

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE PATOLOGIA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA

Carolina Aguiar de Araújo

**Avaliação do efeito anti-*Leishmania* de zidovudina (AZT- 3'azido-2'-3'-
dideoximidina) em formas promastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis*.**

Orientador

Prof. Dr. José Clecildo Barreto Bezerra

Co-orientadora:

Prof.^a. Dr.^a. Marina Clare Vinaud

Dissertação de Mestrado

Goânia- Goiás, 2010.

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE PATOLOGIA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA

Carolina Aguiar de Araújo

**Avaliação do efeito anti- *Leishmania* de zidovudina (AZT- 3'azido-2'-3'-
dideoximidina) em formas promastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis*.**

Orientador

Prof. Dr. José Cleildo Barreto Bezerra

Co-orientadora:

Prof.^a. Dr.^a. Marina Clare Vinaud

Colaborador:

Prof. Dr. Milton Adriano Pelli de Oliveira

Dissertação de Mestrado submetida ao
Programa de Pós-Graduação em Medicina
Tropical IPTSP/UFG como requisito parcial
para obtenção do título de Mestre na área de
concentração de Parasitologia

Goiânia- Goiás, 2010

AGRADECIMENTOS

A Deus que, com seu Amor, me deu a vida e me faz querer aprender mais sobre Ele e sobre as coisas Dele.

Agradeço a minha mãe Valdeina Barbosa Aguiar de Araujo por ser uma mulher dedicada, empenhada e correta com o trabalho e com a vida. Ao meu pai Rubens Pereira de Araujo por ser um homem honesto e digno. Por sempre fazerem mais do que o essencial pela família sou grata e espero poder ser um pouco de cada um de vocês.

Meu agradecimento aos preciosos irmãos que, mesmo estando distantes, somos unidos por um grande amor. Ao meu lindo irmão Arpuim Aguiar de Araujo por me ensinar sobre a beleza do Amor de Deus e por se preocupar com minha vida espiritual. À minha irmã, amiga e colega de profissão Aline Aguiar de Araujo por ser minha maior incentivadora e me mostrar como nosso ofício é fascinante.

À minha mais nova irmã Flanders Franck Auxiliadora Moreira da Silva e sua família pelo grande carinho.

Aos meus familiares, todos os Aguiar, Barbosa, Pereira e Araujo, vocês são grandes em quantidade e em importância para mim.

Tenho a felicidade de contar com excelentes professores que contribuíram com o meu desenvolvimento, a eles meus profundos agradecimentos. Ao meu orientador prof. Dr José Clecildo Barreto Bezerra pela confiança desde o estágio até a pós-graduação. À Prof^a. Dr^a Marina Clare Vinaud por seu brilhante profissionalismo e por me acompanhar desde o início nesta instituição mostrando dedicação, carinho e respeito por mim e meus trabalhos. Ao prof. Dr Milton Adriano Pelli de Oliveira pela contribuição técnica e teórica dada a este trabalho. À prof^a. Dra Valéria de Oliveira e ao prof. Dr. Ruy de Souza Lino Junior pelo fornecimento de material necessário para realização dos experimentos. À todos os

funcionários e professores do IPTSP/UFG, especialmente à Coordenação do Programa de Pós-graduação em Medicina Tropical e Saúde Pública.

À Camilla Luiza Batista que rapidamente assumiu compromisso com o laboratório e participou de maneira inestimável dos experimentos desta dissertação.

Às companheiras de laboratório Aline Almeida Barbaresco, Carolina Miguel Fraga, Carolina Martins Treméa, Flávia Martins Nascente, Mirian de Sylvio, Juliana Boaventura Avelar e Tatiane Luiza da Costa. Muito obrigada por estes agradáveis anos de trabalho.

À família Le tangô sempre presente nos momentos mais alegres da minha vida.

Aos companheiros e irmãos Djones Ribeiro, Flávia Ikeda e Araujo, Flávio da Silva Borges, Kamilla Gomes Camargo, Kleber Moreira de Melo, Lorena Siqueira Araujo, Luana Neres, Luana Pauline Roewer Kummer, Marcos Alexandre Araujo Pinheiro, Pedro Henrique Wendling, Rodolpho Teles Machado e Rodrigo Rodrigues Vaz. Apesar de conhecer cada um em lugares e circunstâncias diferentes vocês estão unidos em meu coração e são os melhores amigos que alguém pode ter.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a duas mulheres que viveram sem grandes oportunidades de estudo e, no entanto foram sábias, corajosas, exímias cristãs e tiveram sempre muito amor pela vida. Às minhas inesquecíveis avós Vicentina Barbosa Aguiar e Severiana Araujo Pereira (Cívica) todo meu amor e admiração por vocês.

ABREVIATURAS

Acetil-CoA Acetil coenzima A

ADP Adenosina difosfato

ATP Adenosina trifosfato

AZT 3' azido-2'-3' – dideoximidina, zidovudina

CLAE Cromatografia líquida de alta eficiência

CO₂ Gás carbônico

DL Dose letal

e⁻ Elétrons

H₂O Água

IPTSP Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública

kDNA kinetoplast desoxyribonucleic acid (DNA do cinetoplasto)

LC Leishmaniose cutânea

LCD Leishmaniose cutâneo-difusa

LMC Leishmaniose muco-cutânea

LV Leishmaniose visceral

mt-DNA mitochondrial desoxyribonucleic acid (DNA mitocondrial)

MTT Método de tetrazólio

NAD Nicotinamida dinucleotídeo

NAD⁺ Nicotinamida dinucleotídeo oxidada

NADH Nicotinamida dinucleotídeo reduzida

NADP Nicotinamida dinucleotídeo fosfato

NADP⁺ Nicotinamida dinucleotídeo fosfato oxidada

NADPH Nicotinamida dinucleotídeo fosfato reduzida

NAPD⁺ Nicotinamida dinucleotídeo fosfato oxidada

O₂ Oxigênio

OMS – Organização Mundial de Saúde

PEPCK Fosfoenolpiruvato carboxiquinase

Succinil-CoA Succinil coenzima A

SUMÁRIO

Agradecimentos	i
Dedicatória	iii
Abreviaturas	iv
Lista de figuras da introdução	vii
Lista de figuras e tabelas Manuscrito 1	viii
Lista de figuras e tabelas Manuscrito 2	iv
Resumo	x
Abstract	xii
I-Introdução	
1.1- O agente infeccioso	1
1.2- Ciclo Biológico	3
1.2.1- Metaciclogênese	4
1.3- Fatores epidemiológicos	6
1.4- Leishmaniose	8
1.5- Coinfecção <i>Leishmania</i> /HIV	11
1.6- Metabolismo de <i>Leishmania</i> spp	12
1.7- Bases bioquímicas para o tratamento das leishmanioses	19
1.8- Zidovudina	22
II-Objetivos	25
III- Manuscritos	26
Manuscrito 1	27
Manuscrito 2	43
IV-Conclusões gerais	58
VI- Considerações finais	59
VII-Referências Bibliográficas	60

LISTA DE FIGURAS DA INTRODUÇÃO

Figura 1	Formas amastigotas e promastigotas de <i>Leishmania</i> sp.	2
Figura 2	Ciclo biológico de <i>Leishmania</i> sp	4
Figura 3	Desenvolvimento do parasito nos hospedeiros	6
Figura 4	Distribuição das espécies de <i>Leishmania</i> responsáveis pela LTA no Brasil	7
Figura 5	<i>Lutzomyia</i> sp	9
Figura 6	Glicólise no metabolismo aeróbio de <i>Leishmania</i> spp	16
Figura 7	Esquema do ciclo de Krebs	17
Figura 8	Esquemada cadeia respiratória no metabolismo aeróbio de <i>Leishmania</i> spp	19
Figura 9	Estrutura química da zidovudina	22

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

MANUSCRITO 1

EFEITOS DA ZIDOVUDINA (AZT) NAS TAXAS DE SOBREVIVÊNCIA E MORFOMETRIA DE PROMASTIGOTAS DE *Leishmania (L.) amazonensis*.

Tabela 1	Médias (\pm desvio padrão) das curvas de crescimento de formas promastigotas de <i>Leishmania (L.) amazonensis</i> expostas a diferentes concentrações de zidovudina.	34
Figura 1	Curvas de crescimento de promastigotas de <i>Leishmania (L.) amazonensis</i> expostas a diferentes concentrações de AZT(μ M).	35
Tabela 2	Média (\pm desvio padrão) da morfometria de formas promastigotas de <i>Leishmania (L.) amazonensis</i> expostas a diferentes concentrações de zidovudina.	37
Figura 2	Formas promastigotas de <i>Leishmania (L.) amazonensis</i> , na fase estacionária (3º dia).	39
Figura 3	Formas promastigotas de <i>Leishmania (L.) amazonensis</i> , na fase logarítmica (6º dia).	40

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

MANUSCRITO 2

METABOLISMO ENERGÉTICO DE PROMASTIGOTAS DE *Leishmania (L.) amazonensis* EXPOSTAS A DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE ZIDOVUDINA

Tabela 1	Média (\pm desvio padrão) em $\mu\text{M.mL}^{-1}$ da concentração de ácidos orgânicos secretados/excretados por formas promastigotas em fase logaritmica (3ºdia) de <i>Leishmania amazonensis</i> expostas a diferentes concentrações de AZT.	52
Tabela 2	Média (\pm desvio padrão) em $\mu\text{M.mL}^{-1}$ da concentração de ácidos orgânicos secretados/excretados por formas promastigotas em fase estacionária (6ºdia) de <i>Leishmania amazonensis</i> expostas a diferentes concentrações de AZT.	53

RESUMO

A leishmaniose é uma parasitose causada por protozoários do gênero *Leishmania*, sua incidência anual em humanos está estimada em 1 a 1,5 milhão de casos de leishmaniose cutânea em todo o mundo. A zidovudina (AZT) vem sendo utilizada no tratamento de portadores do vírus da imunodeficiência humana (HIV) e inibe a transcriptase reversa competindo com o trifosfato de timidina, com grande seletividade antiviral. Para avaliar a dose tóxica em células humanas foi realizado o ensaio de citotoxicidade em macrófagos variando-se a concentração do AZT de 1 a 100 μM e identificando a dose letal em células humanas. A avaliação da sobrevivência de formas promastigotas foi realizada por microscopia óptica após exposição a diferentes doses de AZT. A avaliação das características morfológicas das estruturas parasitárias foi realizada utilizando-se o programa Image J (NIH) para os seguintes parâmetros: comprimento e largura do corpo e comprimento do flagelo. A avaliação do metabolismo respiratório e energético foi realizada pela técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), determinando-se a concentração dos ácidos orgânicos como: citrato, piruvato, oxalacetato, α -cetoglutarato, malato, succinato, lactato e fumarato. Além de corpos cetônicos: acetoacetato e β -hidroxibutirato e dos ácidos relacionados a via de oxidação de ácidos graxos: propionato e acetato. Realizou-se a análise estatística para correlação das alterações com as dosagens de zidovudina utilizadas. Observou-se por meio do teste de citotoxicidade que a DL50 foi de 30 μM . Observou-se a redução quantitativa de parasitos quando comparados ao grupo controle em 62%, 64%, 88% no 3º dia de crescimento das promastigotas sob ação de AZT em 30, 40 e 50 μM respectivamente. Com relação às características morfométricas das promastigotas expostas às concentrações de 1- 50 μM de AZT, quando comparadas às do grupo controle, foi possível observar: redução do comprimento do corpo em 17,2-38,5% no 3º dia e 17, 5-30,2% no 6º dia, aumento da largura em 48,7-54,9% no 3º dia e redução em 8-41,3% no 6º dia e redução do comprimento do flagelo em 12,3-18,2% no 3º dia e 6,4-38,8% no 6º dia. Com relação a alterações bioquímicas, observou-se maior secreção/excreção de fumarato e succinato nos parasitos de 6º dia, confirmando a ação do AZT que tem um mecanismo relacionado ao bloqueio da cadeia transportadora de elétrons. Estes dados demonstram a atividade *in vitro* do AZT em diferentes concentrações no crescimento, morfologia e metabolismo das formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis*.

Palavras chave: AZT, *Leishmania (L.) amazonensis*, leishmanicida, metabolismo energético e de carboidratos, morfometria.

ABSTRACT

Leishmaniasis is a disease caused by a protozoan from the genus *Leishmania* and its annual incidence in humans is estimated around 1 to 1,5 million cases of cutaneous leishmaniasis around the world. Zidovudine (AZT) have been used in the treatment of patients with human immunodeficiency virus (HIV) and inhibits the reverse transcriptase by competition for thymidine triphosphate, with great viral selectivity. To determine the AZT's cytotoxicity against human cells an assay with macrophages was performed, in which the drug's concentration varied from 1 to 100 μM of AZT and allowed the identification of the lethal dose to human cells. The evaluation of the survival was performed by optic microscopy after the exposition to different doses of AZT. The evaluation of the morphologic characteristics of the parasites was performed through use of Image J (NIH) and the following parameters: length and width of the body and length of the flagellum. The evaluation of the respiratory and energetic metabolism was performed through HPLC techniques from which the quantification of organic acids such as citrate, pyruvate, oxaloacetate, α -ketoglutarate, malate, succinate, lactate, fumarate, acetoacetate, β -hydroxybutyrate, propionate and acetate was possible. The statistical analysis was performed to correlate the AZT's dosage with the injuries observed in the parasites. The cytotoxicity assay showed that the IC₅₀ was of 30 μM . A quantitative reduction of the parasites was observed when compared the control groups to the exposed ones, showing a reduction of 62%, 64%, 88% on the 3rd day of promastigotes growth when exposed to 30, 40 and 50 μM dosages, respectively. In regard to the morphometric characteristics of promastigotes exposed to concentrations varying from 1- 50 μM of AZT, when compared to the control group, it was possible to observe: reduction of the length of the body 17,2-38,5% on the 3rd day and 17,5-30,2% on the 6th day, increase of the width in 48,7-54,9% on the 3rd day and reduction of 8-41,3% on the 6th day, and reduction of the length of the flagellum of 12,3-

18,2% on the 3rd day and of 6,4-38,8% on the 6th day. Regarding the biochemical alterations, it was possible to observe an increase in the secretion/excretion of fumarate and succinate in parasites from the 6th day due to the fact that the mode of action of AZT is related to the blockage of the electrons transporting chain. These data demonstrate the *in vitro* activity of different concentrations of AZT on the growth, morphology and metabolism of promastigotes forms of *L. (L.) amazonensis*.

Key words: AZT, *Leishmania (L.) amazonensis*, leishmanicid, carbohydrate and energetic metabolism, morphometry.

I-Introdução

1.1-O agente infeccioso

Leishmania foi descrita em 1903 por Leishman e Donovan na Índia e simultaneamente por Wright, como um protozoário flagelado pertencente à classe *Zoomastigophora*, filo *Sarcomastigophora*, ordem *Kinetoplastida* e família *Trypanosomatidae*. Como todos os pertencentes à ordem *Kinetoplastida* apresenta cinetoplasto, uma estrutura única especializada que contém grande quantidade de material genético, essencial para a sobrevivência do parasito (Blum *et al* 2004, Garcia-Almagro 2005, Souza *et al* 2009).

A família *Tripanossomatidae* é composta de protozoários que representam um dos primeiros ramos da linhagem eucariótica. Todos os pertencentes a esta família são parasitos, alguns deles causando sérias doenças ao ser humano (*Leishmania* sp, *Trypanosoma cruzi* e *T. brucei*), animais domésticos (*Trypanosoma equinum*) e plantas (*Phytomonas*) (Besteiro 2002).

