

TATIANE LUIZA DA COSTA

**Estudo do metabolismo energético de *Leishmania*
spp utilizando cromatografia líquida de alta
eficiência e ressonância magnética nuclear**

Orientador: Prof. Dr. José Clecildo Barreto Bezerra

Co-orientador(a): Prof. Dr^a Marina Clare Vinaud

**Tese apresentada ao programa de Pós
Graduação em Medicina Tropical do
Instituto de Patologia Tropical e Saúde
Pública da Universidade Federal de
Goiás como requisito parcial para
obtenção do grau de Doutor em
Medicina Tropical – Área de
Concentração: Parasitologia.**

Goiânia, Goiás 2011.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL
E SAÚDE PÚBLICA

TATIANE LUIZA DA COSTA

**Estudo do metabolismo energético de *Leishmania*
spp utilizando cromatografia líquida de alta
eficiência e ressonância magnética nuclear**

Goiânia, 2011.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

GPT/BC/UFG

C837e	<p>Costa, Tatiane Luiza da. Estudo do metabolismo energético de <i>Leishmania spp</i> utilizando cromatografia líquida de alta eficiência e ressonância magnética nuclear [manuscrito] / Tatiane Luiza da Costa. - 2011. 102 f. : il., figs.</p> <p>Orientador: Prof. Dr. José Clecildo Barreto Bezerra. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Goiás, Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, 2011. Bibliografia. Inclui lista de figuras, abreviaturas. Anexos.</p> <p>1. Bioquímica parasitária – <i>Leishmania spp</i>. 2. Metabolismo energético parasitário – ácidos orgânicos. 3. <i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i> – CLAE/RMN. I. Título.</p> <p style="text-align: right;">CDU: 616.993</p>
-------	--

Dedico este trabalho à minha família que acaba de receber mais uma nova integrante, minha filha Luiza. Importantes também, todos os parentes, amigos e amigas que sempre estiveram comigo durante os momentos bons e difíceis de minha vida.

AGRADECIMENTOS

A Deus por tudo que sou e por tudo que tenho. Por não me permitir perder a fé, por ter me dado força e saúde para chegar até aqui, e pelas belas amizades que conquistei.

Aos professores Dr^o José Clecildo Barreto Bezerra e Dr^a Marina Clare Vinaud, por terem acreditado e depositado confiança em mim aceitando orientar este estudo. Sou-lhes grata pela oportunidade, por terem me conduzido com imensa tranqüilidade e sabedoria.

À professora e amiga Dr^a Ana Maria de Castro por ter me dado a oportunidade de chegar onde estou hoje.

Aos Professores Dr^a Fátima Ribeiro Dias, Dr^o Milton A. Pelli Oliveira, Dr^a Miriam Leandro Dorta e Dr^o Ruy de Souza Lino Júnior pelo apoio na realização da pesquisa, por cederem os parasitos, além da atenção que despenderam sempre que necessitei.

Aos meus queridos amigos e amigas por me ensinarem tudo que precisei referente à pesquisa e compartilhar os momentos bons e difíceis ao meu lado, sempre com muito humor, dedicação e paciência. Que perdue a nossa amizade.

Aos meus pais, Rubens Pedro da Costa e Eneci Luiza da Costa por terem me apoiado durante a realização deste estudo.

Ao meu esposo Arthur da Costa e Silva, que soube compreender a minha ausência. Deu-me força, apoio e segurança durante toda a minha formação profissional.

A coordenação do programa de pós-graduação em Medicina Tropical e Saúde Pública, aos colegas de laboratório e amigos que acreditam em mudanças e participaram na execução dessa pesquisa.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Goiás – FAPEG - pela concessão da bolsa de doutorado destinada aos servidores públicos da Educação, viabilizando este estudo.

SUMÁRIO	Página
SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS.....	ix
1. INTRODUÇÃO.....	01
1.1. Leishmaniose tegumentar americana.....	01
1.2. Morfologia e ciclo biológico.....	04
1.3. Tratamento.....	09
1.4. Metabolismo em tripanosomatídeos.....	11
1.5. Ressonância magnética nuclear.....	26
1.6. Cromatografia líquida de alta eficiência.....	28
2. JUSTIFICATIVA.....	30
3. OBJETIVOS.....	33
3.1. Objetivo geral.....	33
3.2. Objetivos específicos do artigo 1.....	33
3.3. Objetivos específicos do artigo 2.....	34
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	35
4.1. Cultura de formas promastigotas de <i>Leishmania</i> spp.....	35
4.2. Padronização da curva de crescimento.....	35
4.3. Análise cromatográfica da concentração de ácidos orgânicos.....	36

4.4. Espectrofotometria.....	37
4.5. Ressonância magnética nuclear.....	37
4.6. Análise estatística.....	39
5. ARTIGOS.....	40
5.1. Artigo 1.....	41
5.2. Artigo 2.....	47
6. DISCUSSÃO GERAL.....	69
7. CONCLUSÕES GERAIS.....	80
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	83

FIGURAS E ANEXOS

	Página
Figura 1. Formas biológicas distintas de <i>Leishmania</i> spp.....	05
Figura 2. Ciclo biológico de <i>Leishmania</i> spp.....	08
Figura 3. Representação esquemática do metabolismo de carbono em formas procíclicas de <i>Trypanosoma brucei</i>	15
Figura 4. Metabolismo energético de <i>Leishmania</i> spp.....	18
Figura 5. Representação esquemática da biosíntese de lipídeos a partir do metabolismo da glicose em <i>Trypanosoma brucei</i>	21
Figura 6. Formação de corpos cetônicos a partir do acetil-CoA.....	22
Figura 7. Resumo do metabolismo da arginina em mamíferos.....	24
Figura 8. Metabolismo da amônia em mamíferos.....	25
Anexo 1. Bula do meio de cultura grace's.....	92
Anexo 2. Fluxograma de materiais e métodos do artigo 1.....	93
Anexo 3. Fluxograma de materiais e métodos do artigo 2.....	94
Anexo 4. Normas para elaboração de tese para obtenção do título de doutor.....	95
Anexo 5. Normas da Revista Experimental Parasitology.....	97

SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS

Aa - Aminoácidos

ADP - Adenosina difosfato

ATP - Adenosina trifosfato

CDC - *Center disease control*

CLAE - Cromatografia líquida de alta eficiência

CoA - Coenzima A

CTE - Cadeia transportadora de elétrons

DNA - Ácido desoxirribonucléico

D₂O - Água Deuterada

E/S - Excreção/Secreção

FID'S - *Free induction decay*

HMG-CoA - hidroximetilglutaril coenzima A

HMG - hidroximetilglutaril

HMBC - Correlação heteronuclear de múltiplo quanto

HR-MAS - 1H *high resolution magic-angle spinning*

HSQC - Correlação heteronuclear de um único quantum

kDNA - Ácido desoxirribonucléico mitocondrial

LTA - Leishmaniose tegumentar americana

L. (L.) amazonensis - Leishmania (Leishmania) amazonensis

L. (V.) braziliensis - Leishmania (Viannia) braziliensis

NADH - Nicotinamida dinucleotídeo reduzida

NADPH - Nicotinamida dinucleotídeo fosfato reduzida

OAA - oxalacetato

PBS - *Phosphate buffered saline*

PEP - Fosfoenolpiruvato carboxiquinase

RMN - Ressonância Magnética Nuclear

SucCoA - Succinato CoA transferase

TCA - Ciclo do ácido tricarboxílico

TMSP - Trimetilsililpropionato

TOCSY - *Total correlated spectroscopy*

M2903 - MHOM/BR/1975/M2903 - Espécie de *Leishmania (V.) braziliensis*

IMG3 - MHOM/BR/2003/IMG3 - Espécie de *Leishmania (V.) braziliensis*

RPL5 - MHOM/BR/2005/RPL5 - Espécie de *Leishmania (V.) braziliensis*

WSS5 - MHOM/BR/2005/WSS5 - Espécie de *Leishmania (V.) braziliensis*

EFSF6 - MHOM/BR/2006/EFSF6 - Espécie de *Leishmania (V.) braziliensis*

PH8 - IFLA/BR/1967/PH8 - Espécie de *Leishmania (L.) amazonensis*

RESUMO

A leishmaniose é uma doença do sistema mononuclear fagocitário causada por protozoários do gênero *Leishmania*. As formas promastigotas de *Leishmania sp* degradam carboidratos pela via glicolítica e a primeira reação ocorre dentro do glicossomo. Utilizando como fonte de energia a glicose, aminoácidos e lipídeos presentes no meio de cultura, os produtos excretados/secretados (E/S) podem ser indicadores do perfil metabólico energético parasitário e de distúrbios biológicos. A análise bioquímica do metabolismo de *Leishmania* vem atualizar os estudos parasitológicos com técnicas adequadas à avaliação do perfil bioquímico na relação parasito-hospedeiro, levando ao melhor entendimento da maneira como esses organismos conseguem sobreviver em ambientes diversos como o trato digestório do hospedeiro invertebrado ou nos tecidos do hospedeiro vertebrado. O objetivo deste trabalho foi o estudo do metabolismo energético de diferentes espécies de *Leishmania*. Para tanto, foi realizada a análise *in vitro* de metabólitos E/S pelo parasito em meio de cultura durante as fases logarítmicas e estacionárias do crescimento, e quantificados por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). A espectrofotometria foi utilizada para a dosagem de glicose. O método de ressonância magnética nuclear foi implantado para o estudo do metabolismo parasitário. Pela CLAE verificou-se diferença nos produtos E/S dos ácidos orgânicos do metabolismo de carboidratos (piruvato e lactato), do metabolismo intermediário (citrato, α -cetoglutarato, succinato, fumarato, malato e oxaloacetato) e do metabolismo dos ácidos graxos (β -hidroxibutirato) entre diferentes espécies e isolados de *Leishmania*. Pela análise espectrofotométrica enzimática verificou-se

diferença na concentração de glicose na cepa M2903 de *L.(V.) braziliensis*. Pela RMN de ^{13}C e ^1H detectaram-se os seguintes metabólitos no sedimento e sobrenante: alanina, lactato, acetato, oxalato, piruvato, succinato, glicerol, CO_2 , uréia e aminoácidos (glutamina, valina e arginina). Entretanto, através de vários métodos, foi possível observar que há diferenças na E/S de metabólitos entre diferentes cepas e isolados de *Leishmania* spp que utilizam diversas vias bioquímicas para a obtenção de energia e a identificação dessas vias poderá ser utilizada para investigar a atuação de fármacos anti-parasitários. Mudanças bioquímicas no metabolismo podem indicar possíveis adaptações do parasito às diferentes condições ambientais e fisiológicas durante o ciclo de vida e essas características bioquímicas individuais poderão ser utilizadas na identificação de cada isolado, além de estabelecer diferenças metabólicas na relação parasito-hospedeiro.

ABSTRACT

Leishmaniasis is a disease of the endothelial reticulum system and is caused by protozoans from the *Leishmania* genus. The promastigote forms of *Leishmania sp* degrade carbohydrates through the glycolytic pathway and its first reaction occurs inside the glycosome. As they use as energy source glucose, aminoacids and lipids from the culture media the excreted/secreted (E/S) products may be useful as indicative of the energetic and metabolic profile of the parasite and of its biological disturbances. The biochemical analysis of *Leishmania* metabolism is important to upgrade the parasitological studies with techniques which are adequate to the evaluation of the biochemical profile of the host-parasite relationship towards a better understanding of how these organisms are able to survive in such diverse environments such as the digestive tract of the insect or inside vertebrate hosts tissues. The aim of this study was to perform a study of the energetic metabolism of species and isolates of *Leishmania spp*. Therefore the *in vitro* analysis of E/S metabolic products from the parasite within the culture media during logarithmic and stationary growth phases was performed through chromatographic (HPLC) methods. The spectrophotometry was used to glucose measurement and the nuclear magnetic resonance (NMR) was implanted aiming the study of the parasite's metabolism. Through HPLC it was possible to verify a significant difference in the E/S of organic acids from the carbohydrates metabolism (pyruvate and lactate), intermediary metabolism (citrate, α -ketoglutarate, succinate, fumarate, malate and oxaloacetate) and from the fatty

acids oxidation (β -hydroxybutyrate) between different species and isolates of *Leishmania* spp. Through the enzymatic spectrophotometric analysis we verified the different concentrations of glucose. The NMR through ^{13}C and ^1H detected the following metabolites in pellet and supernatant: alanine, lactate, acetate, oxalate, pyruvate, succinate, glycerol, CO_2 , ureia and aminoacids (glutamine, valine and arginine). Therefore, through the several methods it was possible to observe that there is difference of E/S metabolites between the isolates and strains of *Leishmania* spp that utilize several biochemical pathways to energy production and the identification of these pathways may be used to identify each isolate and also establish metabolic differences in the host-parasite relationship.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Leishmaniose Tegumentar Americana

A família *Trypanosomatidae* é composta por protozoários que podem causar doenças graves em seres humanos como a doença do sono (*Trypanosoma brucei*), doença de Chagas (*Trypanosoma cruzi*) e as leishmanioses (*Leishmania* spp.). Esses parasitos possuem características biológicas específicas como a presença de uma organela citoplasmática, o cinetoplasto, que é derivado da mitocôndria. O cinetoplasto é um organela única rica em DNA, o kDNA (Souza, 2009).

A leishmaniose é uma doença do sistema fagocítico mononuclear causada por protozoários do gênero *Leishmania*. É um protozoário heteroxeno que essencialmente requer dois diferentes hospedeiros para completar o seu ciclo biológico: (1) um inseto vetor, fêmeas da ordem Díptera, família *Psychodidae*, subfamília *Phlebotominae*, gênero *Lutzomyia* ou *Phlebotomus* e (2) como hospedeiro definitivo, o homem, cachorros ou qualquer mamífero (Balanã-Fouce et al. 1998).

A leishmaniose tegumentar americana (LTA) é endêmica em mais de 70 países, com uma estimativa de 1,5 – 2 milhões de novos casos por ano. No Afeganistão, Síria e Brasil estão os principais focos, sendo comuns em áreas rurais, regiões áridas e florestas. No entanto, relata-se um aumento crescente nas regiões urbanas e peri-urbanas (Pavli & Maltezou 2010). A partir da década de 1990, o Ministério da Saúde do Brasil notificou uma média anual de 32 mil novos casos de LTA. Analisando-se os dados pertinentes em 2003, verificou-se a seguinte situação: a Região Norte notificou aproximadamente 45% dos casos, predominando os estados do Pará, Amazonas e Rondônia; a Região Nordeste, 26% dos casos, principalmente no Maranhão, Bahia e Ceará; a Região Centro-Oeste, 15% dos casos,

com maior frequência em Mato Grosso; a Região Sudeste, 11% dos casos, predominantemente em Minas Gerais; e a Região Sul, 3,0%, destacando-se o Paraná (MS 2005). A região norte vem contribuindo com o maior número de casos (cerca de 37,3% do total de casos registrados no período) e com coeficientes médios mais elevados (66,9 casos por 100.000 habitantes), seguida das regiões Centro-oeste (32,6% casos por 100.000 habitantes) e Nordeste (16,1 casos por 100.000 habitantes) (MS 2005).

Com o desmatamento e a expansão das cidades do interior do Estado de Goiás observou-se um aumento progressivo da casuística de LTA atendida em Goiânia, essencialmente no Hospital de Doenças Tropicais, hospital de referência para o tratamento dessa enfermidade (SUS-GO). Até 1984 já haviam sido notificados um total de 565 casos autóctones nos municípios endêmicos, com um franco predomínio nos pacientes do gênero masculino e nos habitantes das zonas rurais próximas ou vizinhas às áreas com formações florestais (Hidasi Filho & Garcia-Zapata, 2004).

Na realidade, a real prevalência das diferentes leishmanioses no continente americano é difícil de ser estabelecida, em vista das subnotificações, diagnósticos incorretos, afecção inaparentes, variações de resposta do hospedeiro e multiplicidade de agentes etiológicos envolvidos (Marzochi 1992).

A leishmaniose cutânea é causada por *Leishmania tropica*, *L. major* e *L. infantum* do Velho Mundo e por *Leishmania (Viannia) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis*, *L. panamensis*, *L. peruviana*, *L. mexicana*, *L. (Leishmania) amazonensis* e *L. venezuelensis* do Novo Mundo (Pavli & Maltezou, 2010). Até o momento, foram identificadas no Brasil, seis espécies de *Leishmania* pertencentes aos subgêneros *Leishmania* ou *Viannia*. A principal é *L. (V.) braziliensis*, encontrada em todas as zonas endêmicas do país e associada à presença de

animais domésticos. As outras são *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) naiffi*, *L. (V.) shawi*, *L. (V.) lainsoni* e *L. (L.) amazonensis* (Gontijo & Carvalho 2003).

Variações genéticas do parasito ou imunológicas do hospedeiro podem resultar em diferentes status da infecção como a produção de imunoglobulinas específicas, mensuração do tamanho da lesão e carga parasitária que levam a um melhor entendimento da cinética da infecção por *Leishmania* (Millington et al. 2010). As principais lesões são ulceradas, com pápulas eritematosas no início da infecção e o período de incubação pode ser curto (de uma a duas semanas) ou longo (de um a dois meses) para o desenvolvimento da doença (Balanã-Fouce et al. 1998).

A leishmaniose mucocutânea (espúndia) é produzida por *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) panamensis* e *L. (V.) guyanensis*. A doença inicia-se com a forma cutânea ou escaras típicas no local da picada do inseto vetor (Balanã-Fouce et al. 1998). No homem, as lesões são conhecidas como úlcera-de-Bauru, ferida brava, ferida seca e boubá. As lesões primárias são únicas, em pequeno número, mas freqüentemente de grandes dimensões, com úlceras em forma de cratera. O curso da infecção é geralmente irregular, crônico e com tendência para a cura espontânea, que depende da localização das lesões e varia de uma região geográfica para outra (Genaro 2003).

O polo oposto, hiperérgico-pauciparasitário, é representado pela leishmaniose mucosa (LM), que tem como agente etiológico principal a *L. (V.) braziliensis*, e se caracteriza imunologicamente pelo exagero das respostas celulares anti-*Leishmania* e pela escassez de parasitos. A resposta proliferativa e a produção de IFN- γ e TNF- α estimuladas por antígenos de *Leishmania* em culturas de células mononucleares de sangue periférico também são significativamente maiores do que as observadas na LC. Esta resposta exacerbada promove

então destruição de tecido onde houver depósito de partículas antigênicas. Isto é o que ocorre na chamada forma mucosa clássica (MS 2007).

A resposta terapêutica da LM não é boa. Ainda que as lesões regridam ou mesmo desapareçam com os tratamentos convencionais, as recidivas são frequentes. Embora a resposta imune que se desenvolve na LM não seja capaz de controlar a doença e muito provavelmente seja responsável pelas manifestações clínicas, ela é capaz de conter a multiplicação parasitária, e os parasitos são escassos nas lesões mucosas. A patogênese da LM continua sendo um mistério, embora alguns estudos tenham associado um risco aumentado a determinadas características genéticas (MS 2007).

1.2. Morfologia e ciclo biológico do parasito

Existem duas formas morfológicas e bioquimicamente distintas: amastigota e promastigota (Figura 1). A forma no inseto vetor chamada de promastigota que é móvel e dispõe de um flagelo fixado na organela similar a uma mitocôndria chamada cinetoplasto. As formas promastigotas vivem no lúmen do tubo digestório do inseto vetor e são formas alongadas, flageladas e móveis, enquanto as formas amastigotas são arredondadas sem flagelo aparente e que infectam células do sistema mononuclear fagocítico do hospedeiro vertebrado (Balanã-Fouce et al. 1998).



www.dbbm.fiocruz.br/.../images/ciclo2a.jpg

Figura 1. Formas biológicas distintas de *Leishmania* spp. (A) Amastigota e (B) promastigota

No intestino dos insetos vetores, as formas promastigotas passam por um processo denominado de metaciclogênese, que é o processo pelo qual estas formas deixam de se reproduzir e tornam-se infectantes (promastigotas metacíclicas). As formas reprodutivas, não infectantes (prócíclicas), prendem-se a parede do tubo digestivo do inseto vetor. Durante a metaciclogênese, as promastigotas sofrem modificações bioquímicas em sua superfície, perdendo assim sua capacidade de adesão ao epitélio do intestino médio do flebótomo. Como resultado, as promastigotas metacíclicas destacam-se, migrando para a faringe e cavidade bucal, de onde elas são transmitidas ao hospedeiro vertebrado, durante o próximo

repasto sanguíneo (MS 2007). A diferenciação de promastigotas próclicas em promastigotas metacíclicas (metaciclogênese) é crucial para a infectividade (Mojtahedi et al. 2008).

Mudanças no proteoma durante a diferenciação celular pode ser controlado por mecanismos pós-transcricionais, incluindo modulação na estabilidade de mRNA, regulação da translação e modificações na pós-translação de proteínas (Mojtahedi et al. 2008). É conhecido que a transformação de formas promastigotas próclicas em formas promastigotas metacíclicas ocorre em um ambiente pobre em nutrientes. Modificações pós-translação podem ser esperadas no controle do estágio da metaciclogênese, onde poucas proteínas foram identificadas como expressa durante o estágio de formas metacíclicas (Mojtahedi et al. 2008).

Quando as promastigotas são introduzidas na pele, encontram neste local algumas células do sistema imune (linfócitos T e B, macrófagos residentes, células de Langerhans, mastócitos), que formam um compartimento bastante específico denominado sistema imune da pele. Por um mecanismo ainda não totalmente esclarecido, envolvendo receptores e ligantes em ambas superfícies, o parasito se adere à superfície dos macrófagos e células de Langerhans passando para o meio intracelular por meio de um processo de fagocitose mediada por receptores, em que se transforma na forma amastigota, característica do parasitismo nos mamíferos (MS 2007).

Nos macrófagos, os parasitos internalizados ficam dentro de um vacúolo parasitóforo (fagolisossoma), que os separa do citoplasma celular. Esta organela deriva da fusão do fagossoma, resultante da fagocitose dos parasitos com os lisossomas, que contém substâncias responsáveis pela destruição de microorganismos. Embora os macrófagos

sejam células fagocitárias especializadas no combate a agentes infecciosos, as leishmanias desenvolverem mecanismos de defesa capazes de subverter sua capacidade microbicida, conseguindo sobreviver neste ambiente potencialmente tóxico e multiplicar-se até a ruptura da célula, quando são liberadas para infectar outros macrófagos, propagando a infecção (MS 2007).

A infecção do vetor ocorre quando as fêmeas, ao sugarem o sangue de mamíferos infectados, ingerem macrófagos parasitados por formas amastigotas de *Leishmania*. No trato digestório anterior ocorre o rompimento dos macrófagos, liberando as amastigotas que se reproduzem por divisão binária e se diferenciam rapidamente em formas flageladas denominadas de promastigotas, estas também se reproduzem por processos sucessivos de divisão binária. As formas amastigotas ingeridas pelos insetos transmissores demoram oito dias ou mais para se diferenciar em promastigotas. As formas promastigotas transformam-se em promastigotas próclicas as quais colonizam o esôfago e a faringe do vetor, onde permanecem aderidas ao epitélio pelo flagelo, quando se diferenciam em formas infectantes promastigotas metacíclicas, fechando, dessa forma, o ciclo biológico de transmissão deste protozoário, como demonstrado na Figura 2 (Alexander et al. 1999; Burchmore & Barrett 2001).

