com o desenvolvimento da lesão, enquanto que, no LNd, a arginase está associada com a persistência dos parasitas.



**Figura 8 – Inibição da atividade da arginase na infecção por *L. braziliensis*.**

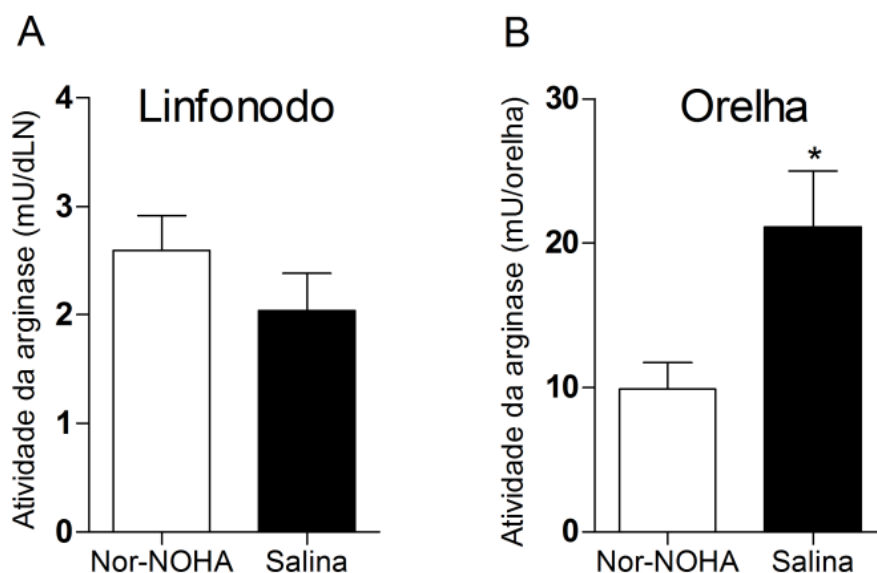
Camundongos BALB/c foram infectados na derme da orelha e, após três semanas de infecção, os animais foram tratados diariamente com Nor-NOHA, durante três semanas. O tamanho da lesão foi mensurado semanalmente (A). (B) Foto representativa das orelhas de animais infectados e tratados ou não, na sexta semana de infecção. A carga parasitária foi determinada na orelha e LNd (C) por meio de diluição limitante. Os resultados são representativos de dois



experimentos realizados separadamente e, representam a média e desvio padrão de 5 animais por grupo. \* $p < 0.05$ .

### 5.5. Atividade da arginase e produção de NO em animais infectados por *L. braziliensis* e tratados com nor-NOHA

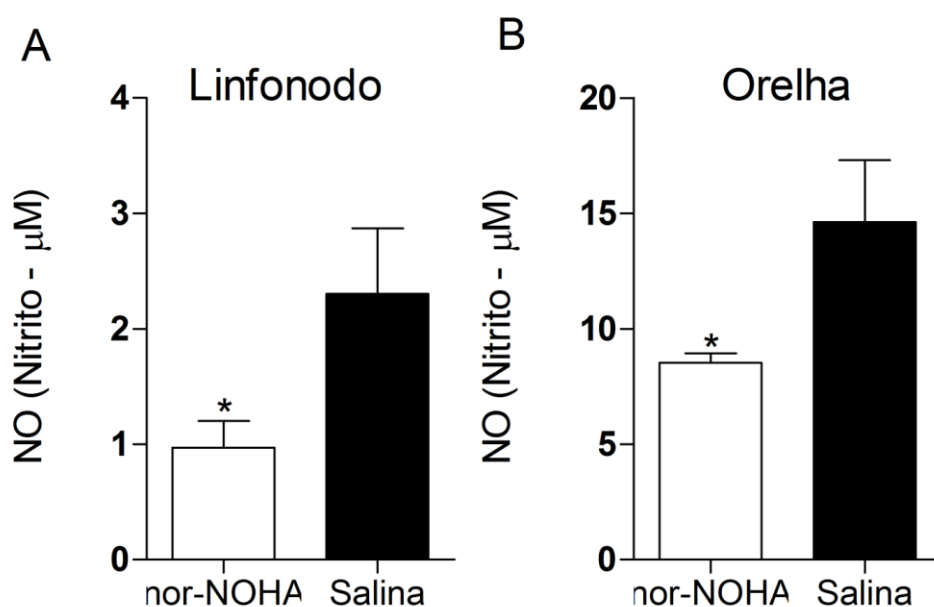
Para confirmarmos o efeito do tratamento do inibidor competitivo da arginase, determinamos a atividade da arginase e a produção de NO após três semanas de tratamento. Na sexta semana de infecção, não houve diferença significativa na atividade da arginase no LNd, comparando os grupos tratado e controle (Figura 9A). Na orelha, por outro lado, a atividade da arginase foi significativamente menor (Figura 9B), o que pôde ser relacionado com o menor tamanho da lesão (Figura 8A) e com o menor número de parasitas (Figura 8C), nesse mesmo tempo.



**Figura 9 – Atividade da arginase em animais infectados com *L. braziliensis* tratados com Nor-NOHA.** Camundongos BALB/c foram infectados na derme da orelha e, após três semanas de infecção, os animais

foram tratados diariamente com Nor-NOHA, durante três semanas. Na sexta semana de infecção, os animais foram eutanasiados e, as células do LNd (A) ou da orelha (B) foram utilizadas para medir a atividade da arginase. Os resultados são de dois experimentos realizados separadamente e representam a média e desvio padrão de 5 animais por grupo.  $*p < 0.05$

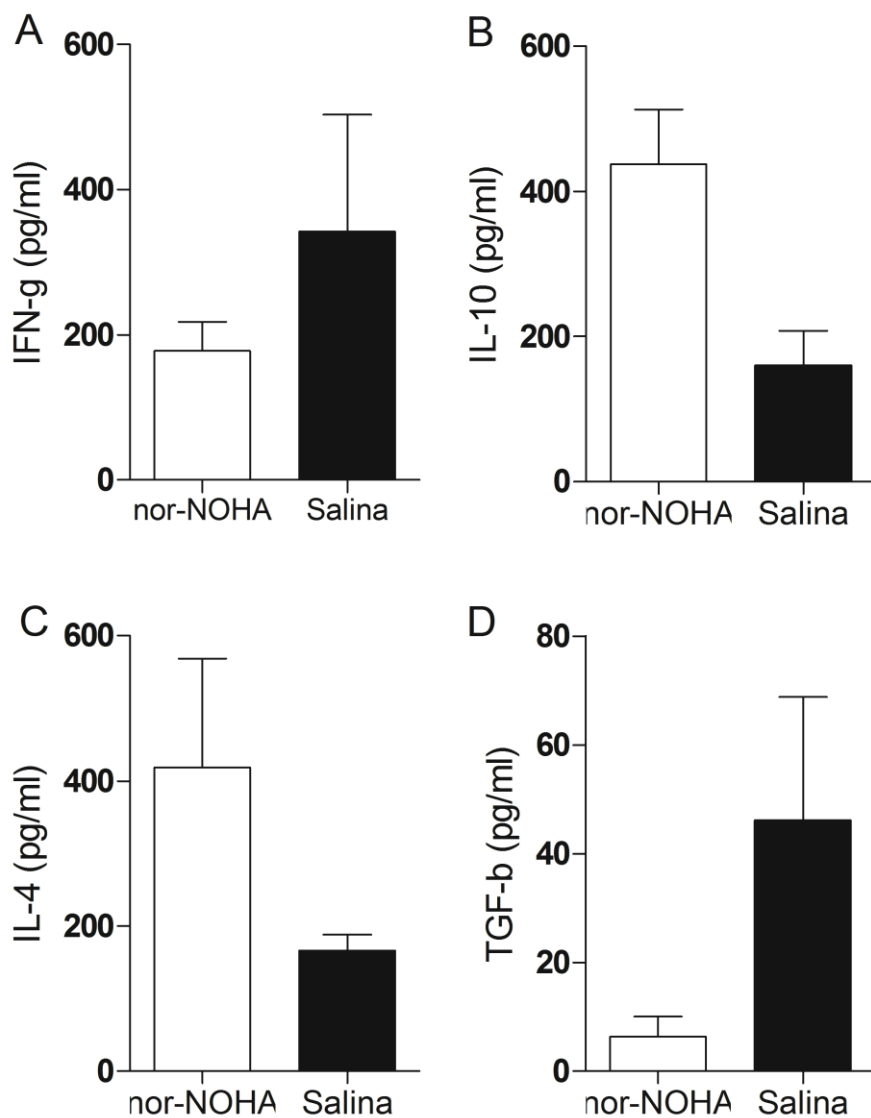
Quanto à produção de NO, observamos uma diminuição significativa, tanto no LNd (Figura 10A), quanto na orelha (Figura 10B), dos animais tratados com nor-NOHA.