Os parasitos do gênero *Leishmania* apresentam em seu ciclo de vida heteroxeno duas formas evolutivas: a forma amastigota, que é intracelular e sem movimentos e a promastigota, que é flagelada e extracelular (figura 1). A amastigota têm corpo ovóide, medindo entre 2 a 6 µm de comprimento por 1,5 a 3 µm de largura, flagelo interno em uma invaginação da membrana chamada bolso flagelar e cinetoplasto próximo ao núcleo. A promastigota apresentam corpo alongado, medindo entre 14 e 20 µm de comprimento por 1,5 a 4 µm de largura, flagelo livre, núcleo no terço médio da célula e cinetoplasto em forma de bastonete curvo situado anteriormente ao núcleo (Rey 2008).

Do ponto de vista de sua biologia molecular e genética, deve salientar-se que as leishmanias têm dois genomas, nuclear e cinetoplástico, este último equivalente ao genoma mitocondrial de mamíferos. O cariótipo de *Leishmania* é de 34-36 cromossomos (Garcia-Almagro 2005).

As leishmanias são flagelados heteroxênicos, ou seja, parasitos com alternância de evolução entre hospedeiros vertebrados e invertebrados. Formas amastigotas se multiplicam dentro dos fagolisossomos de macrófagos de vertebrados. Enquanto que as formas promastigotas, flageladas e móveis, se multiplicam extracelularmente no trato alimentar (intestinal) do vetor invertebrado e em culturas axênicas (Shaw 1982; Sacks 1985; Alexander 1999).

Um padrão diferente de desenvolvimento das formas promastigotas é observado nos dois subgêneros, *Leishmania (Leishmania)* e *Leishmania (Viannia)*. Membros do subgênero *L.(Leishmania)* se desenvolvem exclusivamente no intestino médio e anterior de seus vetores (desenvolvimento suprapilário), enquanto os membros do subgênero *L.(Viannia)* se desenvolvem no intestino posterior (desenvolvimento peripilário) (Gossage 2003).

Existem evidências da presença de distintas formas promastigotas infectantes aos mamíferos, na qual a promastigota metacíclica é a fase final de desenvolvimento no vetor com diferenças morfológicas e bioquímicas que determinam a capacidade infectante (Gossage 2003).

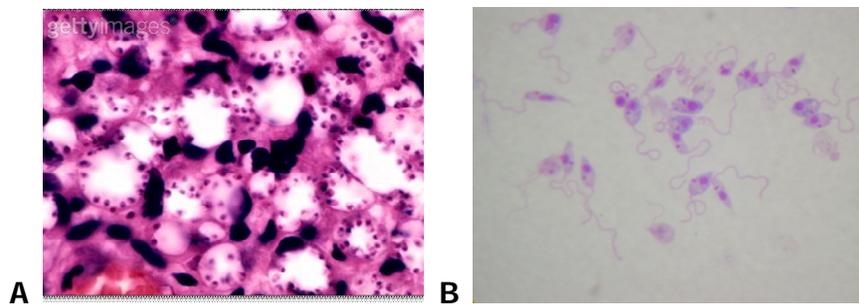


Figura 1 : A-Formas amastigotas de *Leishmania* sp (Retirado de Gettyimages 2009).

B- Formas promastigotas de *Leishmania* sp.

1.2-Ciclo Biológico

A forma promastigota da *Leishmania* é transmitida pela picada de vetores infectados do gênero *Lutzomyia* e/ou *Phlebotomus*. Apesar de existirem 500 espécies conhecidas, somente cerca de 30 delas foram positivamente identificadas como vetores da doença. Apenas a fêmea do inseto transmite os protozoários, infectando-se com as formas amastigotas do parasito, contidos no sangue que ingere a partir do seu hospedeiro humano ou mamífero, a fim de obter as proteínas necessárias para o desenvolvimento de seus ovos (CDC 2008; WHO 2010).

O vetor infectado apresenta uma obstrução de seu proventrículo e estômago, levando à regurgitação das formas infectantes (ou seja, promastigotas metacíclicas) durante o repasto sangüíneo. As promastigotas inoculadas no local da picada são fagocitadas pelos macrófagos e outros tipos de células mononucleares fagocitárias. Após a internalização, a promastigota metacíclica é encontrada em um vacúolo parasitóforo. Ocorre, então, o fenômeno de toque entre o vacúolo que contém o parasito e os lisossomos, que permitem a passagem de enzimas para o fagossomo, sem ocorrer uma fusão. Os vacúolos parasitóforos de *Leishmania* são acidificados, ricos em enzimas lisossomais e suas membranas mostram os marcadores fagolisossomais. A promastigota transforma-se em amastigota, capaz de se desenvolver e multiplicar no meio ácido encontrado no vacúolo digestivo (Neves 2005). As amastigotas são uma fase tissular do parasito que se multiplicam por divisão simples até romperem a célula hospedeira, quando apresentam a capacidade de continuar a infectar outras células mononucleares fagocitárias (CDC 2008; Real 2008; WHO 2010).

Os flebótomos podem ser infectados pela ingestão de células repletas de amastigotas durante o repasto sangüíneo. No vetor, as amastigotas transformam-se em

promastigotas, desenvolvem-se no trato intestinal, e migram para a probóscide (figura 4) (CDC 2008; WHO 2010).

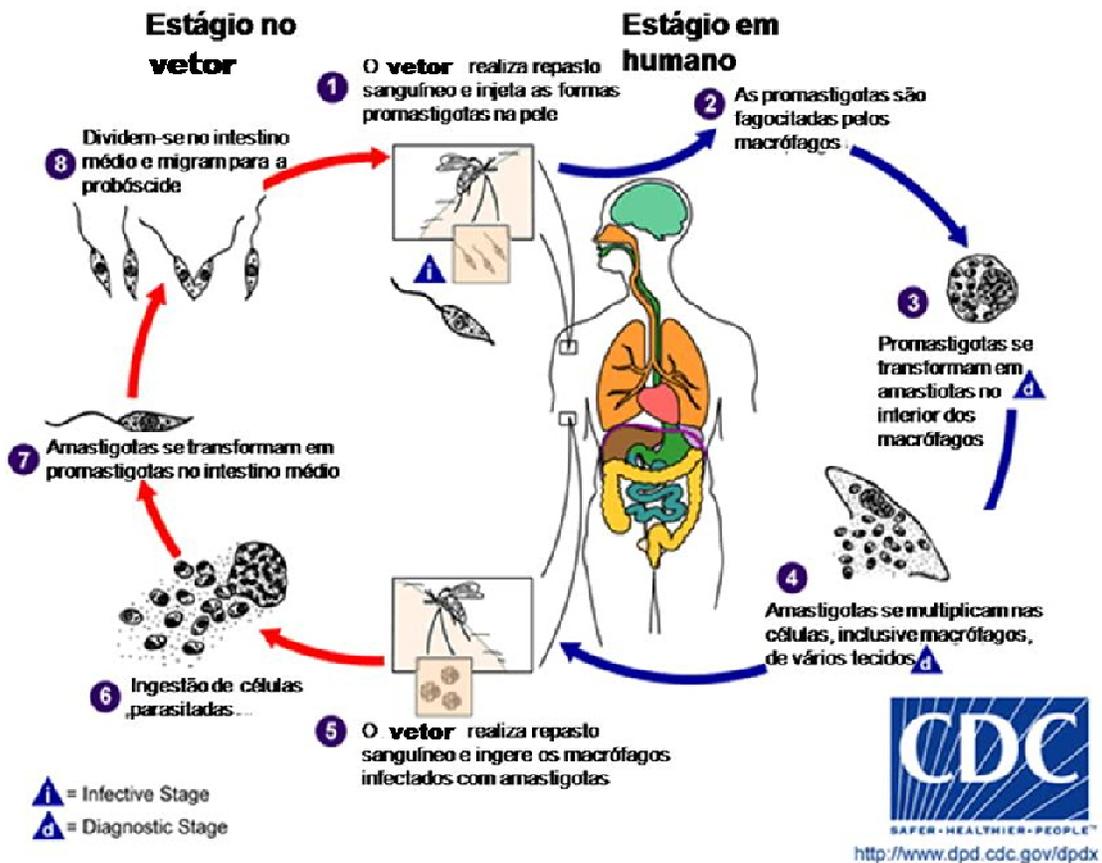


Figura 2: Ciclo Biológico da *Leishmania* sp (Adaptado de CDC 2008).

1.2.1-Metaciclologênese

Dentro do tubo digestivo do vetor, as características da promastigota vão modificando desde a fase de nectomona, nas microvilosidades do tubo digestivo, até a promastigota metacíclica infectante, livre na hipofaringe, passando por uma fase intermediária de haptomona. Este processo é conhecido por metaciclologênese e dura aproximadamente de 6 a 10 dias (Garcia-Almagro 2005).

A transformação da forma promastigota procíclica que é pouco infectante em promastigota metacíclica altamente infectante é demonstrada na figura 3. Na natureza, a metaciclogênese, ocorre no inseto vetor. Esta transformação é acompanhada por um aumento na capacidade de infectar e sobreviver no hospedeiro vertebrado, onde o parasito é atacado pelo sistema imune do hospedeiro (Zakai 1998).

As promastigotas crescem em meio de cultura em duas fases, logarítmica (crescimento exponencial) e estacionária. Em culturas, as promastigotas de fase estacionária apresentam maior concentração de metacíclicas e maior virulência do que as que crescem progressivamente (Gossage 2003).

Mudanças morfológicas no tamanho e forma do parasito e comprimento do flagelo estão associados à diferenciação no intestino médio do hospedeiro invertebrado e em diferentes fases de crescimento em culturas axênicas. A expressão de moléculas de superfície como a lipofosfoglicano (LPG) e a protease gp63 foram associadas a este processo de diferenciação de promastigotas de formas procíclicas para metacíclicas (Dórea *et al* 2003).

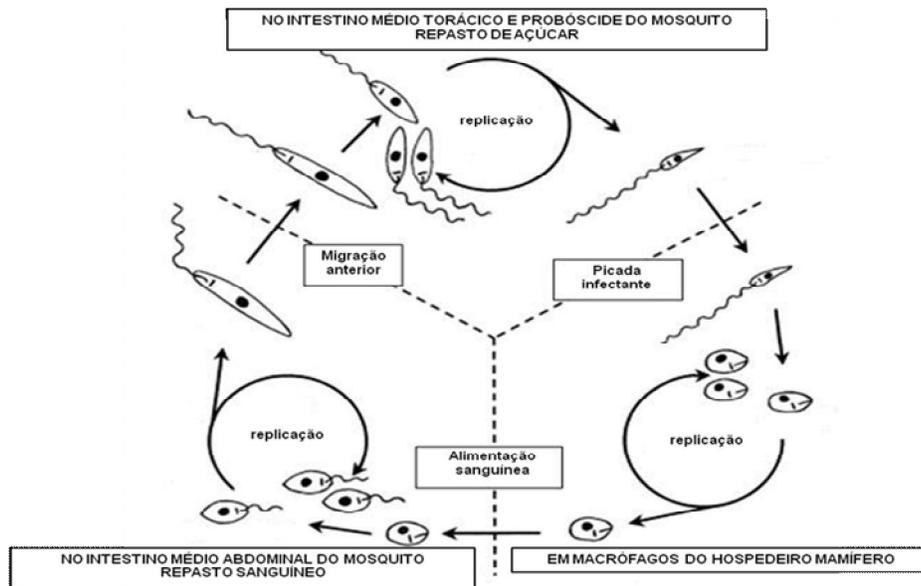


Figura 3: Desenvolvimento do parasito nos hospedeiros, destacando a metaciclogênese que ocorre no interior do hospedeiro invertebrado (Adaptado de Gossage, 2003).

1.3-Fatores epidemiológicos

As leishmanioses são zoonoses consideradas como um grande problema de saúde pública, representando um complexo de doenças com importante espectro clínico e diversidade epidemiológica. A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que 350 milhões de pessoas estejam expostas ao risco de infecção com registro aproximado de dois milhões de novos casos da doença em suas diferentes formas clínicas ao ano (Ministério da Saúde 2007).

A leishmaniose é uma doença de distribuição mundial, atingindo 88 países, dos quais 72 são países em desenvolvimento e 13 são países desenvolvidos. A incidência anual está estimada em 1 a 1,5 milhão de casos de leishmaniose cutânea (LC) e 500.000 de leishmaniose visceral (LV). Nem sempre é uma doença de notificação compulsória e

apenas em 33 dos 88 países é considerada uma doença endêmica (Desjeux 2004; Ministério da Saúde 2007).

Grande parte dos casos não é diagnosticada ou não notificada, em especial nos casos em que os pacientes não possuem acesso aos serviços de saúde (Desjeux 2004).

Em muitas áreas do mundo, ocorre um aumento no número de casos de leishmaniose. No Brasil, em 1998 havia 21.800 casos de LC e em 2002, este número aumentou para 40.000. No caso da LV, no nordeste do Brasil em 1998 ocorreram 1.840 casos novos e em 2002, 6.000 casos novos (figura 5) (Desjeux 2004).

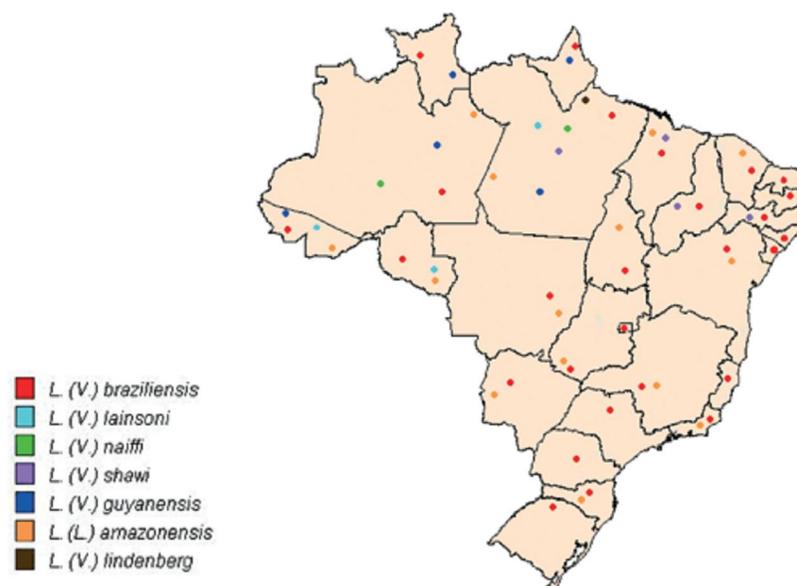


Figura 4: Distribuição de espécies de *Leishmania* responsáveis pela transmissão da leishmaniose tegumentar americana, Brasil – 2005 (Ministério da Saúde 2007).

Outro fator epidemiológico importante é que as leishmanioses visceral e tegumentar vêm surgindo como coinfeções com o vírus da imunodeficiência humana/síndrome da imunodeficiência adquirida (HIV/AIDS), adquirindo um caráter de doença oportunista (Desjeux 2004). Na África, principalmente Etiópia e Sudão, estima-se que 70% dos adultos com leishmaniose visceral também têm a infecção pelo HIV (Ngure *et al*, 2009)

As leishmanioses caracterizam-se como um grave problema de saúde pública. As perspectivas de controle são altamente dependentes do progresso científico para obtenção de melhorias das ferramentas que as controlem e uma melhor estratégia de custo efetivo para manejo e controle de vetores (Desjeux 2004).