Estágio no hospedeiro invertebrado

Estágio no hospedeiro vertebrado

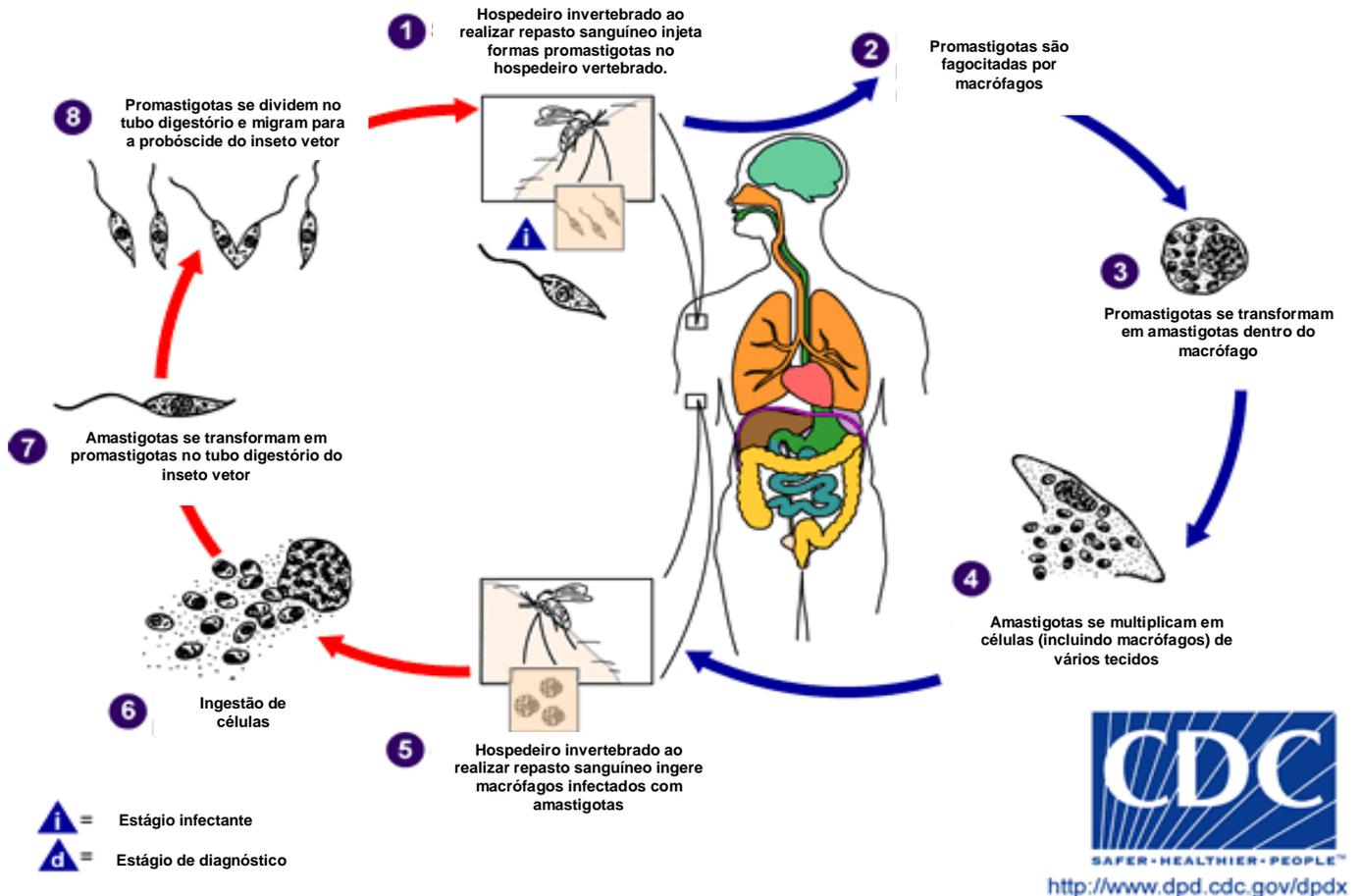


Figura 2. Ciclo biológico de *Leishmania* sp. 1- Promastigotas metacíclicas inoculadas pelo hospedeiro invertebrado. 2- Formas promastigotas fagocitadas por macrófagos. 3- Formas promastigotas transformadas em amastigotas e se multiplicando por divisão binária. 4- Lise dos macrófagos e liberação das amastigotas. 5,6- Ao realizar o repasto sanguíneo o hospedeiro invertebrado ingere as formas amastigotas. 7- As formas amastigotas se transformam em promastigotas no tubo digestório do vetor. 8- As promastigotas se multiplicam por divisão binária e migram para a probóscide do vetor.

1.3. Tratamento

Os antimoniais pentavalentes, como o antimoniato de meglumina (Glucantine[®]) e o estibogluconato de sódio (Pentostan[®]) formam a “primeira-linha” de fármacos no tratamento da LTA. A depleção intracelular nos níveis de ATP interfere na glicólise e β -oxidação de ácidos graxos nas formas amastigotas, sendo este o principal modo de ação dos antimoniais pentavalentes contra diferentes espécies de *Leishmania* (Goto & Lindoso 2010). A dosagem recomendada é de 20 mg/kg/dia via intramuscular ou intravenosa, por um período de 20 dias (Momeni et al. 2002). Baixas dosagens ou descontinuidade do tratamento são as principais causas do aumento de recidivas e resistências do parasito a esses fármacos (Oliveira et al. 2011). Há preocupações sobre o custo, toxicidade e desenvolvimento de resistência medicamentosa. Fármacos antimoniais são associados aos efeitos adversos graves, incluindo náuseas, vômitos, diarreia, erupções na pele, tontura, arritmia cardíaca, hipotensão, artralgia, mialgia, desconforto abdominal, dor de cabeça e elevação reversível de enzimas hepáticas, trombocitopenia e anemia ocasional que muitas vezes são dependentes da dose (González et al. 2008).

Os antimoniais pentavalentes são fármacos leishmanicidas que interferem na bioenergética das formas amastigotas de *Leishmania*. Tanto a glicólise, quanto a oxidação dos ácidos graxos, processos localizados em organelas peculiares, são inibidos, sendo que esta inibição é acompanhada de redução na produção de ATP e GTP. Os compostos de antimônio pentavalente, como o estibogluconato de sódio, exercem pouco efeito sobre as formas promastigotas que crescem em culturas de tecidos (MS 2007).

Os antimoniais encapsulados em lipossomos foram utilizados, com efeito, no tratamento de infecções por *Leishmania donovani* em hamsters e em humanos. Nesta

apresentação, o fármaco é seletivamente incorporado através de endocitose e alcança os fagolisossomos dos macrófagos, onde se encontram os parasitos. Ainda, em relação ao mecanismo de ação, questiona-se a possibilidade de estimularem mecanismos imunológicos do indivíduo parasitado (MS 2007).

Os fármacos de segunda escolha são a anfotericina B e a pentamidina. A pentamidina foi sintetizada como droga hipoglicêmica no tratamento de diabetes e seu perfil anti-parasitário foi descoberto (Balanã-Fouce et al. 1998). O modo de ação das pentamidinas não é bem entendido. Recentemente têm-se reportado resistência aos fármacos de primeira escolha, requerendo o uso de compostos mais tóxicos como os de segunda escolha (Rocha et al. 2005). A anfotericina B é um antibiótico macrolídeo anti-fúngico eficaz contra leishmaniose visceral e menos efetiva na LTA. Sua forma de ação é baseada no peculiar metabolismo de esteróis de *Leishmania* e fungos, onde o 24-ergosterol é o principal esteroide sintetizado e existente nas membranas desses parasitos. Os macrolídeos ligam-se aos esteróis e criam poros na membrana, mudando a permeabilidade celular, que levam à morte do parasito (Balanã-Fouce et al. 1998).

A azitromicina oral é um antibiótico efetivo *in vitro* e experimental em camundongos, mas precisa de mais investigações para leishmaniose humana. A pentoxifilina oral é um inibidor de fosfodiesterase, que aumenta o AMP cíclico e diminui o TNF. É utilizada em pessoas com doenças vasculares, diminui a reação inflamatória e conseqüentemente os danos teciduais, embora náuseas, artralguas, tonturas, dor abdominal e diarreia possam ocorrer (González et al. 2008). A miltefosina oral, que foi originalmente desenvolvida como um fármaco antineoplásico, é ativo contra a membrana de *Leishmania* (Croft et al. 2006). Parece mais ativo contra algumas espécies de *Leishmania*, mas sua eficácia é variável

dependendo das áreas geográficas, inclusive para a mesma espécie (González et al. 2008). A rifampicina foi muito utilizada na Amazônia, mas mostra-se ineficaz quando o agente etiológico é a *L.(V.) braziliensis* (Rey 2008).

1.4. Metabolismo em tripanosomatídeos

Os tripanosomatídeos dependem da viabilidade de fontes de carbono presentes no hospedeiro para manter o seu metabolismo energético. Estes protozoários possuem diversidade de habitat conforme a fase evolutiva em que se encontram no hospedeiro. Torna a avaliação de vias metabólicas mais interessante e de grande valia nos estudos de bioquímica comparada, principalmente entre hospedeiros e parasitos.

Esta compreensão permite que formas promastigotas de *Leishmania*, por exemplo, que residem naturalmente no inseto vetor, possa ser utilizada em uma variedade de meios de cultura, já bem identificados, e que ao mesmo tempo compõem-se de substratos que permitem o aporte de fontes energéticas à sua manutenção (Mendes 2006). Sua facilidade de manipulação *in vitro*, se torna objeto de estudo de muitas investigações bioquímicas, imunológicas e moleculares, e posteriormente esses resultados são direcionados para estudos em outras formas, como as amastigotas, relatadas como causadoras de graves transtornos para a saúde (Rainey & MacKenzie 1991).

A metabolômica tem demonstrado diferenças metabólicas entre as duas formas de leishmania e compõem a área de estudos da bioquímica comparada, haja visto que, o habitat natural das formas promastigotas é o trato digestório do inseto vetor enquanto as formas amastigotas residem dentro de vacúolos parasitóforos do macrófago em hospedeiros vertebrados (Rainey & MacKenzie 1991).

A metabolômica aspira mensurações de analitos de baixo peso molecular que são sintetizados por uma célula ou organismo, analitos difíceis de encontrar, principalmente devido às amplas e dinâmicas propriedades físico-químicas dos metabólitos celulares (Barret et al. 2010). Estudos do perfil metabólico de células e/ou organismos tem sido utilizados para a obtenção de informações sobre a adaptação do parasito ao seu ambiente, além da atuação de novas terapias anti-parasitárias (Coombs 2010).

É uma ferramenta de pesquisa complementar a era pós-genômica, que envolve a análise global de metabólitos e pode ser utilizada para a caracterização de *Leishmania*. Para o entendimento das características fenotípicas de um organismo, é essencial a complementação com a análise do transcriptoma e proteoma, que são pesquisas de investigação metabolômicas. Pesquisas dos níveis metabólicos são relevantes na biologia do parasito, onde os processos metabólicos são os maiores alvos de fármacos (Scheltema et al. 2010).

Como para a proteômica, as técnicas analíticas baseadas em espectroscopia de massa são essenciais para a metabolômica. A metabolômica revive conceitos e estudos clássicos de bioquímica durante a revolução genômica, e quando combinada à informação de seqüenciamento genômico ou a qualquer outra abordagem sistêmica (transcriptômica, proteômica) se torna uma ferramenta única na ciência biológica moderna. A tecnologia tornou-se amplamente empregada nos estudos parasitários, como por exemplo, a utilização da ressonância magnética nuclear, a espectrometria de massa e a cromatografia líquida de alta eficiência (Coombs 2010).

A RMN é usada para a análise quantitativa e na identificação de metabólitos. Relativamente poucos trabalhos na identificação e quantificação de metabólitos de *T. brucei*

têm sido relatados. Os produtos intermediários da via glicolítica têm sido identificados como parte do programa investigativo do metabolismo energético, usando CLAE ou análise enzimática (Barret et al. 2010). Scheltema et al. (2010) para ilustrar os conceitos e os resultados da análise metabolômica, traçaram o perfil metabólico comparativo em isolados de *Leishmania* resistentes e não resistentes à fármacos.

Vários membros da família *Trypanosomatidae* geram energia por uma mesma via metabólica, entretanto diferenças fundamentais existem e nem sempre são conhecidas,mas analisando as formas adaptativas de tripanosomatídeos, Pan & McMahon-Pratt (1987) descreveram que formas amastigotas de *L. (mexicana) pifanoi* podem crescer em culturas axênicas e que são indistinguíveis em morfologia, antigenicidade e infectividade quando comparadas às formas amastigotas isoladas de animais infectados ou de cultura de macrófagos, mas bioquimicamente elas podem ser diferentes. Já Rainey & MacKenzie (1991) demonstraram que formas amastigotas são muito similares bioquimicamente dentre as isoladas de lesões ou de cultura de macrófagos, mas há diferenças entre formas amastigotas e promastigotas *Leishmania*.

Leishmania e *Trypanosoma* são membros da família *Trypanosomatidae*, apresentam ciclos de vida complexos, envolvendo, ambos, hospedeiros vertebrados e invertebrados. Durante seu ciclo de vida os parasitos adaptam seu metabolismo de acordo com a disponibilidade de alimentos, ou melhor, com os substratos disponíveis. A energia do metabolismo dos tripanosomatídeos é especial, pois grande parte da glicólise ocorre em uma organela específica chamada glicossomo (Tielens & van Hellemond 2009).

Durante o ciclo de vida, os tripanosomatídeos encontram grandes variações de viabilidade de oxigênio, visto que as formas sanguíneas possuem muito oxigênio viável,

enquanto certos estágios, como no inseto, podem se confrontar com condições de hipóxia. As formas promastigotas de *Leishmania* possuem baixa capacidade funcional anaeróbia e utilizam o metabolismo de reserva durante a anóxia. Possuem uma pobre capacidade anaeróbia e dependem principalmente da respiração mitocondrial para gerar energia (van Hellemond et al. 1997, van Hellemond & Tielens 1997).

Embora as formas promastigotas aparentemente não possuam um metabolismo anaeróbio facultativo, elas são tolerantes à hipóxia por um extenso período e a inibição de sua cadeia respiratória resulta numa reversão das condições nas quais o metabolismo é reduzido a níveis mínimos, podendo induzir a um estado fisiológico de estivação das promastigotas. Esta habilidade garante a sobrevivência em condições adversas e muitas vezes previnem o desenvolvimento durante o estágio no inseto vetor (van Hellemond & Tielens 1997).

A Figura 3 mostra o metabolismo de carbono esquematizado de alguns tripanosomatídeos em meio de cultura.

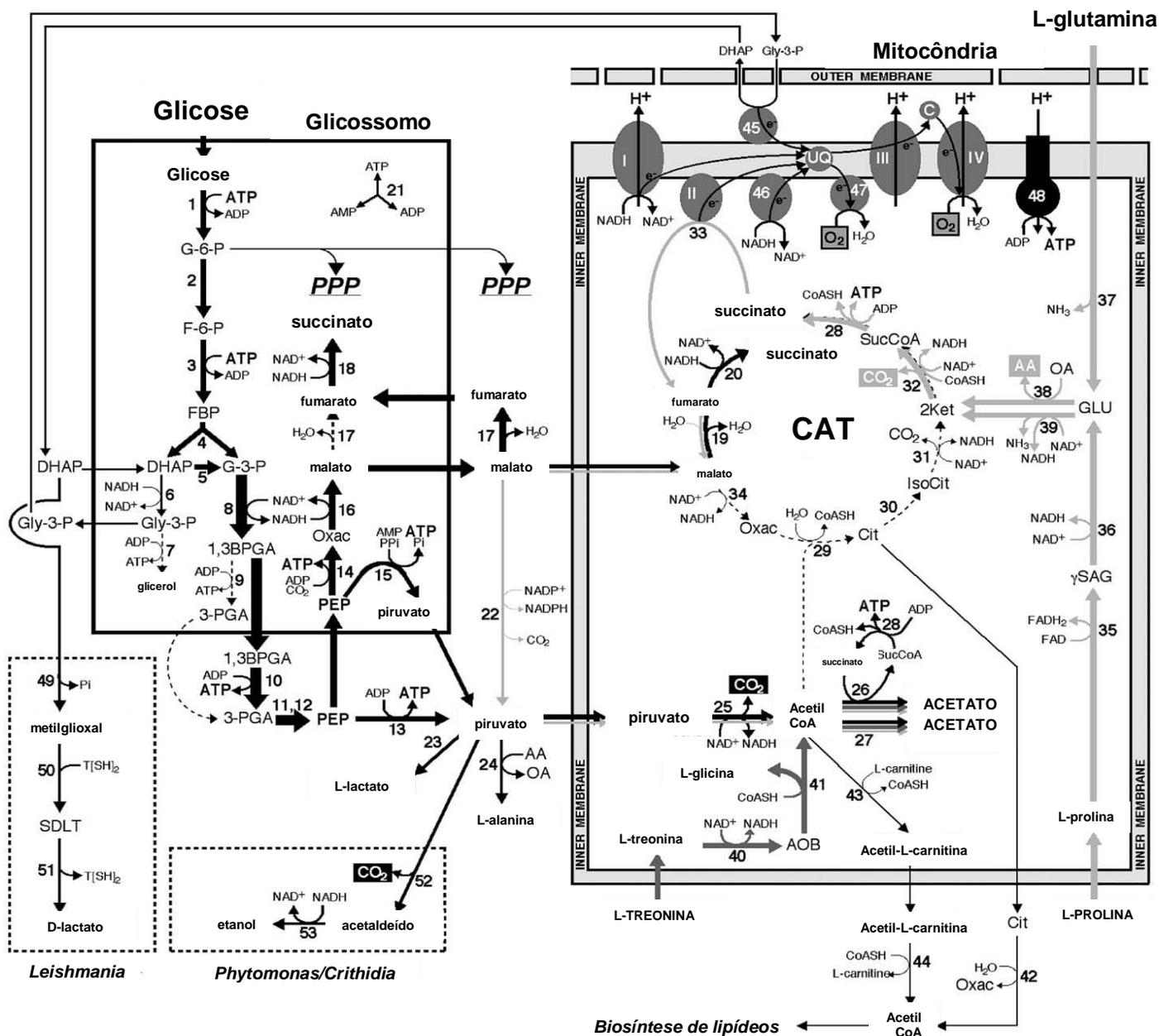


Figura 3. Representação esquemática do metabolismo de carbono em formas procíclicas de *Trypanosoma brucei* em meio de cultura rico em glicose. As setas cinza claro e escuras representam passos enzimáticos da glicólise, treonina, prolina e glutamina. Produtos finais excretados (acetato, alanina, glicerol, glicina, d-lactato, succinato e CO₂). O glicosomo, a mitocôndria, o ciclo do ácido tricarbóxico (TCA), a via pentose fosfato (PPP) e biosíntese de lipídeos estão representados na figura. A membrana externa mitocondrial é permeável aos metabólitos e é demonstrada a cadeia transportadora de elétrons (CTE). As vias de produção do d-Lactato e etanol têm sido observadas

somente em *Leishmania* spp e *Phytomonas/Crithidia*. Abreviações: AA, aminoácidos; AOB, amino-oxibutirato; 1,3BPGA, 1,3-bifosfoglicerato; C, citocromo c; Cit, citrato; CoASH, coenzima A; DHAP, dihidroxiacetona fosfato; F-6-P, frutose 6-fosfato; FBP, frutose 1,6-bifosfato; G-3-P, gliceraldeído 3-fosfato; G-6-P, glicose 6-fosfato; GLU, glutamato; Gly-3-P, glicerol 3-fosfato; IsoCit, isocitrato; 2Ket, 2-cetoglutarato; OA, oxalato; Oxac, oxaloacetato; PEP, fosfoenolpiruvato; 3-PGA, 3-fosfoglicerato; Pi, fosfato inorgânico; P_{Pi}, pirofosfato inorgânico; SAG, glutamato semialdeído; SucCoA, succinil-CoA; T[SH]₂, forma reduzida do tripanotiona; UQ, ubiquinona. Enzimas são: 1, hexoquinase; 2, glicose-6-fosfato isomerase; 3, fosfofrutoquinase; 4, aldolase; 5, triose-fosfato isomerase; 6, glicerol-3-fosfato desidrogenase; 7, glicerol quinase; 8, gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase; 9, fosfoglicerato quinase glicosomal; 10, fosfoglicerato quinase citosolico; 11, fosfoglicerato mutase; 12, enolase; 13, piruvato quinase; 14, fosfoenolpiruvato carboxiquinase; 15, piruvato fosfato diquinase; 16, malato desidrogenase glicosomal; 17, fumarase citosólico e glicosomal (FHc); 18, fumarato redutase NADH-dependente glicosomal; 19, fumarase mitocondrial (FHm); 20, fumarase redutase NADH-dependente mitocondrial; 21, adenilato quinase glicosomal; 22, enzima málica; 23, enzima desconhecida; 24, alanina aminotransferase; 25, complexo piruvato desidrogenase; 26, acetato:succinato.Coa transferase; 27, Enzima desconhecida; 28, succinil-CoA sintetase; 29, citrato liase; 30, aconitase; 31, isocitrato desidrogenase; 32, complexo de α -cetoglutarato desidrogenase; 33, succinato desidrogenase (complexo II da cadeia respiratória); 34, malato desidrogenase mitocondrial; 35, L-prolina desidrogenase; 36, Pirrolina-5 carboxilase desidrogenase; 37, L-glutamina deaminase; 38, glutamato aminotransferase; 39, glutamato desidrogenase; 40, L-treonina desidrogenase; 41, acetil-CoA: glicina C-acetiltransferase; 42, citrato liase; 43,44 acetil-L-carnitina transferase; 45, glicerol-3-fosfato FAD dependente desidrogenase; 46, rotenona NADH desidrogenase; 47. Oxidase alternativa; 48, F₀F₁-ATP sintase; 49, reação espontânea; 50, glioxalase I; 51, glioxalase II, 52, piruvato descarboxilase; 53, NAD-ligado ao álcool desidrogenase; I, II, III e IV, complexos da cadeia respiratória. (Adaptado de Bringaud et al. 2006).

O meio rico em glicose é usado para o crescimento parasitário e o seu metabolismo tem recebido atenção especial, pois pouco se sabe sobre o metabolismo dos aminoácidos e ácidos graxos (Bringaud et al. 2006). Por exemplo, aminoácidos e glicose podem ser usados como fonte energética, e parecem gerar energia pelo metabolismo glicosomal e mitocondrial, que compreende a cadeia transportadora de elétrons (Opperdoes & Coombs

2007). Nas formas promastigotas há o registro da presença de enzimas do ciclo do ácido tricarboxílico (TCA), porém estudos experimentais revelam que o ciclo não é ativo (Opperdoes & Coombs, 2007).

A constatação das vias metabólicas, mesmo sem atividade, permite, ou induz a existência de um metabolismo facultativo, dando condição às formas promastigotas de *Leishmania* sobreviverem em ambientes adversos, que é uma adaptação do parasito para sobreviver durante seu ciclo de vida no inseto vetor, como a utilização da glicose que não é a fonte natural de carbono, e sim o glicogênio (Bringaud et al. 2006), porém outras fontes de reserva energética tem sido relatadas em *Leishmania*, como por exemplo a manose, que parece ser uma fonte de energia de reserva em potencial (Opperdoes & Coombs 2007), como demonstrado na figura 4.

A glicólise é uma via metabólica presente em todos os eucariotos, e nos tripanosomatídeos não é exceção. Em todos os estágios a glicose pode ser degradada em piruvato, usando a via clássica Embden-Meyerhof, porém em *Kinetoplastida* a glicólise ocorre em uma organela específica denominada glicossomo (Tielens & Van Hellemond 2009).

A glicose é a maior fonte de energia para a maioria dos estádios nos hospedeiros vertebrados, no entanto, os estádios no inseto utilizam aminoácidos, como a prolina, e não a glicose, porém a via glicolítica é sempre ativa (Tielens & Van Hellemond 1998). A presença do ciclo do glioxalato foi relatada e os produtos finais da glicólise identificados e descritos na literatura foram o succinato, acetato, piruvato e D-lactato (Figura 4). A produção de CO₂ é resultado da via de produção do acetato e succinato. Alanina, amônia e uréia também foram identificadas (Opperdoes & Coombs 2007).

