

DOENÇAS NEGLIGENCIADAS: - COMO A *LEISHMANIA* SUBVERTE
AS DEFESAS DO HOSPEDEIRO

Lucile M. Floeter-Winter

Departamento de Fisiologia Instituto de Biociências USP

Doenças Negligenciadas: são um grupo de doenças tropicais, endêmicas em países em desenvolvimento nas regiões da África, Ásia e Américas. Em cada uma dessas regiões existem diferentes doenças, mas o fato comum é o impacto na população, principalmente aquela de baixa renda.

Em ordem decrescente de prevalência mundial, as doenças negligenciadas incluem: Ascariíase; Tricuríase; Ancilostomíase; Esquistosomose; Elefantíase; Oncocercose. Leishmaniose visceral e/ou cutânea, Doença de Chagas, Lepra, Doença do Sono, e ainda a OMS inclui Cisticercose, Dengue/Dengue hemorrágico, Equinococose e Raiva.

A Leishmaniose Visceral é uma forma severa da doença que pode levar a óbito. A Leishmaniose Cutânea/Mucocutânea não leva a óbito, mas é deformante. Além disso, o tratamento preconizado é administração de compostos antimoniais pentavalentes, que não é eficaz ainda é caro e tóxico. Além disso, o aparecimento de parasitas resistentes é um forte indicativo para a busca de novos alvos quimioterápicos.

O agente biológico causador das leishmanioses é o protozoário flagelado do gênero *Leishmania*. Seu ciclo de vida compreende dois hospedeiro. No flebotomíneo, encontramos a forma promastigota no tubo digestório. Essa forma se divide por mitose e na ausência de nutrientes diferencia na forma metacíclica, infectiva, que migra para a probóscide do inseto e é injetada no mamífero quando do repasto sanguíneo. Nos hospedeiros mamíferos, a forma metacíclica é fagocitada por macrófagos, e burlam os mecanismos microbicidas dessas células, tais como a produção de óxido nítrico (NO) para sobreviver e multiplicar, instalando a infecção.

Em ambas as fases de vida, *Leishmania* apresenta atividade de algumas enzimas do ciclo da uréia, um ciclo utilizado pela maioria dos metazoários como via metabólica para eliminação de nitrogênio em forma de uréia, produto menos solúvel, porém menos tóxico. A pergunta que aparece neste contexto é a razão pela qual um protozoário necessita

eliminar nitrogênio em forma de uréia e não na forma de amônia, uma vez que se encontra em ambientes abundantes em água.

Na década de 70, os trabalhos do grupo do Prof. Erney Camargo apontavam que a arginase, enzima do ciclo da uréia, presente em *Leishmania*, *Leptomonas* e *Crithidia* teria um papel na produção de ornitina, produto da catálise de arginina pela arginase, juntamente com a uréia. A ornitina por sua vez tem papel importante na proliferação dos organismos uma vez que é precursor da síntese de poliaminas.

Interessante que a enzima óxido nítrico sintase induzida (iNOS) nos macrófagos utiliza arginina para produzir NO, o mesmo aminoácido utilizado pela arginase, como substrato para produzir ornitina e uréia. Dessa forma foi postulada a hipótese de que a arginase pudesse atuar na sobrevivência de *Leishmania* no hospedeiro mamífero, competindo com a iNOS e dessa forma reduzindo a produção de NO. Em adição, teríamos sua atuação na via de poliaminas, essencial para a replicação do parasita.

Com objetivo de elucidar o papel da arginase de *L. (L.) amazonensis* durante o ciclo de vida do parasita, fizemos a caracterização do gene que a codifica (da Silva, Castilho et al. 2002), mostrando ser um gene de cópia única, transcrito ao longo de todo o ciclo. A forma ativa da enzima também foi caracterizada mostrando ser um trímero globular, com dois átomos de manganês em cada monômero (da Silva and Floeter-Winter 2010). A posição subcelular da enzima na forma promastigota foi determinada como sendo uma organela exclusiva desses organismo, o glicossomo, cujo equivalente funcional nas células de vertebrados é o peroxissomo (da Silva, da Silva et al. 2008).

O soro policlonal anti-arginase foi ainda utilizado na imunomarcação da enzima em preparações de 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 (da Silva, Zampieri et al. 2012).