1.4-Leishmaniose

A leishmaniose é uma doença grave que envolve três participantes centrais do ponto de vista biológico: o parasito, o inseto (hospedeiro invertebrado) e o ser humano (hospedeiro vertebrado). Tal doença é causada pelas espécies pertencentes ao gênero *Leishmania*, um grupo de protozoários flagelados da família *Trypanosomatidae* e ordem Kinetoplastida (Almeida 2003).

Os dípteros da subfamília Phlebotominae são os únicos vetores das várias espécies de *Leishmania*, sendo os gêneros *Phlebotomus* vetor das espécies no Velho mundo e *Lutzomyia* vetor das espécies de *Leishmania* nas Américas (figura 5). Eles são conhecidos por preferirem viver em florestas, florestas secundárias e áreas de rochas calcárias. Suas adaptações em proximidades de habitações têm facilitado a transmissão da doença e provocado a sua urbanização (Almeida 2003; Amóra 2009).

No Brasil, é uma doença endêmica e mostra um padrão de transmissão peridomiciliar principalmente porque algumas espécies de vetores se adaptaram às alterações ambientais. Além disso, a ocupação humana desordenada de áreas florestais possibilita a disseminação da doença em um ciclo extra-florestal. Essa redução do espaço ecológico dos vetores facilita a ocorrência das epidemias (Amóra 2009).

Os flebotomíneos têm hábitos crepusculares e noturnos permanecendo abrigados em seus nichos durante o dia. A sua ocorrência em algumas áreas também pode estar relacionadas a fatores climáticos como temperatura, precipitação e umidade relativa. Estes

dípteros se beneficiam de moderada precipitação durante a estação chuvosa, mas inundações são prejudiciais, porque destroem suas áreas reprodutoras e matam a pupa no solo. Além disso, as temperaturas mais baixas e maior disponibilidade alimentar para as larvas com as folhas caídas no outono podem estimular pupação em massa (Amóra 2009).



Figura 5: *Lutzomyia* sp: vilosidades e pêlos eretos, cabeça estreita na base, tórax mais elevado que a cabeça, asas lanceoladas, levantadas e cobertas de pêlos (UNMSN 2009).

A infecção humana pode ser totalmente inaparente ou subclínica ou pode apresentar um espectro de manifestações de envolvimento cutâneo, das mucosas até destruição generalizada sistêmica na forma visceral da doença com evolução fatal (Balaña-Fouce 1998).

A LV pode ser fatal se não tratada, visto que existem aproximadamente 500.000 casos de LV por ano em todo o mundo. A falta de sistemas de vigilância e o frequente subdiagnóstico tornam difícil estimar a real incidência e a taxa de letalidade da LV (Desjeux 2004).

A leishmaniose tegumentar americana (LTA) distribui-se amplamente no continente americano, estendendo-se desde o sul dos Estados Unidos até o norte da Argentina. No Brasil tem sido assinalada em todos os estados, constituindo, portanto, uma das afecções dermatológicas que merece maior atenção, devido ao risco de ocorrência de deformidades que pode produzir no homem, como também pelo envolvimento psicológico do doente,

com reflexos no campo social e econômico, uma vez que, na maioria dos casos, pode ser considerada uma doença ocupacional (Ministério da Saúde 2000).

As leishmanioses são divididas em dois grupos de doenças: leishmaniose tegumentar americana (LTA) que ocorre somente nas Américas e leishmaniose visceral (LV). A LTA inclui várias formas clínico-epidemiológicas relacionadas a diferentes subgêneros e espécies de *Leishmania* :

- Leishmaniose cutânea (LC): As espécies relacionadas no Novo Mundo são principalmente do complexo *L. (Leishmania) mexicana* (*L. amazonensis*, *L. mexicana* e *L. venezuelensis*) e do subgênero *Viannia* (*L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) panamensis*, *L. (V.) peruviana* e *L. (V.) guyanensis*). As manifestações clínicas são caracterizada por úlceras crônicas na pele, desenvolvidas no local da picada do inseto vetor e que podem levar meses para cicatrizar. É geralmente auto-resolutiva, mas que se apresenta como uma forma grave quando há lesões múltiplas (Desjeux 2004, Rey 2008).

- Leishmaniose cutâneo-difusa (LCD): relacionada com o complexo *L. mexicana*, no Novo Mundo. É caracterizada como uma doença crônica e poliparasitária, por lesões não ulcerativas, resistência a quimioterapia e anergia das células T *Leishmania* específicas. Não possui cura espontânea e é uma doença que surge devido à deficiência na resposta imune mediada por células. As lesões disseminadas se assemelham à Hanseníase (Desjeux 2004, Azeredo-Coutinho 2007, Rey 2008).

- Leishmaniose muco-cutânea (LMC): causada pelo subgênero *Viannia*, sendo as principais espécies representadas por *L. (V.) braziliensis* e *L. (V.) guyanensis*. Causa, no início, úlceras na pele que, entretanto, cicatrizam para depois reaparecerem, principalmente, nas mucosas do nariz e da boca, geralmente esta forma é acompanhada por infecções secundárias. Provoca a destruição das cartilagens e mucosas oro-nasal e faríngea se apresentando de forma mutilante (Desjeux 2004, Rey 2008:).

A leishmaniose visceral (LV) possui a *L. donovani* como a principal espécie causadora desta doença na Índia e Leste da África. A *L. (L.) infantum chagasi* é responsável pelos casos de LV na região mediterrânica e *L. chagasi* nas Américas. Esta é forma mais grave da leishmaniose, sendo freqüentemente fatal na ausência de tratamento. Os sintomas começam após um período longo de incubação (1-3 meses). O conjunto da doença é geralmente insidioso, febre irregular, acompanhada de sudorese, fraqueza e perda de peso gradual se torna perceptível. Em casos avançados podem desenvolver esplenomegalia, hepatomegalia, linfadenopatia e anemia. Edema e ascite podem desenvolver-se e, em casos não tratados, as mortes são comuns devido a doenças causadas por infecções bacterianas secundárias, como pneumonia, tuberculose ou disenteria (Balaña-Fouce 1998; Desjeux 2004).

No Brasil, a *L. chagasi* é a espécie mais comumente implicada em casos de leishmaniose visceral. A *L. amazonensis* é amplamente reconhecida como agente causador da leishmaniose cutânea na América Latina, mas também pode promover a leishmaniose visceral atípica com hepatite e linfadenopatia (Aleixo *et al*,2006).

1.5-Coinfecção *Leishmania*/HIV

Com o advento da AIDS, a ocorrência de leishmaniose visceral em indivíduos infectados com o vírus da imunodeficiência humana (HIV) aumentou em alguns países africanos, da região do Mediterrâneo e no Brasil (Matos *et al* 1998; Rabello *et al* 2003, Ngure *et al* 2009). Nessa correlação é possível observar alto risco de desenvolvimento de leishmaniose visceral, de forma rápida e grave (Garcia-Almagro 2005).

A coinfecção AIDS/leishmaniose se inclui num ciclo vicioso de reforço mútuo no qual as enfermidades produzem uma diminuição sinérgica da resposta imunitária ao destruírem as mesmas células (Garcia-Almagro 2005). A associação entre leishmaniose

tegumentar e infecção pelo HIV parece ser muito rara. Múltiplas lesões cutâneas com maior envolvimento das mucosas caracterizam o quadro clínico da leishmaniose tegumentar americana em associação com a infecção pelo HIV na maioria dos casos (Matos *et al* 1998). Manifestações atípicas variando de casos anérgicos paradoxais, profundidade das lesões ulcerativas, padrão esporotricóide e envolvimento cutâneo-mucoso, assim como uma resposta pobre a terapia padrão é observado como consequência da imunodeficiência em vários casos (Rosatelli *et al*, 1998; Padovese *et al*, 2009).

O uso de agulhas intravenosas em usuários de drogas de abuso permitem a transmissão direta pessoa a pessoa, constituindo um novo padrão de transmissão da leishmaniose em um novo ciclo convencional em pacientes coinfectados (Garcia-Almagro 2005).

O diagnóstico da coinfeção apresenta dificuldades específicas, devido fundamentalmente à destruição das mesmas células e conseqüentemente da resposta imunitária por ambos agentes infecciosos: falsa negatividade sorológica em pacientes coinfectados com outras doenças como toxoplasmose e tuberculose e dificuldade em diagnóstico parasitológico (Garcia-Almagro 2005).

O tratamento apresenta as mesmas dificuldades, por redução na eficácia dos medicamentos, recidivas por resistência ao tratamento e acúmulo de efeitos secundários (Garcia-Almagro 2005). Daí a grande importância na busca de fármacos com alvos específicos contra o parasito e com baixa toxicidade para o hospedeiro.

1.6-Metabolismo de *Leishmania* spp

Os Trypanosomatidae são caracterizados por alta flexibilidade de seu metabolismo energético. Eles possuem uma mitocôndria única em todas as fases de desenvolvimento que contribuem para a geração global de ATP variando significativamente de um membro

da família Trypanosomatidae para outro e de uma fase de ciclo de vida para outra. Em consequência, a contribuição do catabolismo de carboidratos para a geração de energia é também altamente variável (Opperdoes 1995).

Durante seu ciclo de vida, os parasitos adaptam seu metabolismo energético de acordo com o hospedeiro visando a disponibilização de substratos. Sendo carboidratos e aminoácidos os principais substratos para o gênero *Leishmania* (Cazzulo *et al* 1985).

A glicose é a principal fonte de energia para a maioria dos estágios dentro do hospedeiro vertebrado. Em *L. mexicana* a utilização de glicose é baixa e a oxidação de ácidos graxos é maior em amastigotas que promastigotas, o que significa um favorecimento da glicólise nestas últimas. O consumo de glicose por *Leishmania* sp é relativamente baixo se comparado a outros tripanossomatídeos, sendo maior em aerobiose que anaerobiose (Cazzulo *et al* 1992).

A glicose é metabolizada por parasitos do gênero *Leishmania* e outros tripanossomatídeos por meio da via glicolítica e a via da pentose fosfato (Maugeri 2003). Apesar de ter a glicólise ativa, algumas espécies de *Leishmania* preferem aminoácidos como a prolina e não a glicose como fonte de energia, entretanto o catabolismo de aminoácidos é mais utilizado pelas formas intracelulares deste protozoário (Tielens e Van Hellemond 1998).

Foi demonstrado que *L. mexicana* possui todas as enzimas da via glicolítica e do ciclo do ácido tricarboxílico. Uma menor parte dos carboidratos que participam do metabolismo energético é completamente oxidada a dióxido de carbono. A maioria dos produtos é parcialmente oxidada, como o acetato, piruvato e succinato. Estes também são produtos finais do metabolismo da glicose. O piruvato é degradado na mitocôndria, a este processo deu-se o nome de “fermentação aeróbia” (Martin *et al* 1976; Cazzulo 1992; Tielens e van Hellemond 1998).

Durante a fermentação aeróbia ocorre a excreção de ácidos orgânicos no meio de cultura, levando a uma diminuição no seu pH , principalmente nos casos em que há alto consumo de glicose (Louassini *et al* 1999).

a) Glicólise e glicossomo

Nos estudos com Trypanosomatidae, a glicólise ocorre por meio da via Embden-Meyerhoff dos quais as primeiras enzimas ficam no interior de uma organela: o glicossomo. A ordem Kinetoplastida, a que a família Trypanosomatidae pertence, possui organismos em que se encontraram esse tipo de compartimentalização. O glicossomo é um membro da família de microcorpos a que também pertencem os peroxissomos, presentes em quase todas as outras células eucarióticas (Opperdoes 1995).

Os organismos pertencentes ordem Kinetoplastida desenvolveram vias alternativas do catabolismo de carboidratos. Considerando que a maior parte das outras células eucarióticas, incluindo a de mamíferos possui todas as enzimas da via glicolítica em compartimentos citosólicos, os parasitos da ordem Kinetoplastida possuem de uma a sete enzimas da glicólise, duas enzimas do metabolismo do glicerol e várias enzimas da via da pentose fosfato encontrados em uma organela distinta, o glicossomo (figura 6) (Verlinde 2001; Opperdoes 2001).

As enzimas presentes no glicossomo são a hexoquinase que é a primeira enzima da via glicolítica, fosfofrutoquinase, frutose-1,6-bifosfatase, gliceraldeido-3-fosfato desidrogenase que possui dois tipos de isoenzimas, uma no citosol e uma no glicossomo. Enquanto a enzima glicossomal está diretamente envolvida na glicólise. A função destas isoenzimas citosólicas ainda não está clara. Encontra-se ainda a glicerol-3-fosfato desidrogenase que é uma enzima NAD-dependente, gliceroquinase, fosfoglicerato que têm

descritas duas isoenzimas para as espécies de *Leishmania* (Galbraith 1991, Urbina 1994; Verlinde 2001; Opperdoes 2001).

No citosol podem ser encontradas enzimas como a piruvato quinase que é a última enzima da via glicolítica, envolvida na transferência do grupo fosfato do fosfoenolpiruvato para o ADP e a glicose-6-fosfato desidrogenase responsável pela oxidação da glicose-6-fosfato. Enquanto na mitocôndria encontra-se a citrato sintase, α -cetoglutarato desidrogenase, 13-succinato desidrogenase e a piruvato carboxilase. Os níveis de algumas enzimas glicolíticas são maiores em promastigotas, entretanto a fosfoenol piruvato carboxiquinase (PEPCK) e a malato desidrogenase são mais elevados em amastigotas (Galbraith 1991; Cazzulo 1992; Lehninger 2006).

A enzima glicossomal gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (gGAPDH) exerce grande controle sobre fluxo glicolítico e tem mostrado ser um bom alvo para o planejamento de fármacos contra tripanossomatídeos. O consumo de glicose por *Leishmania* sp é relativamente baixo se comparado a outros tripanossomatídeos, sendo maior em aerobiose do que em anaerobiose (Cazzulo 1992; Verlinde 2001).

O piruvato é o produto final da glicólise e é freqüentemente degradado por uma mitocôndria única (Cazzulo 1992).