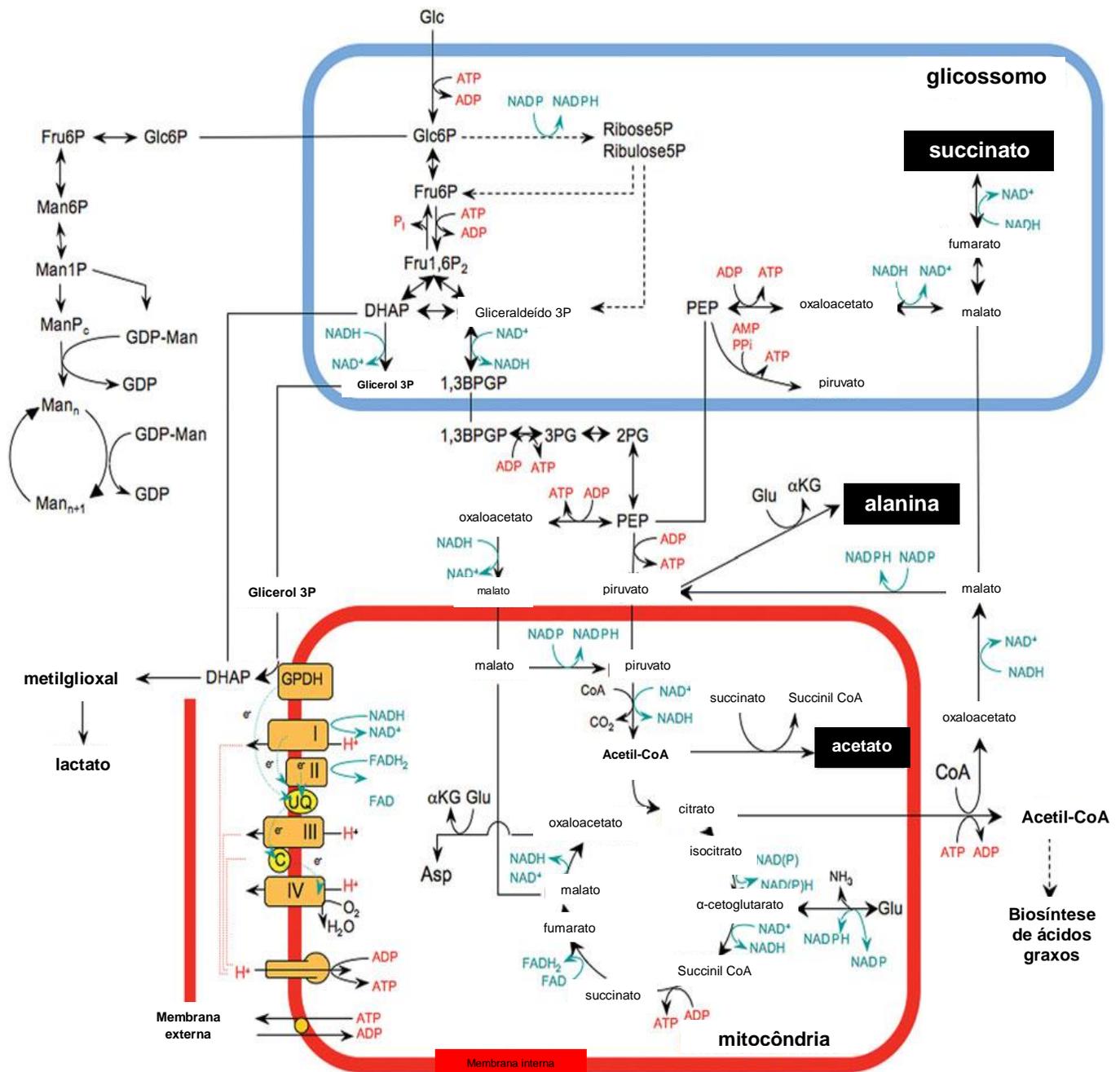


Figura 4: Metabolismo energético de *Leishmania* spp. Representação esquemática do metabolismo energético em formas promastigotas de *Leishmania* em meio de cultura rico em glicose. Principais produtos excretados/secretados são mostrados em preto (succinato, alanina e acetato). As enzimas glicolíticas, da gliconeogênese, via da pentose fosfato e fermentação do succinato são parcialmente (com dupla localização no citosol) ou exclusivamente localizadas no glicosomo. Setas pontilhadas referem-se a múltiplos passos enzimáticos que não são mostrados. Abreviações: I–IV, complexos da cadeia transportadora de elétrons; aKG, α-cetogluturato; 1,3BPGP, 1,3-bisfosfoglicerato; DHAP,

dihidroxiacetona fosfato; Fru1,6P2 frutose-1,6-bifosfatase; Glu, glutamato; GPDH, glicerol 3-fosfato desidrogenase FAD-dependente; Glc6P, glicose-6-fosfato; Man6P, manose-6-fosfato; PEP, fosfoenolpiruvato; 2PG, 2-fosfoglicerato; 3PG, 3 fosfoglicerato; ME, enzima málica; MDH, malato desidrogenase (Adaptado de Saunders et al. 2010).

O piruvato é o produto final da glicólise e é freqüentemente degradado por uma mitocôndria única. O piruvato é transportado para dentro da mitocôndria para sua oxidação e formação de ATP. Se o uso da cadeia transportadora de elétrons é inibida, como por exemplo na falta de oxigênio, o piruvato não é transportado para dentro da mitocôndria e no citosol é reduzido a lactato pela enzima lactato desidrogenase, para manter o balanço redox (Oppenheimer & Coombs 2007). Nas formas sanguíneas de *T. brucei* o balanço redox é mantido usando o oxigênio como aceptor final de elétrons pela via do glicerol-3-fosfato (Oppenheimer & Coombs 2007). Uma pequena parte do piruvato é transaminado em alanina que é excretada (Blum 1993).

Muitos tripanosomatídeos produzem lactato a partir da glicose via piruvato, embora freqüentemente com baixa concentração deste metabólito como produto final do metabolismo. As formas presentes no inseto vetor de *T. brucei* e *Leishmania* spp podem excretar uma maior quantidade de lactato, embora eles utilizem diferentes vias para a produção de L-lactato e D-lactato, respectivamente. As formas promastigotas de *L. (V.) braziliensis* contêm o ciclo do glioxalato como uma via de desintoxicação, que protege a célula contra os efeitos do metilglioxal, um componente mutagênico e citotóxico que é produto da glicólise. Em tripanosomatídeos, por exemplo, *Leishmania*, este sistema contém duas enzimas, glioxalase I e II, que converte o metilglioxal em D-lactato. *Leishmania* spp expressa ambas as enzimas glioxalases, enquanto o genoma do *T. brucei* contém apenas o

gene que expressa a glioxalase II, sugerindo que a via da glioxalase não é funcional neste parasito. Isto implica na ausência da produção de D-lactato por formas procíclicas de *T. brucei gambiense* que excreta somente o isômero L-lactato (Bringaud et al. 2006).

O acetato também é formado em meio de cultura rico em glicose. Este produto final é formado por uma enzima do ciclo envolvendo o acetato: succinato CoA transferase (SucCoA) transfere o CoA para Acetil-CoA e este em succinato, rendendo acetato e succinil-CoA, que é convertido a succinato pela succinil-CoA sintetase, que rende ATP em parte do ciclo do ácido tricarboxílico (Figura 5). Em tripanosomatídeos, o acetato também pode ser produto final da degradação mitocondrial de aminoácidos (como a treonina), resultando na formação do piruvato ou acetil-CoA (Bringaud et al. 2006; Saunders et al. 2010). O acetil-CoA pode ainda ser produto final da β -oxidação dos ácidos graxos (Rivière et al. 2009), como demonstrado nas figuras 5 e 6.

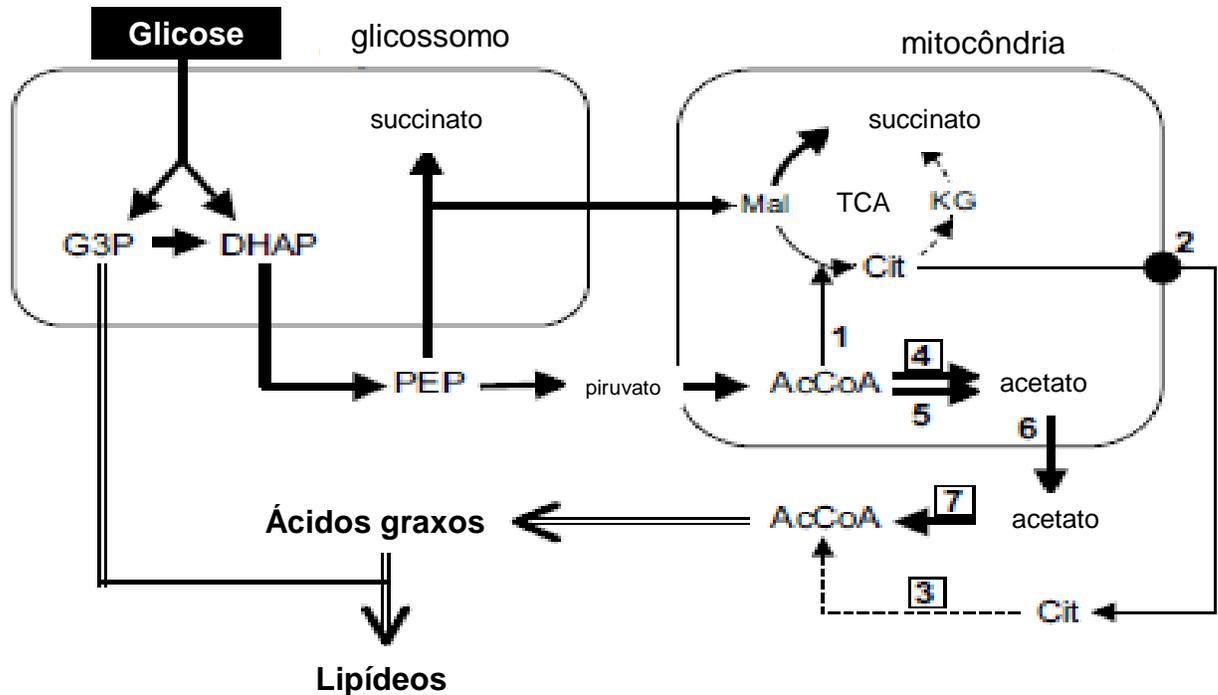


Figura 5. Representação esquemática da biosíntese de lipídeos a partir do metabolismo da glicose em formas procíclicas de *Trypanosoma brucei*. TCA, ciclo do ácido tricarboxílico; AcCoA, acetil-CoA; Cit, citrato; DHAP, dihidroxiacetona fosfato; G3P, glicerol 3-phosphate; KG, α -cetoglutarato; MAL, malato; PEP, fosfoenolpiruvato; Pyr, piruvato. 1, Citrato sintase (CS); 2, transportador de citrato ou citrato/malato; 3, citrato liase (CL); 4, acetato: succinato CoA-transferase (ASCT); 5, enzima desconhecida; 6, difusão passiva de acetato ou carreador de acetato; 7, “AMP” formado pelo acetil-CoA sintetase (AceCS) (Adaptado de Rivière et al. 2009).

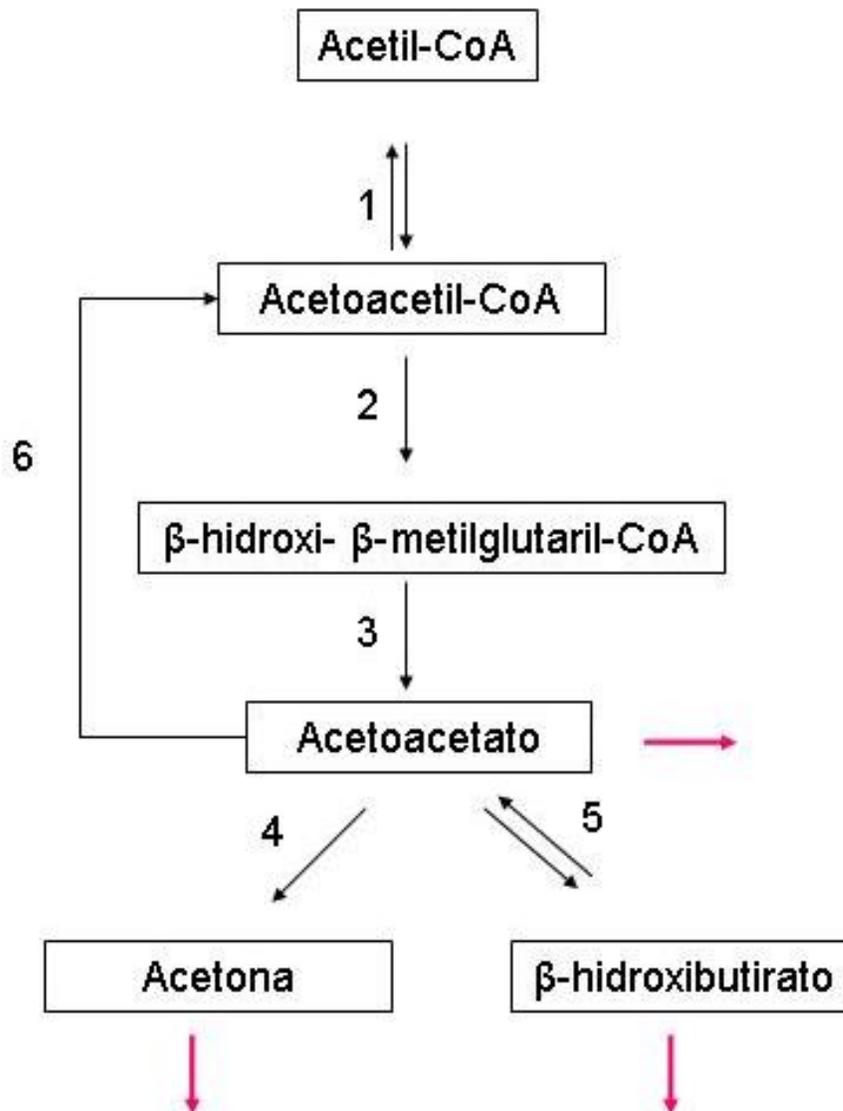


Figura 6. Formação de corpos cetônicos a partir de Acetil-CoA. Enzimas: 1. tiolase; 2. HMG-CoA sintase; 3. HMG-CoA liase; 4. acetato descarboxilase; 5. β-hidroxibutirato desidrogenase; 6. β-cetoacil-CoA transferase. Acetoacetato, acetona e β-hidroxibutirato são excretados ou utilizados como fonte de energia ao originar acetil-CoA. Adaptado de Lehninger et al. 2005 e Vinaud 2007.

O succinato produzido durante incubações de formas promastigotas em condições aeróbias é principalmente produzido por via oxidativa envolvendo parte do ciclo do ácido tricarbóxico (de oxalacetato via citrato até succinato) e oxidação de NADH via cadeia respiratória (van Hellemond et al. 1997). Em muitos tripanosomatídeos, o succinato é um produto final do metabolismo energético. Tem sido sugerido que este succinato é produzido pela fumarato redutase uma enzima homóloga a succinato desidrogenase do ciclo do ácido tricarbóxico, que catalisa a reação reversa – oxidação do succinato (figura 3). A fumarato redutase é bem conhecida em bactérias e em helmintos, onde sua função está na absorção de elétrons no metabolismo anaeróbio destes organismos. Entretanto alguns autores descreveram que a redução do fumarato em tripanosomatídeos é pouco provável (Ackrell et al. 1992, Tielens 1994).

Leishmania contem várias enzimas do ciclo da uréia, embora o ciclo esteja completamente ausente em *L. major*, *T. brucei* e *T. cruzi*. As enzimas carbamoil-fosfatase sintetase e arginase estão presentes em todos os três parasitos, mas argininossuccinato sintase e arginase estão presentes somente em *L. major*. Isto indica que arginina, ornitina e uréia podem ser formadas somente por *Leishmania* e explica o porquê de *Leishmania* excretar uréia enquanto tripanosomas produzem amônia (Oppendoes & Coombs 2007). As figuras 7 e 8 mostram o metabolismo da arginina e amônia em mamíferos, já que em *Leishmania* ainda não foram descritos.

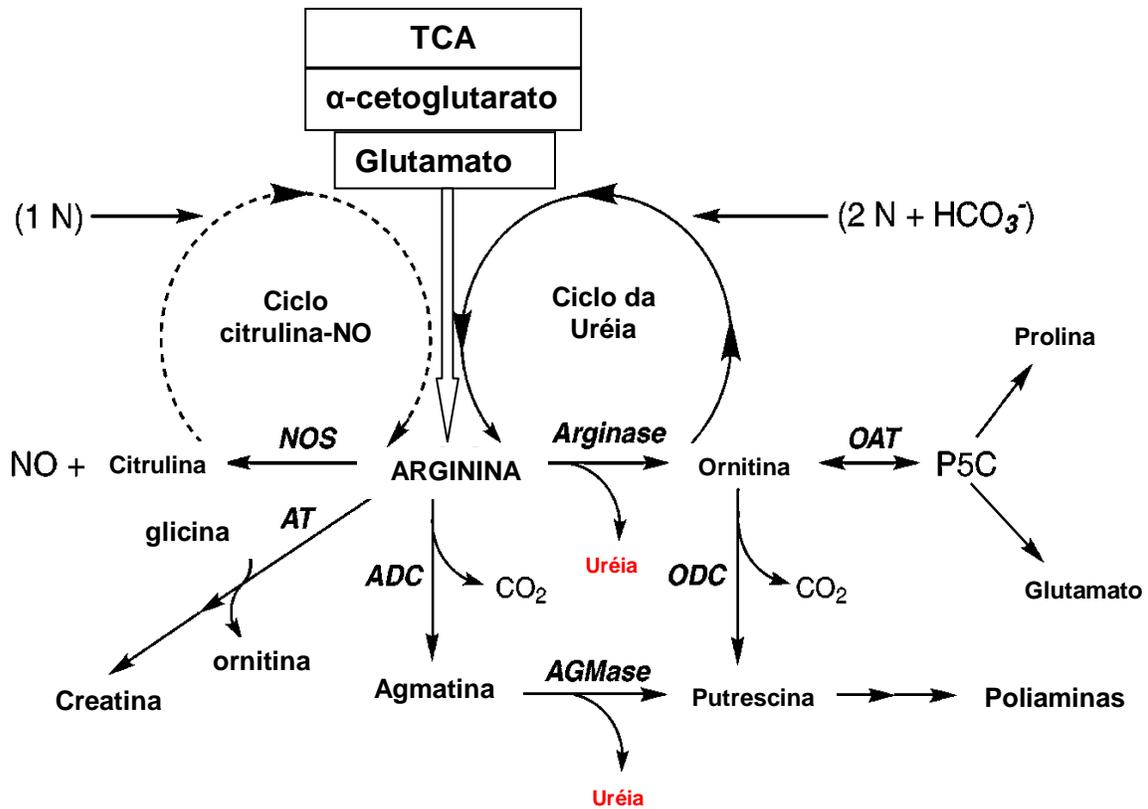


Figura 7. Resumo do metabolismo da arginina em mamíferos. Nem todas as enzimas demonstradas na figura são expressas em todas as células ou tecidos. As enzimas apresentadas são: NOS, óxido nítrico sintase; AT, L-arginina: glicina aminotransferase; ADC, arginina descarboxilase; AGMase, agmatinase; ODC, ornitina descarboxilase; OAT, ornitina aminotransferase; TCA, ciclo do ácido tricarboxílico. A estequiometria de átomos de nitrogênio e bicarbonato é necessária para regenerar a arginina nos dois ciclos. A linha tracejada indica que a eficiência da citrulina-NO no ciclo é variável e não quantitativa (Adaptado de Morris 2002).

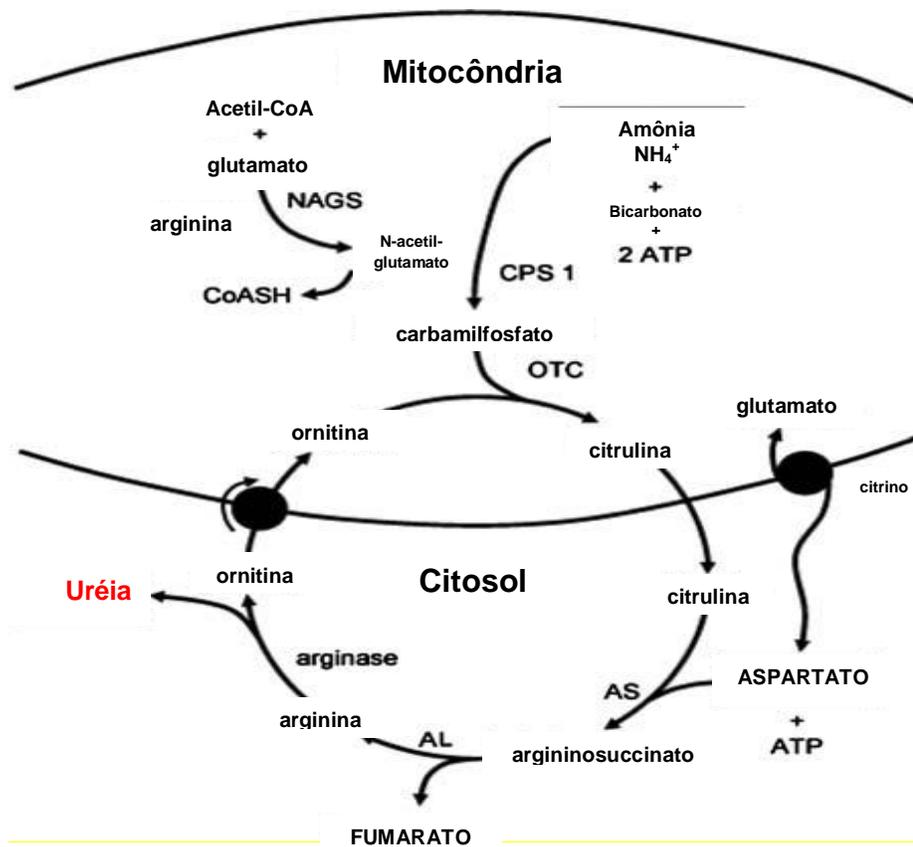


Figura 8. Metabolismo da amônia em mamíferos. NAGS, N-acetilglutamato sintetase; CPS1, carbamilfosfato sintetase 1, OTC, ornitina trasncarbamilase; AS, argininosuccinato sintetase; AL, arginino succinato liase; ● citrino, transportador mitocondrial de aspartato-glutamato; ● sistema de transporte ornitina (Walker, 2009).

As formas promastigotas possuem uma clássica cadeia respiratória, mas carece da oxidase alternativa que está presente em outros tripanossomatídeos (Martin & Mukkada 1979).

Isto tem sido apresentado porque as formas promastigotas são extremamente dependentes desta clássica cadeia respiratória para a geração de energia. Em meio rico em glicose, as formas procíclicas de tripanosomas (bem como outros tripanosomatídeos)

produzem seu ATP através da fosforilação oxidativa. Um completo maquinário enzimático para o metabolismo oxidativo está presente em muitas formas adaptativas. Isto inclui uma cadeia respiratória funcional contendo citocromo capaz de gerar um gradiente de próton através de oxidases terminais, a citocromo oxidase (complexo IV) e oxidase alternativa. Isto está de acordo com a observação que as formas promastigotas possuem um metabolismo energético no qual a maioria dos carboidratos é degradada e parcialmente oxidada até os produtos finais como acetato, succinato e piruvato, um processo que concomitantemente produz NADH que é re-oxidado pela cadeia respiratória (van Hellemond et al. 1997; Bringaud et al. 2006), como demonstrado nas figuras 3 e 4.

Outra via metabólica de degradação de glicose, a pentose fosfato, é também ativa nos tripanossomatídeos e algumas enzimas desta via presentes em *T. cruzi* e *T. brucei* parecem não estar presentes em *Leishmania* (figura. 3). A importância desta ausência é desconhecida porque os genes que codificam muitas das enzimas da via pentose fosfato estão presentes e esta via é relatada em parasitos (Opperdoes & Coombs 2007). Esta via não é muito utilizada no catabolismo de substratos (glicose), pois é necessário NADPH e ribose-5-fosfato para a síntese de D-ribose, empregada na biossíntese de ácidos nucleicos, e estes substratos não estão disponíveis para o parasito. Assim, a atividade da via da pentose fosfato em *Leishmania* é dependente de condições de cultura (Barrett 1997).

1.5. Ressonância magnética nuclear

A ressonância magnética nuclear é a prolongação de um som que causa sua repercussão em outros corpos que entram em vibração. Os núcleos dos átomos giram em orientações randômicas, e quando colocados num campo magnético se orientam. A esses

núcleos é aplicada uma onda de rádio frequência. Os núcleos absorvem e emitem energia, cuja diferença de energia captada e emitida é convertida em gráficos. Pode se determinar informações importantes através da RMN, como por exemplo, determinar a estrutura de moléculas desconhecidas (Pavia 2010).

O átomo mais utilizado na RMN é o de carbono-13 já que este apresenta abundância natural baixa (1,08%) de todos os átomos de carbono na natureza. Para compensar a baixa abundância natural do carbono-13. O carbono-12, é mais abundante, porém é inativo em RMN (Pavia 2010).