**Figura10 – Produção de NO em animais infectados com *L. braziliensis* tratados com nor-NOHA.** Camundongos BALB/c foram infectados na derme da orelha e, após três semanas de infecção, os animais foram tratados diariamente com Nor-NOHA, durante três semanas. Na sexta semana de infecção, os animais foram eutanasiados e, as células do LNd (A) ou da orelha (B) foram utilizadas para medir a produção de NO. Os resultados são representativos de dois experimentos realizados separadamente e, representam a média e desvio padrão de 5 animais por grupo.  $*p < 0.05$ .

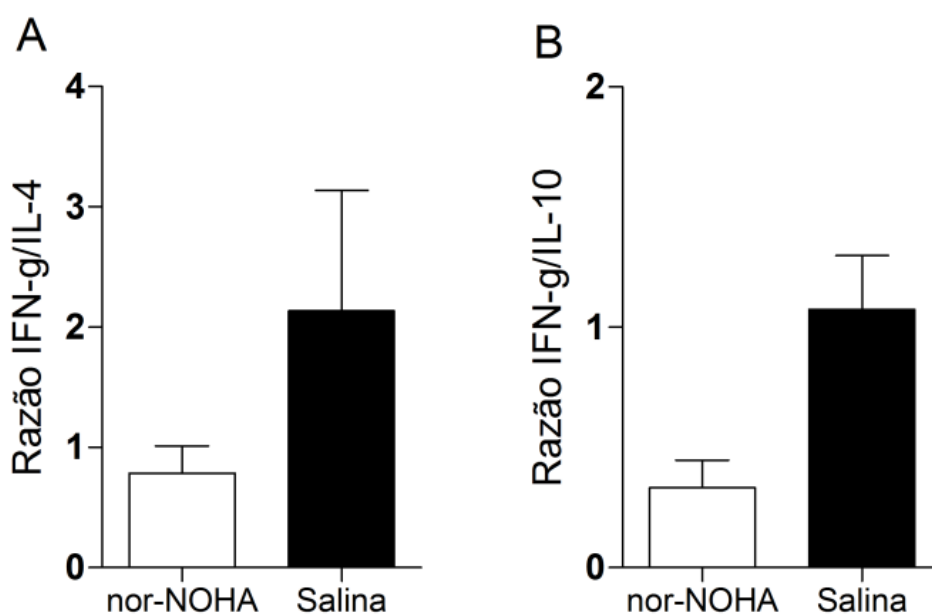
## 5.6 Perfil de citocinas no LN<sub>d</sub> de animais infectados por *L. braziliensis* e tratados com Nor-NOHA

Como exposto acima, a inibição competitiva da atividade da arginase acelerou a cura da lesão (Figura 8A) e diminuiu a atividade da arginase na orelha (Figura 7A). Na oportunidade em tela, avaliamos, a produção de citocinas nesses animais, a partir da re-estimulação das células do LN<sub>d</sub>. Nos animais tratados com nor-NOHA, o nível de IFN-g foi menor em relação aos animais controle (Figura 11A). Por outro lado, notamos um aumento na produção de IL-4 (Figura 11B) e de IL-10 (Figura 11C), quando comparado com o grupo controle. Esse perfil, observado no tratamento com inibidor da arginase, foi similar ao encontrado nos animais curados clinicamente, após a infecção com *L. braziliensis* (Figura 6). Entretanto, a quantidade de TGF- $\beta$  foi menor nos animais tratados do que nos controles.



**Figura 11 – Produção de citocinas em animais infectados com *L. braziliense* tratados com nor-NOHA.** Camundongos BALB/c foram infectados na derme da orelha e, após três semanas de infecção, os animais foram tratados diariamente com Nor-NOHA, durante três semanas. Na sexta semana de infecção, os animais foram eutanasiados e, as células do LN<sub>d</sub> foram re-estimuladas com promastigotas. O sobrenadante da cultura foi utilizado para dosagem IFN-g (A), IL-4 (B), IL-10 (C) e TGF-b (D) por ELISA. Os resultados são representativos de dois experimentos realizados separadamente, os quais representam a média e desvio padrão de 5 animais por grupo.

O cálculo da razão da produção de IFN-g/IL-4 (Figura 12A) e de IFN-g/IL10 (Figura 12B) mostrou a presença de um perfil anti-inflamatório nos animais tratados com nor-NOHA. Este perfil pode estar relacionado à cura mais rápida da lesão na orelha.