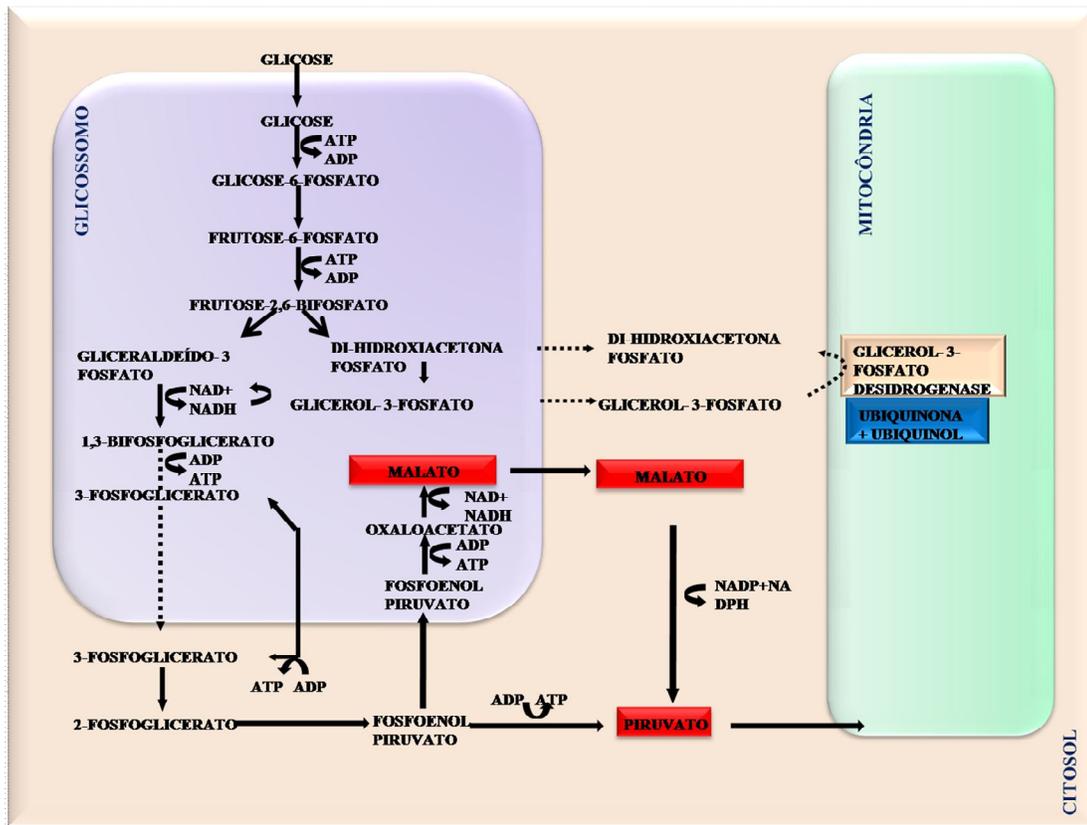


Figura 6: Esquema da glicólise no metabolismo aeróbio de *Leishmania* spp. (modificado de: Tielens e Van Hellemond 1998)

b) Ciclo de Krebs

A glicose também pode ser metabolizada por uma via alternativa à glicólise, a via da pentose fosfato (figura 7). Embora o papel da glicólise seja a geração de ATP e piruvato, a via da pentose fosfato é essencialmente envolvida na manutenção de NADPH celular, que podem servir como doadores de hidrogênio na biossíntese redutora, ou seja, na defesa contra o estresse oxidativo (Verlinde 2001; Opperdoes 2001).

As promastigotas de *Leishmania* possuem um metabolismo energético no qual pequena parte do carboidrato é oxidado completamente em CO₂, via ciclo de Krebs, mas

grande parte é oxidado em produtos como acetato e succinato. Uma parte do piruvato é transaminado em alanina que é excretada (Blum 1993; Cazzulo 1992).

No parasito a NADH fumarato-redutase age sobre o fumarato gerando succinato, revertendo dessa forma um ponto no ciclo do ácido tricarboxílico (Urbina, 1994; Turrens, 2004). Nas formas promastigotas de *Leishmania* spp, o succinato é um dos principais produtos gerado pelo ciclo do ácido tricarboxílico (Tielens e Van Hellemond 1998).

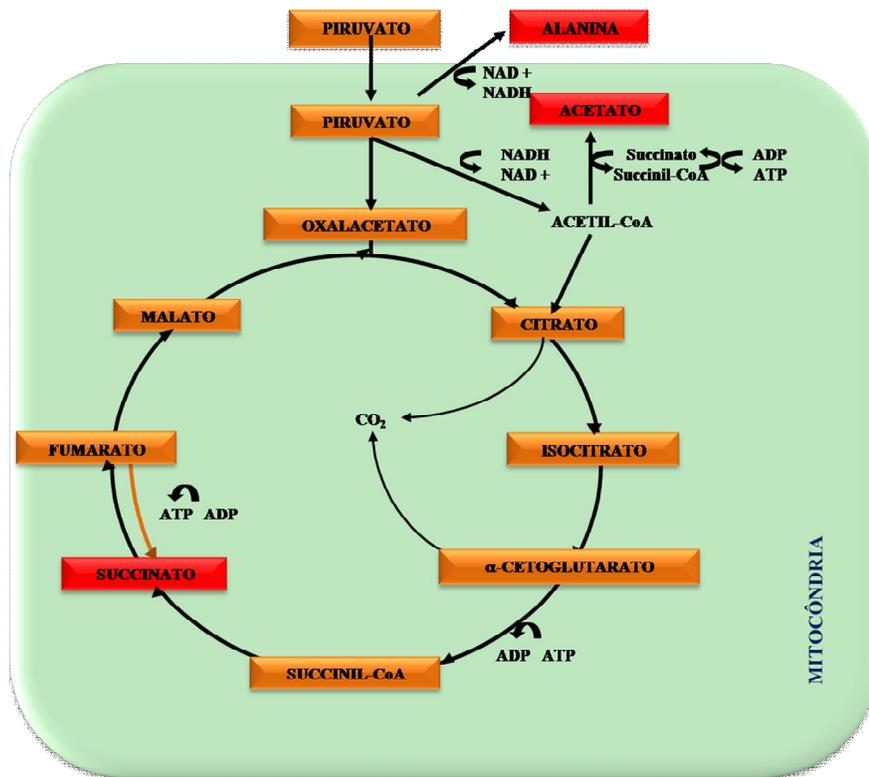


Figura 7: Esquema do ciclo de Krebs no metabolismo aeróbio de *Leishmania* spp, com destaque à inversão parcial do ciclo de fumarato à succinato. Produtos finais: acetato, alanina e succinato (modificado de: Tielens e Van Hellemond 1998).

c) Cadeia respiratória

Nas promastigotas, parte dos produtos finais oxidados são resultados do metabolismo aeróbio envolvendo uma cadeia transportadora de elétrons com um aceptor final, o oxigênio (figura 8). O succinato produzido durante incubações de promastigotas em condições aeróbias é principalmente produzido via oxidativa envolvendo parte do ciclo de Krebs (de oxalacetato via citrato até succinato) e oxidação de NADH via cadeia respiratória que é uma via já bem estudada em vertebrados (Van Hellemond *et al* 1997).

As formas amastigotas são intracelulares e possuem uma mitocôndria reduzida denominada pró-mitocôndria. Isto sugere um metabolismo aeróbio ou anaeróbio facultativo, semelhante nas promastigotas, porém ambos os estágios são dependentes da atividade do ciclo de Krebs e da cadeia respiratória semelhante aos mamíferos, embora os ácidos graxos provavelmente sejam os mais importantes substratos para os estágios no inseto, como na *L. mexicana* (Hart e Coombs 1982).

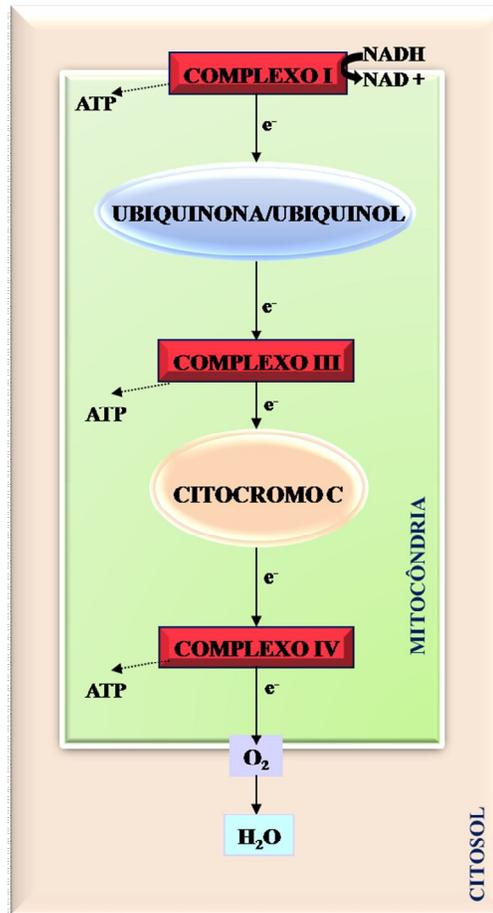


Figura 8: Esquema da cadeia respiratória no metabolismo aeróbio de *Leishmania* spp.

(modificado de: Tielens e Van Hellemond 1998).

1.7-Bases bioquímicas para o tratamento das leishmanioses

Os antimoniais pentavalentes estibogluconato de sódio (Pentostam) e antimoniato de meglumina (Glucantime) são os fármacos de primeira linha em casos de diferentes tipos de leishmanioses (visceral e cutânea). A depleção de níveis de ATP intracelular pela interferência do fluxo glicolítico e β -oxidação dos ácidos-graxos em amastigotas é o principal modo de ação dos antimoniais pentavalentes. Estes medicamentos, embora façam parte do tratamento de escolha, apresentam elevada toxicidade e dificuldade de administração (Balaña-Fouce 1998; Berman 2003; Blum *et al* 2004).

A miltefosina foi estabelecida como o primeiro fármaco de administração oral contra a leishmaniose visceral. Outros alquil-fosfolípidos, como edelfosina foram testados contra a *Leishmania* mostrando uma atividade antiparasitária *in vitro*. A atividade *in vitro* da perifosina tem sido demonstrada previamente contra diferentes espécies de *Leishmania* incluindo *L. amazonensis*, sendo uma grande possibilidade dentro dos alquil-fosfolípidos (Cabrera-Serra *et al*, 2008).

O tratamento da leishmaniose visceral com fármacos convencionais como os antimoniais, anfotericina B, pentamidina, alopurinol, dão poucos resultados em pacientes com HIV, visto que mais de 40% deles têm persistência das infecções crônicas, demonstrando a importância da resposta imune durante a quimioterapia (Balaña-Fouce 1998).

O maior avanço na quimioterapia da leishmaniose é o uso das formulações lipídicas de anfotericina B. Este antifúngico é considerado como segunda linha no tratamento devido a seus efeitos secundários negativos. Seu mecanismo de ação é baseado no peculiar metabolismo de esteróis de *Leishmania*. Em contraste com o hospedeiro, a 24-ergosterol é o principal esteroide sintetizado presente na membrana deste protozoário. A anfotericina B liga-se a essas moléculas, criam poros que permitem o vazamento de íons, ou seja, muda a composição do esteroide, altera sua permeabilidade e mata o parasito. É o fármaco de escolha nos casos de resistência aos antimoniais (Balaña-Fouce 1998, Gontijo e Carvalho 2003; Ouellette *et al* 2004; Murray 2005).

A azitromicina é um macrolídeo e foi desenvolvido no final dos anos 80 e é utilizada no tratamento de infecções bacterianas também utilizada no tratamento de protozoários como *Leishmania sp*, *Plasmodium sp* e *Toxoplasma gondii*. É uma boa opção terapêutica no tratamento das leishmanioses, pois é bem tolerada pelos pacientes, de baixo custo e simples administração, entretanto sua resposta é mais lenta quando comparada aos

antimoniais pentavalentes. Além de processos patológicos presentes, como a inflamação, fatores como a diminuição do pH, podem interferir na ação da azitromicina (Prata *et al* 2003).

Também é relatado como agente antiparasitário, a aminosidina (paramomicina) no qual o mecanismo de ação contra protozoários ainda é desconhecido. É de uso parenteral, podendo ser administrado em associação com os antimoniais (Croft 1997; Armijos *et al* 2004).

A pentamidina e outras diamidinas aromáticas, não são de uso comum no Brasil, foram sintetizadas como fármacos hipoglicemiantes quando seu perfil terapêutico anti-protozoários foi descoberto. Possuem alta estabilidade química, fácil administração e baixa toxicidade. (Balaña-Fouce 1998). Entram nas formas promastigotas e amastigotas de *Leishmania* através de um processo transportador mediado, pelo qual as diamidinas com alta afinidade são reconhecidas. A mitocôndria é um alvo importante das pentamidinas e este fármaco está envolvido na ligação e desintegração do DNA do cinetoplasto (kDNA) (Coelho *et al*, 2008).

O alopurinol atua inibindo a síntese de purinas do parasito, geralmente é utilizado em associação com outros fármacos (Balaña-Fouce 1998).

A utilização de fármacos simbióticos, que são aqueles capazes de atuar em mais de um alvo terapêutico têm se mostrado uma alternativa ao tratamento anti-*Leishmania*, como por exemplo, antibióticos (azitromicina), vasodilatadores (nimodipina), análogos curcuminóides, antifúngicos (anfotericina B) (Sinagra *et al* 2007, Tempone *et al* 2009, Changtam *et al* 2010).

1.8-Zidovudina

A zidovudina (3' azido-2'-3' – dideoxi-timidina; azidotimidina; AZT) é um análogo da timidina e pertence à classe de fármacos chamada de análogo-nucleosídeo inibidores da transcriptase reversa e tem sido utilizada em tratamento de indivíduos HIV-positivos nos últimos anos (figura 9). Este fármaco apresenta uma atividade seletiva pela enzima transcriptase reversa do HIV que, por sua vez, é antagônico à DNA-polimerase humana (Veal 1995; Lynx 2006).

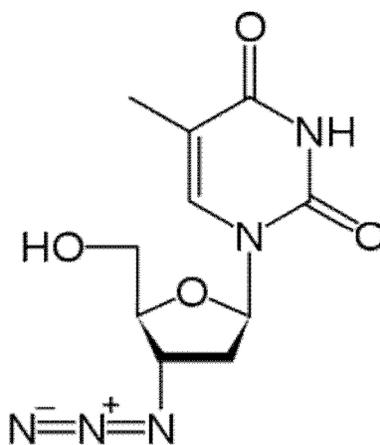


Figura 9: Estrutura química da zidovudina (3'-azido-2',3'-deoxitimidina) (Retirado de Wikipedia 2010).

A zidovudina é estruturalmente relacionada com o nucleosídeo endógeno timidina do qual difere apenas na substituição do grupo hidroxila na posição 3' do anel de ribose por um grupo azido não-reativo (Veal 1995).

Após a difusão do fármaco para o interior da célula do hospedeiro, a zidovudina é inicialmente fosforilada pela timidina quinase. Em seguida é transformada pela difosfato timidilato cinase, de modo que níveis elevados de monofosfato, porém níveis muito mais baixos de difosfato e trifosfato são encontrados nas células. O fármaco não pode ser

administrado na forma fosforilada, porque a fosforilação evita absorção celular. Uma vez fosforilado, a zidovudina se torna um substrato para a síntese de DNA (Lipsky 1996).

O trifosfato de zidovudina, que tem uma meia-vida intracelular de eliminação de 3-4 horas, inibe a transcriptase reversa em competição com o trifosfato de timidina. A transcriptase reversa transcreve as cadeias infectantes de RNA dos vírus em moléculas complementares de DNA que se integram no genoma da célula hospedeira. Esta usa RNA ou DNA como moldes genéticos. A enzima é codificada pelo RNA viral e se encontra alojada no interior de cada capsídeo viral, durante a produção de novas partículas virais (Graham 2009).

A seletividade antiviral da zidovudina se deve à sua maior afinidade pela transcriptase reversa do HIV do que pelas DNA polimerases humanas (Graham 2009).

Como a zidovudina carece do grupo hidroxil na posição 3', outro nucleotídeo não pode ser adicionado a ele, porque a ligação fosfodiéster 3'-5' na cadeia de DNA não pode ser formada. Assim, são conhecidos como análogos nucleosídicos terminadores de cadeia, uma vez que a cadeia de DNA é encerrada com a incorporação do dideoxynucleotídeo. O término da síntese viral impede a replicação do vírus (Lipsky 1996).

Alguns derivados nucleosídicos têm demonstrado propriedades leishmanicidas. Por exemplo, a sinefugina, um antibiótico nucleosídeo natural produzido por *Streptomyces griseolus*, é estruturalmente relacionado para S-adenosil-L-metionina, exibe forte atividade antifúngica e antiparasitária tanto *in vitro* quanto *in vivo* (Peyron *et al* 2005).