O ^1H é naturalmente abundante (97%) e é um dos núcleos mais sensíveis à RMN. A ^1H RMN tem sido bem relatada na detecção de componentes específicos de fluidos biológicos e extratos de tecidos, como por exemplo, na detecção de produtos metabólicos finais que são acumulados por parasitos *in vivo* (Thompson 1991).

Experimentos bidimensionais podem ser realizados na RMN, como por exemplo, a análise de dois núcleos simultaneamente, carbono e hidrogênio. Dentre as técnicas de RMN bidimensionais temos: TOCSY, HSQC, HMQC.

Outra técnica que pode ser utilizada na RMN é a HR-MAS. É uma técnica nova, que possui uma alta sensibilidade, com resultados de alta qualidade. Além de ser um método não destrutivo, é utilizada para caracterizar compostos semi-sólidos ou sólidos (Shapiro & Gounarides 2000).

Assim, a ressonância magnética nuclear oferece novos meios para a análise de fenômenos biológicos *in vivo*, e espectros utilizando ^1H , ^{13}C e ^{31}P têm sido empregados em estudos metabólicos de células intactas, tecidos, órgãos, bem como em organismos. É uma ferramenta com alto potencial que pode ser aplicada na parasitologia (Thompson, 1991),

como descrito por Chapman et al. (1985) que utilizaram ^{13}C RMN em *Trichomonas vaginalis*, Nishina et al. (1994) ^1H RMN em *Schistosoma japonicum*, por Thompson et al. (1994) com ^{31}P e ^1H RMN em *Biomphalaria glabrata* entre outros organismos. Suas vantagens são inerentes por não ser um método destrutivo e nem mesmo invasivo, podendo dar informações importantes da visão global do metabolismo celular (O'Sullivan et al. 1989).

1.6. Cromatografia líquida de alta eficiência

A cromatografia é um método físico-químico de separação. Está fundamentada na migração diferencial dos componentes de uma mistura, que ocorre devido a diferentes interações, entre duas fases imiscíveis, a fase móvel e a fase estacionária. A grande variedade de combinações entre fases móveis e estacionárias a torna uma técnica extremamente versátil e de grande aplicação (Degani et al. 1998).

A cromatografia pode ser utilizada para a identificação de compostos, por comparação com padrões previamente existentes, para a purificação de compostos, separando-se as substâncias indesejadas e para a separação dos componentes de uma mistura. A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) utiliza uma fase estacionária de partículas menores, sendo necessário o uso de uma bomba de alta pressão para a eluição da fase móvel, devido a sua baixa permeabilidade (Degani et al. 1998).

As fases móveis utilizadas em CLAE devem possuir alto grau de pureza e estarem livres de oxigênio ou outros gases dissolvidos, sendo filtradas e desgaseificadas antes do uso. A bomba deve proporcionar ao sistema vazão contínua sem pulsos com alta reprodutibilidade, possibilitando a eluição da fase móvel a um fluxo adequado (Degani et al. 1998). A

versatilidade desta técnica reside no grande número de fases estacionárias existentes, as quais possibilitam análises de separações de uma ampla gama de compostos com alta eficiência. Tem sido utilizada em várias áreas da ciência, no acompanhamento de sínteses, em análises de pesticidas, feromônios, no isolamento de produtos naturais e sintéticos e na produção e controle de qualidade de medicamentos, dentre tantas outras aplicações (Degani et al. 1998), como no estudo bioquímico parasitário.

2. JUSTIFICATIVA

A leishmaniose tegumentar constitui um problema de saúde pública em 88 países, distribuídos em quatro continentes (Américas, Europa, África e Ásia), com registro anual de 1 a 1,5 milhões de casos. É considerada pela Organização Mundial da Saúde (OMS), como uma das seis mais importantes doenças infecciosas, pelo seu alto coeficiente de detecção e capacidade de produzir deformidades (MS 2007).

No Brasil, a Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) é uma das afecções dermatológicas que merece mais atenção, devido a sua magnitude, assim como pelo risco de ocorrência de deformidades que pode produzir no ser humano, e também pelo envolvimento psicológico, com reflexos no campo social e econômico, uma vez que, na maioria dos casos, pode ser considerada uma doença ocupacional. O tratamento é longo, agressivo e muitas vezes ineficaz. Apresenta ampla distribuição com registro de casos em todas as regiões brasileiras (MS 2007).

Sabe-se que os protozoários dependem da ingestão de alimentos orgânicos como fontes energéticas para a manutenção de sua organização, crescimento e reprodução. Possuem como fonte de reserva o glicogênio e a principal fonte de energia a glicose. Esta molécula é catabolizada aos poucos e a partir dela são sintetizados outros compostos orgânicos (Bringaud et al. 2006).

Os bioensaios, como por exemplo, a CLAE e RMN, podem estabelecer uma análise de ácidos orgânicos, que são indicadores do perfil metabólico parasitário. A metabolômica através de estudos dos ácidos orgânicos essenciais à manutenção do ciclo metabólico pode indicar distúrbios biológicos nos componentes do metabolismo intermediário e energético de todos os seres vivos (Scriver et al. 2001).

A investigação das vias metabólicas é relevante para o entendimento da biologia parasitária, onde estão os principais alvos de fármacos, por exemplo: diidrofolato redutase (metotrexato), ergosterol (anfotericina B), a biossíntese dos esteróis (azóis), metabolismo de fosfolípidos (miltefosina), e biossíntese de poliaminas (eflornitina). É possível verificar ainda as alterações metabólicas ocorridas que fundamentam os efeitos letais dos fármacos. A metabolômica tem permitido uma melhor compreensão dos processos biológicos básicos que já são abordados nos estudos de transcriptoma e proteoma e agora passam a ser aplicados na identificação das vias metabólicas parasitárias para futuras intervenções farmacêuticas específicas (Scheltema et al. 2010).

As vias bioquímicas são essenciais para a sobrevivência do parasito e a identificação dessas vias e a quantificação dos metabólitos excretados/secretados podem ser utilizados para caracterizar diferenças existentes entre cepas e isolados, bem como demonstrar o desenvolvimento fisiopatológico de cada uma, como relatado por Oliveira et al. (2010) ao analisarem diferenças na infectividade entre diferentes recém-isolados de *L. (V.) braziliensis*, como por exemplo, no tamanho da lesão em camundongos.

Neste estudo, as atividades realizadas servirão como importantes indicadores do metabolismo em *Leishmania* spp e a implementação de pesquisas para a compreensão do estudo biológico destes parasitos e inclusive na prospecção de estudos em outros estágios evolutivos com relação ao metabolismo energético e interação com os hospedeiros. Sabe-se que este conhecimento é essencial para dar suporte a vias essenciais do metabolismo de *Leishmania*, com vistas ao desenvolvimento de propostas inovadoras no tratamento das doenças parasitárias, como por exemplo, as Leishmanioses.

A análise bioquímica do metabolismo de parasitos, através das metodologias de cromatografia líquida de alta eficiência, espectrofotometria e ressonância magnética nuclear vem atualizar os estudos metabolômicos parasitológicos, com técnicas adequadas à avaliação do perfil bioquímico na relação parasito-hospedeiro, levando ao melhor entendimento da maneira como esses organismos conseguem desenvolver estratégias metabólicas para sobreviverem em ambientes diversos, como o trato digestório do hospedeiro invertebrado ou os tecidos do hospedeiro vertebrado, além de possibilitar maiores estudos da relação parasito-hospedeiro como demonstrado por Vinaud (2007) e Araújo (2010). Acrescenta-se à relevância destas técnicas a baixa densidade nacional de pesquisadores envolvidos em metodologias bioquímicas para os estudos em questão.

Assim, o estudo do metabolismo energético permite avaliar a dinâmica das vias metabólicas utilizadas pelo parasito diante de ação efetiva de um fármaco anti-parasitário, permite avaliar mudanças do perfil metabólico frente a utilização dos fármacos que causam resistência no parasito. A diferenciação entre as cepas e isolados de *Leishmania* pode estar relacionada à concentração de metabólitos responsáveis pelas mudanças genéticas parasitárias. Estes metabólitos podem indicar importantes diferenças entre a bioquímica do hospedeiro e do parasito. Sendo assim, os conhecimentos aprimorados dos mecanismos metabólicos específicos do parasito e do hospedeiro ampliam a possibilidade de um combate mais acentuado e eficaz às muitas doenças que atingem o homem, em especial as leishmanioses. Estabelecer diferenças metabólicas nesta relação possibilita a determinação de medidas terapêuticas de controle e combate dos parasitos através de alvos específicos.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Estudar o metabolismo energético em *Leishmania (Viannia) braziliensis* e *Leishmania (Leishmania) amazonensis* na fase promastigota do parasito, utilizando os métodos da cromatografia líquida de alta eficiência e ressonância magnética nuclear.

3.2. Objetivos específicos do artigo 1

3.2.1. Comparar e avaliar as taxas de concentrações de indicadores metabólicos por CLAE na cepa de referência MHOM/BR/1975/M2903 e nos isolados MHOM/BR/2003/IMG3 e MHOM/BR/2005/RPL5 de *L. (V.) braziliensis*.

3.2.2. Detectar e quantificar *in vitro* por CLAE ácidos orgânicos do metabolismo intermediário em diferentes isolados de *L. (V.) braziliensis*: piruvato, lactato, citrato, α -cetogluturato, succinato, fumarato, malato e oxaloacetato; e do metabolismo de ácidos graxos: acetoacetato, acetato e β -hidroxibutirato.

3.2.3. Avaliar *in vitro*, por espectrofotometria, as taxas de metabolização da glicose utilizada como fonte energética por *L. (V.) braziliensis*:

3.3. Objetivos específicos do artigo 2

3.3.1. Implantar o método de Ressonância Magnética Nuclear – RMN para estudos bioquímicos em formas promastigotas de *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) amazonensis*.

3.3.2. Avaliar *in vitro* qualitativamente, utilizando a RMN, excreção e secreção de metabólitos pelos parasitos MHOM/BR/1975/M2903, MHOM/BR/2005/WSS5 e MHOM/BR/2006/EFSF6 de *L. (V.) braziliensis* e por IFLA/BR/1967/PH8 de *L. (L.) amazonensis*.

4. MATERIAL E METODOS

4.1. Cultura de formas promastigotas de *Leishmania spp*

As formas promastigotas de *Leishmania (V.) braziliensis* (MHOM/BR/1975/M2903, MHOM/BR/2003/IMG3, MHOM/BR/2005/RPL5, MHOM/BR/2006/EFSF6, e MHOM/BR/2005/WSS5) e *Leishmania (L.) amazonensis* (IFLA/BR/1967/PH8) foram gentilmente cedidas pelo Banco imunobiológico das leishmanioses (Leishbank) da região Centro-oeste/Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás. Os parasitos foram cultivados em meio líquido Grace's (Grace's Insect Medium – Gibco®) acrescido de 20% soro fetal bovino estéril, L-glutamina à 2 mM/mL e dos antibióticos: penicilina à 100 µg/mL e estreptomicina 100 µg/mL. Foram mantidos em placas de cultura com 24 poços em estufa a 26°C. Dessa forma, estas amostras serviram para avaliar as formas promastigotas sob tensão normal de O₂.

4.2. Padronização da curva de crescimento

Uma alíquota de parasitos foi diluída em formaldeído a 10% e então realizada a contagem em câmara de Neubauer. A curva teve início com 1×10^6 *Leishmania*/mL em cinco repetições. O crescimento das formas promastigotas foi acompanhado por oito dias. As amostras das fases logarítmicas (3º dia) e estacionárias (6º dia) foram coletadas (1,0mL de cada amostra), feita a paralização do metabolismo energético das amostras em nitrogênio líquido e posteriormente foram processadas e submetidas à cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e à espectrofotometria. O anexo 2 mostra de forma resumida as metodologias empregadas neste estudo.

4.3. Análise cromatográfica da concentração de ácidos orgânicos

Amostra de 1 mL da cultura de fase logarítima contendo 2×10^7 parasitos/mL e amostras de 1 mL da cultura de fase estacionária contendo 4×10^7 parasitos/mL foram processadas para extração dos ácidos orgânicos por meio de uma pequena coluna de troca iônica, o Bond Elut[®] (coluna Varian). Com auxílio de uma bomba à vácuo, esta coluna de extração foi ativada com 1 mL de HCl (0,5 mol/L), 1 mL de metanol e 2 mL de água ultrafiltrada. Em seguida 250 μ L da amostra foram aplicadas no aparelho de CLAE.

Após a aplicação da amostra, foram acrescentados 2 mL de água ultrafiltrada, retirado o Bond Elut[®] do vácuo, aplicaram-se 250 μ L de H₂SO₄ (0,5 M), centrifugando a 500 g (aproximadamente 2000 rpm), por cinco minutos a 2^oC.

A amostra resultante foi submetida à análise de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE – Varian ProStar) com uma coluna de exclusão BIORAD-Aminex ion exclusion HPX – 87H (300 X 7,8 mm). A coluna de separação é protegida por uma coluna de proteção BIORAD-Aminex HPX – 85. O eluente utilizado na fase móvel foi o ácido sulfúrico (5 mmol/L), à temperatura de 30^oC, com vazão de 0,6 mL/min, acoplado a um detector UV/visível em comprimento de onda de 210 nm. Cada amostra foi injetada num volume de 40 μ L (Bezerra et al. 1997, 1999; Vinaud et al. 2008).

Os ácidos orgânicos presentes nas amostras analisadas foram identificados com base no seu tempo de retenção. O tempo de retenção dos ácidos orgânicos e área do pico destas substâncias foram calculados e integrados através de uma planilha do Excel, fornecendo assim sua concentração.

Foram estudados os ácidos orgânicos indicadores da glicólise: piruvato e lactato; os elementos do ciclo do ácido tricarboxílico: citrato, α -cetoglutarato, succinato, fumarato,

malato e oxaloacetato; os ácidos graxos: acetato; e os corpos cetônicos: hidroxibutirato e acetoacetato (Vinaud et al. 2008).

Como controle negativo da secreção e excreção dos ácidos orgânicos foi utilizado o meio de cultura Grace's livre de parasitos, que foi submetido à análise por CLAE, após processamento da amostra.

4.4. Espectrofotometria/colorimetria UV visível

Nas diferentes fases de crescimento (logarítmica e estacionária) das formas promastigotas de *L. (V.) braziliensis* foi realizado o método de espectrofotometria enzimática e colorimétrica no aparelho Konelab60i Wiener® para as dosagens de glicose de acordo com o protocolo do kit comercial:

Glicose – método enzimático, Wiener®, leitura de absorvância a 505 nm UV visível (Väisänen et al. 2004).

4.5. Ressonância magnética nuclear

Os parasitos na fase estacionária do crescimento foram coletados por centrifugação a 500 g por 15 minutos a temperatura ambiente. Formas promastigotas foram lavadas três vezes em solução tampão (PBS) contendo 1 mM de glicose marcada nos seis carbonos (U-¹³C-glicose). Em tubos plásticos 2×10^8 promastigotas foram ressuspensas em 1 mL de PBS contendo 5 mM de U-¹³C-glicose e mantidas em estufa à 26°C por cinco horas. A integridade das formas promastigotas foi visualizada por observação microscópica. Em seguida, o metabolismo foi paralisado em banho de gelo por cinco minutos e centrifugado a 500 g por 10 minutos, para a obtenção do sobrenadante. Este foi coletado e, após a adição de D₂O

(10%v/v), 0,5 mL foi utilizado para análises de RMN de ^{13}C , o sedimento (formas promastigotas sedimentadas por centrifugação) puro foi analisado por RMN de ^1H .

Os ensaios de RMN foram realizados no Instituto de Química/UFG, onde os experimentos mono e bidimensionais foram obtidos à 25°C em espectrômetro Bruker Avance III 500 (operando a 500,13 MHz para ^1H e 125,76 MHz para ^{13}C). Para a análise dos sobrenadantes, foi utilizada uma sonda de detecção direta de 5 mm e seqüência de pulso para a pré-saturação do sinal da água. Para a aquisição dos dados, foram adicionados 10% (v/v) de solução de trimetilsililpropionato de sódio (TMSP-2,2,3,3- d_4) em D_2O (0,1% m/v) a 600 μL da amostras do sobrenadante. Para a análise dos sedimentos dos parasitos foi utilizada a sonda de alta resolução com giro no ângulo mágico (HR-MAS) de 4 mm. Os pellets sem nenhum pré-tratamento foram acondicionados em rotores de zircônio de 50 μL seguidas pela adição de uma solução de D_2O /TMSP-2,2,3,3- d_4 .

Tipicamente, os experimentos monodimensionais de ^{13}C foram realizados utilizando-se a seqüência de pulso com desacoplamento de ^1H . Os espectros foram obtidos com um acúmulo total de 20.000,00 FIDs e 32K pontos digitalizados, janela espectral de 30.000,00 Hz, e tempo de aquisição de 0,5s. Espectros monodimensionais de ^1H também foram obtidos com um acúmulo total de 64 FIDs e 32K pontos digitalizados, janela espectral de 8.000,00 Hz e tempo de aquisição de 2,0s.

Os espectros adquiridos foram identificados através do deslocamento químico referencial interno TMSP-2,2,3,3- d_4 . A atribuição dos sinais de metabólitos dos espectros de ^{13}C e ^1H foi realizada com base em valores de deslocamento químico e constante de acoplamento já publicados por Darling et al. (1987), Rainey & Mackenzie (1991), Castilla et al. (1995), Singha et al. (1996), Gupta et al. (1999) e confirmados no software ACDLAB NMR.

Os dados obtidos no presente estudo foram confirmados através da avaliação de espectros bidimensionais HSQC, HMBC e TOCSY.

Os padrões de ácidos orgânicos à 25 mM (piruvato, lactato, citrato, α -cetogluturato, succinato, fumarato, malato, oxaloacetato, acetato e β -hidroxibutirato), dos aminoácidos (glutamina e valina) e a U- ^{13}C -glicose à 5 mM foram submetidos à análise por RMN para confirmação dos resultados que foram obtidos pela CLAE.

4.6. Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas por meio do programa *Sigma Stat 3.2* (*Microsoft Corp.*). Os dados foram apresentados sob a forma de média e respectivo desvio-padrão, obtidos de amostras com cinco repetições. Todas as variáveis foram testadas quanto à distribuição normal e variância homogênea. Quando a distribuição foi considerada normal e com variância homogênea foram utilizados testes paramétricos. Nos casos em que a distribuição não foi normal ou que a variância não foi homogênea foram utilizados testes não paramétricos. As proporções e as correlações também foram avaliadas. As diferenças observadas foram consideradas significantes quando $p < 0,05$ pelo teste ANOVA. Os estudos realizados com RMN foram de variáveis qualitativas, cujas taxas de concentrações não foram mensuráveis.

5. ARTIGOS

Artigo 1 – ENERGETIC METABOLISM OF AXENIC PROMASTIGOTES OF *Leishmania (Viannia) braziliensis*

Tatiane L. Costa, Fátima Ribeiro-Dias, Milton A.P. Oliveira, José C.B. Bezerra, Marina C.

Vinaud

Artigo aceito pela revista *Experimental Parasitology* em Maio/2011.

Artigo 2 – *Leishmania spp*: IDENTIFICAÇÃO DE METABÓLITOS DERIVADOS DA GLICOSE ATRAVÉS DA RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR POR ^{13}C e ^1H

Tatiane L. Costa, Aline L. Oliveira, Luciano M. Lião, Fátima Ribeiro-Dias, Milton A. P. Oliveira,

Marina C. Vinaud, José C. B. Bezerra

Artigo será submetido à revista *Experimental Parasitology*

ARTIGO 2

***Leishmania spp.*: IDENTIFICAÇÃO DE METABÓLITOS DERIVADOS DA GLICOSE ATRAVÉS DA RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR POR ^{13}C e ^1H**

Tatiane L. da Costa^a, Aline L. Oliveira^b, Luciano M. Lião^b, Fátima Ribeiro-Dias^c, Milton A. P. Oliveira^d, Marina C. Vinaud^a, José C.B. Bezerra^a

^a Laboratório de Estudos da Relação Parasito Hospedeiro/ LAERPH/IPTSP/UFG,

^b Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear/IQ/UFG

^c Laboratório de Imunobiologia das Leishmanioses/IPTSP/UFG

^d Laboratório de Citocinas/IPTSP/UFG

Artigo formatado de acordo com as normas da revista *Experimental Parasitology*

RESUMO

As formas promastigotas de *Leishmania spp* degradam carboidratos pela via glicolítica e a primeira reação ocorre dentro do glicossomo. Utilizando como fonte de energia a glicose e ainda, aminoácidos e lipídeos presentes no meio de cultura, os produtos excretados/secretados (E/S) podem ser indicadores do perfil metabólico energético parasitário e serem importantes indicadores de distúrbios da relação parasito-hospedeiro. A análise bioquímica do metabolismo de *Leishmania* através da RMN vem atualizar os estudos parasitológicos com técnicas adequadas à avaliação do perfil bioquímico na relação parasito-hospedeiro, levando ao melhor entendimento da maneira como esses organismos conseguem sobreviver em ambientes diversos como o trato digestório do hospedeiro invertebrado ou os tecidos do hospedeiro vertebrado. O presente trabalho utilizou as técnicas de ^{13}C e ^1H em solução e HR-MAS em células (pellet) RMN para a identificação *in vitro* de metabólitos excretados/secretados por formas promastigotas em duas diferentes espécies de *Leishmania spp*, sendo três amostras de *L. (V.) braziliensis* e uma de *L. (L.) amazonensis*, demonstrando possíveis diferenças entre suas vias metabólicas para produção de energia. Foram observados os seguintes metabólitos E/S por promastigotas de *Leishmania* através da RMN ^{13}C e ^1H : alanina, lactato, acetato, piruvato, succinato, glicerol, uréia, CO_2 , oxalato, valina, glutamina e arginina. Qualitativamente houve diferença de metabólitos E/S no pellet e no sobrenadante entre diferentes cepas e isolados. Os resultados sugerem que formas promastigotas de *Leishmania* utilizam diferentes vias bioquímicas para a obtenção de energia necessária à sua sobrevivência. O método de RMN foi utilizado como mais uma ferramenta nos estudos bioquímicos parasitários, sendo a HR-MAS ineditamente utilizada nos estudos bioquímicos parasitários. A bioquímica parasitária faz parte da metabolômica, constitui mais uma ferramenta, além da biologia molecular, para a identificação das espécies, aponta possíveis adaptações parasitárias ao meio em que vive. Pode indicar vias metabólicas para a atuação de fármacos, sendo a ressonância magnética nuclear uma ferramenta para a análise de fenômenos biológicos *in vivo* e *in vitro*.

Palavras-chave: *Leishmania spp*, bioquímica parasitária, Ressonância Magnética Nuclear, HR-MAS.

Abstract

Leishmania spp promastigotes degrade carbohydrates through the glycolytic pathway and its first reaction occurs inside the glycosome. They use as energy source glucose, aminoacids and lipids which are found in the culture media and result in excreted/secreted (E/S) products that can indicate the energetic metabolic profile of the parasite and may betoken disturbs in the host-parasite relationship. The biochemical analysis of *Leishmania* metabolism through NMR is an update of the parasitological studies which brings new adequate techiques to the evaluation of the biochemical profile of the host-parasite relationship. This studies lead to a better understanding of the way as to how this organisms can survive in such diverse environment such as the digestory tract of the invertebrate host or the vertebrate host tissues. This study used the ^{13}C and ^1H NMR in solution and HR-MAS NMR to the *in vitro* identification of E/S metabolites from promastigotes forms from four species of *Leishmania spp* and demonstrating differences between their energy production metabolic pathways. It was possible to observe the following E/S metabolites from *Leishmania* promastigotes through ^{13}C and ^1H NMR: alanine, lactate, acetate, pyruvate, succinate, glycerol, urea, CO_2 , oxalate, valine, glutamine and arginine. There was a qualitative difference between the excretion/secretion of metabolites from the pellet and overnatant and between species. These results sugest that *Leishmania* promastigotes use different biochemical pathways to obtain the necessary energy to survive. The NMR method was used as a tool to parasitary biochemical studies and the HR-MAS technique was never used before with this goal. The parasitary biochemistry is part of the metabolomic and constitute another tool added to the molecular biology to the species identification and points to possible adaptations of the parasite inserted in its environment. It can also indicate metabolic pathways of drugs mode of action and the NMR as an important tool to the analysis of *in vivo* and *in vitro* biological phenomena.