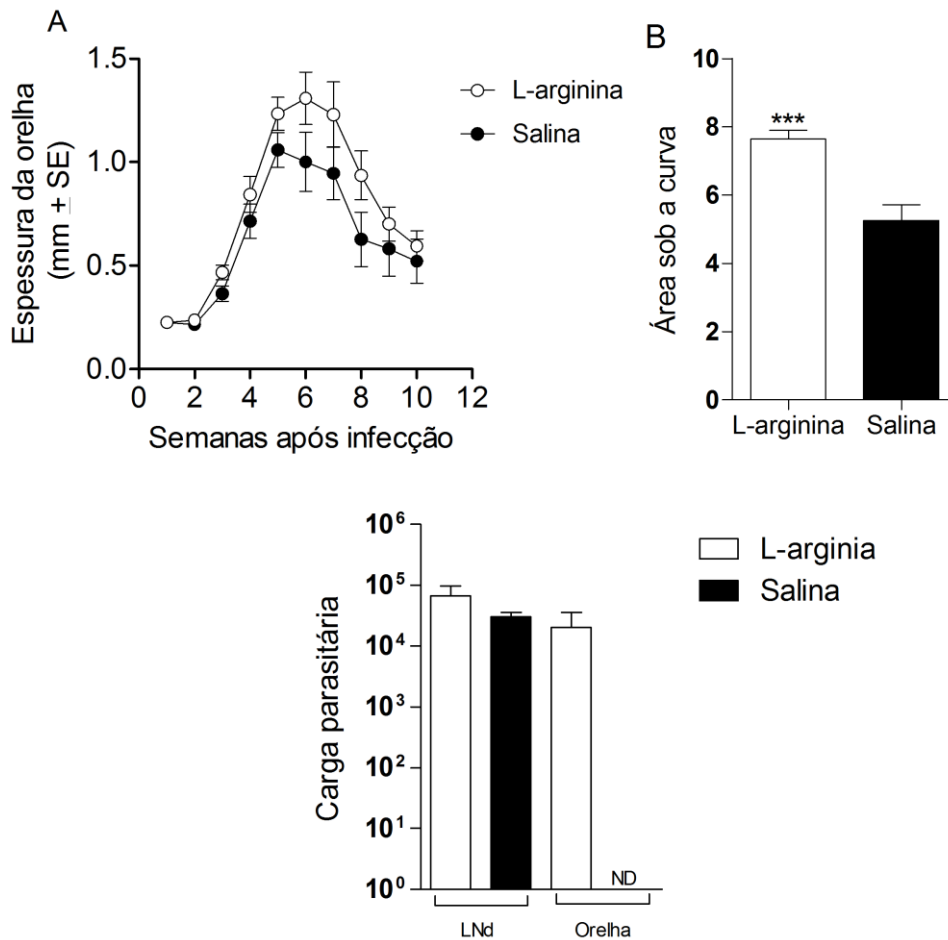


**Figura 12 – Razão entre citocinas pró e anti-inflamatórias, em animais infectados com *L. braziliensis* tratados com nor-NOHA.** As razões IFN-g/IL-4 (A), IFN-g/IL-10 (B) foram calculadas com base nos valores de produção de citocinas obtidos em animais infectados com *L. braziliensis*, tratados com nor-NOHA. Os resultados são de dois experimentos realizados separadamente, representando a média e desvio padrão de 5 animais por grupo.

## 5.7. Aumento da disponibilidade de L-arginina durante a infecção por *L. braziliensis*

Conforme salientado nas linhas anteriores, a L-arginina é o substrato, tanto para a enzima arginase, quanto para a iNOS. Sendo assim, resolvemos avaliar o efeito de uma maior disponibilidade de L-arginina durante a fase inicial da infecção experimental por *L. braziliensis*, no período em que observamos maior atividade da enzima (Figura 3). Os animais receberam L-arginina dois dias antes da infecção e durante uma semana após a infecção.

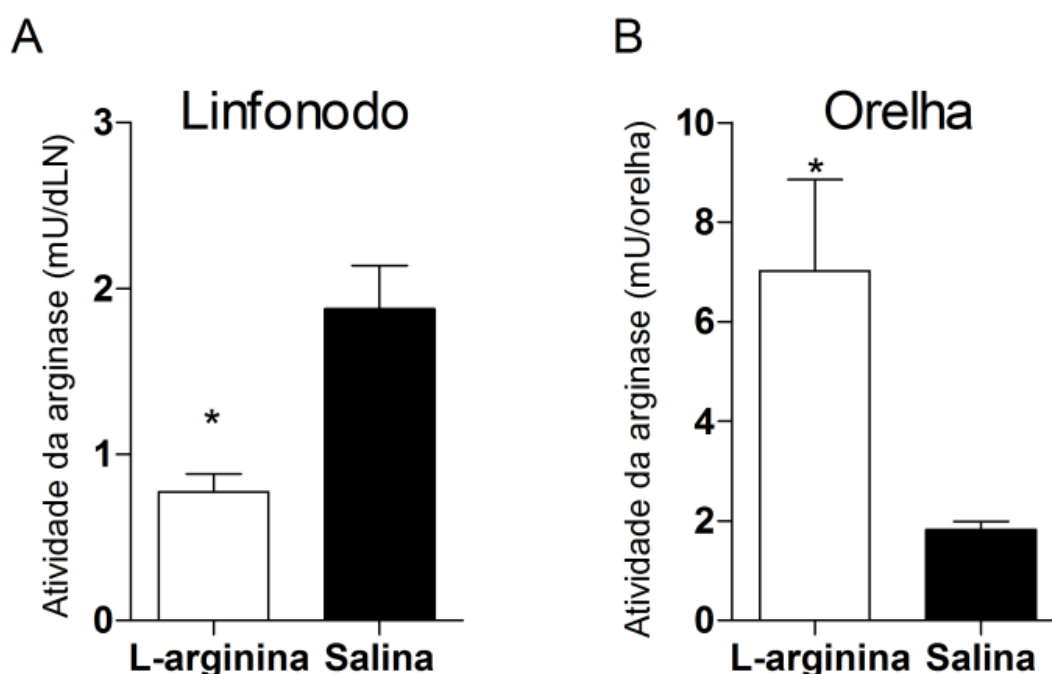
Os animais suplementados com L-arginina apresentaram uma lesão maior quando comparados aos animais controle (Figura 13A), confirmado pelo gráfico, mostrando a área sob a curva da lesão (Figura 13B). Não observamos diferença no número de parasitas no LNd. Entretanto, foi possível detectar a presença de parasitas nas orelhas dos animais tratados, dez semanas após infecção, ao contrário dos animais que receberam somente salina (Figura 13C). Vale lembrar que, nesse modelo de infecção, os parasitas não são observados na orelha, quando as mesmas apresentam curam clínica (Figura 2B).



**Figura 13 – A suplementação com L-arginina exacerba a infecção por *L. braziliensis*.** Camundongos BALB/c foram infectados na derme da orelha. Dois dias antes da infecção e, durante uma semana após infecção, os animais receberam L-arginina, totalizando dez dias de suplementação. O tamanho da lesão foi mensurado semanalmente (A). (B) Cálculo da área sob as curvas mostradas em (A). (C) A carga parasitária foi determinada na décima semana, após a infecção por meio de diluição limitante. Os resultados representam a média e desvio padrão de um experimento com 5 animais por grupo. \*\*\* $p < 0.001$ . ND: não detectado.

### 5.8. Atividade da arginase e produção de NO em animais tratados com L-arginina e infectados por *L. braziliensis*

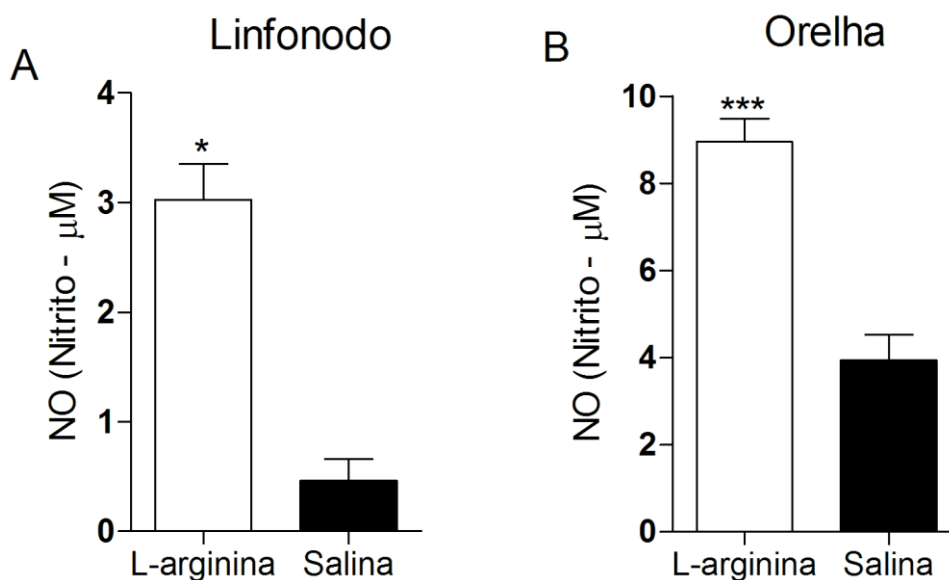
Sabendo que o aumento da disponibilidade de L-arginina exacerba a manifestação clínica (Figura 13B) e que promove a persistência da *L. braziliensis* na orelha (Figura 13C), verificamos a atividade da arginase e a produção de NO nesses animais. A atividade de arginase foi significativamente menor no LNd dos animais suplementados (Figura 14A) e, ao contrário, foi maior ( $p < 0.05$ ) na orelha (Figura 14B), quando comparados com os animais controle.