Outro derivado é a 5'-substituído-2'-deoxiuridina que apresenta boa atividade leishmanicida *in vitro* contra formas promastigotas e amastigotas de *L. donovani* (Peyron *et al* 2005).

A quimioterapia da leishmaniose é ainda baseada em antimoniais pentavalentes e, em casos de resistência para antimoniais, a anfotericina B. Existe um progresso das novas

formulações de anfotericina B com capacidade de reduzir a toxicidade e aumentar o efeito leishmanicida do fármaco assim como o uso de miltefosina oral com a mesma finalidade. No entanto, ainda há necessidade urgente de novas moléculas com atividade contra *Leishmania* sp pois existem algumas limitações toxicológicas e econômicas desses fármacos (Peyron *et al* 2005).

Devido ao mecanismo de ação universal da zidovudina, visto que um fármaco análogo-nucleosídeo pode apresentar alvo terapêutico em vários tipos celulares, propõe-se seu emprego como fármaco simbiótico especialmente em terapia de doenças negligenciadas.

II-OBJETIVOS

Objetivo geral

Avaliar a taxa de sobrevivência, morfologia e metabolismo *in vitro* de formas promastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis* expostas a diferentes concentrações de zidovudina.

Objetivos específicos

1. Avaliar a sobrevivência das formas promastigotas *in vitro* expostas a diferentes concentrações de zidovudina.
2. Analisar as alterações morfométricas das formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis* sob as diferentes concentrações de zidovudina sobre as formas promastigotas.
3. Identificar as alterações no metabolismo energético e respiratório de formas promastigotas de *L.(L.) amazonensis* expostas a diferentes concentrações de zidovudina.

III-MANUSCRITOS

Normas segundo a revista Parasitology Research.

3.1- EFEITOS DA ZIDOVUDINA (AZT) NAS TAXAS DE SOBREVIVÊNCIA E MORFOMETRIA DE PROMASTIGOTAS DE *Leishmania (L.) amazonensis*.

3.2-METABOLISMO ENERGÉTICO E RESPIRATÓRIO DE PROMASTIGOTAS DE *Leishmania (L.) amazonensis* EXPOSTAS A DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE ZIDOVUDINA

Manuscrito 1

**EFEITOS DA ZIDOVUDINA (AZT) NAS TAXAS DE SOBREVIVÊNCIA E
MORFOMETRIA DE PROMASTIGOTAS DE *Leishmania (L.)amazonensis*.**

Araújo CA¹, Batista CL¹, Oliveira MAP¹, Oliveira V², Lino Junior RS¹, Vinaud M C¹,
Bezerra JCB¹

¹ Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública IPTSP/UFG

² Laboratório de Bioconversão LaBioCon/FF/UFG

E mail: carolinaaguia@gmail.com

Resumo: Os protozoários pertencentes ao gênero *Leishmania*, agentes causadores da leishmaniose, apresentam duas fases de crescimento *in vitro* de formas promastigotas, a logarítmica e a estacionária. A quimioterapia da leishmaniose é ainda baseada em antimoniais pentavalentes os quais possuem diversas limitações econômicas e toxicológicas, além dos relatos do surgimento de cepas resistentes. Alguns derivados nucleosídicos têm demonstrado propriedades leishmanicidas e este trabalho visa avaliar a sobrevivência e morfologia de promastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis* expostas a diferentes concentrações de zidovudina (AZT). Primeiramente foi realizado ensaio de toxicidade em macrófagos para avaliar a dose letal (DL50) do fármaco (em μM). Em seguida os testes *in vitro* de zidovudina em promastigotas de *L. (L.) amazonensis* foram realizados avaliando o crescimento dos parasitos durante sete dias sob as concentrações de 1; 10; 20; 30; 40 e 50 μM . No terceiro e sexto dias de crescimento parasitário foram confeccionadas lâminas, as promastigotas fotografadas e as imagens analisadas pelo programa Image J para análise das características morfológicas dos parasitos. A análise estatística foi realizada utilizando-se o programa Sigma Stat 3.2. Observou-se que há redução quantitativa de parasitos na fase logarítmica de crescimento nas maiores concentrações testadas. Foram encontradas diferenças nos parâmetros morfométricos analisados tanto na fase logarítmica quanto estacionária das promastigotas sob ação de todas as concentrações de zidovudina como o aumento na largura dos parasitos à medida que se aumentam as concentrações. Além do aparecimento de granulações e vacuolizações no citoplasma dos parasitos. Estes dados demonstram a atividade leishmanicida *in vitro* de baixas doses do AZT, que se apresenta como uma alternativa terapêutica promissora para o tratamento das leishmanioses.

Palavras-Chave: *Leishmania (L.) amazonensis*, morfometria, promastigotas.

1-Introdução:

A leishmaniose é uma doença grave, podendo causar lesões desfigurantes e até o óbito. É causada pelas espécies pertencentes ao gênero *Leishmania*, um grupo de protozoários flagelados da família *Trypanosomatidae* e ordem Kinetoplastida (Almeida, 2003). Os parasitos do gênero *Leishmania* apresentam em seu ciclo de vida heteroxeno apenas duas formas evolutivas: a forma promastigota, que é flagelada e extracelular, e a forma amastigota, que é intracelular e sem movimentos. Existem evidências da existência de distintas formas promastigotas: procíclicas e metacíclicas, na qual a promastigota metacíclica é a fase final de desenvolvimento no vetor e altamente infectante. O processo de transformação da promastigota procíclica em metacíclica é conhecido como metaciclogênese. (Sacks 1989; Gossage 2003; Saraiva 2005).

A quimioterapia da leishmaniose é baseada em antimoniais pentavalentes e, em casos de resistência para antimoniais, indica-se a utilização da anfotericina B. No entanto, ainda há necessidade urgente de novas moléculas com atividade contra *Leishmania* sp pois existem algumas limitações toxicológicas e econômicas impedindo a ampla utilização desses fármacos, além do desenvolvimento de resistência do parasito aos seus princípios ativos (Peyron *et al* 2005).

Alguns derivados nucleosídicos têm demonstrado propriedades leishmanicidas como, por exemplo, contra formas promastigotas e amastigotas de *Leishmania donovani*. (Peyron *et al* 2005). O objetivo deste trabalho é avaliar a sobrevivência e alterações morfológicas de formas promastigotas *in vitro* de *Leishmania (L.) amazonensis* expostas a diferentes concentrações de zidovudina.

2-Metodologia:

2.1- Toxicidade da zidovudina em fagócitos mononucleares humanos

Para ensaio da toxicidade em macrófagos foi utilizada a linhagem celular U937, que são monócitos humanos de linfoma histiocitário descritos por Sundstrom e Nilsson em 1974. Estas células foram mantidas em meio de cultura RPMI-1640 (Sigma Chemical Co) acrescido de 10% de soro fetal bovino (LGC, Rio de Janeiro, Brasil), 2mM de L-glutamina (Sigma Chemical Co), 100U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina (Sigma Chemical Co), denominado RPMI completo. A cultura foi feita numa atmosfera de 95% de ar e 5% de dióxido de carbono (CO₂) a 37°C. Em placas de cultura de 96 poços (Costar), a cada poço contendo 1x10⁶ células/mL foi acrescido solução de zidovudina nas concentrações a serem testadas. Após incubação nas condições descritas anteriormente, o experimento foi parado depois de 72 horas e a viabilidade celular dos monócitos checada utilizando 30µL de MTT (substrato tetrazólio) em cada poço e após 4h acrescido 100µL de SDS, finalizando a reação depois de mais 24h de incubação. Sendo este um método colorimétrico a leitura de concentração realizou-se em absorbância num comprimento de onda de 560 nm. A dose letal (DL 50) foi determinada por análise de regressão linear expressa em µM ± SD e a concentração máxima tolerada (“MTC”) expressa em µM foi avaliada para este fármaco (Peyron *et al* 2005; ATCC 2009).

2.2- Cultura de formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis*

As formas promastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis* (IFLA/BR/1967/PH8) foram cedidas pelo Laboratório de Citocinas do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás para o cultivo destes parasitos realizado em meio líquido Grace (Grace's Insect Medium – Gibco®) acrescido de 20% de soro fetal bovino

estéril e inativado, 2 mM de L-glutamina, 100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina (Sigma Chemical Co.) mantidos em placas de cultura de 24 poços em estufa de 26°C. Dessa forma, estas amostras serviram para avaliar as formas promastigotas sob tensão normal de O₂.

2.3- Atividade leishmanicida

As formas promastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis* foram submetidas às concentrações de 1; 10; 20; 30; 40 e 50 µM de AZT que foram previamente diluídos em dimetilsulfóxido (DMSO).

O ensaio foi realizado em placas de 24 poços no qual em cada poço continha leishmânias na concentração de 2×10^5 *Leishmania*/mL e as concentração de AZT a serem testadas bem como um grupo controle contendo somente os parasitos e outro grupo contendo leishmânias e DMSO, nas concentrações utilizadas para diluição do fármaco.

As placas foram mantidas nas condições descritas anteriormente e realizada a contagem de leishmânias presentes em cada poço diariamente, separando amostras no 3º dia (fase logarítmica) e 6º dia (fase estacionária) para confecção de lâminas e realização de testes bioquímicos.

Para a contagem, as amostras foram diluídas em formaldeído tamponado a 0,2% (diluição 1:10) e então realizada a contagem em câmara de Newbauer. A curva foi realizada em quintuplicata e o crescimento das formas promastigotas foi acompanhado diariamente durante 7 dias consecutivos.

2.4-Análise morfométrica

Após realização das culturas de promastigotas, estes foram coletados no 3º e 6º dias de crescimento e colocados em lâmina, fixados com metanol e corados pelo método

Panótipo (Instant Prov, Pinhais, PR, Brasil). As formas promastigotas foram fotografadas com utilização de fotomicroscópio Zeiss acoplado a uma câmera digital Sony para registro e digitalização dos resultados obtidos. As imagens foram analisadas utilizando-se o programa Image J onde foram avaliadas características morfológicas dos parasitos como: granulações nucleares, alterações no comprimento e/ou largura celulares e comprimento do flagelo. Estas variáveis foram avaliadas nos grupos teste e nos grupos controle.

2.5-Análise estatística

Foi realizada por meio do programa Sigma Stat 3.2. Todas as variáveis foram testadas quanto à distribuição normal e variância homogênea. Quando a distribuição for considerada normal e com variância homogênea foram utilizados testes paramétricos. Em 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 $p < 0,05$.

3-Resultados e discussão:

Este trabalho avaliou a atividade anti-*Leishmania* do AZT por meio de determinação de alterações na curva normal de crescimento e se o fármaco alterou a morfologia das formas promastigotas, observados em dois momentos distintos do crescimento.

3.1-Citotoxicidade

Para se verificar o índice de citotoxicidade neste estudo, foi realizada uma triagem inicial de citotoxicidade nas concentrações de 0,01; 0,1; 1; 10 e 100 μM , de onde observou-se que concentrações superiores a 50 μM apresentavam alta letalidade para os macrófagos. Portanto, determinou-se um redirecionamento da triagem de citotoxicidade no qual as

concentrações testadas em macrófagos foram de 1; 10; 20; 30; 40 e 50 μM . Analisando-se as absorbâncias após o teste com MTT, determinou-se que a DL50 de AZT corresponde a 30 μM . Portanto, determinou-se que as concentrações testadas nas formas promastigotas seriam de 1 a 50 μM .

Estes resultados estão de acordo com a literatura, que indica que a citotoxicidade da AZT foi avaliada em outros estudos em diversos tipos celulares humanos e de murinos além de protozoários expressando índices de letalidade celular maiores de 50% (IC 50) em diversas concentrações, inclusive em concentrações compatíveis com as detectadas em nosso trabalho (Peyron *et al* 2005; Storch 2007; Giampieri 2009)

3.2-Curvas de crescimento

Foram estabelecidos dois grupos controle, o primeiro somente com formas promastigotas em meio de cultura e o segundo com esses parasitos acrescidos de DMSO na maior concentração de diluição dos fármacos em meio de cultura. As médias da contagem das formas promastigotas referentes a estes grupos podem ser observada na tabela 1. Não se observou diferença no crescimento das formas promastigotas entre os grupos controles. Isto indica que o DMSO utilizado para a diluição das concentrações de AZT não teve influência no crescimento das formas promastigotas.

Entre as concentrações analisadas observou-se diferença significativa nas concentrações de 30, 40 e 50 μM entre o 1º e 3º dias de crescimento (fase logarítmica), quando comparados aos grupos controle. Indicando que a fase logarítmica, de intensa multiplicação celular, é sensível à presença destas concentrações do fármaco.

Enquanto que no 7º dia da curva de crescimento, observou-se uma diferença na comparação entre as concentrações de 20, 30, 40 e 50 μM e grupo controle.

Tabela 1: Médias (\pm desvio padrão) das curvas de crescimento de formas promastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis* expostas a diferentes concentrações de zidovudina.

	<i>Dia 0</i>	<i>Dia 1</i>	<i>Dia 2</i>	<i>Dia 3</i>	<i>Dia 4</i>	<i>Dia 5</i>	<i>Dia 6</i>	<i>Dia 7</i>
	(x 10 ⁵)							
Controle	2	24	177,7	210,6	214,4	202	235	207,6
		($\pm 7,4$) *	($\pm 54,6$) *	($\pm 106,2$) *	($\pm 114,2$) *	($\pm 113,1$) *	($\pm 114,3$) *	($\pm 94,7$) *
Controle com DMSO	2	18,25	118,7	209	203,25	188,25	252,75	207,25
		($\pm 7,4$) *	($\pm 79,5$) *	($\pm 30,5$) *	($\pm 78,7$) *	($\pm 43,6$) *	($\pm 115,1$) *	($\pm 90,9$) *
AZT 1 μM	2	12,46	71	154,4	190,8	194,6	245,2	163,8
		($\pm 2,6$)	($\pm 10,5$)	($\pm 48,5$)	($\pm 55,9$)	($\pm 32,4$)	(± 127)	($\pm 32,2$)
AZT 10 μM	2	14,2	109	171,3	201	165,3	159	159
		($\pm 8,4$)	($\pm 41,5$)	($\pm 67,4$)	($\pm 66,5$)	($\pm 18,4$)	($\pm 112,8$)	($\pm 79,1$)
AZT 20 μM	2	11	72	133,2	193	172,2	175	87
		($\pm 4,5$)	($\pm 18,7$)	($\pm 51,1$)	($\pm 43,6$)	($\pm 51,5$)	($\pm 69,1$)	($\pm 21,6$)
AZT 30 μM	2	8,6	48	81	139	168,2	168	65,4
		($\pm 5,3$)	($\pm 5,2$)	($\pm 44,4$)	($\pm 96,3$)	($\pm 62,4$)	($\pm 58,7$)	(± 30)
AZT 40 μM	2	5,875	31,66667	72	106,5	151,75	130,25	74,5
		($\pm 2,4$)	($\pm 14,6$)	($\pm 47,1$)	($\pm 100,2$)	($\pm 64,2$)	($\pm 125,5$)	($\pm 41,7$)
AZT 50 μM	2	7,9	10	25,6	61,2	84,4	80,8	56,6
		($\pm 6,4$)	($\pm 1,7$)	($\pm 33,1$)	(± 92)	($\pm 81,4$)	($\pm 87,3$)	($\pm 57,2$)

*p<0,05. (ANOVA), quando comparou-se os controles com todos os grupos teste.