Para verificar tanto o papel funcional da enzima bem como avaliar a importância da compartimentalização dessa enzima no glicossomo para exercer essa função, fizemos a construção de mutantes nulos para arginase e com esses construímos mutantes com a expressão de arginase reconstituída, de dois modos. Um com o sinal de endereçamento para o glicossomo e outro sem esse sinal. A caracterização biológica dos mutantes mostrou que, como esperado, o nocaute nulo não apresenta nem o transcrito nem a enzima e tampouco atividade de arginase. Já os mutantes recuperados apresentam quantidades semelhantes do transcrito, mas o mutante cuja arginase não está

endereçada, não apresenta nem a proteína nem atividade enzimática. Tratamento com inibidor de proteassomo indicou que a proteína não-endereçada é rapidamente degradada por aquela maquinaria (da Silva, Zampieri et al. 2012).

A análise funcional dos mutantes, em infecções *in vitro* e *in vivo* demonstrou que a atividade da arginase, localizada no glicossomo, é importante tanto para o estabelecimento e manutenção da infecção, como para a proliferação do parasita na célula hospedeira. Assim, o papel da enzima na fisiologia do parasita e sua relação com o macrófago parece ser muito mais complexo e envolve a regulação de outras vias metabólicas do próprio parasita e da célula hospedeira.

Como se dá a tomada e a distribuição do substrato da enzima, a arginina, foi a próxima pergunta a ser abordada. Caracterizamos em *L. (L.) amazonensis* a presença de um transportador de aminoácidos catiônicos que se comporta como o sistema y+ tipo symporter, responsável pela tomada de arginina. Esse transportador é codificado por um gene presente em duas cópias organizadas *em tandem* no genoma. A fase aberta de leitura das duas cópias apresenta uma similaridade de 98%, mas as regiões 5' e 3' UTR de cada cópia se apresentam com diferenças que puderam ser exploradas para quantificar os transcritos de cada cópia. Um dos transcritos é menos abundante e está presente de maneira similar ao longo da curva de crescimento de promastigotas. O outro transcrito apresenta uma expressão regulada ao longo da curva de crescimento sendo mais abundante na fase estacionária. Como essa é a fase em que há um decréscimo de nutrientes no meio, testamos como se dá tanto a expressão desse transcrito como a atividade de transporte quando os parasitas eram submetidos à privação de arginina. Nessas condições tanto o transporte como a abundância do transcrito regulado aumentavam significativamente (Castilho-Martins, Laranjeira da Silva et al. 2011).

O experimento de privação foi repetido utilizando os mutantes de arginase, nulo e recuperados, nos quais também foi medida a concentração endógena de arginina. Tanto a quantidade do transcrito regulado como a tomada de arginina correlacionaram inversamente com a quantidade de arginina intracelular. Isto é, os mutantes sem atividade de arginase apresentam uma concentração intracelular de arginina cerca de 4 vezes maior do que o mutante recuperado com a enzima sinalizada para o glicossomo e o parasita selvagem. Da mesma forma, os primeiros apresentam uma menor quantidade de transcritos e uma menor atividade de tomada de arginina (Castilho-Martins, Laranjeira da Silva et al. 2011). Assim, pode-se concluir que o transporte de arginina é regulado pela

oferta do aminoácido no meio externo e pela concentração no aminoácido no meio intracelular.

Apesar da arginase do parasita ser um bom alvo para o desenvolvimento de um quimioterápico, o fato da enzima estar compartimentalizada no glicosomo e a maneira pela qual se dá o tráfego de arginina indicam que uma estratégia melhor para o tratamento de leishmaniose pode residir em inibir a chegada do aminoácido no sítio de atividade da enzima do parasita.

Referencias

- Castilho-Martins, E. A., M. F. Laranjeira da Silva, et al. (2011). "Axenic *Leishmania amazonensis* promastigotes sense both the external and internal arginine pool distinctly regulating the two transporter-coding genes." PLoS One**6**(11): e27818.
- 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, E. R. and L. M. Floeter-Winter (2010). "Activation of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* arginase at low temperature by binuclear Mn²⁺ center formation of the immobilized enzyme on a Ni²⁺ resin." Exp Parasitol**125**(2): 152-155.
- da Silva, M. F., R. A. Zampieri, et al. (2012). "*Leishmania amazonensis* Arginase Compartmentalization in the Glycosome Is Important for Parasite Infectivity." PLoS One**7**(3): e34022.