**Figura 14 – Atividade da arginase em animais suplementados com L-arginina e infectados com *L. braziliensis*.** Camundongos BALB/c foram infectados na derme da orelha. Dois dias antes da infecção e, durante uma semana após a infecção, os animais receberam L-arginina, totalizando dez dias de suplementação. Após 10 (dez) semanas de infecção, células do LNd (A) ou da orelha (B) foram utilizados para medir a atividade da arginase. Os resultados representam a média e desvio padrão de um experimento com 5 animais por grupo.  $*p < 0.05$ .



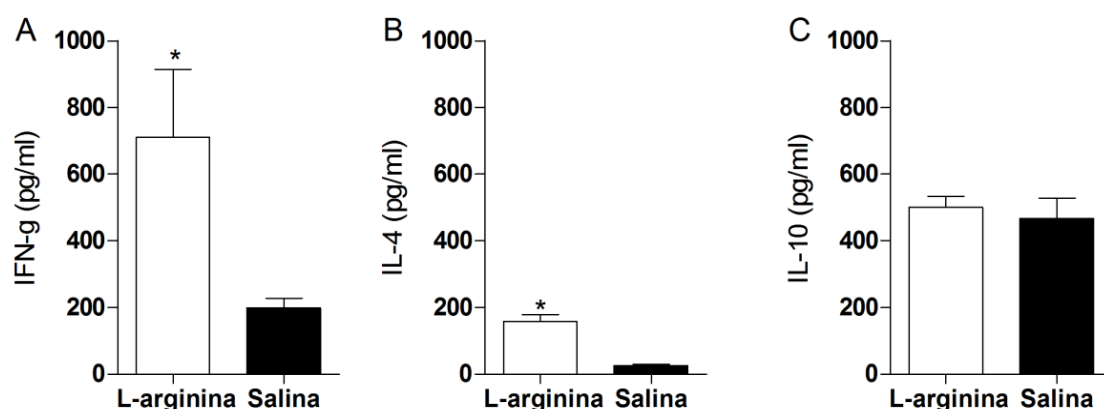
Ao avaliarmos a produção de NO, notamos que, tanto o LN<sub>d</sub> (Figura 15A), quanto a orelha (Figura 15B), dos animais tratados com L-arginina apresentaram mais NO ( $p < 0.05$ ) do que os animais controle.



**Figura 15 – Produção de NO em animais suplementados com L-arginina e infectados com *L. braziliensis*.** Camundongos BALB/c foram infectados na derme da orelha. Dois dias antes da infecção e, durante uma semana após infecção, os animais receberam L-arginina, totalizando dez dias de suplementação. A produção de NO, no LN<sub>d</sub> (A) ou na orelha (B), foi determinada por reação de Griess, como uma medida indireta da produção de NO na décima semana após infecção. Os resultados representam a média e desvio padrão de 5 animais por grupo. \* $p < 0.05$  e \*\*\* $p < 0.001$ .

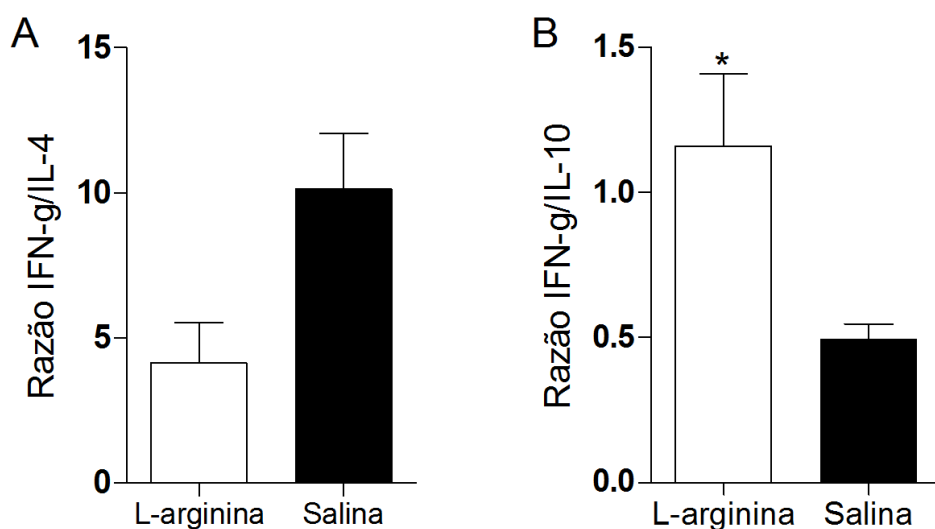
## 5.9. Perfil de citocinas no LNd de camundongos tratados com L-arginina e infectados por *L. braziliensis*

Animais tratados com L-arginina desenvolvem lesões maiores e, falham em eliminar os parasitas da orelha após dois meses de infecção (Figura 13). Nesses animais, notamos aumento na produção de arginase (Figura 14) e de NO (Figura 15). A partir desses resultados, avaliamos o perfil de citocinas, observamos, assim, níveis elevados ( $p < 0.05$ ) de IFN-g (Figura 16A) e de IL-4 (Figura 16B). Por outro lado, não houve diferença na produção de IL-10 (Figura 16C).



**Figura 16 – Produção de citocinas em animais suplementados com L-arginina, após a infecção por *L. braziliensis*.** Camundongos BALB/c foram infectados na derme da orelha. Dois dias antes da infecção e, durante uma semana após infecção, os animais receberam L-arginina, totalizando dez dias de suplementação. Após dez semanas de infecção, as células do LNd foram reestimuladas in vitro e, o sobrenadante da cultura, foi utilizado para dosagem IFN-g (A), IL-4 (B) e IL-10 (C) por ELISA. Os resultados são representativos de dois experimentos realizados separadamente, representando a média e o desvio padrão de 5 animais por grupo. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.001$ .

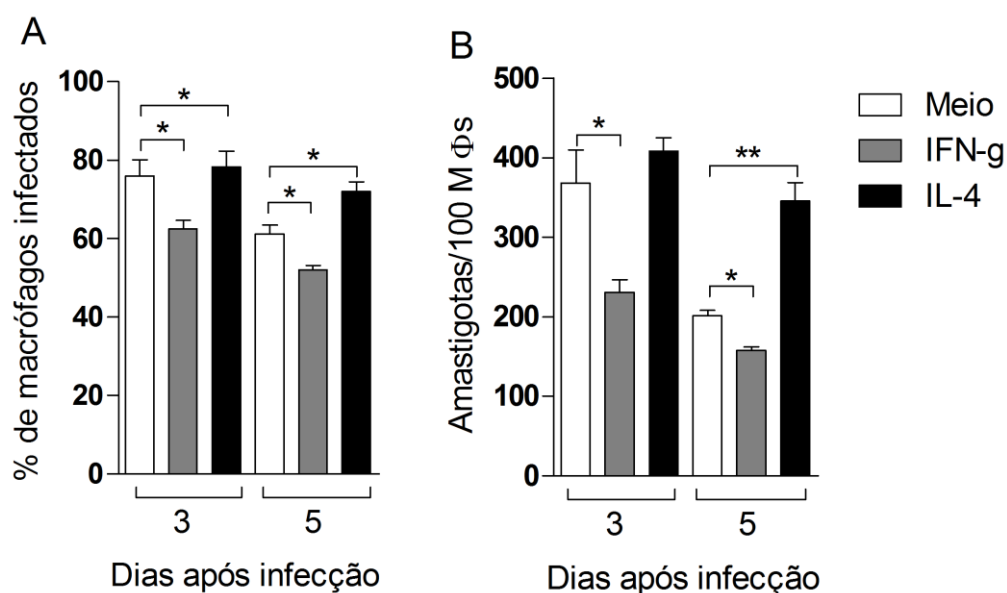
O cálculo da razão da produção de IFN-g/IL-4 (Figura 17A) e de IFN-g/IL10 (Figura 17B) mostrou a presença de um perfil pro-inflamatório nos animais suplementados com L-arginina. Este perfil pode estar relacionado com a tentativa de controlar os parasitas persistentes da orelha (Figura 13C), por meio do aumento da produção de NO (Figura 15B) e, em função da maior disponibilidade de L-arginina.