Key words: *Leishmania spp*, biochemistry parasitary, Nuclear Magnetic Resonance, HR-MAS.

1. INTRODUÇÃO

Os protozoários dependem de fontes energéticas para a manutenção de sua organização, crescimento e reprodução. Possuem como fonte de reserva o glicogênio e a principal fonte de energia é a glicose. Esta molécula é catabolizada aos poucos e a partir dela são sintetizados outros compostos orgânicos (Bringaud et al., 2006). As formas promastigotas de *Leishmania sp* catabolizam carboidratos pela via glicolítica que se inicia dentro do glicossomo, organela única presente na ordem Kinetoplastida (Tielens and Hellemond, 2009). Utilizando como fonte de energia a glicose e ainda, aminoácidos e lipídeos presentes no meio de cultura, os produtos excretados/secretados (E/S), como por exemplos os ácidos orgânicos, podem ser indicadores do perfil metabólico energético desses parasitos e são indicadores de distúrbios biológicos em diversos outros organismos (Scriver et al., 2001). No caso de *Leishmania spp* essas vias bioquímicas são essenciais para a espécie e parecem desempenhar um importante papel na fisiopatologia da relação parasito-hospedeiro.

Nas formas promastigotas, parte dos produtos finais oxidados são resultados do metabolismo aeróbio (van Hellemond et al., 1997). Estudos *in vitro* demonstraram a produção de CO₂, succinato, acetato, piruvato, lactato e alanina como produtos E/S por diferentes cepas de *Leishmania* através da ressonância magnética nuclear (Darling et al., 1987; Singha et al., 1996) que além da identificação do perfil metabólico dos parasitos pode-se até mesmo realizar a diferenciação de espécies ou cepas existentes (Singha et al., 1996). A bioquímica parasitária faz parte da metabolômica, constitui mais uma ferramenta, além da biologia molecular, para a identificação das espécies, aponta possíveis adaptações parasitárias ao meio em que vive e, pode indicar vias metabólicas essenciais e específicas na atuação de fármacos (Singha et al., 1996).

A ressonância magnética oferece novos meios para a análise de fenômenos biológicos *in vivo*, e espectros utilizando ^1H , ^{13}C e ^{31}P têm sido empregados em estudos metabólicos de células intactas, tecidos, órgãos, bem como em organismos, sendo uma importante ferramenta com alto potencial que pode ser aplicada na parasitologia (Thompson, 1991). Chapman et al. (1985) descreveram a utilização de ^{13}C para estudos de *Trichomonas vaginalis*, Nishina et al. (1994) ^1H RMN em *Schistosoma japonicum*, Thompson et al. (1994) com ^{31}P e ^1H RMN em *Biomphalaria glabrata* entre outros organismos. Suas vantagens são inerentes por não ser um método destrutivo e nem mesmo invasivo, podendo dar informações importantes da visão global do metabolismo celular (O'Sullivan et al., 1989).

Para a análise bidimensional dos experimentos tem-se utilizado a espectroscopia de correlação ^1H - ^1H (TOCSY), ^1H - ^{13}C (HSQC) e ^1H - ^{13}C (HMBC), além da utilização da técnica de HR-MAS que é uma técnica sensível de alta resolução e um método não destrutivo utilizado para caracterizar compostos em estado semi-sólido (Shapiro and Gounarides 2001).

A análise bioquímica do metabolismo de *Leishmania* através da RMN complementa os estudos parasitológicos com técnicas adequadas à avaliação do perfil bioquímico na relação parasito-hospedeiro levando ao melhor entendimento da maneira como esses organismos conseguem sobreviver em ambientes diversos como o trato digestório do hospedeiro invertebrado ou os tecidos do hospedeiro vertebrado.

Neste trabalho foi utilizada a técnica de ^{13}C e ^1H - RMN em solução para a identificação *in vitro* de metabólitos excretados/secretados e a técnica de HR-MAS para a análise celular (pellet) em formas promastigotas de duas cepas e dois isolados de *Leishmania spp* demonstrando possíveis diferenças entre suas vias metabólicas para produção de energia.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Cultura de formas promastigotas de *Leishmania (Viannia) braziliensis* e *Leishmania (Leishmania) amazonensis*

As formas promastigotas de *Leishmania (Viannia) braziliensis* (MHOM/BR/1975/M2903, MHOM/BR/2006/EF6 e MHOM/BR/2005/WSS5) e *Leishmania (Leishmania) amazonensis* (IFLA/BR/1967/PH8) foram cedidas pelo Banco imunobiológico das leishmanioses (Leishbank) da região Centro-Oeste/Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás. Os parasitos foram cultivados em meio líquido Grace's (Grace's Insect Medium – Gibco®) acrescido de 20% soro fetal bovino estéril, L-glutamina à 2 mM/mL e dos antibióticos: penicilina à 100 µg/mL e estreptomicina 100 µg/mL. Os parasitos foram mantidos em placas de cultura com 24 poços em estufa a 26°C. As curvas de crescimento tiveram início com $1,0 \times 10^6$ *Leishmania*/mL. Foi realizada uma expansão de parasitos em 25 mL de meio de cultura grace's mantidos em garrafas de cultura (Corning® and Costar® 75mL) sob as mesmas condições supracitadas. As formas promastigotas de fase estacionária de crescimento (6º dia) foram utilizadas para experimentação da ressonância magnética nuclear (RMN).

2.2. Ensaio utilizando U-¹³C Glicose

Os parasitos da fase estacionária foram coletados por centrifugação a 500 g por 15 minutos a temperatura ambiente, evitando assim a lise celular. Formas promastigotas foram lavadas três vezes em solução tampão (PBS) contendo 1 mM de glicose marcada nos seis carbonos (U-¹³C-glicose), como descrito por Rainey and MacKenzie (1991). Em tubos plásticos 2×10^8 promastigotas foram ressuspensas em 1 mL de PBS contendo 5 mM de U-¹³C-glicose e mantidas em estufa à 26°C por cinco horas em aerobiose. A integridade das

formas promastigotas foi visualizada por observação microscópica. Em seguida, o metabolismo foi paralisado em banho de gelo por cinco minutos e centrifugado a 500 g por 10 minutos para a obtenção do sobrenadante. Este foi coletado para análise dos metabólitos excretados/secretados e, após a adição de D₂O (10%v/v), 0,5 mL foi utilizado para análises de RMN de ¹³C. O sedimento formado pelo acúmulo de promastigotas intactas obtidas após centrifugação foi utilizado para análise do metabolismo através da RMN de ¹H utilizando a técnica de HR-MAS.

2.3. Ressonância Magnética Nuclear

Os ensaios de RMN foram realizados no Instituto de Química/UFG onde experimentos mono e bidimensionais foram obtidos à 25°C em espectrômetro Bruker Avance III 500 (operando a 500,13 MHz para ¹H e 125,76 MHz para ¹³C). Para a análise dos sobrenadantes, foi utilizada uma sonda de detecção direta de 5 mm e seqüência de pulso para a pré-saturação do sinal da água. Para a aquisição dos dados, foi adicionada 10% (v/v) de solução de trimetilsililpropionato de sódio (TMSP-2,2,3,3-*d*₄) em D₂O (0,1% m/v) a 600 µL da amostras do sobrenadante. Para a análise dos parasitos foi utilizada a sonda de alta resolução com giro no ângulo mágico (HR-MAS) de 4 mm. O material sem nenhum pré-tratamento foi acondicionado em rotores de zircônio de 50 µL, seguidos pela adição de uma solução de D₂O/TMSP-2,2,3,3-*d*₄.

Tipicamente, os experimentos monodimensionais de ¹³C foram realizados utilizando-se a seqüência de pulso com desacoplamento de ¹H. Os espectros foram obtidos com um acúmulo total de 20.000,00 FIDs e 32 K pontos digitalizados, janela espectral de 30.000,00 Hz, e tempo de aquisição de 0,5 s. Espectros monodimensionais de ¹H também foram

obtidos com um acúmulo total de 64 FIDs e 32 K pontos digitalizados, janela espectral de 8.000,00 Hz, e tempo de aquisição de 2,0 s.

Os espectros adquiridos foram referenciados pelo TMSP-2,2,3,3- d_4 . A atribuição dos sinais de metabólitos dos espectros de ^{13}C e ^1H foi realizada com base em valores de deslocamento químico e constante de acoplamento já publicados por Darling et al. (1987), Rainey and Mackenzie (1991), Castilla et al. (1995), Singha et al. (1996), Gupta et al. (1999). Os dados encontrados no presente estudo foram confirmados através de espectros bidimensionais HSQC, HMBC e TOCSY.

Os padrões de ácidos orgânicos à 25 mM (piruvato, lactato, citrato, α -cetogluturato, succinato, fumarato, malato, oxaloacetato, oxalato, acetato, β -hidroxibutirato), dos aminoácidos (glutamina e valina) e a U- ^{13}C -glicose à 5 mM foram utilizados como controles e submetidos à análise por RMN. Todos os experimentos foram realizados em três replicatas, obtendo-se sempre os mesmos perfis de metabólitos E/S.

3. RESULTADOS

Os metabólitos E/S detectados no sobrenadante das amostras analisadas por ^{13}C foram: alanina, lactato, acetato, piruvato, succinato, glicerol, CO_2 , uréia e aminoácidos. Como exceção, pode se observar que o isolado de *L. (V.) braziliensis* EFSF6, além dos metabólitos supracitados apresentou a valina e glutamina e não foi detectado a uréia e o CO_2 , e na cepa de *L. (L.) amazonensis* PH8 não foi detectado o lactato (Figura 1).

Os metabólitos E/S detectados no sobrenadante das amostras analisadas por ^1H foram: alanina, lactato, acetato, oxalato, piruvato, succinato, e aminoácidos. Como exceção, pode se observar que somente na cepa *L. (L.) amazonensis* PH8 e no isolado de *L. (V.)*

braziliensis WSS5 foram detectados sinais compatíveis com o metabólito oxalato e grupos de aminoácidos compatíveis com a glutamina e prolina. O piruvato e succinato foram detectados apenas na cepa M2903 e no isolado EFSF6 de *L. (V.) braziliensis* (Figura 2).

Os metabólitos detectados nos parasitos analisados por ^{13}C foram: alanina, succinato, glicerol, CO_2 e uréia. Sendo que, somente no isolado de *L. (V.) braziliensis* EFSF6 foi detectado succinato. E apenas na cepa M2903 e no isolado EFSF6 de *L.(V.) braziliensis* apresentaram o glicerol. A uréia foi visualizada na cepa de *L. (L.) amazonensis* PH8 e no isolado de *L. (V.) braziliensis* WSS5 e o CO_2 apenas na cepa de *L. (L.) amazonensis* PH8 (Figura 3).

Os metabólitos detectados nos parasitos de todas as amostras analisadas por ^1H foram: alanina, lactato, oxalato, aminoácidos e ácidos graxos. Sendo que o oxalato e os aminoácidos glutamina e prolina só foram detectados na cepa de *L. (L.) amazonensis* PH8 e no isolado de *L. (V.) braziliensis* WSS5. O isolado de *L. (V.) braziliensis* EFSF6 não apresentou grupos de aminoácidos e ácidos graxos no deslocamento químico 1,0 e 1,3 ppm (Figura 4).

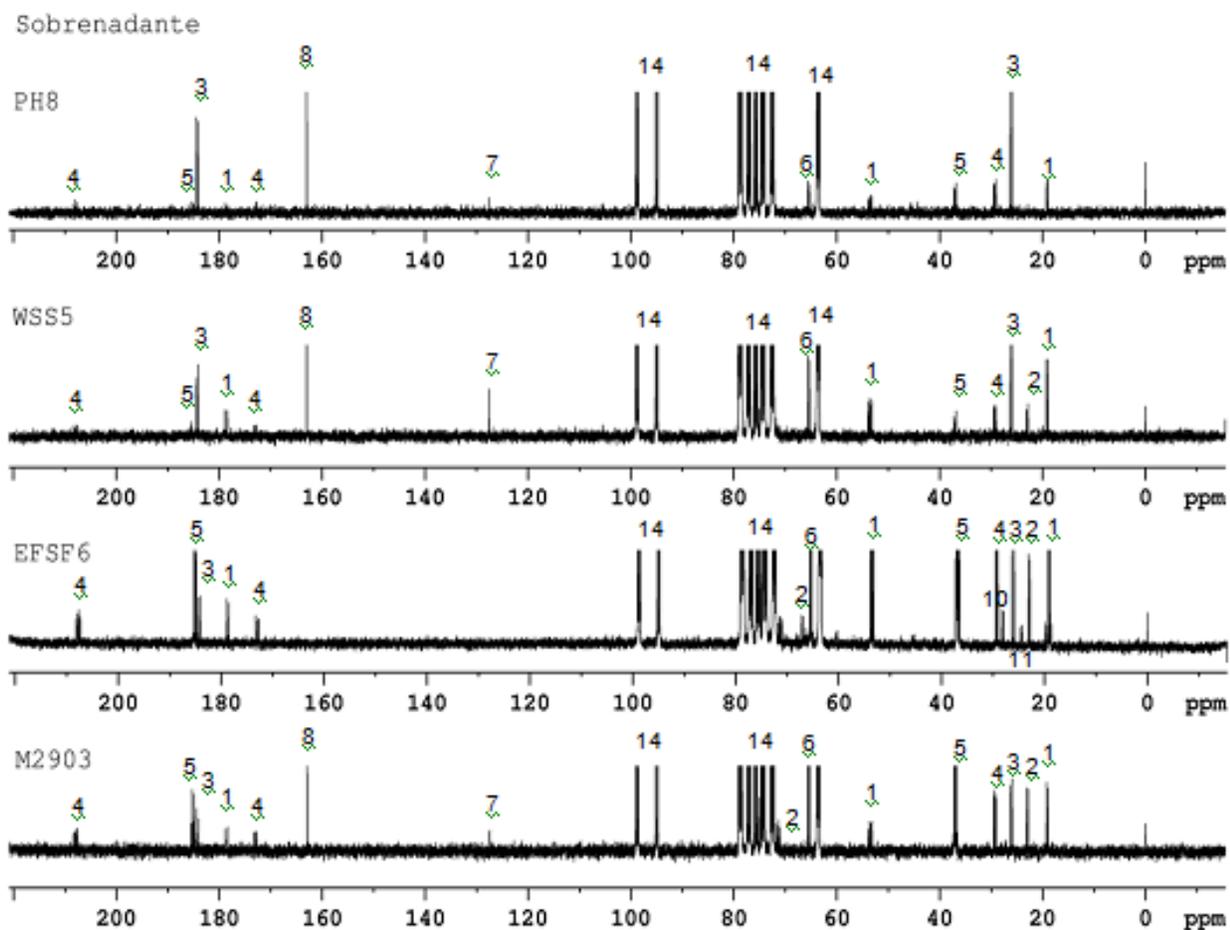


Figura. 1. Os espectros representam os metabólitos excretados/secretados no sobrenadante por formas promastigotas de *Leishmania* por ^{13}C RMN. Os números referentes aos metabólitos estão listados na tabela 1.

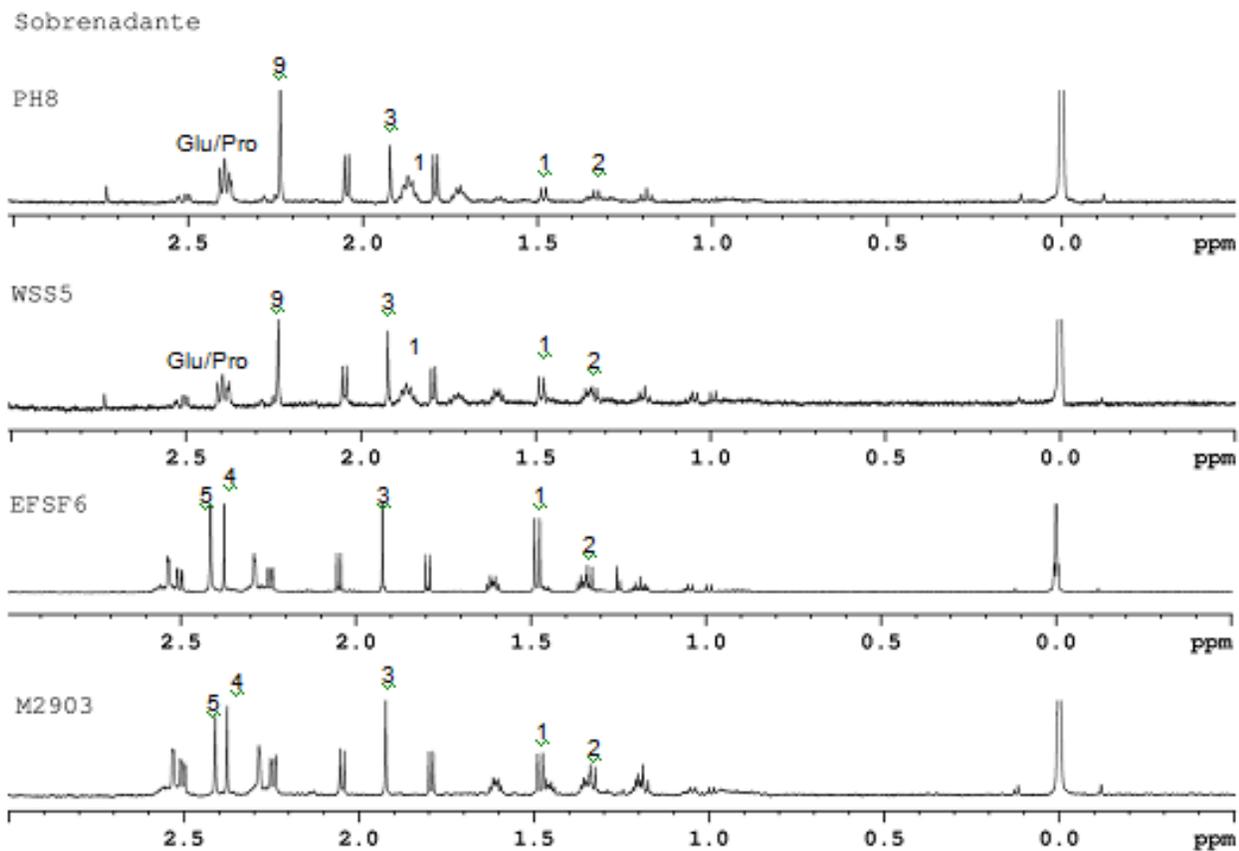


Figura 2. Os espectros representam os metabólitos excretados/secretados no sobrenadante por formas promastigotas de *Leishmania* por ¹H RMN. Glutamina/Prolina: GLU/PRO. Os números referentes aos metabólitos estão listados na tabela 1.

Parasitos

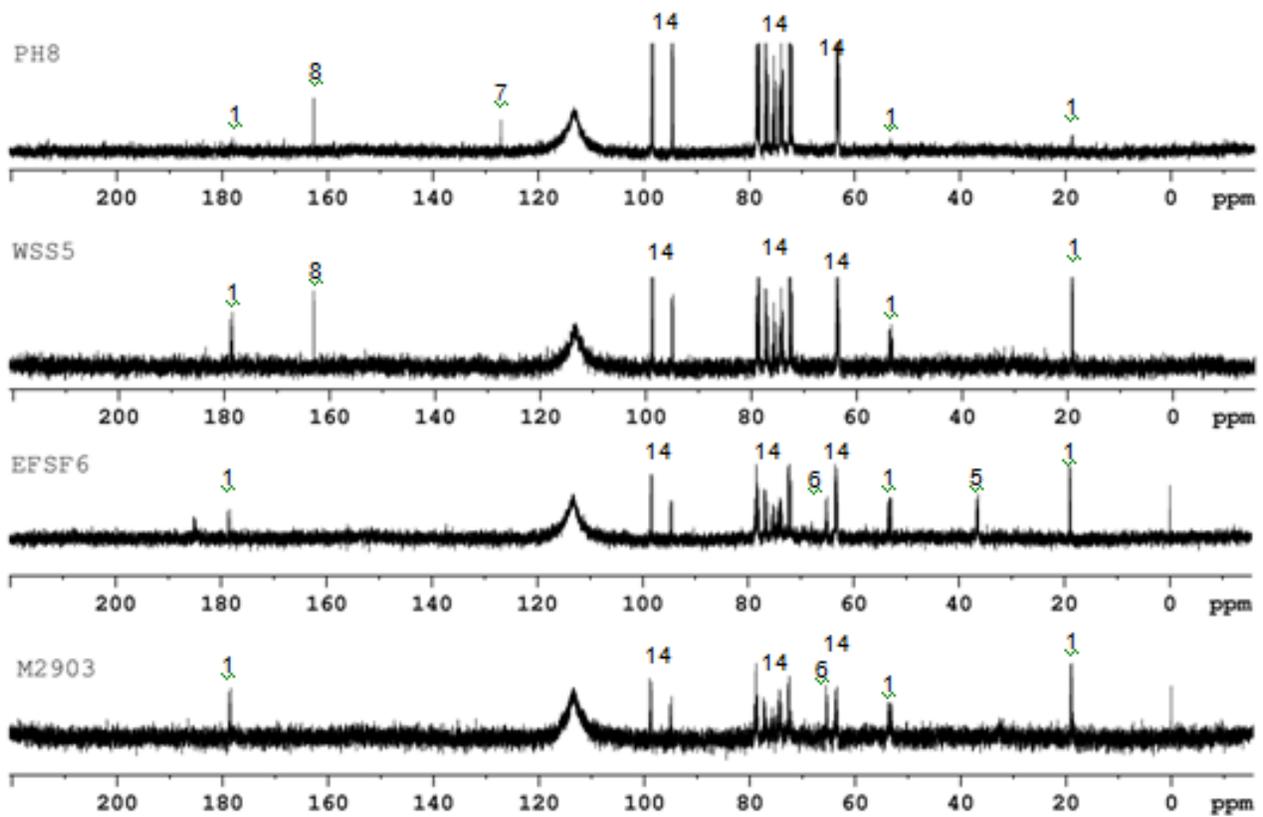


Figura 3. Os espectros representam os metabólitos encontrados nas formas promastigotas de *Leishmania* por ^{13}C RMN. Os números referentes aos metabólitos estão listados na tabela 1.

Parasitos

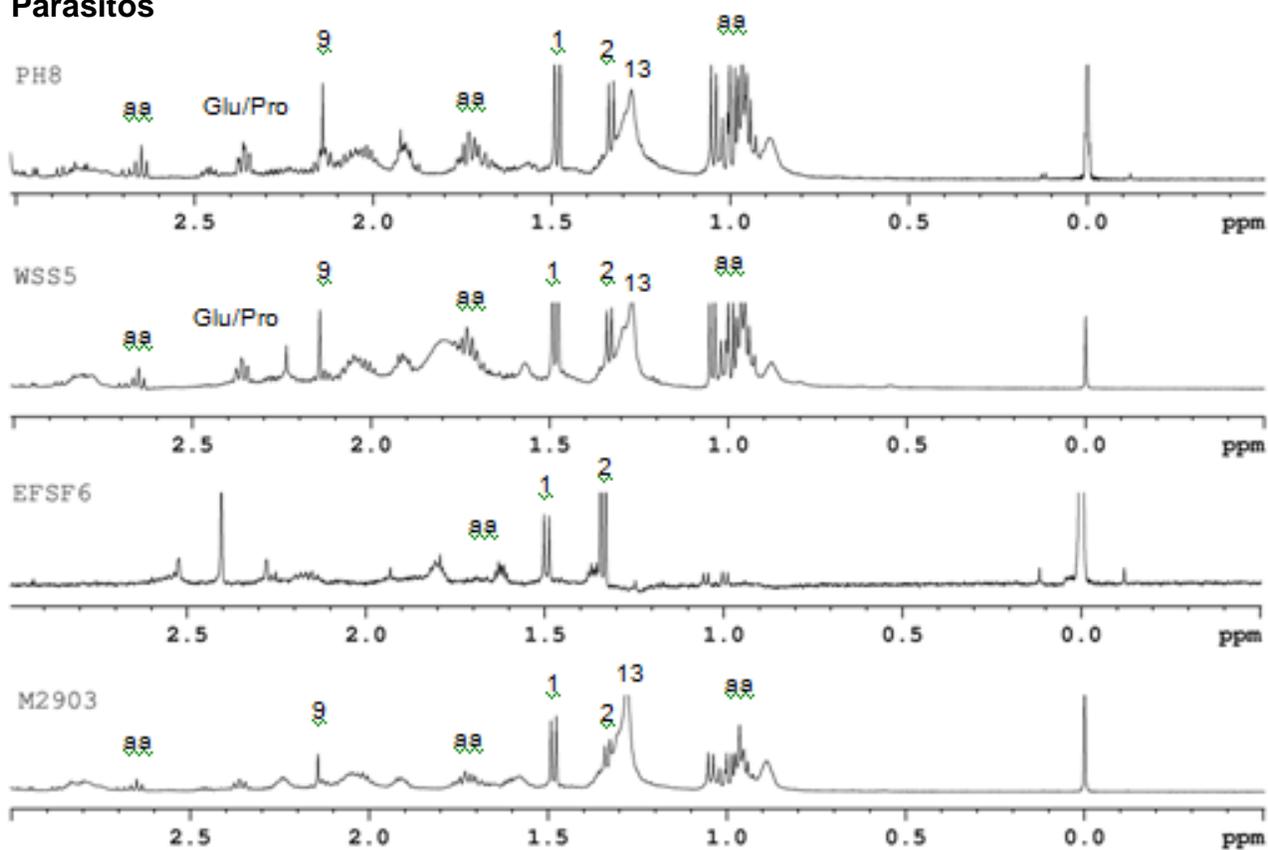


Figura 4. Os espectros representam os metabólitos encontrados nas formas promastigotas de *Leishmania* por ¹H RMN. Glutamina/Prolina: GLU/PRO. Aminoácidos: aa. Os números referentes aos metabólitos estão listados na tabela 1.