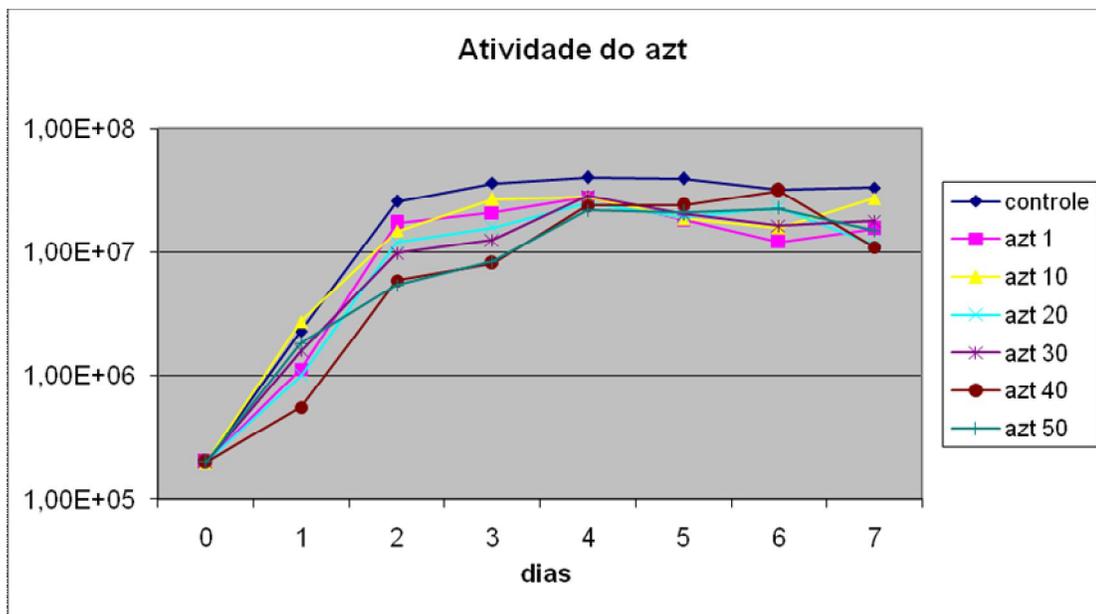


Figura 1: curvas de crescimento de promastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis* expostas a diferentes concentrações de AZT(µM).

Não se encontrou na literatura trabalhos avaliando a atividade de AZT em formas promastigotas na fase logarítmica e estacionária de *Leishmania sp.* Entretanto, alguns trabalhos indicam que o AZT induz significativamente possíveis alterações na membrana mitocondrial isoladas, atuando na biogênese do DNA mitocondrial (mtDNA) causando alterações morfológicas e depleção do mt DNA em tratamentos a longo prazo ou em testes *in vitro* e também na translocação do ATP mitocondrial (Cazzalini 2001; Dias 2005).

O AZT pode causar insuficiência no metabolismo do mtDNA levando a uma redução dele a nível celular e citotoxicidade. Alguns análogos nucleosídicos (similares ao AZT) são capazes de reduzir o mtDNA através da inibição da síntese DNA polimerase δ mitocondrial e da replicação do mtDNA. Embora estes análogos nucleosídicos tenham propriedades *in vitro* em células de mamíferos esgotando mtDNA levando à perda, retardamento do crescimento e viabilidade celular, o exato papel da mitocôndria no mecanismo de ação dessas fármacos deve ser esclarecido. Além de prejudicar a função da

mtDNA polimerase δ , o AZT também é conhecido por inibir a telomerase, o translocador das atividades ADP / ATP mitocondrial e enzimas da fosforilação oxidativa (Dias 2005). Esta atividade do fármaco no funcionamento mitocondrial pode explicar a baixa sobrevivência de promastigotas em fase logarítmica expostas ao AZT além de elucidar a possível causa das alterações morfológicas citadas abaixo.

Devido ao processo de intensa multiplicação das formas promastigotas no terceiro dia de cultivo de *L.amazonensis* e à sua grande atividade celular decorrente desse processo o fármaco se mostrou mais ativo nesta fase.

3.3-Análise morfométrica:

A morfometria foi realizada nas formas promastigotas em fase logarítmica (3º dia) e estacionária (6º dia) nos grupos controles e testes.

Observou-se diferença na morfometria das formas promastigotas nos seguintes parâmetros: comprimento do corpo, largura do corpo e comprimento do flagelo.

Tabela 2. Média (\pm desvio padrão) da morfometria de formas promastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis* expostas a diferentes concentrações de zidovudina.

	<i>Comprimento do corpo</i> μm		<i>Largura do corpo</i> μm		<i>Comprimento Flagelo</i> μm	
	3º dia	6º dia	3º dia	6º dia	3º dia	6º dia
Controle	10 $\pm 2,56^*$	8,24 $\pm 2,56^*$	2,44 $\pm 0,76^*$	2,93 $\pm 1,09^*$	13,05 $\pm 2,76^*$	13,87 $\pm 4,19^*$
Controle DMSO	9,97 $\pm 2,53^*$	10,18 $\pm 2,30^*$	2,53 $\pm 0,88^*$	2,74 $\pm 0,71^*$	13,08 $\pm 2,87^*$	13,73 $\pm 2,78^*$
AZT 1 μM	6,15 $\pm 1,95$	6,15 $\pm 1,37$	3,78 $\pm 1,71$	2,12 $\pm 0,70$	10,73 $\pm 3,37$	8,49 $\pm 2,73$
AZT 10 μM	7,74 $\pm 1,81$	6,39 $\pm 1,49$	3,75 $\pm 1,12$	1,72 $\pm 0,47$	10,68 $\pm 2,77$	8,88 $\pm 2,04$
AZT 20 μM	7,86 $\pm 1,75$	6,68 $\pm 1,95$	3,99 $\pm 1,01$	2,90 $\pm 1,52$	11,45 $\pm 2,02$	10,35 $\pm 3,76$
AZT 30 μM	7,86 $\pm 2,34$	5,75 \pm 1,16	3,63 $\pm 0,97$	2,70 $\pm 1,19$	10,92 $\pm 2,18$	12,98 $\pm 3,08$
AZT 40 μM	8,29 $\pm 2,18$	6,80 $\pm 1,24$	3,70 $\pm 1,24$	2,93 $\pm 0,79$	10,88 $\pm 2,82$	12,36 $\pm 1,52$
AZT 50 μM	8,28 $\pm 1,93$	6,27 $\pm 1,27$	3,74 $\pm 1,66$	2,34 $\pm 0,71$	10,95 $\pm 2,00$	11,44 $\pm 3,64$

* $p < 0,05$ (ANOVA), quando comparou-se os controles com todos os grupos teste.

Não houve diferença entre os controles, indicando que o DMSO não altera a morfologia dos parasitos.

Com relação ao comprimento do corpo, observou-se que o fármaco levou a diminuição do comprimento em todos os grupos testados, sendo que as formas promastigotas do 3º dia foram maiores do que as do 6º dia ($p < 0,05$). Santana *et al* (2005) relatam que as formas promastigotas de fase estacionária apresentam dimensões do corpo

8,68 μm x 1.2–1.5 μm , dados que estão de acordo com os valores encontrados nos grupos controles deste trabalho, tanto em relação ao comprimento do corpo quanto em relação à largura.

Ao analisar a largura do corpo, o grupo controle foi estatisticamente menor que os grupos teste em todas as concentrações tanto no 3º quanto no 6º dia.

Quanto ao comprimento do flagelo, o grupo controle no 6º dia foi estatisticamente maior que o do 3º dia. Os testes nas concentrações de AZT de 30 μM e 40 μM foram menores no 3º dia do que no 6º dia. O oposto foi observado nos testes nas concentrações de 1 μM , 10 μM e 20 μM pois o comprimento do flagelo foi estatisticamente maior no 3º dia do que no 6º dia.

As alterações observadas nas promastigotas sob efeito das concentrações de AZT foram: 3º dia: à medida que se aumenta a concentração aumenta-se a largura do corpo ($p < 0,05$), aparecem granulações (20 μM , 30 μM , 40 μM e 50 μM) e ainda há uma aglutinação maior entre as leishmanias. No 6º dia: à medida que vão se aumentando as concentrações há um grande aumento na largura ($p < 0,05$) e aparecem vacuolizações principalmente nas concentrações de 30 μM e 40 μM e redução no comprimento do flagelo.

Os modelos atuais para avaliação de atividade de novos fármacos anti-*Leishmania* incluem ensaios de formas amastigotas em macrófagos, modelos *in vivo* com a utilização de murinos e o amplamente utilizado ensaio *in vitro* de formas promastigotas (Sinagra *et al* 2007, Seifert *et al* 2010).

Não se encontrou na literatura trabalhos avaliando a morfologia de formas promastigotas de *Leishmania sp* expostas a ação de fármacos.

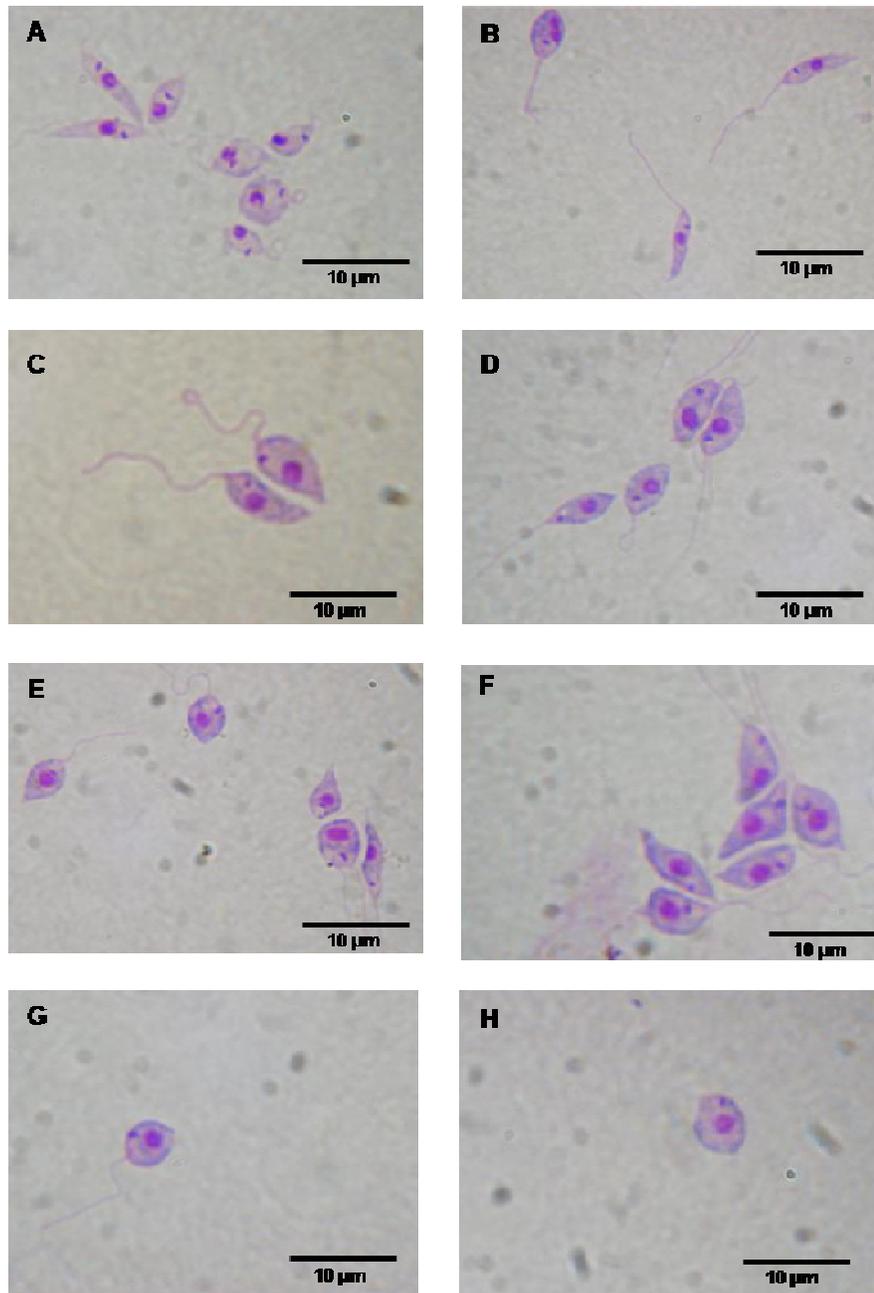


Figura 2: Formas promastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis*, na fase logarítmica (3º dia).
A. Controle. B. Controle com DMSO. C. Expostas a 1 µM de AZT. D. Expostas a 10 µM de AZT. E. Expostas a 20 µM de AZT. F. Expostas a 30 µM de AZT. G. Expostas a 40 µM de AZT. H. Expostas a 40 µM de AZT.

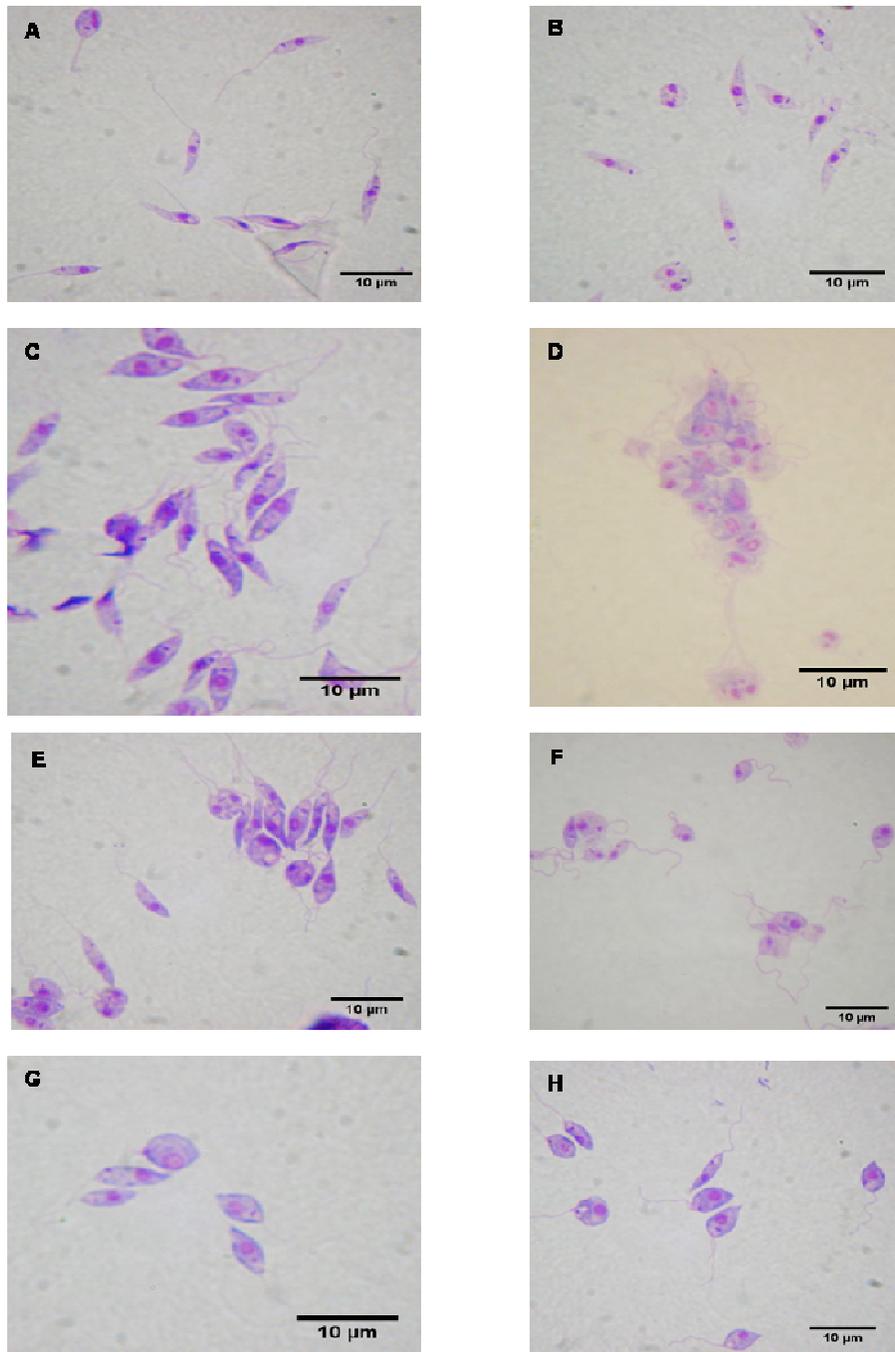


Figura 3: Formas promastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis*, na fase estacionária (6º dia).