**Figura 17 – Razão entre citocinas pró e anti-inflamatórias, em animais infectados com *L. braziliensis* suplementados com L-arginina.** As razões IFN-g/IL-4 (A), IFN-g/IL-10 (B) foram calculadas com base nos valores de produção de citocinas obtidos em animais infectados com *L. braziliensis*, suplementados com L-arginina. Os resultados são um experimento e, por sua vez, representam a média e desvio padrão de 5 animais por grupo. \* $p < 0.05$ .

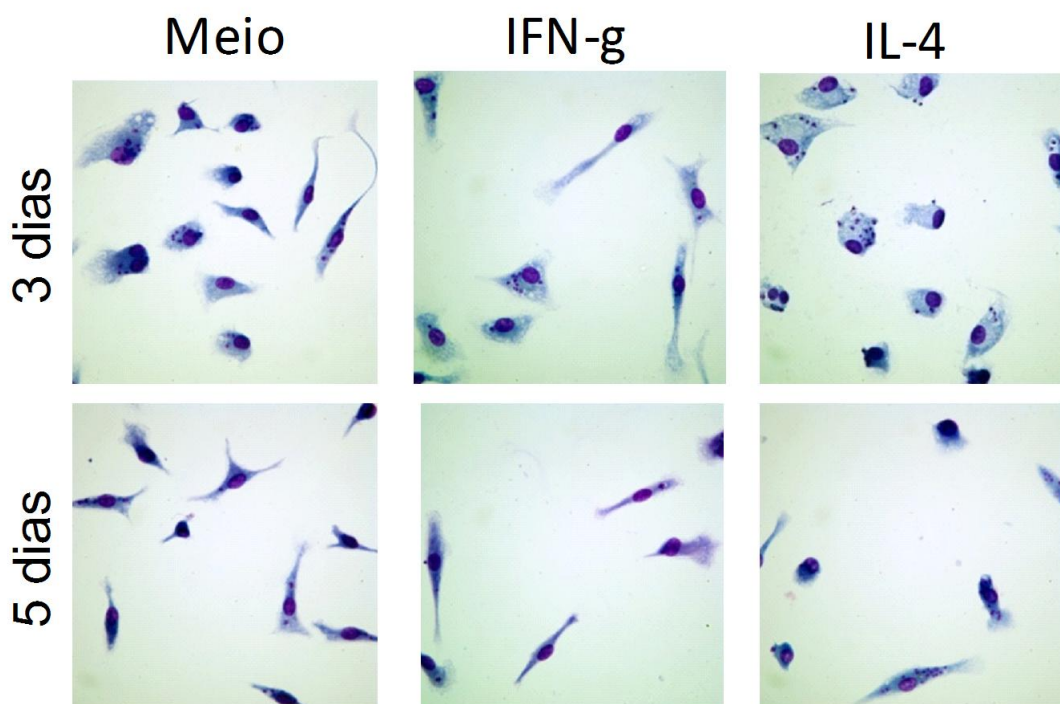
5.10. Infecção de macrófagos de camundongos BALB/c por *L. braziliensis* na presença de citocinas pró e anti-inflamatórias.

Sabendo que as citocinas estão envolvidas no processo de eliminação ou manutenção do parasita durante o desenvolvimento da LT causada por *L. braziliensis*, resolvemos testar esse efeito *in vitro*. Para isso, macrófagos murinos mantidos na presença de IL-4 ou de IFN-g foram infectados com parasitas. Quando os macrófagos foram mantidos na presença de IFN-g, a porcentagem de células infectadas foi significativamente menor (Figura 18A) assim como o número de parasitas (Figura 18B), quando comparado com as células controle. Ao contrário, na presença de IL-4, há uma manutenção do número de células infectadas (Figura 18A), bem como no número de parasitas (Figura 17B).



**Figura 18– Replicação de *L. braziliensis* em macrófagos estimulados com IL-4 ou IFN-g.** Macrófagos residentes peritoneais foram infectados com Lb e mantidos em cultura por 1, 3 e 5 dias, na presença de IFN-g ou de IL-4. A porcentagem de macrófagos infectados (A), bem como o número de parasitas por 100 células (B). Os resultados são representativos de um experimento e representam à média e desvio padrão de quintuplicata. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ .

De fato, ao observamos as lamínulas coradas, é possível notar maior quantidade de macrófagos infectados quando estes são cultivados na presença de IL-4, ao contrário do que acontece na presença de IFN-g (Figura 19)



**Figura 19– Macrófagos peritoneais estimulados com diferentes citocinas respondem de forma desigual à infecção por *L. braziliensis*.** Macrófagos residentes peritoneais foram infectados com *L. braziliensis*, mantidos em cultura na presença de IFN-g ou de IL-4. As lamínulas foram fixadas após 1, 3 ou 5 dias de cultura, sendo-as coradas com H&E. Fotografias representativas. Magnificação 1000x. Os resultados são representativos de um experimento realizado em quintuplicata.

## 6. DISCUSSÃO

---

A arginase é uma enzima expressa por diferentes tipos celulares, incluindo a *L. braziliensis*, a qual pode ser modulada em função do tipo de ambiente (inflamatório x anti-inflamatório), onde as células se encontram (Munder *et al.*, 1999). Durante a infecção experimental de camundongos BALB/c por *L. braziliensis*, os animais desenvolvem uma lesão que cura espontaneamente (Moura *et al.*, 2005) e, permanecem albergando parasitas no LNd. Nesse modelo, os animais infectados apresentam uma resposta mista, com a presença de citocinas pró e anti-inflamatórias. Desta forma, resolvemos avaliar o papel da arginase nesse modelo e, assim, partimos da hipótese que há uma relação entre o desenvolvimento da lesão, a persistência do parasita e a atividade da arginase.

Os animais apresentam um pico de atividade da arginase e de produção de NO na quinta semana após a infecção por *L. braziliensis*, o que coincidiu com o desenvolvimento da lesão. Na décima semana, a atividade da arginase e a produção de NO foram reduzidos aos níveis encontrados antes da infecção e esse resultado coincidiu com a cura da lesão. Durante a infecção por *L. major* também se observou uma relação entre o desenvolvimento da lesão e a atividade da arginase (Iniesta *et al.*, 2005; Kropf *et al.*, 2005). Nesses trabalhos, os autores mostraram que, quanto maior a atividade da arginase, maior a disponibilidade de ornitina para produção de poliaminas, favorecendo diretamente a proliferação do parasita e o tamanho da lesão (Kropf *et al.*, 2005). Em paralelo, a menor disponibilidade de L-arginina, por causa da arginase elevada, diminui a produção de IFN- $\gamma$  por linfócitos T, em função da

redução na expressão da cadeia zeta do CD3 (Rodriguez *et al.*, 2003, 2004), e da parada dessas células na fase G0-G1 do ciclo celular, associada com a ausência do aumento da ciclina D3 e ciclina dependente de quinase 4 (cdk4) (Rodriguez, Quiceno and Ochoa, 2007), comprometendo a ativação dos macrófagos e a destruição do parasita.