Tabela 1. Sinais dos metabólitos encontrados nas amostras de sobrenadante e nos parasitos de *Leishmania spp* através de RMN ^{13}C e ^1H .

Nr. do metabólito nos				
espectros	Metabólitos	Carbono	^{13}C ppm/ J (Hz)	^1H (ppm)
1	Alanina	1	178,7 (d; 52,7)	
		2	53,5 (dd; 52,7, 35)	3,79
		3	19,0 (d, 35)	1,47
2	Lactato	2	71,3 (dd; 36; 55)	
		3	23 (d; 36)	1,33
3	Acetato	1	184,3 (d, 52,4)	1,9
		2	26,1 (d, 52,4)	
4	Piruvato	1	173,3 (dd; 62, 13)	
		2	208,2 (dd; 62, 40)	
		3	29,3 (dd; 40, 13)	2,38
5	Succinato	1	185,0 (t, 25)	
		2	36,7 (m)	2,42
6	Glicerol	1,3	65,4 (d, 41)	
		2	75 (d, 41)	
7	CO ₂		127,0 (s)	
8	Uréia		163,0 (s)	
9	Oxalato			2,23
10	Valina		28,0 (d; 44)	
11	Glutamina		22,0 (d, 36,8)	2,1
				2,4
12	Arginina			1,87
13	Ácidos Graxos			1,4
14	Glicose não			
	metabolizada		60 - 100	

4. DISCUSSÃO

Dos resultados obtidos foi possível observar as diferenças qualitativas nos metabólitos E/S pelas cepas e isolados de *Leishmania* spp. Fato observado pela detecção de metabólitos derivados da glicólise, como o piruvato, nas amostras analisadas. É importante ressaltar que os produtos do metabolismo intracelular, por exemplo, o oxalato, foi observado nos parasitos sem nenhum tratamento pré-existente na cepa de *L. (L.) amazonensis* PH8 e no isolado de *L. (V.) braziliensis* WSS5

Pode-ser observar os seguintes metabólitos E/S por formas promastigotas de *Leishmania* através da RMN ^{13}C e ^1H : alanina, lactato, acetato, piruvato, succinato, glicerol, uréia, CO_2 , oxalato, valina, glutamina e arginina. Foi possível verificar que há diferenças no perfil metabólico entre diferentes cepas e isolados como demonstrado nos resultados apresentados neste trabalho. Darling et al. (1987) em formas promastigotas de *L. braziliensis panamensis* utilizando RMN ^{13}C detectaram em aerobiose: alanina, lactato, acetato, piruvato, succinato e glicerol. Rainey and MacKenzie (1991) utilizando ^{13}C em formas promastigotas de *L. pifanoi* detectaram a presença de alanina, acetato, citrato, malato e succinato no sobrenadante. Já nos parasitos tratados com ácido perclórico, além dos metabólitos supracitados verificaram a presença de glicerol e aminoácidos. Singha et al. (1996) em formas promastigotas de *L. donovani*, utilizando a extração dos parasitos com ácido perclórico detectaram através ^1H : valina, lactato, alanina, arginina, acetato, acetoacetato, succinato, α -glicerofosforilcolina, glicina, S-adenosil metionina, inosina monofosfato, tirosina, histidina, fenilalanina, hipurato, adenosina e etanol. Corroborando com este estudo, pode-se observar a presença do lactato em *L. donovani* (Singha et al., 1996) e *L. major* (Greig et al., 2009).

O lactato foi detectado por ^{13}C no sobrenadante de todas as amostras analisadas, com exceção da cepa PH8 de *L. (L.) amazonensis*, indicando uma maior atividade fosforilativa da cepa PH8 de *L. (L.) amazonensis*. As formas promastigotas de *Leishmania* contêm o ciclo do glioxalato como uma via de desintoxicação, que protege a célula contra os efeitos do metilglioxal, um componente mutagênico e citotóxico que é convertido em lactato, e este metabólito é então utilizado na gliconeogênese (Bringaud et al., 2006; Saunders et al., 2010). Rainey and MacKenzie (1991) não detectaram o lactato em *L. pifanoi*. Costa et al. (2011) por HPLC detectaram o lactato na cepa M2903 e em três isolados de *L. (V.) braziliensis*.

Alguns aminoácidos como a valina, glutamina e arginina foram encontrados através da RMN ^{13}C tanto nos parasitos quanto no sobrenadante do isolado de *L. (V.) braziliensis* EFSF6. O piruvato é produto da glicólise, sendo importado para a mitocôndria e convertido em acetil-CoA. A primeira reação do ciclo do ácido tricarboxílico é a condensação do acetil-CoA com o oxaloacetato para formar o citrato e este pode ser utilizado no catabolismo de aminoácidos ou na biosíntese de ácidos graxos (Bringaud et al., 2006; Saunders et al., 2010), razão da presença deste aminoácidos no presente estudo.

A alanina foi detectada em todas as cepas e isolados deste estudo, já a uréia só não foi detectada no isolado EFSF6. A alanina é produto do catabolismo dos aminoácidos, é uma fonte de nitrogênio e utilizada na síntese da uréia. *Leishmania* contem várias enzimas do ciclo da uréia, embora o ciclo esteja descrito como ausente em outros tripanosomatídeos como *Trypanosoma brucei* e *Trypanosoma cruzi*. As enzimas argininosuccinato sintase e arginase foram descritas somente em *L. major* e indicam que arginina, ornitina e uréia podem ser formadas somente por *Leishmania* e explica a causa da excreção de uréia por *Leishmania* (Opperdoes and Coombs, 2007).

A E/S do succinato no sobrenadante apresentou um padrão semelhante entre a cepa M2903 e o isolado EFSF6 de *L.(V.) braziliensis* através do ^1H e entre a cepa PH8 de *L.(L.) amazonensis* e o isolado WSS5 *L. (V.) braziliensis* pelo ^{13}C . No pellet houve a detecção deste metabólito, apenas no isolado *L. (V.) braziliensis* EFSF6 por ^{13}C , sendo um dos principais produtos E/S nas amostras analisadas. Costa et al. (2011) por HPLC detectou o succinato como o segundo metabólito E/S em grandes concentrações em diferentes cepas e isolados de *L. braziliensis*. Darling et al. (1987) utilizando RMN ^{13}C em amostras de *L. braziliensis panamensis* verificou que o succinato foi o metabólito E/S em maiores concentrações, sob condições aeróbias. O succinato é rapidamente consumido do meio de cultura por ser um importante doador de elétrons na cadeia respiratória mitocondrial. É resultado da carboxilação do fosfoenolpiruvato ou do piruvato em oxaloacetato que é convertido a succinato via malato e fumarato por uma via alternativa do ciclo do ácido tricarbóxico (Rainey and MacKenzie, 1991). O succinato pode ainda ser formado pela importação do fosfoenolpiruvato para o glicossomo onde é fermentado (Saunders et al., 2010).

Por ^{13}C , o piruvato foi detectado no sobrenadante de todas as amostras analisadas e por ^1H foi detectado somente no sobrenadante da cepa M2903 e do isolado EFSF6 de *L. (V.) braziliensis*. Darling et al. (1987) através da RMN do ^{13}C relataram a presença do piruvato E/S por promastigotas de *L. braziliensis panamensis*. Costa et al. (2011) por HPLC não detectaram a presença do piruvato em formas promastigotas *L.(V.) braziliensis*. O piruvato é o produto final da via glicolítica que termina no citosol. Pode ser transportado para dentro da mitocôndria, ser oxidado e formar ATP, pois é um metabólito muito utilizado na biosíntese dos compostos intermediários do ciclo do ácido tricarbóxico. Em um ambiente rico em

glicose, como nos experimentos realizados neste estudo, a quantidade de ATP formada via glicossomo parece ser suficiente para a manutenção e sobrevivência do parasito, sendo este o motivo do piruvato ter sido encontrado no sobrenadante das amostras analisadas. Se o uso da cadeia transportadora de elétrons é inibida, como por exemplo, na falta de oxigênio, o piruvato não é transportado para dentro da mitocôndria e no citosol é reduzido a lactato para manter o balanço redox. Uma pequena parte do piruvato também pode ser transaminado em alanina, sendo esta excretada (Blum, 1993).

O acetato foi detectado no sobrenadante de todas as amostras analisadas por ^1H e ^{13}C , corroborando com dados da literatura (Darling et al., 1987; Rainey and MacKenzie, 1991; Castilla et al., 1995; Singha et al., 1996). O acetato é formado intracelularmente, em meio de cultura rico em glicose, sendo produto de degradação da glicose ^{13}C . Em tripanosomatídeos, o acetato pode ser o produto final da degradação mitocondrial de aminoácidos (como a treonina) resultando na formação do piruvato ou acetil-CoA (Bringaud et al., 2006; Saunders et al., 2010). O acetato é um excelente doador de acetil-CoA que pode ser utilizado na síntese de ácidos graxos (Rivière et al., 2009). Coustou et al. (2008) descreveram em *T. brucei* que o β -hidroxibutirato é considerado um produto do metabolismo do acetil-CoA, onde a L-prolina, que é derivada do acetil-CoA, é preferencialmente convertida em β -hidroxibutirato e acetato através do ciclo do ácido tricarboxílico. Bringaud et al. (2006) ressaltam que todas as formas adaptativas de tripanosomatídeos analisadas (exceto as formas sanguíneas do *T. brucei*) produzem acetato a partir da glicose.

O CO_2 esteve presente em todos os sobrenadantes das amostras analisadas neste estudo pelo ^{13}C , com exceção do isolado EFSF6 de *L. (V.) braziliensis*. Sugere que o acetil-CoA, produzido a partir do metabolismo da glicose, é convertido em CO_2 através do ciclo do

ácido tricarbóxico na cepa M2903 e no isolado WSS5 de *L. (V.) braziliensis* e na cepa PH8 de *L. (L.) amazonensis*. Já o isolado EFSF6 de *L. (V.) braziliensis* apresenta uma menor atividade do ciclo do ácido tricarbóxico.

No presente estudo, o glicerol foi detectado através do ^{13}C no sobrenadante de todas as amostras analisadas e no pellet somente na cepa M2903 e no isolado EFSF6 de *L. (V.) braziliensis*. Foi relatada a presença de glicerol em *T. brucei gambiense*, *Trichomonas vaginalis* e *L. braziliensis panamensis* em condições de anaerobiose (Darling et al., 1987) e em *L. pifanoi* (Rainey and Mackenzie, 1991). O glicerol é formado no glicosomo a partir da glicólise, sendo re-oxidado na membrana mitocondrial em dihidroxiacetona-fosfato que é convertido em metilglicoxal e este em lactato, sendo utilizado na gliconeogênese (Saunders et al., 2010).

O catabolismo da glicose em *Leishmania* apresenta alguns aspectos diferenciais quando comparada à dos mamíferos hospedeiros, como por exemplo, a via glicolítica em tripanosomatídeos que ocorre dentro do glicosomo, e a via do metilglicoxal, como uma via de desintoxicação. Essas diferentes características metabólicas em *Leishmania* podem demonstrar exemplos de adaptação genética e especialização, surgindo a necessidade de mais estudos bioquímicos, especialmente em formas amastigotas.

Através deste estudo foi possível observar que há diferenças na E/S de metabólitos entre diferentes cepas e isolados de *Leishmania spp* para a obtenção de energia necessária à sua sobrevivência. Mudanças bioquímicas no metabolismo podem indicar possíveis adaptações do parasito às diferentes condições ambientais e fisiológicas durante o ciclo de vida, além de estabelecer diferenças metabólicas na relação parasito-hospedeiro.

Os estudos realizados através da ^1H e ^{13}C RMN possibilitaram a identificação de metabólitos E/S por duas diferentes cepas de *Leishmania sp* e dois isolados de *L. braziliensis*. Utilizando uma técnica altamente sensível, não invasiva e sem destruição das células *in vitro* a HR-MAS, inédita para estudos parasitários, permitiu a confirmação na identificação das moléculas. Foram analisadas variáveis qualitativas, cujas taxas de concentrações não foram mensuráveis. Necessitando de estudos futuros através da RMN quantitativa ou da espectrometria de massa, que melhor definirá estatisticamente as diferenças e semelhanças existentes entre as cepas e isolados de *Leishmania spp*. Com a utilização da RMN pode-se ter uma visão global do perfil metabólico utilizado pelo parasito, permitindo a identificação de uma via metabólica comum à todas as espécies e esta ser utilizada na atuação de fármaco.

AGRADECIMENTOS: Os autores deste trabalho agradecem à CAPES (Coordenação de aperfeiçoamento de pessoal de nível superior) e à FAPEG (Fundação de amparo à pesquisa do estado de Goiás) pelo suporte financeiro destinado à realização deste estudo.

REFERÊNCIAS

- Blum, J.J., 1993. Intermediary metabolism of *Leishmania*. *Parasitol. Today* 9: 118–122.
- Bringaud, F., Rivière, L., Coustou, V., 2006. Energy metabolism of trypanosomatids: Adaptation to available carbon sources. *Molecular and Biochemical Parasitology* 149, 1-9.
- Castilla, J.J., Sanchez-Moreno, M., Mesa, C., Osuna, A., 1995. *Leishmania donovani*: *In vitro* culture and ^1H NMR characterization of amastigote-like forms. *Molecular and Cellular Biochemistry* 142, 89-97.
- Chapman, A., Linsteadt, J., Lloyd, D., Williams, J., 1985. ^{13}C -NMR reveals glycerol as an metabolite of the protozban parasite unexpected major. *The Journal of Federation of European Biochemical Societies* 191(2); 287-292.

- Costa, T.L., Ribeiro-Dias, F., Oliveira, M.A.P., Bezerra, J.C.B., Vinaud, M.C., 2011. Energetic metabolism of axenic promastigotes of *Leishmania (Viannia) braziliensis*. *Experimental Parasitology* 128 (4), 438-443.
- Coustou, V., Biran, M., Breton, M., Guegan, F., Rivière, L., Plazolles, N., Nolan, D., Barrett, M.P., Franconi, J.M., Bringaud, F., 2008. Glucose-induced remodeling of intermediary and energy metabolism in procyclic *Trypanosoma brucei*. *The Journal of Biological Chemistry* 283(24),16342-16354.
- Darling, T.N., Davis, D.G., London, R.E., Blum, J.J., 1987. Products of *Leishmania braziliensis* glucose catabolism: Release of D-lactate and, under anaerobic conditions, glycerol. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 84, 7129-7133.
- Greig, N., Wyllie, S., Patterson, S., Fairlamb, A.H., 2009. A comparative study of methylglyoxal metabolism in trypanosomatids. *The Journal of Federation of European Biochemical Societies* 276, 376-386.
- Gupta, N., Goyal, N., Singha, U.K., Bhakuni, V., Roy, R., Rastogi, A.K., 1999. Characterization of intracellular metabolites of axenic amastigotes of *Leishmania donovani* by ¹H NMR spectroscopy. *Acta Tropica* 73, 121-33.
- Nishima, M., Matsushita, K., Furuhashi, T., Hori, E., Takahashi, M., Kato, K., Matsuda, H 1994. Nuclear magnetic resonance (NMR) analysis on the serum lipids of rabbits infected with *Schistosoma japonicum*: Oxidative modifications of diene system in fatty chains. *Australian Society for Parasitology* 20, 417-419.
- Opperdoes, F.R., Coombs, G., 2007. Metabolism of *Leishmania*: proven and predicted. *Trends in Parasitology* 23(4), 149-158.
- O'Sullivan, W.J., Edwards, M.R., Norton, R.S., 1989. The application of nuclear magnetic resonance spectroscopy to parasite metabolism. *Parasitology Today* 5 (3), 79-82.
- Rainey, P.M., MacKenzie, N.E., 1991. A carbon-13 nuclear magnetic resonance analysis of the products of glucose metabolism in *Leishmania pifanoi* amastigotes and promastigotes. *Molecular and Biochemical Parasitology* 45, 307-316.

Rivière, L., Moreau, P., Allmann, S., Hahn, M., Biran, M., Plazolles, N., Franconi, J.M., Boshart, M., Bringaud, F., 2009. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 106(31), 12694-12699.

Saunders, E.C., Souza, D.P., Naderer, T., Sernee, M.F., Ralton, J.E., Doyle, M.A., Macrae, J.I., Chambers, J.L., Heng, J., Nahid, A., Likic, V.A., Mcconville, M.J., 2010. Central carbon metabolism of *Leishmania* parasites. Parasitology 137, 1-11.

Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D., 2001. The metabolic basis of inherited disease, McGraw-Hill, N.Y.

Shapiro, M.J., Gounarides, J.S., 2001. High resolution MAS-NMR in combinatorial chemistry. Biotechnology and bioengineering (combinatorial chemistry) 71; 130-148.

Singha, U.K., Bhakuni, V., Ali, V., Roy, R., 1996. *Leishmania donovani*: Metabolite mapping of promastigotes using proton nuclear magnetic resonance spectroscopy. Molecular and Cellular Biochemistry 162, 17-22.

Tielens, A.G.M., van Hellemond, J.J., 2009. Surprising variety in energy metabolism within Trypanosomatidae. Trends in Parasitology 25(10), 482-490.

Thompson, S.N., 1991. Applications of nuclear magnetic resonance in parasitology. The Journal of Parasitology 77(1), 1-20.

Thompson, S.N., Lee, R.W.K., Mejia-Scales, V., El-Din, SM., 1994. Biochemical and morphological pathology of the foot of the Shistosome vector *Biomphalaria glabrata* infected with *Schistosoma mansoni*. The Journal of Parasitology 107, 275-285.

van Hellemond, J.J., Tielens, A.G.M., 1997. Inhibition of the respiratory chain results in a reversible metabolic arrest in *Leishmania* promastigotes. Molecular and Biochemical Parasitology 85, 135-138.

van Hellemond, J.J., Van der Meer, P., Tielens, A.G.M., 1997. *Leishmania infantum* promastigotes have a poor capacity for anaerobic functioning and depend mainly on respiration for their energy generation. Parasitology 114, 351-360.

6. DISCUSSÃO GERAL

Dos resultados obtidos por cromatografia de alta eficiência (CLAE) foi possível observar que a fase estacionária (est) da cepa referência M2903 de *Leishmania (Viannia) braziliensis* apresentou uma maior concentração de glicose que na fase logarítmica (log), enquanto nos isolados IMG3 e RPL5 de *Leishmania (V.) braziliensis* houve diminuição da fase logarítmica para a estacionária. Durante os períodos de crescimento parasitário a glicose é catabolizada pela via glicolítica que ocorre no glicossomo dos tripanossomatídeos (Tielens & van Hellemond, 2009), alternativamente o excesso de hexoses pode ser exportado para o citosol e catabolizado em manógeno (Saunders et al. 2010). Os manógenos são sintetizados por alguns parasitos monoxênicos (*Crithidia* sp, *Herpetomonas* sp) e alguns heteroxênicos (*Leishmania* sp) e se acumulam extracelularmente durante a fase estacionária (Ralton et al. 2003). O aumento de glicose na cepa M2903 de *Leishmania (V.) braziliensis* pode ser ainda devido à quebra da sucrose presente no meio de cultura e pode estar relacionado com a baixa infectividade da cepa em camundongos, já que o excesso de glicose apresenta um efeito imunossupressor.

O lactato foi detectado em maiores concentrações na fase estacionária do que na logarítmica tanto na cepa M2903 de *Leishmania (V.) braziliensis* quanto nos isolados IMG3 e RPL5 de *Leishmania (V.) braziliensis*. Promastigotas de *L. (V.) braziliensis* produzem lactato que pode ser formado pela via do metilglioxalato, que é tóxico para a célula, sendo utilizado na gliconeogênese (Bringaud et al. 2006; Saunders et al. 2010). A fase logarítmica é replicativa e requer um alto gasto de energia, o que pode justificar um aumento na concentração de lactato que é fonte de ATP, já que em um meio de cultura rico em glicose a fosforilação oxidativa torna-se dispensável ao crescimento do parasito (Bringaud et al. 2010).

Greig et al. (2009) demonstrou em *L. major* uma maior atividade da enzima *D-lactato desidrogenase* pela via do metilglioxal e teve como produto excretado o D-lactato. O lactato também é produto do catabolismo da glicose em anaerobiose (Lehninger, 2007; Darling et al. 1987), assim estes dados demonstram que o parasito cataboliza glicose tanto em aerobiose quanto em anaerobiose.

O malato foi o ácido orgânico detectado em maiores concentrações no presente estudo, sendo a fase estacionária em concentrações maiores que a fase logarítima tanto na cepa M2903 de *Leishmania (V.) braziliensis* quanto nos isolados IMG3 e RPL5 de *Leishmania (V.) braziliensis*. Talvez a via do malato seja um eixo importante e crucial para a atuação de fármacos. Darling et al. (1987) e Gupta et al. (1999) utilizando ressonância magnética nuclear detectaram o succinato como o metabólito excretado em maior concentração, ao contrário dos dados apresentados pelo presente estudo. Os ácidos orgânicos são produtos da glicólise, que ocorre no glicossomo do parasito, onde o piruvato é o produto final da via glicolítica e pode ser importado para a mitocôndria e convertido em acetil-CoA. A primeira reação do ciclo do ácido cítrico é a condensação do acetil-CoA com o oxaloacetato para formar o citrato (Lehninger, 2007) e este pode ser utilizado no catabolismo de aminoácidos ou na biosíntese de ácidos graxos (Bringaud et al. 2006; Saunders et al. 2010). O citrato e malato são utilizados para a transferência do grupo acetil da matriz mitocondrial para formar o acetil-CoA citosólico, sendo convertido em oxaloacetato e malato e os tripanosomas não usam esta excreção do citrato/malato para a síntese de ácidos graxos (Bringaud et al. 2010), motivo da grande concentração de malato E/S encontrado neste estudo, pois promastigotas de *Leishmania* possuem enzimas glicossomal, mitocondrial e citosólica que reduzem o oxaloacetato a malato (Saunders et al. 2010).

O α -cetogluturato e fumarato foram detectados em maiores concentrações na fase logarítmica do na fase estacionária da cepa M2903 de *Leishmania (V.) braziliensis*. Nos isolados IMG3 e RPL5 de *Leishmania (V.) braziliensis* o fumarato foi detectado em maiores concentrações na fase estacionária do que na fase logarítmica. Observa-se a diferença metabólica entre a cepa M2903 e os isolados IMG3 e RPL5 de *Leishmania (V.) braziliensis*. Esses metabólitos são precursores para a biossíntese de vários aminoácidos, como por exemplos as purinas (Lehninger, 2007). Coustou et al. (2006) demonstrou em *T. brucei* que o fumarato, mesmo em baixas concentrações, é um acceptor de elétrons e está envolvido na síntese de ATP pela fosforilação oxidativa, sendo um metabólito intermediário essencial ao crescimento do parasito durante o ciclo no vetor. Neste estudo observou-se uma diferença na concentração de fumarato entre as cepas analisadas.