A. Controle. B. controle com DMSO. C. Expostas a 1 μM de AZT. D. Expostas a 10 μM de AZT. E. Expostas a 20 μM de AZT. F. Expostas a 30 μM de AZT. G. Expostas a 40 μM de AZT. H. Expostas a 40 μM de AZT.

4. Dias N, Bailly C (2005) Drugs targeting mitochondrial functions to control tumor cell growth. *Biochem Pharma* 70:1–12.
5. Giampieri M , Balbi A, Mauro Mazzei M , La Colla P, Ibba C, Loddo R (2009) Antiviral activity of indole derivatives. *Antiviral Res* 2490: No. of Pages7.
6. Gossage SM, Rogers ME, Bates PA (2003) Two separate growth phases during the development of *Leishmania* in sand flies: implications for understanding the life cycle. *Intern J Parasitol* 33: 1027-1034.
7. Peyron C, Benhida R, Bories C, Loiseau PM (2005) Synthesis and *in vitro* antileishmanial activity of 5-substituted-2'-deoxyuridine derivatives. *Bioorganic Chem* 33: 439-447.
8. Sacks DL (1989) Metacyclogenesis in *Leishmania* promastigotes. *Exp.Parasitol.*, 69:100-103.
9. Saraiva EM, Pinto-da-SilvaLH, Wanderley JLM, Bonomo AC, Barcinski MA, Moreira MEC (2005) Flow cytometric assessment of *Leishmania* spp metacyclic differentiation: Validation by morphological features and specic markers. *Exp Parasitol* 110:39–47.
10. Seifert K, Escobar P, Croft SL (2010) In vitro activity of anti-leishmanial drugs against *Leishmania donovani* is host cell dependent. *J Antimicrob Chem* 65(3):508-11.
11. Sinagra A, Luna C, Abraham D, Iannella MC, Riarte A, Krolewiecki AJ (2007) The activity of azithromycin against *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *Leishmania (Leishmania) amazonensis* in the golden hamster models. *Rev Soc Bras Med Trop* 40(6):627-30.
12. Storch CH, Theile D, Lindenmaier H, Haefeli WE, Weiss J (2007) Comparison of the inhibitory activity of anti-HIV drugs on P-glycoprotein. *Biochem Pharm* 73: 1573–1581.

Manuscrito 2

**METABOLISMO ENERGÉTICO E RESPIRATÓRIO DE
PROMASTIGOTAS DE *Leishmania (L.) amazonensis* EXPOSTAS A
DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE ZIDOVUDINA**

Araújo CA ¹, Oliveira MAP¹, Oliveira V², Lino Junior RS¹, Vinaud M C¹, Bezerra JCB¹

¹ Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública IPTSP/UFG

² Laboratório de Bioconversão LaBioCon/FF/UFG

E mail: carolinaaguia@gmail.com

Normas segundo a revista Parasitology Research.

Resumo:

Os carboidratos e aminoácidos são os principais substratos para o metabolismo energético de *Leishmania* sp sendo a glicose metabolizada por meio da via glicolítica e via da pentose fosfato. A zidovudina é um análogo da timidina e pertence à classe de medicamentos chamada de nucleosídeo-análogo inibidores da transcriptase reversa. Alguns derivados nucleosídicos têm demonstrado propriedades leishmanicidas. Este trabalho buscou detectar e analisar os ácidos orgânicos secretados e/ou excretados do metabolismo energético de duas fases (estacionária e logarítmica) das formas promastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis* expostas a diferentes concentrações de zidovudina por meio de análise cromatográfica. Observou-se que os ácidos fumarato e succinato tiveram secreção/excreção em maior quantidade na fase estacionária (6º dia) quando expostos às menores concentrações de AZT o que indica um possível bloqueio da cadeia respiratória como mecanismo de ação do fármaco. Não houve influencia na secreção/excreção dos ácidos orgânicos relacionados ao metabolismo energético. Conclui-se que o mecanismo de ação do AZT está relacionado à interferência de atividades mitocondriais, indicando este como um promissor mecanismo anti-leishmania a ser explorado.

Palavras-chave: ácidos orgânicos, *Leishmania (L.)amazonensis*, metabolismo energético.

1-Introdução:

Os Trypanosomatidae são caracterizados por alta flexibilidade de seu metabolismo energético (Oppenheimer, 1995). Sendo carboidratos e aminoácidos os principais substratos para o gênero *Leishmania* (Cazzulo *et al* 1985).

A glicose é metabolizada por parasitos do gênero *Leishmania* e outros tripanossomatídeos por meio da via glicolítica e a via da pentose fosfato (Maugeri, 2003). Nos estudos com Trypanosomatidae, a glicólise ocorre por meio da via Embden-Meyerhoff sendo que as primeiras enzimas desta via ficam confinadas no interior de uma organela: o glicosomo (Cazzulo *et al* 1985).

O piruvato é o produto final da glicólise e é frequentemente degradado por uma mitocôndria única (Cazzulo *et al* 1992). Embora o papel da glicólise seja a geração de ATP e piruvato, a via da pentose fosfato é essencialmente envolvida na manutenção de NADPH intracelular (Verlinde 2001; Oppenheimer 2001).

Nas promastigotas, parte dos produtos finais oxidados, como o succinato, por exemplo, são resultado do metabolismo aeróbio envolvendo uma cadeia transportadora de elétrons com um aceptor final de oxigênio (Van Hellemond *et al* 1997).

Os casos de coinfeção de *Leishmania*-HIV em países da Europa e África estão cada vez mais frequentes, no Brasil a concomitância das duas doenças é crescente e nesse país é importante ressaltar que a terapia antiretroviral é disponível para distribuição ao público por meio do Sistema Único de Saúde (SUS) desde 1991 (Desjeux, 2003; Ngure *et al*, 2009; Rabello *et al* 2003). Devido a esse novo perfil epidemiológico das leishmanioses e da ampla utilização da zidovudina (AZT) nas terapias antiretrovirais é importante avaliar a ação anti-parasitária desse fármaco.

Alguns derivados nucleosídicos têm demonstrado propriedades leishmanicidas como, por exemplo, 5'-substituído-2'-deoxiuridina que apresentam boa atividade

leishmanicida contra formas promastigotas e amastigotas de *Leishmania donovani* (Peyron et al 2005). Não se sabe, entretanto, seu efeito sobre o metabolismo energético e respiratório destes parasitos.

A zidovudina (3' azido-2'-3' – dideoximidina; azidotimidina; AZT) é um análogo da timidina e pertence à classe de medicamentos chamada de nucleosídeo-análogo inibidores da transcriptase reversa, e tem sido utilizada no tratamento de indivíduos HIV-positivos. Este fármaco apresenta uma atividade seletiva pela transcriptase reversa do HIV que, por sua vez, é antagonico à DNA-polimerase humana (Veal 1995; Lynx 2006)

Este trabalho tem como objetivo detectar e analisar os ácidos orgânicos secretados e/ou excretados do metabolismo energético das formas promastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis* expostas à diferentes concentrações de zidovudina.

2- Metodologia

2.1- Toxicidade da zidovudina em fagócitos mononucleares humanos

Para ensaio da toxicidade em macrófagos foi utilizada a linhagem celular U937, que são monócitos humanos de linfoma histiocitário descritos por Sundstrom e Nilsson em 1974. Estas células foram mantidas em meio de cultura RPMI-1640 (Sigma Chemical Co) acrescido de 10% de soro fetal bovino (LGC, Rio de Janeiro, Brasil), 2mM de L-glutamina (Sigma Chemical Co), 100U/mL de penincilina e 100 µg/mL de estreptomicina (Sigma Chemical Co), denominado RPMI completo. A cultura foi feita numa atmosfera de 95% de ar e 5% de dióxido de carbono (CO₂) a 37°C. Em placas de cultura de 96 poços (Costar), a cada poço contendo 1x10⁶ células/mL foi acrescido solução de zidovudina nas concentrações a serem testadas. Após incubação nas condições descritas anteriormente, o experimento foi parado depois de 72 horas e a viabilidade celular dos monócitos checada

utilizando 30 μ L de MTT (substrato tetrazólio) em cada poço e após 4h acrescido 100 μ L de SDS, finalizando a reação depois de mais 24h de incubação. Sendo este um método colorimétrico a leitura de concentração realizou-se em absorbância num comprimento de onda de 560 nm. A concentração inibitória (IC 50) foi determinada por análise de regressão linear expressa em μ M \pm SD e a concentração máxima tolerada (“MTC”) expressa em μ M foi avaliada para este fármaco (Peyron *et al* 2005; ATCC 2009).

2.2- Cultura de formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis*

As formas promastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis* (IFLA/BR/1967/PH8) foram cedidas pelo Laboratório de Citocinas do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás para o cultivo destes parasitos realizado em meio líquido Grace (Grace's Insect Medium – Gibco®) acrescido de 20% de soro fetal bovino estéril e inativado, 2 mM de L-glutamina, 100 U/mL de penicilina e 100 μ g/mL de estreptomicina (Sigma Chemical Co.) mantidos em placas de cultura de 24 poços em estufa de 26°C. Dessa forma, estas amostras serviram para avaliar as formas promastigotas sob tensão normal de O₂.

2.3-Análise cromatográfica da concentração de ácidos orgânicos

A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) foi realizada para avaliar a concentração dos ácidos orgânicos excretados ou consumidos no cultivo das formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis*.

As amostras do meio de cultura foram coletadas no 3º e 6º dia da curva de crescimento, com pipetas automáticas no volume de 1 mL foram congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a -2°C. Posteriormente, submetidas a cromatografia líquida (HPLC –

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°C, com vazão de 0,8 mL/min, acoplado a um detector UV/visível em comprimento de onda de 210nm. Cada amostra injetada corresponde a um volume de 80µL (Bezerra *et al* 1999, Vinaud *et al* 2007).

O tempo de retenção dos ácidos orgânicos e as áreas dos picos das substâncias detectadas foram calculadas por um programa computadorizado acoplado ao cromatógrafo: Star Chromatography Workstation 5.0 Varian, fornecendo sua concentração nas amostras. Os ácidos orgânicos foram identificados de acordo com o tempo de retenção e com calibração previamente realizada no CLAE para piruvato e lactato, indicadores da glicólise, succinato, fumarato e malato, substâncias do ciclo de Krebs. (Bezerra *et al* 1999, Vinaud *et al* 2007).

3-Resultados e discussão

Este trabalho visou avaliar as alterações induzidas por diferentes concentrações de AZT no metabolismo energético e respiratório de formas promastigotas de *L. amazonensis*.

Para se verificar o índice de citotoxicidade neste estudo, foi realizada uma triagem inicial de citotoxicidade nas concentrações de 0,01; 0,1; 1; 10 e 100 µM, de onde observou-se que concentrações superiores a 50 µM apresentavam alta letalidade para os macrófagos. Portanto, determinou-se um redirecionamento da triagem de citotoxicidade no qual as concentrações testadas em macrófagos foram de 1; 10; 20; 30; 40 e 50 µM. Analisando-se as absorbâncias após o teste com MTT, determinou-se que a DL50 de AZT corresponde a

30 μM . Portanto, determinou-se que as concentrações testadas nas formas promastigotas seriam de 1 a 50 μM .

Com relação aos ácidos orgânicos ao piruvato e ao oxalacetato, que poderiam indicar alterações da via glicolítica, não foi observado nenhuma mudança significativa. O mesmo foi observado com a via de oxidação dos ácidos graxos representados por acetato e propionato. A excreção/secreção de corpos cetônicos, indicados por β -hidroxibutirato e acetoacetato também foi estatisticamente insignificante.

Entretanto, com relação à secreção/excreção de fumarato e succinato, observou-se uma maior quantidade destes ácidos sendo secretados pelas formas promastigotas em fase estacionária (6º dia) quando expostos às menores concentrações de AZT (1, 10 e 20 μM) (Tabela 1 e 2).

O metabólito succinato, formado a partir da succinil-CoA, promove ganho energético por via Ciclo de Krebs, a enzima succinato desidrogenase oxida succinato a fumarato que é substrato da respiração mitocondrial. Um mecanismo peculiar ocorre em *Leishmania* spp, no qual o succinato pode ser reduzido a fumarato pela ação da NADH-fumarato redutase, uma enzima presente nesses protozoários, tal mecanismo conhecido por inversão metabólica ocorre em situações de inibição da respiração mitocondrial. Esta inversão parcial do ciclo de Krebs não é ainda descrita no metabolismo de vertebrados (Tielens e Van Hellemond 1998).

Devido ao mecanismo de ação do fármaco estar intensamente relacionado ao controle da proliferação celular (Cazzalini 2001; Dias 2005), visto ser um análogo da timidina, percebe-se que as formas do parasito que apresentam menor taxa de replicação apresentam uma tendência ao maior aproveitamento energético, o que resulta em maior

excreção de fumarato e succinato. Entretanto, observamos essas alterações somente nas menores concentrações testadas, o que indica que o fármaco apresenta uma curva de dose resposta, já que as maiores concentrações induzem à morte do parasito nesta fase da curva de crescimento (Araújo *et al*, 2010 dados não publicados).

Os fármacos de escolha em tratamentos anti-*Leishmania* utilizam mecanismos diversos como na interferência do fluxo glicolítico e na β -oxidação de ácidos graxos (antimoniais pentavalentes), inibição da replicação do DNA do cinetoplasto e competição com as poliaminas (diamidinas aromáticas e as pentamidinas), bloqueio da via de salvamento de purinas (alopurinol), os antibióticos se utilizam da síntese dos esteróis provocando mudança na permeabilidade de membrana (anfotericina B) e inibição da demetilação do lanosterol (cetoconazol e itraconazol) (Balaña-Fouce *et al* 1998). Entretanto não se conhece o efeito destes fármacos nas principais vias metabólicas de obtenção de energia e respiração utilizadas pelo parasito.

A mitocôndria das células é um alvo de ação do AZT, que quando utilizado em tratamentos em longo prazo, promove a inibição da polimerase responsável pela replicação do mtDNA e comprometimento da fosforilação oxidativa via redução da atividade da citocromo c oxidase (COX) e por alteração do complexo I da cadeia transportadora de elétrons (Barille *et al*, 1998; Cazzalini *et al*, 2001; Kiyomoto *et al*, 2008).

Não foi possível observar diferença significativa nas concentrações de lactato e dos ácidos resultantes da β -oxidação de Acetil-CoA e de ácidos graxos, ao contrário do observado em indivíduos com tratamento em longo prazo com AZT quando se avalia o metabolismo de células musculares (Barille *et al*, 1998; Hobbs *et al*, 1995).