No modelo de infecção por *L. braziliensis*, a cinética de produção de NO e a atividade da arginase podem ser explicadas, em parte, pela existência de um padrão misto de resposta, com a presença de citocinas do tipo Th1 e Th2: há predomínio de IFN-g na fase aguda da infecção (na quinta semana), motivo pelo qual, sugerimos que os linfócitos Th1 (produtores de IFN-g) migram ao sítio da infecção e ativam os macrófagos, levando ao controle na replicação do parasita. Este controle também acontece no LN<sub>d</sub>, uma vez que, nesta fase, deve haver grande número de parasita, drenando ao LN. Na fase crônica (a partir da 10<sup>a</sup> semana após infecção), há mais IL-4, IL-10 e TGF- $\beta$ . Os linfócitos produtores de citocinas do tipo Th2 e/ou Treg podem favorecer o processo de cicatrização da orelha, por meio do aumento inicial da atividade da arginase. Ao mesmo tempo, promovem a manutenção de parasitas no LN<sub>d</sub>. Sugerimos que esses linfócitos produtores de citocinas do tipo Th2 e/ou Treg estão ligados à persistência do parasita no LN<sub>d</sub>, porque camundongos deficientes para o receptor de IL-10 ou camundongos tratados com anticorpo anti-IL-10R produzem uma forte resposta Th1, que leva à total destruição dos parasitas (Belkaid *et al.*, 2001). Falcão *et al.* (2012) também observaram o acúmulo de células TCD4+CD25+ no LN<sub>d</sub> e no sítio da infecção de camundongos BALB/c infectados com *L. braziliensis*, no momento da cura clínica. Assim, as células

Treg podem estar contribuindo para a diminuição da inflamação na lesão e para a persistência do parasita no LNd.

Além disso, como sabemos, o IFN-g leva a ativação de macrófagos com a consequente indução da expressão da enzima iNOS, que metaboliza a arginina em NO. O NO está relacionado com a eliminação do parasita e com a cicatrização da lesão (Witte e Barbul, 2002). Camundongos deficientes para IFN-g e IL-12 desenvolvem lesões crônicas ao serem infectados por *L. braziliensis* (DeKrey, Lima and Titus, 1998; Rocha *et al.*, 2007). Rocha *et al.* (2007) demonstraram que camundongos deficientes em iNOS e, infectados com *L. braziliensis*, desenvolvem lesões que não curam. Camundongos infectados com cepas de *L. braziliensis* isoladas de pacientes resistentes ao tratamento têm lesões maiores, com maior expressão de arginase I, e aumento na quantidade de IL-4 no dLN (Costa *et al.*, 2011). Entretanto, a ausência do receptor para IL-4 em macrófagos e em neutrófilos de camundongos susceptíveis atenua a infecção por *L. mexicana*, o que foi associado à menor expressão e atividade da arginase e à maior produção de NO (Hölscher *et al.*, 2006).

O parasita parece ter um papel importante também no que diz respeito à expressão de arginase, uma vez que, cepas isoladas de pacientes com LM e com LCD apresentam maior atividade de arginase, do que as cepas isoladas de pacientes com LCL (Vendrame *et al.*, 2010). Além disso, Souza *et al.* (2010) observaram que cepas de *L. braziliensis* isoladas de pacientes refratários ao tratamento são mais resistentes à ação do NO.

Durante a infecção experimental por *L. braziliensis*, observa-se grande recrutamento de neutrófilo, com maior quantidade no pico da lesão (Moura *et*



*al.*, 2005; Novais *et al.*, 2009). Iniesta *et al.* (2005) observaram a expressão de arginase I durante a infecção por *L. major* no espaço intersticial e em neutrófilos. Da mesma forma, Abebe *et al.* (2012) demonstraram que, em biópsias de pacientes com LT, causada por *L. major*, a maior parte das células que expressam arginase I são neutrófilos. O neutrófilo expressa a arginase I constitutivamente, podendo liberá-la no meio extracelular (Munder *et al.*, 2005) e, esta arginase liberada, pode modular os linfócitos T (Abebe *et al.*, 2012; Munder *et al.*, 2006). Assim, é possível que exista também uma relação entre o aumento da atividade da arginase e o recrutamento de neutrófilo durante a infecção por *L. braziliensis*.

Para ganharmos conhecimento a respeito do papel da arginase na cicatrização e na persistência da *L. braziliensis*, durante a infecção experimental, utilizamos o inibidor competitivo nor-NOHA. Nesses ensaios, notamos uma diminuição no tamanho da lesão e no número de parasitas na orelha e no LNd, fato similar ao observado por Iniesta *et al.* (2001 e 2005) e Kropf *et al.* (2005), durante a infecção por *L. major*. Este achado pode estar associado à diminuição da quantidade de ornitina, disponível para a formação de poliaminas e à maior disponibilidade de L-arginina para ser utilizada pela iNOS e pelos linfócitos T, como notado durante a infecção por *L. major* (Iniesta *et al.*, 2005; Kropf *et al.*, 2005; Modolell *et al.*, 2009), favorecendo o controle do parasita e a aceleração da cicatrização.

presença de arginase acelera a cicatrização de feridas cirúrgicas e, mas isso também, depende do aumento de NO (Kavalukas *et al.*, 2012).

No entanto, os animais tratados com nor-NOHA e infectados por *L. braziliensis* apresentaram predomínio de IL-4 e IL-10 em relação ao IFN-g e

essa resposta se assemelha à encontrada na fase crônica da infecção com *L. braziliensis* (na décima semana). Assim, o maior controle na replicação da *L. braziliensis*, durante a inibição da arginase, não está associado com a maior produção de NO na orelha. Nos ensaios de inibição da arginase em camundongos infectados por *L. major*, também não foi observado o aumento na produção de NO paralelamente à diminuição da atividade da arginase I na lesão (Kropfet al., 2005). No entanto, o perfil de citocina dos animais se manteve igual ao do controle no LNd (Iniesta et al., 2005; Modolell et al., 2009), apesar de haver maior proliferação de linfócitos TCD4 produtores de IFN-g na lesão (Modolell et al., 2009).

Contudo, a inibição da arginase de macrófagos infectados por *L. mexicana*, potencializou a produção de NO e a expressão de IL-12, favorecendo a morte do parasita e a produção de IFN-g pelo linfócito (Shweash et al., 2011). O mesmo aconteceu durante a infecção de macrófagos por *L. amazonensis*: a inibição da arginase com NOHA potencializou a morte do parasita e aumentou a produção de NO (Vendrame et al., 2007). De fato, a *L. amazonensis* é extremamente susceptível ao NO e ao superóxido (Mukbel et al., 2007).

Kropfet al. (2005) demonstraram que a disponibilização de ornitina para macrófagos tratados com nor-NOHA reverte o efeito do inibidor, aumentando a infecção e proliferação do parasita. Iniesta et al (2005) também observaram que camundongos resistentes à infecção por *L. major* tornam-se susceptíveis ao receberem ornitina. Aqui, a disponibilização de L-arginina na fase inicial da infecção por *L. braziliensis* levou ao aumento da lesão e a persistência do parasita na orelha, o que é acompanhado pelo aumento na atividade da

arginase e na produção de NO. Sugerimos, portanto, que a maior atividade da arginase promoveu maior disponibilidade de poliaminas na orelha, favorecendo a replicação e manutenção do parasita. Entretanto, também observamos maior produção de NO na orelha, o que pode ser relacionado com a maior produção de IFN-g no LNd.

As citocinas do tipo Th1 estão envolvidas com a ativação dos macrófagos e ao aumento da expressão de iNOS, bem como à produção de NO, a partir da L-arginina. Por outro lado, citocinas do tipo Th2 favorecem a desativação do macrófago, com aumento da expressão de arginase (Munder et al., 1998). Nossos experimentos *in vitro* mostraram que IL-4 favorece a infecção por *L. braziliensis*, enquanto o IFN-g ajuda no controle do parasita. Desta forma, podemos sugerir que, na presença de IFN-g, a infecção é menor, possivelmente devido ao aumento na produção de NO, como acontece durante a infecção por *L. major* (Green et al, 1990). Ao contrário, quando o macrófago é estimulado por IL-4, há maior infecção e replicação parasitária em função da maior expressão e atividade da arginase, como mostrado por Iniesta et al. (2002 e 2001), durante a infecção por *L. major*.