O succinato foi o segundo metabólito detectado em maiores concentrações, sendo que este metabólito apresentou maior concentração na fase estacionária do que na logarítmica na cepa M2903 *Leishmania (V.) braziliensis* e nos isolados IMG3 e RPL5 de *Leishmania (V.) braziliensis* analisadas, porém não houve diferença estatística entre os valores analisados. Darling et al. (1987) e Gupta et al. (1999) utilizando ressonância magnética nuclear verificaram que o succinato foi o produto metabólico da glicólise E/S em maiores concentrações em *L. braziliensis* e *L. donovani* respectivamente, sob condições aeróbias, ao contrário dos dados obtidos do presente estudo, onde o malato foi o metabólito E/S maiores concentrações, seguido do succinato. O succinato é rapidamente consumido do meio de cultura por ser um importante doador de elétrons na cadeia respiratória mitocondrial. É resultado da carboxilação do fosfoenolpiruvato ou do piruvato em oxaloacetato que é convertido a succinato via malato e fumarato por uma via alternativa do ciclo do ácido cítrico

(Rainey & MacKenzie, 1991). van Hellemond & Tielens (1997) demonstraram em promastigotas de *L. infantum* que o succinato é produzido principalmente pela via oxidativa e não pela redução do fumarato. Pode ser formado também pela importação do fosfoenolpiruvato para o glicossomo onde é fermentado a succinato (Saunders et al. 2010), sendo um dos principais produtos E/S do glicossomo.

O β -hidroxibutirato E/S apresentou-se em maiores concentrações na fase estacionária do que na fase logarítmica na cepa M2903 e no isolado IMG3 de *Leishmania (V.) braziliensis*. No isolado RPL5 de *Leishmania (V.) braziliensis* não houve a detecção de β -hidroxibutirato. As maiores concentrações de β -hidroxibutirato E/S na fase estacionária da cepa M2903 *Leishmania (V.) braziliensis* e do isolado IMG3 de *Leishmania (V.) braziliensis* indicam um alto consumo de acetil-CoA e acetato que, em vertebrados. O acetil-CoA e o acetato são precursores biossintéticos utilizados na síntese de ácidos graxos (Lehninger, 2007). Coustou et al. (2008) descreveu em *T. brucei* que β -hidroxibutirato é considerado um produto do metabolismo do acetil-CoA, onde a L-prolina, que é derivada do acetil-CoA, é preferencialmente convertida em β -hidroxibutirato e acetato através do ciclo do ácido tricarbóxico.

Assim, através da técnica de cromatografia de alta eficiência, foi possível observar que há diferenças metabólicas entre cepa e isolados de *Leishmania (V.) braziliensis*. Diferenças essas que podem estar diretamente correlacionadas com a metaciclo gênese e infectividade dos parasitos. Oliveira et al. (2010) relataram diferenças biológicas *in vitro* entre os isolados IMG3 e RPL5 como: tamanho da lesão, susceptibilidade e resistência em camundongos. Verificaram que apesar do isolado RPL5 de *Leishmania (V.) braziliensis* ter um menor crescimento parasitário, é um isolado mais agressivo do que a IMG3. Essas características

fenotípicas podem estar relacionadas com o perfil metabólico individual de cada cepa e isolado analisados neste estudo.

Mudanças bioquímicas no metabolismo podem indicar possíveis adaptações do parasito às diferentes condições ambientais e fisiológicas durante o ciclo de vida e essas características bioquímicas individuais poderão ser utilizadas como identificação para cada espécie, além de estabelecer diferenças metabólicas na relação parasito-hospedeiro.

Dos resultados obtidos através da ressonância magnética nuclear foi possível observar que há diferenças qualitativas nos metabólitos E/S pelas cepas e isolados de *Leishmania* spp. Fato observado pela detecção de metabólitos derivados da glicólise, como o piruvato, nas amostras analisadas, sendo que Costa et al. (2011) não detectaram este metabólito pela técnica de CLAE. É importante ressaltar que os produtos do metabolismo intracelular, por exemplo, o oxalato, foi observado nos parasitos sem nenhum tratamento pré-existente na cepa de *L. (L.) amazonensis* PH8 e no isolado de *L. (V.) braziliensis* WSS5

Pode-se observar os seguintes metabólitos E/S por formas promastigotas de *Leishmania* através da RMN ^{13}C e ^1H : alanina, lactato, acetato, piruvato, succinato, glicerol, uréia, CO_2 , oxalato, valina, glutamina e arginina. Foi possível verificar que há diferenças no perfil metabólico entre diferentes cepas e isolados como demonstrado nos resultados apresentados neste trabalho. Darling et al. (1987) em formas promastigotas de *L. braziliensis panamensis* utilizando RMN ^{13}C detectaram em aerobiose: alanina, lactato, acetato, piruvato, succinato e glicerol. Rainey & MacKenzie (1991) utilizando ^{13}C em formas promastigotas de *L. pifanoi* detectaram a presença de alanina, acetato, citrato, malato e succinato no sobrenadante. Já nos parasitos tratados com ácido perclórico, além dos metabólitos supracitados verificaram a presença de glicerol e aminoácidos. Singha et al. (1996) em

formas promastigotas de *L. donovani*, utilizando a extração dos parasitos com ácido perclórico detectaram através ^1H : valina, lactato, alanina, arginina, acetato, acetoacetato, succinato, α -glicerofosforilcolina, glicina, S-adenosil metionina, inosina monofosfato, tirosina, histidina, fenilalanina, hipurato, adenosina e etanol. Corroborando com este estudo, pode-se observar a presença do lactato em *L. donovani* (Singha et al. 1996) e *L. major* (Greig et al. 2009).

O lactato foi detectado por ^{13}C no sobrenadante de todas as amostras analisadas, com exceção da cepa PH8 de *L. (L.) amazonensis*, indicando uma maior atividade fosforilativa da cepa PH8 de *L. (L.) amazonensis*. As formas promastigotas de *Leishmania* contêm o ciclo do glioxalato como uma via de desintoxicação, que protege a célula contra os efeitos do metilglioxal, um componente mutagênico e citotóxico que é convertido em lactato, e este metabólito é então utilizado na gliconeogênese (Bringaud et al., 2006; Saunders et al. 2010). Rainey and MacKenzie (1991) não detectaram o lactato em *L. pifanoi*. Costa et al. (2011) por CLAE detectaram o lactato na cepa referência M2903 de *Leishmania (V.) braziliensis* e em dois recém-isolados de *L. (V.) braziliensis*, o IMG3 e RPL5.

Alguns aminoácidos como a valina, glutamina e arginina foram encontrados através da RMN ^{13}C tanto nos parasitos quanto no sobrenadante do isolado de *L. (V.) braziliensis* EFSF6. O piruvato é produto da glicólise, sendo importado para a mitocôndria e convertido em acetil-CoA. A primeira reação do ciclo do ácido tricarboxílico é a condensação do acetil-CoA com o oxaloacetato para formar o citrato e este pode ser utilizado no catabolismo de aminoácidos ou na biosíntese de ácidos graxos (Bringaud et al. 2006; Saunders et al. 2010), razão da presença deste aminoácidos no presente estudo. Costa et al. (2011) por CLAE não detectaram o piruvato na cepa referência M2903 de *Leishmania (V.) braziliensis* e em dois

recém-isolados de *L. (V.) braziliensis*, o IMG3 e RPL5. Como o piruvato é um metabólito muito utilizado para a síntese de outros compostos, não foi detectado pelo método de RMN e pela CLAE foi detectado por ser um método muito mais sensível que a RMN.

A alanina foi detectada em todas as cepas e isolados deste estudo. A uréia só não foi detectada no isolado EFSF6 de *Leishmania (V.) braziliensis*. A alanina é produto do catabolismo dos aminoácidos, é uma fonte de nitrogênio e utilizada na síntese da uréia. *Leishmania* contem várias enzimas do ciclo da uréia, embora o ciclo esteja descrito como ausente em outros tripanosomatídeos como *Trypanosoma brucei* e *Trypanosoma cruzi*. As enzimas argininosuccinato sintase e arginase foram descritas somente em *L. major* e indicam que arginina, ornitina e uréia podem ser formadas somente por *Leishmania* e explica a causa da excreção de uréia por *Leishmania* (Oppenheimer & Coombs, 2007).

A E/S do succinato no sobrenadante apresentou um padrão semelhante entre a cepa M2903 de *L.(V.) braziliensis* e o isolado EFSF6 de *L.(V.) braziliensis* através do ^1H e entre a cepa PH8 de *L.(L.) amazonensis* e o isolado WSS5 *L. (V.) braziliensis* pelo ^{13}C . No pellet houve a detecção do succinato, apenas no isolado *L. (V.) braziliensis* EFSF6 por ^{13}C , sendo um dos principais produtos E/S nas amostras analisadas. Costa et al. (2011) por CLAE detectaram o succinato como o segundo metabólito E/S em grandes concentrações em diferentes cepas e isolados de *L. (V.) braziliensis*. Darling et al. (1987) utilizando RMN ^{13}C em amostras de *L. braziliensis panamensis* verificou que o succinato foi o metabólito E/S em maiores concentrações, sob condições aeróbias. O succinato é rapidamente consumido do meio de cultura por ser um importante doador de elétrons na cadeia respiratória mitocondrial. É resultado da carboxilação do fosfoenolpiruvato ou do piruvato em oxaloacetato que é convertido a succinato via malato e fumarato por uma via alternativa do ciclo do ácido

tricarboxílico (Rainey & MacKenzie, 1991). O succinato pode ainda ser formado pela importação do fosfoenolpiruvato para o glicossomo onde é fermentado (Saunders et al. 2010).

Por ^{13}C , o piruvato foi detectado no sobrenadante de todas as amostras analisadas e por ^1H foi detectado somente no sobrenadante da cepa M2903 e do isolado EFSF6 de *L. (V.) braziliensis*. Darling et al. (1987) através da RMN do ^{13}C relataram a presença do piruvato E/S por promastigotas de *L. braziliensis panamensis*. Costa et al. (2011) por CLAE não detectaram a presença do piruvato em formas promastigotas *L.(V.) braziliensis*. O piruvato é o produto final da via glicolítica que termina no citosol. Pode ser transportado para dentro da mitocôndria, ser oxidado e formar ATP, pois é um metabólito muito utilizado na biosíntese dos compostos intermediários do ciclo do ácido tricarboxílico. Em um ambiente rico em glicose, como nos experimentos realizados neste estudo, a quantidade de ATP formada via glicossomo parece ser suficiente para a manutenção e sobrevivência do parasito, sendo este o motivo do piruvato ter sido encontrado no sobrenadante das amostras analisadas. Se o uso da cadeia transportadora de elétrons é inibida, como por exemplo, na falta de oxigênio, o piruvato não é transportado para dentro da mitocôndria e no citosol é reduzido a lactato para manter o balanço redox. Uma pequena parte do piruvato também pode ser transaminado em alanina, sendo esta excretada (Blum, 1993).

O acetato foi detectado no sobrenadante de todas as amostras analisadas por ^1H e ^{13}C , corroborando com dados da literatura (Darling et al. 1987; Rainey & MacKenzie, 1991; Castilla et al. 1995; Singha et al. 1996). O acetato é formado intracelularmente, em meio de cultura rico em glicose, sendo produto de degradação da glicose ^{13}C . Em tripanosomatídeos, o acetato pode ser o produto final da degradação mitocondrial de aminoácidos (como a

treonina) resultando na formação do piruvato ou acetil-CoA (Bringaud et al. 2006; Saunders et al. 2010). O acetato é um excelente doador de acetil-CoA que pode ser utilizado na síntese de ácidos graxos (Rivière et al. 2009). Coustou et al. (2008) descreveram em *T. brucei* que o β -hidroxibutirato é considerado um produto do metabolismo do acetil-CoA, onde a L-prolina, que é derivada do acetil-CoA, é preferencialmente convertida em β -hidroxibutirato e acetato através do ciclo do ácido tricarboxílico. Bringaud et al. (2006) ressaltam que todas as formas adaptativas de tripanosomatídeos analisadas (exceto as formas sanguíneas do *T. brucei*) produzem acetato a partir da glicose.

O CO₂ esteve presente em todos os sobrenadantes das amostras analisadas neste estudo pelo ¹³C, com exceção do isolado EFSF6 de *L. (V.) braziliensis*. Sugere que o acetil-CoA, produzido a partir do metabolismo da glicose, é convertido em CO₂ através do ciclo do ácido tricarboxílico na cepa M2903 e no isolado WSS5 de *L. (V.) braziliensis* e na cepa PH8 de *L. (L.) amazonensis*. Já o isolado EFSF6 de *L. (V.) braziliensis* apresenta uma menor atividade do ciclo do ácido tricarboxílico.

No presente estudo, o glicerol foi detectado através do ¹³C no sobrenadante de todas as amostras analisadas e no pellet somente na cepa M2903 e no isolado EFSF6 de *L. (V.) braziliensis*. Foi relatada a presença de glicerol em *T. brucei gambiense*, *Trichomonas vaginalis* e *L. braziliensis panamensis* em condições de anaerobiose (Darling et al. 1987) e em *L. pifanoi* (Rainey & Mackenzie, 1991). O glicerol é formado no glicossomo a partir da glicólise, sendo re-oxidado na membrana mitocondrial em dihidroxiacetona-fosfato que é convertido em metilglioxal e este em lactato, sendo utilizado na gliconeogênese (Saunders et al. 2010).

O catabolismo da glicose em *Leishmania* apresenta alguns aspectos diferenciais quando comparada à dos mamíferos hospedeiros, como por exemplo, a via glicolítica em tripanosomatídeos que ocorre dentro do glicosomo, e a via do metilglioal, como uma via de desintoxicação celular parasitária. Essas diferentes características metabólicas em *Leishmania* podem demonstrar exemplos de adaptação genética e especialização, surgindo a necessidade de mais estudos bioquímicos, especialmente em formas amastigotas.

Através deste estudo foi possível observar que há diferenças na E/S de metabólitos entre diferentes cepas e isolados de *Leishmania* spp para a obtenção de energia necessária à sua sobrevivência. A cepa M2903 e os isolados EFSF6 e WSS5 de *L.(V.) braziliensis* E/S lactato, indicando uma maior atividade glicolítica e maior necessidade de fontes energéticas.

O isolado EFSF6 de *L.(V.) braziliensis* parece ter o ciclo do ácido tricarboxílico menos ativo do que os demais isolados e cepas. A cepa PH8 de *Leishmania (Leishmania) amazonensis* parece ser a mais rica em metabólitos, com uma maior E/S de metabólitos e ausência de lactato, podendo estar relacionada com as características da doença, por exemplo, na forma difusa, além de ser a cepa mais imunossupressora.

Mudanças bioquímicas no metabolismo podem indicar possíveis adaptações do parasito às diferentes condições ambientais e fisiológicas durante o ciclo de vida, sendo esta a possível causa das diferenças bioquímicas encontradas entre isolados de uma mesma espécie, além de estabelecer diferenças metabólicas na relação parasito-hospedeiro.

Os estudos realizados através da CLAE e RMN integram a metabolômica possibilitando a identificação de metabólitos E/S por diferentes cepas de *Leishmania* spp e isolados de *L. (V.) braziliensis*, permitindo uma melhor compreensão e descrição das respostas dos mecanismos bioquímicos e biológicos do metabolismo parasitário. São

métodos distintos, porém complementares, utilizados para se traçar as vias bioquímicas utilizadas pelo parasito durante a metaciclogênese e durante sua adaptação no hospedeiro.

Pela RMN, utilizando uma técnica altamente sensível, não invasiva e sem destruição das células *in vitro* a HR-MAS, inédita para estudos parasitários, permitiu a confirmação na identificação dos metabólitos detectados tanto no sobrenadante quanto nos parasitos. Foram analisadas variáveis qualitativas, cujas taxas de concentrações não foram mensuráveis. Necessitando de estudos futuros através da RMN quantitativa ou da espectrometria de massa, que melhor definirá estatisticamente as diferenças e semelhanças existentes entre as cepas e isolados de *Leishmania* spp. Com a utilização da RMN pode-se ter uma visão global do perfil metabólico utilizado pelo parasito, permitindo a identificação de uma via metabólica comum à todas as espécies e esta ser utilizada na atuação de fármaco.

7. CONCLUSÕES GERAIS

Através de estudos *in vitro* foi possível verificar diferenças bioquímicas na excreção/secreção de metabólitos entre os isolados MHOM/BR/2003/IMG3, MHOM/BR/2005/RPL5 e a cepa MHOM/BR/1975/M2903 de formas promastigotas de *L. (V.) braziliensis*, entre as fases de crescimento logarítmicas e estacionárias.

Pela cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) verificou-se diferença na excreção/secreção dos ácidos orgânicos do metabolismo de carboidratos (piruvato e lactato), do metabolismo intermediário (citrato, α -cetogluturato, succinato, fumarato, malato e oxaloacetato) e do metabolismo dos ácidos graxos (β -hidroxibutirato). Sendo que o citrato, oxaloacetato, malato, succinato, lactato e β -hidroxibutirato apresentaram-se em maiores concentrações E/S durante a fase de crescimento estacionária do que na fase logarítmica. O malato foi o metabólito detectado em maiores concentrações tanto na fase logarítmica quanto na fase estacionária, e em todas as cepas e isolados analisados. Já o fumarato e α -cetogluturato apresentaram maiores concentrações E/S na fase logarítmica do que estacionária. Foram verificadas diferenças nas concentrações de todos os metabólitos E/S supracitados entre cepas e isolados de *L. (V.) braziliensis*.

Pela análise espectrofotométrica enzimática verificou-se diferença na concentração de glicose, onde as formas promastigotas da fase de crescimento logarítmico apresentaram maior concentração de glicose do que na fase estacionária, com exceção da cepa M2903.

O método de ressonância magnética nuclear - RMN foi utilizado como mais uma ferramenta nos estudos bioquímicos parasitários, tendo como modelo experimental a cepa de referência de *L. (V.) braziliensis* MHOM/BR/1975/M2903 e os isolados de *L. (V.)*

braziliensis MHOM/BR/2006/EF6 e MHOM/BR/2005/WSS5, e de *L. (L.) amazonensis* a cepa de referência IFLA/BR/1967/PH8. Utilizando ^{13}C e ^1H detectaram-se os seguintes metabólitos no sedimento e sobrenante: alanina, lactato, acetato, oxalato, piruvato, succinato, glicerol, CO_2 , uréia e aminoácidos (glutamina, valina e arginina). Qualitativamente houve diferença na S/E dos metabólitos entre parasitos e sobrenadantes e entre diferentes cepas e isolados de *Leishmania* spp.

Por ^{13}C RMN, o lactato não foi detectado no sobrenadante da cepa PH8 de *L. (L.) amazonensis* e, a uréia e CO_2 também não foram detectados no isolado EF6 de *L. (V.) braziliensis*, porém este isolado apresentou a valina e glutamina. Assim, o isolado EF6 de *L. (V.) braziliensis* parece ter o ciclo do ácido tricarboxílico menos ativo. Por ^1H RMN no sobrenadante foi detectado o oxalato, glutamina e prolina na cepa PH8 de *L. (L.) amazonensis* e no isolado WSS5 de *L. (V.) braziliensis*, parecendo haver uma maior atividade do ciclo do ácido tricarboxílico. Na cepa M2903 e no isolado EF6 *L. (V.) braziliensis* não foi detectado o oxalato, porém houve a presença do succinato e do piruvato, que podem ser derivados da via de fermentação succínica glicossomal.

Por ^{13}C RMN as análises dos parasitos permitiu a detecção da uréia e CO_2 na cepa PH8 de *L. (L.) amazonensis* e a uréia no isolado WSS5 de *L. (V.) braziliensis*. Na cepa M2903 de *L. (V.) braziliensis* verificou-se a presença do glicerol, e no isolado EF6 de *L. (V.) braziliensis* detectou-se o glicerol e succinato. Em todas as amostras analisadas parece não haver atividade do ciclo do ácido tricarboxílico.

Por ^1H RMN as análises dos parasitos permitiu a detecção do oxalato, aminoácidos no deslocamento químico 1,0 ppm e ácidos graxos no deslocamento químico 1,3 ppm em todas as cepas e isolados analisados, com exceção do isolado EF6 de *L. (V.) braziliensis*.

A CLAE e RMN demonstraram ser métodos totalmente diferentes para o estudo bioquímico parasitário, porém tornam-se complementares para definir as vias bioquímicas comuns utilizadas pelo parasito. No presente estudo, pode se observar que apenas o succinato e o lactato foram os metabólitos E/S comuns às duas metodologias empregadas

Utilizando uma técnica altamente sensível, não invasiva e sem destruição das células *in vitro* a HR-MAS, inédita para estudos parasitários, permitiu a identificação das moléculas. Foram variáveis qualitativas, cujas taxas de concentrações não foram mensuradas. Necessitando de estudos futuros, definindo estatisticamente as diferenças e semelhanças existentes entre cepas e isolados de *Leishmania*. Através da RMN pode-se ter uma visão global do perfil metabólico utilizado pelo parasito, permitindo a identificação de uma via específica na atuação de fármaco.

Assim, através de vários métodos foi possível observar que há diferenças na excreção/secreção de metabólitos entre diferentes cepas e isolados de *Leishmania spp* que utilizam diversas vias bioquímicas para a obtenção de energia necessária à sua sobrevivência e a identificação dessas vias poderão ser utilizadas na atuação de fármacos anti-parasitários. Mudanças bioquímicas no metabolismo podem indicar possíveis adaptações do parasito às diferentes condições ambientais e fisiológicas em que ele se encontra durante o ciclo de vida, além de poder estabelecer diferenças metabólicas na relação parasito-hospedeiro.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ackrell BC, Johnson MK, Gunsalus RP, Cecchini G, 1992. In Chemistry and Biochemistry of Flavoenzymes. Muller F, ed., CRC Press. III: 229–297.

Alexander J, Satoskar AR, Russell DG, 1999. *Leishmania* species: models of intracellular parasitism. Journal of Cell Science 112: 2993–3002.

Araújo CA, 2010. Avaliação do efeito anti-*Leishmania* de zidovudina (AZT-3'-AZIDO-2'-3'-DIDEOXITIMIDINA) em formas promastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis* (Dissertação de mestrado em Medicina Tropical – área Parasitologia). Goiânia: Universidade Federal de Goiás; 96p.

Balanã-Fouce R, Reguera RM, Cubría JC, Ordóñez D, 1998. The pharmacology of Leishmaniasis. General Pharmacology: The vascular system 30(4): 435-443.

Barrett MP, 1997. The pentose phosphate pathway and parasitic protozoa. Parasitology Today 13: 11–16.

Barrett MP, Badder BM, Breitling R, 2010. Metabolomics systems biology of trypanosomes. Parasitology 137: 1285-1290.

Bezerra JCB, Becker W, Zelck UE, 1997. A comparative study of the organic acid content of the hemolymph of *Schistosoma mansoni*-resistant and susceptible strains of *Biomphalaria glabrata*. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz (Supl) 92(3): 421-425.

Bezerra JCB, Kemper A, Becker W, 1999. Profile of organic acids concentrations in digestive gland and hemolymph of *Biomphalaria glabrata* under estivation. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz (Supl) 94(6): 779-784.

Blum JJ, 1993. Intermediary metabolism of *Leishmania*. Parasitology Today 9: 118–122.

Bringaud F, Rivière L, Coustou V, 2006. Energy metabolism of trypanosomatids: Adaptation to available carbon sources. Molecular and Biochemical Parasitology 149, 1-9.

Burchmore RJS, Barrett MP, 2001. Life in vacuoles - nutrient acquisition by *Leishmania* amastigotes. International Journal for Parasitology 31: 1311–1320.

Castilla JJ, Sanchez-Moreno M, Mesa C, Osuna A, 1995. *Leishmania donovani*: In vitro culture and ¹H NMR characterization of amastigote-like forms. Molecular and Cellular Biochemistry 142, 89-97.