Pelos dados expostos, observamos que, no local da infecção, a atividade da arginase aumenta com o desenvolvimento da lesão e diminui com a cura clínica. No LNd, a atividade da arginase aumentada é encontrada junto com a persistência dos parasitas. Quando inibimos a atividade da arginase, conseguimos diminuir a carga parasitária e, conseqüentemente, a lesão. Ao contrário senso, quando aumentamos a disponibilidade do substrato para arginase, notamos maior lesão e persistência do parasita na orelha. Assim, nossos dados sugerem que, a arginase está envolvida no processo de

replicação parasitária, desenvolvimento da lesão na orelha e na persistência da *L. braziliensis* no LNd durante a infecção experimental de camundongos BALB/c.

## 7. CONCLUSÕES

---

No local da infecção, a atividade da arginase aumenta com o desenvolvimento da lesão e diminui com a cura clínica, enquanto que, no LNd, a atividade da arginase aumentada reflete a persistência dos parasitas.

O tratamento com o nor-NOHA acelera a cura da lesão de camundongos BALB/c após a infecção por *L. braziliensis*.

O aumento da arginina interfere negativamente no curso da infecção por *L. braziliensis*, tornando camundongos BALB/c mais susceptíveis.

## 8. REFERÊNCIAS

---

ABEBE, T. *et al.* Local increase of arginase activity in lesions of patients with cutaneous leishmaniasis in Ethiopia. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 6, n. 6, p. e1684, 2012.

BAECHER-ALLAN, C.; HAFLER, D. A. Human regulatory T cells and their role in autoimmune disease. **Immunological reviews**, v. 212, p. 203-16, 2006.

BARRAL, A. *et al.* Transforming growth factor f8 as a virulence mechanism for *Leishmania braziliensis*. **Immunology**, v. 90, p. 3442-3446, 1993.

BARRAL-NETTO, M.; BARRAL, A. Transforming growth factor-beta in tegumentary leishmaniasis. **Brazilian journal of medical and biological research**, v. 27, p. 1-9, 1994.

BELKAID, Y. *et al.* The role of interleukin (IL)-10 in the persistence of *Leishmania major* in the skin after healing and the therapeutic potential of anti-IL-10 receptor antibody for sterile cure. **The journal of experimental medicine**, v. 194, p. 1497-506, 2001.

BOGDAN, C. Nitric oxide and the regulation of gene expression. **Trends in cell biology**, v. 11, p. 66-75, 2001.

BOITZ, J. M. *et al.* *Leishmania donovani* Ornithine Decarboxylase Is Indispensable for Parasite Survival in the Mammalian Host. **Infection and Immunity**, v. 77, p. 756-763, 2009.

CAMARGO, E. P. Enzimas do ciclo ornitina-arginina em tripanosomatídeos: significado fisiológico e valor taxonômico. **Instituto de Química, São Paulo, Universidade de São Paulo**, 1979.

CAMPANELLI, A. P. *et al.* CD4+CD25+ T cells in skin lesions of patients with cutaneous leishmaniasis exhibit phenotypic and functional characteristics of natural regulatory T cells. **The journal of infectious diseases**, v. 193, p. 1313-22, 2006.

CARNEIRO, F. P. *et al.* Foxp3 expression in lesions of the different clinical forms of American tegumentary leishmaniasis. **Parasite immunology**, v. 31, p. 646-651, 2009.

CORRALIZA, I. M. *et al.* Determination of arginase activity in macrophages: a micromethod. **Journal of immunological methods**, v. 174, p. 231-5, 1994.

COSTA, D. L. *et al.* BALB/c mice infected with antimony treatment refractory isolate of *Leishmania braziliensis* present severe lesions due to IL-4 production. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 5, p. e965, 2011.

DEKREY, G. K.; LIMA, H. C.; TITUS, R. G. Analysis of the immune responses of mice to infection with *Leishmania braziliensis*. **Infection and immunity**, v. 66, p. 827-9, 1998.

FALCÃO, S. *et al.* The presence of Tregs does not preclude immunity to reinfection with *Leishmania braziliensis*. **International journal for parasitology**, v. 42, p. 771-780, 2012.

FREIRE-DE-LIMA, C. G. *et al.* Apoptotic cells, through transforming growth factor-beta, coordinately induce anti-inflammatory and suppress pro-inflammatory eicosanoid and NO synthesis in murine macrophages. **The Journal of biological chemistry**, v. 281, p. 38376-84, 2006.

GAUR, U. *et al.* An effect of parasite-encoded arginase on the outcome of murine cutaneous leishmaniasis. **The journal of immunology**, v. 179, n. 12, p. 8446-53, 2007.

GOERDT, S.; ORFANOS, C. E. Other functions, other genes: alternative activation of antigen-presenting cells. **Immunity**, v. 10, p. 137-42, 1999.

GORDON, S. Alternative activation of macrophages. **Nature reviews immunology**, v. 3, p. 23-35, 2003.

GREEN, L. C. *et al.* Analysis of Nitrate, Nitrite, and [15N] Nitrate in Biological Fluids. **Analytical biochemistry**, v. 126, p. 131-138, 1982.

GREEN, S. J. *et al.* Activated macrophages destroy intracellular *Leishmania major* amastigotes by an L-arginine-dependent killing mechanism. **The journal of immunology**, v. 144, p. 278-283, 1990.

HECKER, M. *et al.* Inhibition of arginase by N-G-hydroxy-L-arginine in alveolar macrophages: Implications for the utilization of L-arginine for nitric oxide synthesis. **FEBS Letters**, v. 359, p. 251-254, 1995.

HÖLSCHER, C. *et al.* Cutaneous Leishmaniasis in Nonhealing BALB / c Mice 1. **The journal of immunology**, v. 176, p. 1115-1121, 2006.

INIESTA, V. *et al.* Arginase I induction in macrophages, triggered by Th2-type cytokines, supports the growth of intracellular *Leishmania* parasites. **Parasite immunology**, v. 24, p. 113-8, 2002.

INIESTA, V. *et al.* Arginase I induction during *Leishmania major* infection mediates the development of disease. **Infection and immunity**, v. 73, p. 6085-6090, 2005.

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**, v. 193, p. 777-784, 2001.

KAVALUKAS, S. L. *et al.* Arginase inhibition promotes wound healing in mice. **Surgery**, v. 151, p. 287-95, 2012.

KIM, P. S. *et al.* Expression of the liver form of arginase in erythrocytes. **Molecular genetics and metabolism**, v. 76, p. 100-10, 2002.

KREBS, H. A. e HENSELEIT, K. Studies on urea formation in the animal organism. **Z. physiology chemistry**, v 310, p. 22-66, 1932.

KROPF, P. *et al.* Arginase and polyamine synthesis are key factors in the regulation of experimental leishmaniasis in vivo. **The FASEB journal**, v. 19, p. 1000-1002, 2005

Kossel A. e Dakin H. D. Über die Arginase. **Z. physiology chemistry** , v. 41, p. 321–331, 1904.

LINDEMANN, D.; RACKÉ, K. Glucocorticoid inhibition of interleukin-4 (IL-4) and interleukin-13 (IL-13) induced up-regulation of arginase in rat airway fibroblasts. **Naunyn schmiedebergs archives of pharmacology**, v. 368, p. 546-550, 2003.

MENDONÇA, M. G. *et al.* Persistence of leishmania parasites in scars after clinical cure of American cutaneous leishmaniasis: is there a sterile cure? **The Journal of infectious diseases**, v. 189, p. 1018-23, 2004.

MODOLELL, M. *et al.* Local Suppression of T Cell Responses by Arginase-Induced L-Arginine Depletion in Nonhealing Leishmaniasis. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 3, p. 11, 2009.

MORRIS, S. M. Regulation of enzymes of the urea cycle and arginine metabolism. **Annual review of nutrition**, v. 22, p. 87-105, 2002.

MOURA, T. R. DE *et al.* Toward a Novel Experimental Model of Infection To Study American Cutaneous Leishmaniasis Caused by *Leishmania braziliensis*. **Infection and immunity**, v. 73, p. 5827-5834, 2005.

MUKBEL, R. M. *et al.* Macrophage killing of *Leishmania amazonensis* amastigotes requires both nitric oxide and superoxide. **The american journal of tropical medicine and hygiene**, v. 76, p. 669-75, 2007.

MULEME, H. M. *et al.* Infection with arginase-deficient *Leishmania major* reveals a parasite number-dependent and cytokine-independent regulation of host cellular arginase activity and disease pathogenesis. **The journal of immunology**, v. 183, p. 8068-8076, 15 dez. 2009.

MUNDER, M. *et al.* Th1/Th2-regulated expression of arginase isoforms in murine macrophages and dendritic cells. **The journal of immunology**, v. 16, p. 3771-7, 1999.



MUNDER, M. *et al.* Arginase I is constitutively expressed in human granulocytes and participates in fungicidal activity. **Blood**, v. 105, p. 2549-2556, 2005.

MUNDER, M. *et al.* Suppression of T-cell functions by human granulocyte arginase. **Blood**, v. 108, p. 1627-1634, 2006.

MUNDER, M. Arginase: an emerging key player in the mammalian immune system. **British journal of pharmacology**, v. 158, p. 638-651, 2009.

MUNDER, M.; EICHMANN, K.; MODOLELL, M. 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. **The journal of immunology**, v. 160, p. 5347-5354, 1998.

NOVAIS, F. O. *et al.* Neutrophils and macrophages cooperate in host resistance against *Leishmania braziliensis* infection. **The journal of immunology**, v. 183, p. 8088-98, 2009.

OKWOR, I.; UZONNA, J. Persistent parasites and immunologic memory in cutaneous leishmaniasis: implications for vaccine designs and vaccination strategies. **Immunologic research**, v. 41, p. 123-136, 2008.

PEARCE, E. J.; MACDONALD, A. S. The immunobiology of schistosomiasis. **Nature reviews immunology**, v. 2, p. 499-511, 2002.

ROBERTS, S. C. *et al.* Arginase plays a pivotal role in polyamine precursor metabolism in *Leishmania*. Characterization of gene deletion mutants. **The journal of biological chemistry**, v. 279, p. 23668-23678, 2004.

ROCHA, F. J. S. *et al.* Cytokines, signaling pathways, and effector molecules required for the control of *Leishmania (Viannia) braziliensis* in mice. **Infection and immunity**, v. 75, p. 3823-32, 2007.

RODRIGUEZ, P. C. *et al.* L-arginine consumption by macrophages modulates the expression of CD3 zeta chain in T lymphocytes. **The journal of immunology**, v. 171, p. 1232-9, 2003.

RODRIGUEZ, P. C. *et al.* Arginase I production in the tumor microenvironment by mature myeloid cells inhibits T-cell receptor expression and antigen-specific T-cell responses. **Cancer research**, v. 64, p. 5839-49, 2004.

RODRIGUEZ, P. C.; QUICENO, D. G.; OCHOA, A. C. L-arginine availability regulates T-lymphocyte cell-cycle progression. **Blood**, v. 109, p. 1568-73, 2007.

ROGERS, M. *et al.* Proteophosphoglycans regurgitated by *Leishmania*-infected sand flies target the L-arginine metabolism of host macrophages to promote parasite survival. **PLoS pathogens**, v. 5, p. e1000555, 2009.

SHILOH, M. U.; NATHAN, C. F. Reactive nitrogen intermediates and the pathogenesis of Salmonella and mycobacteria. **Current Opinion in Microbiology**, v. 3, p. 35-42, 2000.

SHWEASH, M. *et al.* Leishmania mexicana promastigotes inhibit macrophage IL-12 production via TLR-4 dependent COX-2, iNOS and arginase-1 expression. **Molecular immunology**, v. 48, p. 1800-8, 2011.

SILVA, E. R. DA *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**, v. 159, p. 104-11, 2008.

SILVA, M. F. L. DA *et al.* Leishmania amazonensis arginase compartmentalization in the glycosome is important for parasite infectivity. **PLoS one**, v. 7, p. e34022, 2012.

SOUZA, A. S. *et al.* Resistance of Leishmania ( Viannia ) braziliensis to nitric oxide : correlation with antimony therapy and TNF- $\alpha$  production. **BMC infectious diseases**, v. 10, p. 209, 2010.

SOUZA-NETO, S. M. DE *et al.* Leishmania braziliensis : Partial Control of Experimental Infection by Interleukin-12 p40 Deficient Mice. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 99, p. 289-294, 2004.

STECHMILLER, J. K.; CHILDRESS, B.; COWAN, L. Arginine Supplementation and Wound Healing. **Nutrition in clinical practice**, v. 20, p. 52-61, 2005.

STENGER, S. *et al.* Reactivation of latent leishmaniasis by inhibition of inducible nitric oxide synthase. **The journal of experimental medicine**, v. 183, p. 1501-14, 1996.

TREZ, C. DE *et al.* iNOS-producing inflammatory dendritic cells constitute the major infected cell type during the chronic Leishmania major infection phase of C57BL/6 resistant mice. **PLoS pathogens**, v. 5, p. e1000494, jun. 2009.

UZONNA, J. E.; WEI, G.; YURKOWSKI, D. Immune Elimination of Leishmania major in Mice: Implications for Immune Memory, Vaccination, and Reactivation Disease. **The journal of immunology**, v. 167, p. 6967-6974, 2001.

VARGAS-INCHAUSTEGUI, D. A *et al.* Distinct roles for MyD88 and Toll-like receptor 2 during Leishmania braziliensis infection in mice. **Infection and immunity**, v. 77, p. 2948-56, 2009.

VENDRAME, C. M. V *et al.* Effect of insulin-like growth factor-I on Leishmania amazonensis promastigote arginase activation and reciprocal inhibition of NOS2 pathway in macrophage in vitro. **Scandinavian journal of immunology**, v. 66, p. 287-96, 2007.

VENDRAME, C. M. V *et al.* Insulin-like growth factor-I induced and constitutive arginase activity differs among isolates of *Leishmania* derived from patients with diverse clinical forms of *Leishmania braziliensis* infection. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 104, p. 566-8, 2010.

VODOVOTZ, Y. *et al.* Mechanisms of suppression of macrophage nitric oxide release by transforming growth factor beta. **The journal of experimental medicine**, v. 178, p. 605-13, 1993.

WANASEN, N.; SOONG, L. L-arginine metabolism and its impact on host immunity against *Leishmania* infection. **Immunologic research**, v. 41, p. 15-25, 2008.

WEI, X. Q. *et al.* Altered immune responses in mice lacking inducible nitric oxide synthase. **Nature**, v. 375, p. 408-411, 1995.

WITTE, M. B.; BARBUL, A. Role of nitric oxide in wound repair. **American journal of surgery**, v. 183, p. 406-12, 2002.

WU, G.; MORRIS, S. M. Arginine metabolism: nitric oxide and beyond. **The Biochemical journal**, v. 336, p. 1-17, 1998.