Chapman, A., Linsteadt, J., Lloyd, D., Williams, J., 1985. ¹³C-NMR reveals glycerol as a metabolite of the protozoan parasite unexpected major. The Journal of Federation of European Biochemical Societies 191(2); 287-292.

CDC.Leishmaniasis.http://www.dpd.cdc.gov/DPDx/HTML/Leishmaniasis.asp?body=Frames/G-L/Leishmaniasis/body_Leishmaniasis_page1.htm . Capturado em 10-06-2011.

Costa TL, Ribeiro-Dias F, Oliveira MAP, Bezerra JCB, Vinaud MC, 2011. Energetic metabolism of axenic promastigotes of *Leishmania (Viannia) braziliensis*. Experimental Parasitology 128 (4); 438-443.

Croft SL, Sundar S, Fairlamb AH, 2006. Drug Resistance in Leishmaniasis (Reviews). *Clinical Microbiology Reviews* 19(1):111-126.

Darling TN, Davis DG, London RE, Blum JJ, 1987. Products of *Leishmania braziliensis* glucose catabolism: Release of D-lactate and, under anaerobic conditions, glycerol. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of América* 84, 7129-7133.

Degani ALG, Cass QB, Vieira PC 1998. *Cromatografia. Atualidades em química* 7: 21-25.

Genaro O, 2003. Leishmaniose Tegumentar Americana. In: Neves, DP (10. ed). *Parasitologia Humana*. São Paulo, Editora Atheneu 10: 56-72.

Gupta N, Goyal N, Singha UK, Bhakuni V, Roy R, Rastogi AK, 1999. Characterization of intracellular metabolites of axenic amastigotes of *Leishmania donovani* by ¹H NMR spectroscopy. *Acta Tropica* 73:121-33.

Gontijo B, Carvalho MLR, 2003. Leishmaniose Tegumentar Americana. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 36(1):71-80.

González U, Pinart M, Reveiz L, Alvar J, 2008. Interventions for OldWorld cutaneous leishmaniasis (Review). *The Cochrane Library*, Issue 4.

Goto H, Lindoso JAL 2010. Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Expert Review Anti Infective Therapy* 8(4): 419–433.

Hidasi F, Garcia-Zapata MT, 2004. Correlação das Leishmanioses humanas com o bioma cerrado no Estado de Goiás. *Universitas: Ciências da Saúde, Brasília* 1(2): 1-151).

Holmes E, 2010. The evolution of metabolic profiling in parasitology. *Parasitology* 137: 1437-1449.

Lehninger AL, Nelson DL, Cox MM 2005. Oxidação dos aminoácidos e a produção de uréia. In: *Princípios de Bioquímica*. 3ª ed. Sarvier Editora de Livros Médicos Ltda. São Paulo, SP. 839p.

Martin E, Mukkada AJ, 1979. Identification of the terminal respiratory chain in kinetoplast mitochondrial complexes of *Leishmania tropica* promastigotes. *Journal of Biology Chemistry*. 254: 12192–12198.

Marzochi MCA, 1992. Leishmanioses no Brasil: as leishmanioses tegumentares. *Jornal Brasileiro de Medicina* 63: 82-104.

Mendes JM, 2006. Ação leishmanicida de extratos de plantas no desenvolvimento de promastigotas de *Leishmania amazonensis* e estudo do perfil metabólico utilizando a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). (Dissertação de mestrado em Medicina Tropical – área Parasitologia). Goiânia: Universidade Federal de Goiás; 96p.

Millington O R, Myburgh E, Mottram JC, Alexander J, 2010. Imaging of the host/parasite interplay in cutaneous leishmaniasis. *Experimental Parasitology* 126: 310–317.

Ministério da Saúde. Atlas de leishmaniose tegumentar americana. http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/atlas_Ita.pdf. Capturado em 03-08-2011.

Ministério da Saúde. Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar americana 2007. http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/manual_Ita_2ed.pdf. Capturado em 03-10-2011.

Mojtahedi Z, Clos J, Sarvestani-Kamali E, 2008. *Leishmania major*: Identification of developmentally regulated proteins in procyclic and metacyclic promastigotes. *Experimental Parasitology* 119: 422-429.

Momeni AZ, Reiszadae MR, Aminjavaheeri M, 2002. Treatment of cutaneous leishmaniasis with a combination of allopurinol and low-dose meglumine antimoniate. *International Journal of Dermatology* 41:441–443.

Morris SMJ 2002. Regulation of enzymes of the urea cycle and arginine metabolism. *Annual Review of Nutrition* 22: 87-105.

Nishima, M., Matsushita, K., Furuhashi, T., Hori, E., Takahashi, M., Kato, K., Matsuda, H 1994. Nuclear magnetic resonance (NMR) analysis on the serum lipids of rabbits infected with *Schistosoma japonicum*: Oxidative modifications of diene system in fatty chains. *Australian Society for Parasitology* 20, 417-419.

Oliveira MAP, Piresi AS, Bastos RP, Lima GCA, Pinto SA, Pereira LIA, Pereira AJCS, Abrahamsohn IA, Dorta ML, Ribeiro-Dias F, 2010. *Leishmania* spp parasite inoculation of patient biopsy macerates in interferon gamma knockout mice. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 52, 83–88.

Oliveira LF, Schubach AO, Martins MM, Passos SL, Oliveira RV, Marzochi MC, Andrade CA 2011. Systematic review of the adverse effects of cutaneous leishmaniasis treatment in the New World. *Acta Tropica* 118: 87–96.

Opperdoes FR, Coombs GR, 2007. Metabolism of *Leishmania*: proven and predicted. *Trends in Parasitology* 23(4): 149-158.

O'Sullivan, W.J., Edwards, M.R., Norton, R.S., 1989. The application of nuclear magnetic resonance spectroscopy to parasite metabolism. *Parasitology Today* 5 (3), 79-82.

Pan AA, McMahon-Pratt D, 1987. Monoclonal antibodies specific for the amastigote stage of *Leishmania pifanoi*. I. Characterization of antigens associated with stage and species-specific determinants. *Journal of Immunology* 140: 2406-2414.

Pavia DI, Lampman GM, Kriz GS, Vyvyan JR, 2010. Introdução à espectroscopia. 4ª edição. Cengage Learning.

Pavli A, Maltezou HC, 2010. Leishmaniasis, an emerging infection in travelers. *International Journal of Infectious Diseases* 14: 1032-1039.

Pearson RD, Souza AQ, 1996. Clinical spectrum of leishmanioses. *Clinical Infectious Diseases* 22: 1-11.

Rainey PM, MacKenzie NE, 1991. A carbon-13 nuclear magnetic resonance analysis of the products of glucose metabolism in *Leishmania pifanoi* amastigotes and promastigotes. *Molecular and Biochemical Parasitology* 45: 307-316.

Rey L. Parasitologia. 4.ed., Rio de Janeiro, Guanabara, 2008, 379p.

Rivière L, Moreau P, Allmann S, Hahn M, Biran M, Plazolles N, Franconi JM, Boshart M, Bringaud F, 2009. Acetato produced in the mitochondrion is the essential precursor for lipid biosynthesis in procyclic trypanosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106 (31): 12694-12699.

Rocha LG, Almeida JR, Macedo RO, Barbosa-Filho JM, 2005. A review of natural products with antiLeishmanial activity. *Phytomedicine* 12(6-7): 514-35.

Saunders EC, Souza DP, Naderer T, Sernee MF, Ralton JE, Doyle MA, Macrae JI, Chambers JL, Heng J, Nahid A, Likic VA, Mcconville MJ, 2010. Central carbon metabolism of *Leishmania* parasites. *Parasitology* 137: 1-11.

Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, 2001. The metabolic basis of inherited disease, McGraw-Hill, N.Y.

Schetelma RA, Decuypere S, T'Kindt R, Dujardin JC, Coombs GR, Breitling G, 2010. The potential of metabolomics for *Leishmania* research in the post-genomics era. *Parasitology* 137: 1291–1302.

Shapiro MJ, Gounarides JS 2001. High resolution MAS-NMR in combinatorial chemistry. *Biotechnology and bioengineering (combinatorial chemistry)* 71; 130-148.

Singha UK, Bhakuni V, Ali V, Roy R, 1996. *Leishmania donovani*: Metabolite mapping of promastigotes using proton nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Molecular and Cellular Biochemistry* 162: 17-22.

Thompson, S.N., 1991. Applications of nuclear magnetic resonance in parasitology. *The Journal of Parasitology* 77(1), 1-20.

Thompson, S.N., Lee, R.W.K., Mejia-Scales, V., El-Din, SM., 1994. Biochemical and morphological pathology of the foot of the Shistosome vector *Biomphalaria glabrata* infected with *Schistosoma mansoni*. *The Journal of Parasitology* 107, 275-285.

Tielens AGM, 1994. Energy generation in parasitic helminths. *Parasitology Today* 10: 346–352.

Tielens AGM, van Hellemond JJ, 1998. The electron transport chain in anaerobically functioning eukaryotes. *Biochimica and Biophysica Acta* 1365(1-2):71-78.

Tielens AGM, van Hellemond JJ, 2009. Surprising variety in energy metabolism within *Trypanosomatidae*. *Trends in Parasitology* 25(10): 482-490.

van Hellemond JJ, Tielens AGM, 1997. Inhibition of the respiratory chain results in a reversible metabolic arrest in *Leishmania* promastigotes. *Molecular and biochemical Parasitology* 85: 135–138.

van Hellemond JJ, Van der Meer P, Tielens AGM, 1997. *Leishmania infantum* promastigotes have a poor capacity for anaerobic functioning and depend mainly on respiration for their energy generation. *Parasitology* 114: 351–360.

Vinaud MC, 2007. Vias do metabolismo energético e respiratório de cisticercos de *Taenia crassiceps* *in vivo* e seu estudo *in vitro* sob ação de fármacos anti-helmínticos. (Tese de doutorado em Medicina Tropical – área Parasitologia). Goiânia: Universidade Federal de Goiás; 31p.

Vinaud MC, Ferreira CS, Lino Junior RS, Bezerra JCB 2008. *Taenia crassiceps*: energetic and respiratory metabolism from cystierci *in vitro* exposed to praziquantel and albendazole action. *Experimental Parasitology* 120: 221-226.

Väisänen S, Porkkala-Sarataho E, Lampinen H, Eskelinen S, 2004. Evaluation of the Konelab 20XTi clinical chemistry analyzer-cholesterol, creatine kinase, glucose and immunoglobulin A in XXIX Nordic Congress in Clinical Chemistry, Malmö, Sweden, 24 – 27.

Walker V 2009. Ammonia toxicity and its prevention in inherited defects of the urea cycle. *Diabetes, Obesity and Metabolism* 11; 823–835.

Anexo 1. Bula do meio de cultura grace's



3480 Spruce Street
 Saint Louis, Missouri 63103 USA
 Telephone (800) 325-8832 (314) 771-6766
 Fax (314) 286-7838
 email: techserv@sigma.com
 sigma-aldrich.com

Product Information

GRACE'S INSECT MEDIUM With L-Glutamine, Without Sodium Bicarbonate

Product No. G 8771
 Store at 2-8°C

Product Description

Grace's medium was originally formulated to support the growth of cells derived from the Australian emperor gum moth, *Antheraea eucalypti*. The medium is a modification of Wyatt's medium to more closely resemble *Antheraea* hemolymph. The cells established by Grace using this medium were the first continuous lines developed. The basal medium, when properly supplemented, has been used to culture cells derived from a variety of insects including several species of lepidopterans as well as some dipterans. The medium is primarily used as a basal medium for the growth and maintenance of cell lines derived from lepidopterans.

GRACE'S INSECT MEDIUM, Product No. G9771 is one of the cell culture media available from Sigma. The selection of a nutrient medium is strongly influenced by 1) type of cell, 2) type of culture [monolayer, suspension, clonal] and 3) degree of chemical definition necessary. It is important to review the literature for recommendations concerning medium, supplementation and physiological parameters required for a specific cell line.

Components	g/L
Calcium Chloride (anhydrous)	1.0
Magnesium Chloride (anhydrous)	1.058189
Magnesium Sulfate (anhydrous)	1.357858
Potassium Chloride	2.24
Sodium Phosphate Monobasic	0.876923
β-Alanine	0.2
L-Alanine	0.225
L-Arginine•HCl	0.7
L-Aspartic Acid	0.35
L-Asparagine	0.35
L-Cystine•2HCl	0.025
L-Glutamic Acid	0.6
L-Glutamine	0.6
Glycine	0.65
L-Histidine	2.5
L-Isoleucine	0.05
L-Leucine	0.075
L-Lysine•HCl	0.625
L-Methionine	0.05
L-Phenylalanine	0.15

L-Proline	0.35
L-Serine	0.55
L-Threonine	0.175
L-Tryptophan	0.1
L-Tyrosine•2Na	0.07202
L-Valine	0.1
p-Aminobenzoic Acid	0.00002
o-Biotin	0.00001
Choline Chloride	0.0002
Folic Acid	0.00002
myo-Inositol	0.00002
Niacin	0.00002
o-Pantothenic Acid (hemicalcium)	0.00002
Pyridoxine•HCl	0.00002
Riboflavin	0.00002
Thiamine•HCl	0.00002
o(-)-Fructose	0.4
Fumaric Acid, free acid	0.055
o(+)-Glucose	0.7
α-Ketoglutaric Acid	0.37
L(-)-Malic Acid, free acid	0.67
Succinic Acid	0.06
Sucrose	26.68

Precautions and Disclaimer REAGENT

For R&D use only.
 Not for drug, household or other uses.

Preparation Instructions

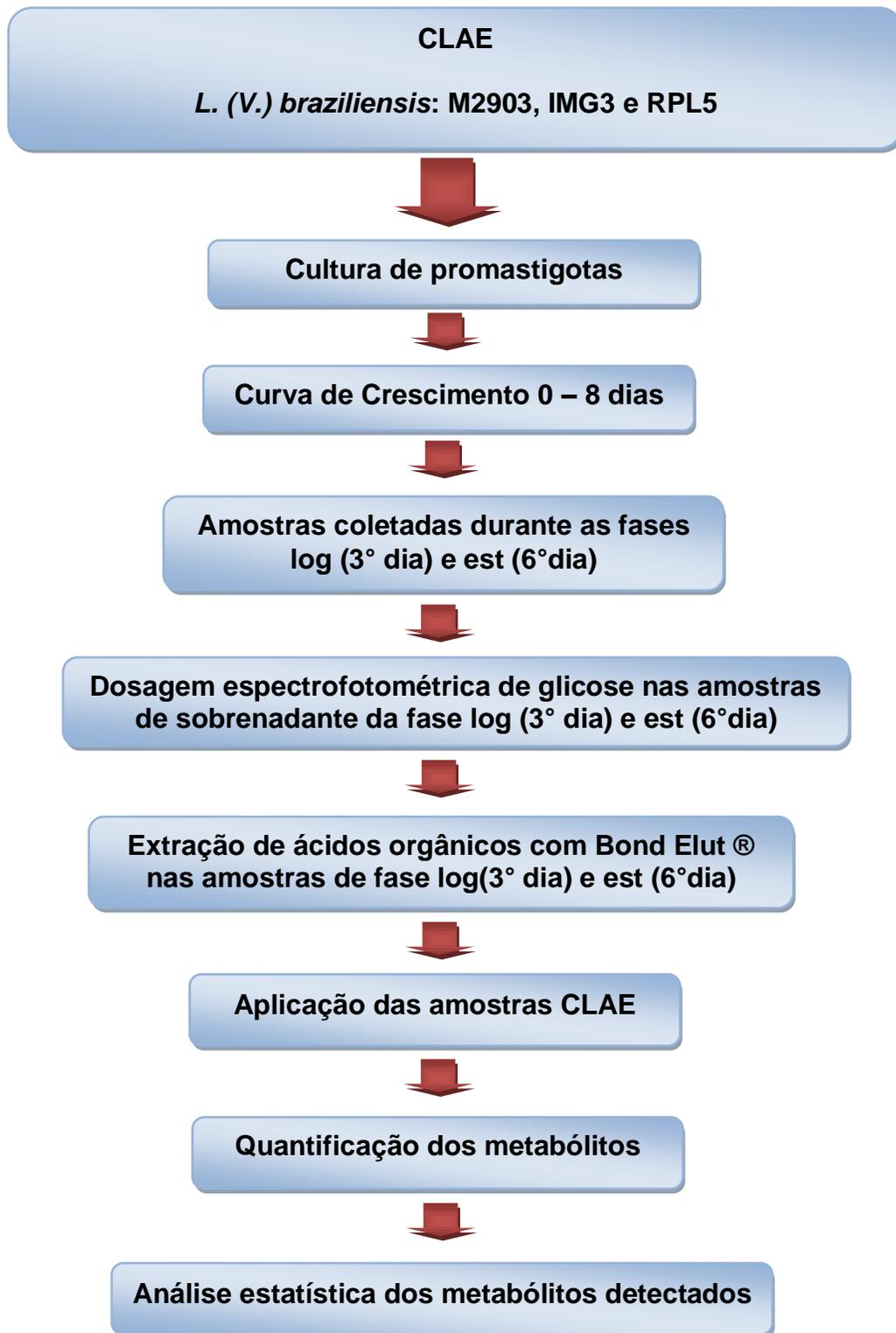
Powdered media are extremely hygroscopic and should be protected from atmospheric moisture. The entire contents of each package should be used immediately after opening. Preparing a concentrated solution of medium is not recommended as precipitates may form.

Supplements can be added prior to filtration or introduced aseptically to sterile medium. The nature of the supplement may affect storage conditions and shelf life of the medium.

1. Measure out 90% of final required volume of water. Water temperature should be 15-20°C.
2. While gently stirring the water, add the powdered medium. Stir until dissolved. Do NOT heat.

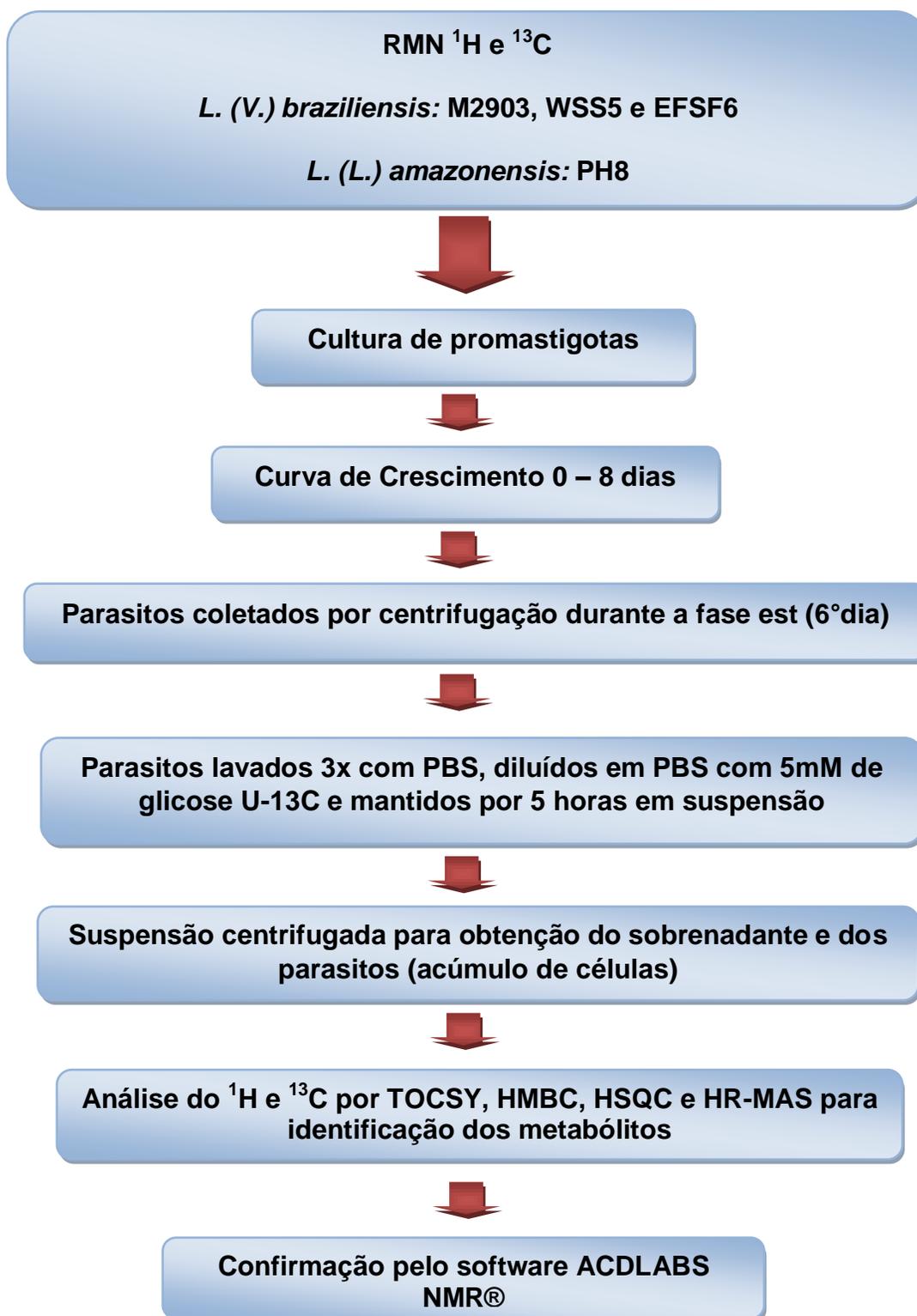
ANEXO 2. FLUXOGRAMA DE MATERIAL E MÉTODOS

Metodologia do Artigo 1



ANEXO 3. FLUXOGRAMA DE MATERIAL E MÉTODOS

Metodologia do Artigo 2



ANEXO 4. NORMAS PARA ELABORAÇÃO DE TESE PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE DOUTOR Nº 04/2009

As Teses de Doutorado devem ser apresentadas na forma de artigos científicos incluindo dois ou mais artigos/ manuscritos publicados/aceitos/submetidos a periódicos internacionais indexados no JCR, sendo pelo menos um artigo em periódico com fator de impacto 1.1. Excepcionalmente poderá ser aceito um único artigo para doutorado de acordo com os critérios de avaliação da CAPES para a área de Medicina II. O doutorando deverá ser o primeiro autor, em pelo menos um dos artigos, que devem pertencer a uma única linha de pesquisa ou a temas relacionados.

1. Preâmbulo (Anexo II): Capa e Contracapa; catalogação bibliográfica segundo regras da UFG; membros da banca examinadora; dedicatória, agradecimentos; Sumário; Lista de tabelas, figuras e anexos incluindo a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa onde a pesquisa foi desenvolvida; Lista das siglas, símbolos e abreviaturas; Resumo; Abstract e Apresentação da trajetória do candidato até o doutorado (opcional).

2. Corpo da Tese

1. Introdução/revisão da literatura sobre o tema; Artigo(s) de revisão sistemática sobre o tema da tese pode(m) substituir a introdução de revisão clássica da literatura;
2. Justificativa;
3. Objetivos;
4. Métodos (opcional);
5. Resultados

Artigos científicos (submetidos, aceitos ou publicados) redigidos segundo as normas de cada periódico selecionado;

6. Discussão objetiva geral dos principais resultados dos artigos apresentados;

7. Conclusões;

8. Recomendações (se pertinentes);

9. Referências Bibliográficas da tese segundo normas do periódico Memórias do Instituto Oswaldo Cruz;

Serão considerados artigos científicos: Artigo completo, Relato Preliminar/ Comunicação Concisa ou Carta ao Editor (no máximo uma carta ao editor por tese quando for o caso).

FORMATAÇÃO:

Qualquer que seja a modalidade, o produto final apresentado ao PPGMTSP deverá ser preparado de acordo com as seguintes especificações: Papel A4; espaçamento entre linhas: 1,5; fonte: Times New Roman tamanho 12; margem superior = 2,5cm margem inferior = 2,5cm , à direita = 3,0cm e à esquerda = 3,0cm. Impressão final - deverá ser encadernada em capa dura – cor preta com letras douradas. Estas normas foram aprovadas em reunião extraordinária da CPG do dia 18/09/2009 e serão aplicadas aos alunos que ingressarem no PPGMTSP a partir de Março de 2010.

**ANEXO 5. NORMAS PARA ELABORAÇÃO E SUBMISSÃO DE ARTIGO CIENTÍFICO DA
REVISTA EXPERIMENTAL PARASITOLOGY**