Barile *et al* (1998) descreveram que enzimas do ciclo de Krebs como succinato desidrogenase e malato desidrogenase não são afetadas pela presença do AZT. O mesmo efeito é observado com relação a enzima citrato sintase que atua regulando este ciclo, via conversão de Acetil-CoA em citrato. Neste trabalho não houve diferença significativa das concentrações de citrato e α -cetoglutarato dos grupos submetidos à ação do fármaco em relação aos grupos controle.

Tabela 1. Média \pm desvio padrão em $\mu\text{M.mL}^{-1}$ da concentração de ácidos orgânicos secretados/excretados por formas promastigotas em fase logarítmica (3º dia) de *Leishmania (L.) amazonensis* expostas a diferentes concentrações de AZT.

	C Grace	C Grace+DMSO	C leishmania 3º dia	C DMSO 3º dia	1 μM 3º dia	10 μM 3º dia	20 μM 3º dia	30 μM - 3º dia	40 μM 3º dia	50 μM 3º dia
Oxalato	ND	0,33 \pm 0,66	2,60 \pm 3,16	1,69 \pm 3,78	1,42 \pm 2,48	2,57 \pm 4	0,28 \pm 0,42	1,76 \pm 3,24	ND	1,59 \pm 2,88
Citrato	1,25 \pm 1,85	0,26 \pm 0,59	4,65 \pm 1,82	7,21 \pm 3,05	13,08 \pm 9,92	6,96 \pm 3,45	5,41 \pm 2,95	6,03 \pm 2,01	5,40 \pm 0,61	4,81 \pm 2,53
α -cetoglutarato	1,69 \pm 3,19	0,79 \pm 1,78	7,23 \pm 3,42	5,95 \pm 2,13	6,35 \pm 2,91	6,55 \pm 3,09	4,60 \pm 3,08	5,40 \pm 3,53	6,81 \pm 2,99	5,31 \pm 3,14
Oxalacetato	1,20 \pm 2,62	0,14 \pm 0,32	3 \pm 2,63	5,70 \pm 3,95	7,92 \pm 6,30	4,47 \pm 2,54	3,32 \pm 2,43	2,17 \pm 2,06	2,82 \pm 1,89	1,88 \pm 1,84
Piruvato	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0,02 \pm 0,04	ND	ND
Malato	431,40 \pm 596,30	168,87 \pm 377,60	1084,89 \pm 343,58	1056,69 \pm 242,88	948,57 \pm 241,80	1195,81 \pm 257,77	1180,23 \pm 490,85	1237,81 \pm 284,22	1346,56 \pm 343,79	1178,28 \pm 239,22
Succinato	6,32 \pm 9,01	0,76 \pm 1,71	52,66 \pm 43,88	31,75 \pm 16,20	29,23 \pm 15,06	36,07 \pm 11,78	43,18 \pm 33,10	29,13 \pm 13,89	28,09 \pm 15,57	21,12 \pm 9,22
Lactato	14,22 \pm 19,71	17,32 \pm 38,73	73,75 \pm 35,81	58,15 \pm 34,08	48,73 \pm 29,63	42,81 \pm 12,48	59,18 \pm 28,20	55,28 \pm 26,46	36,88 \pm 11,34	55,42 \pm 24,35
β -hidroxibutirato	0,09 \pm 0,20	0,50 \pm 1,13	662,52 \pm 1479,17	1,11 \pm 1,51	0,35 \pm 0,50	0,57 \pm 0,60	1,17 \pm 0,77	1,07 \pm 1,31	1,39 \pm 2,09	0,76 \pm 1,28
Acetato	ND	ND	839,06 \pm 1876,19	728,35 \pm 1628,65	800,89 \pm 1790,85	840,25 \pm 1878,87	0,80 \pm 1,79	ND	ND	ND
Acetoacetato	ND	ND	1,75 \pm 3,93	ND	0,27 \pm 0,61	0,54 \pm 1,22	ND	0,44 \pm 0,98	0,39 \pm 0,87	0,47 \pm 1,05
Fumarato	3,66 \pm 5,01	1,22 \pm 2,74	10,51 \pm 7,21	8,03 \pm 4,60	7,04 \pm 4,05	8,20 \pm 4,70	10,49 \pm 3,68	10,66 \pm 2,19	11,81 \pm 3,47	9,05 \pm 5,22
Propionato	ND	44,20 \pm 98,84	58,86 \pm 100,31	97,13 \pm 131,78	68,22 \pm 118,53	24,18 \pm 20,66	108,29 \pm 193,09	71,80 \pm 99,71	8,24 \pm 12,09	64,522 \pm 104,06

ND – não detectado

Tabela 2. Média \pm desvio padrão em $\mu\text{M}\cdot\text{mL}^{-1}$ da concentração de ácidos orgânicos secretados/excretados por formas promastigotas em fase estacionária (6º dia) de *Leishmania (L.) amazonensis* expostas a diferentes concentrações de AZT.

	C Grace	C Grace+DMSO	C leishmania 6º dia	C DMSO 6º dia	1 μM 6º dia	10 μM 6º dia	20 μM 6º dia	30 μM - 6º dia	40 μM 6º dia	50 μM 6º dia
Oxalato	ND	0,33 \pm 0,66	4,29 \pm 5,05	4,22 \pm 2,88	2,99 \pm 4,10	ND	1,27 \pm 2,85	1,74 \pm 3,90	1,40 \pm 2,49	1,00 \pm 2,24
Citrato	1,25 \pm 1,85	0,26 \pm 0,59	7,73 \pm 3,37	7,66 \pm 4,46	7,50 \pm 2,81	8,81 \pm 4,16	7,76 \pm 2,59	6,68 \pm 1,87	7,95 \pm 5,06	9,32 \pm 4,34
α -cetogluturato	1,69 \pm 3,19	0,79 \pm 1,78	7,45 \pm 2,27	6,35 \pm 3,00	7,55 \pm 3,58	7,20 \pm 2,05	7,34 \pm 2,40	5,88 \pm 3,21	4,45 \pm 2,89	6,07 \pm 3,39
Oxalacetato	1,20 \pm 2,62	0,14 \pm 0,32	7,69 \pm 4,92	6,02 \pm 4,81	5,86 \pm 4,34	8,09 \pm 5,91	7,12 \pm 4,84	4,64 \pm 4,23	5,03 \pm 4,08	5,69 \pm 3,75
Piruvato	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0,35 \pm 0,36
Malato	431,40 \pm 596,30	168,87 \pm 377,60	1554,04 \pm 522,00	1561,52 \pm 461,07	1528,45 \pm 375,24	1453,9 \pm 376,57	1526,17 \pm 346,15	1583,57 \pm 295,42	1429,97 \pm 530,51	1634,09 \pm 228,55
Succinato	6,32 \pm 9,01	0,76 \pm 1,71	84,39 \pm 24,47	79,48 \pm 38,32	80,14 \pm 15,30*	75,83 \pm 11,62*	82,70 \pm 19,68*	73,12 \pm 25,69	42,22 \pm 32,05	52,82 \pm 18,18
Lactato	14,22 \pm 19,71	17,32 \pm 38,73	51,14 \pm 33,10	47,35 \pm 18,34	45,22 \pm 13,70	42,99 \pm 14,54	35,74 \pm 16,03	43,75 \pm 20,55	47,16 \pm 25,55	36,13 \pm 11,50
β -hidroxibutirato	0,09 \pm 0,20	0,50 \pm 1,13	2,73 \pm 12,80	3,41 \pm 2,70	4,02 \pm 4,13	1,94 \pm 2,09	1,70 \pm 2,11	1,19 \pm 1,00	2,35 \pm 2,37	1,89 \pm 1,58
Acetato	ND	ND	1118,06 \pm 2500,05	825,95 \pm 1846,9	ND	ND	ND	ND	958,67 \pm 2143,65	2,14 \pm 4,80
Acetoacetato	ND	ND	3,75 \pm 7,36	0,26 \pm 0,59	ND	0,82 \pm 1,83	0,83 \pm 1,86	0,42 \pm 0,95	1,54 \pm 3,46	2,62 \pm 4,65
Fumarato	3,66 \pm 5,01	1,22 \pm 2,74	12,03 \pm 7,27	14,05 \pm 8,18	16,58 \pm 1,39*	15,16 \pm 1,22*	16,53 \pm 3,59*	13,74 \pm 2,59	8,91 \pm 6,08	13,71 \pm 2,41
Propionato	ND	44,20 \pm 98,84	96,77 \pm 171,05	16,97 \pm 34,55	28,51 \pm 30,38	46,44 \pm 17,98	40,02 \pm 26,30	28,97 \pm 11,62	75,00 \pm 10,40	34,00 \pm 34,84

ND – não detectado, * diferença estatística ($p > 0,05$) por ANOVA, comparada ao controle e às concentrações secretadas/excretadas por formas promastigotas de fase logarítmica (3º dia).

Em células musculares de pessoas tratadas com AZT, observou-se que as enzimas da cadeia respiratória mostraram alto percentual de inibição da succinato-citocromo c redutase e da citocromo c oxidase (COX) (Barile *et al*, 1998; Hobbs *et al*, 1995; Kiyomoto *et al*, 2008). Neste trabalho, observou-se uma diferença significativa nas taxas de secreção/excreção de succinato e fumarato, supõe-se, portanto que a inibição da fosforilação oxidativa induz ao acúmulo de succinato e conseqüentemente, por sua oxidação, o aumento na concentração de fumarato. O mecanismo de ação do AZT devido a inibição da replicação do mtDNA pode explicar porque existe essa interferência na fosforilação oxidativa, já que certas subunidades da cadeia respiratória, em humanos, são codificadas por mtDNA (Barile *et al*, 1998). Saunders *et al*, 2010 demonstrou que no metabolismo de *Leishmania* o succinato pode ser encontrado no glicossomo via redução do fumarato, dessa maneira, como o AZT atua em mitocôndria o aumento de fumarato e succinato via glicossomal pode ocorrer.

Visto que a ação do AZT é amplamente estudada *in vivo* principalmente em células musculares de indivíduos que fazem terapia antiretroviral, sugere-se que a descrição de sua atuação *in vitro*, principalmente contra protozoários, deve ser elucidada para maior compreensão da influência desta terapia em pessoas acometidas por AIDS/Leishmaniose.

4-Conclusões:

Conclui-se que baixas concentrações de AZT induzem maior secreção/excreção de fumarato e succinato, ácidos relacionados ao metabolismo respiratório intra-mitocondrial, indicando um estresse bioquímico causado pelo fármaco. Os mecanismos de atuação do AZT em promastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis* (IFLA/BR/1967/PH8) demonstram atuar no mecanismo de fosforilação oxidativa que ocorre na mitocôndria do parasito.

9. Desjeux P, Alvar J (2003) *Leishmania*/HIV co-infections: epidemiology in Europe. *Annals of Trop. Medic. & Parasit.* 97: 3-15.
10. Dias N, Bailly C (2005) Drugs targeting mitochondrial functions to control tumor cell growth. *Biochem Pharm.* 70:1–12.
11. Hobbs GA, Keilbaugh SA (1995) Cellular targets of 3'-azido-3'-deoxythymidine: an early (non-delayed) effect on oxidative fosforilation. *Biochem Pharm.* 50 (3):381-390.
12. Kiyomoto BH, Tengan CH, Godinho RO (2008) Effects of short-term zidovudine exposure on a mitochondrial DNA content and succinate dehydrogenase activity of rat skeletal muscle cells. *J. Neur. Scienc.* 268:33-39.
13. Lynxs MD, McKee EE (2006) 3'-Azido-3'-deoxythymidine (AZT) is a competitive inhibitor of thymidine phosphorylation in isolated rat heart and liver mitochondria. *Biochem Pharm;* 72:239-243.
14. Ngure PK, Kimutai A, Zipporah W, Rukunga G, Tonui WK (2009). A review of Leishmaniasis in Eastern Africa *Journal of Nanjing Medical University* 23(2):79-86.
15. Opperdoes FR (1995) *Biochemistry and Molecular Biology of Parasites* (Marr, J.J. and Müller, M., eds), pp 19–32, Academic Press.
16. Opperdoes FR, Michels PAM (2001) Enzymes of carbohydrate metabolism as potential drug targets. *International Journal for Parasitology.* 31: 482-490.
17. Peyron C, Benhida R, Bories C, Loiseau PM (2005) Synthesis and *in vitro* antileishmanial activity of 5-substituted-2'-deoxyuridine derivatives. *Bioorganic Chem;* 33: 439-447.
18. Rabello A, Orsini M, Disch J (2003) *Leishmania*/HIV co-infection in Brazil: an appraisal. *Annals of Trop. Medic. & Parasit.* 97: 17-28.
19. Sauders 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. *Parasitol.*10:1-11.

20. Tielens AG, Van Hellemond JJ (1998) The electron transport chain in anaerobically functioning eukaryotes. *Biochim Biophys Acta*;1365(1-2):71-8.
21. Veal GJ, Back DJ (1995) Metabolism of Zidovudine. *Gen. Pharmac.* 26: 1469-1475.
22. Verlinde CLMJ (2001) Glycolysis as a target for the design of new anti-trypanosome drugs. *Drug Resist Updates* 4: 50-65.
23. Vinaud MC, Lino Junior RS, Bezerra JCB (2007) *Taenia crassiceps* organic acids detected in cysticerci. *Exp Parasitol* 116:335-339.

IV- CONCLUSÕES GERAIS

Neste trabalho avaliou-se a sobrevivência das formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis in vitro* expostas a diferentes concentrações de zidovudina por meio de mudanças quantitativas no crescimento em meio de cultura quando comparado aos grupos controle.

A sobrevivência das formas promastigotas *in vitro* expostas a diferentes concentrações de zidovudina foi significativamente diminuída na fase logarítmica de crescimento.

Observou-se alterações morfométricas do comprimento do corpo, largura do corpo e comprimento do flagelo das promastigotas expostas a todas as concentrações de AZT. Além disso, observou-se também a formação de granulações e vacuolizações nos citoplasmas dos parasitos.

Em relação às alterações metabólicas conclui-se que baixas concentrações de AZT induzem maior secreção/excreção de fumarato e succinato, substâncias relacionadas ao metabolismo respiratório intra-mitochondrial, indicando um estresse bioquímico causado pelo fármaco. Os mecanismos de atuação do AZT em promastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis* cepa PH8 demonstram atuar no mecanismo de fosforilação oxidativa que ocorre na mitocôndria do parasito.

V- CONSIDERAÇÕES FINAIS

Devido às limitações no tratamento de protozooses, como a leishmaniose, destaca-se a necessidade da pesquisa a respeito de novos fármacos. Portanto, o surgimento da detecção de atividade leishmanicida de derivados nucleosídicos se mostra como uma nova perspectiva deste desafio. Estudos com derivados nucleosídicos estão em ascensão, mas trabalhos em protozoários são recentes e ainda muito limitados.

Os nossos resultados indicam que o efeito leishmanicida das diferentes concentrações de zidovudina sobre as formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis* esteja relacionado à fase proliferativa dos parasitos, ou seja, uma fase de intensa multiplicação e consequente síntese de DNA.

Este fármaco demonstra ser uma promissora alternativa, registrando-se a necessidade da análise de outros parâmetros como, por exemplo, síntese e gasto de ATP, vias metabólicas alternativas como a produção de amônia e uréia, efeito na capacidade infectante das promastigotas expostas e sua sobrevivência em macrófagos.

Em protozooses os estudos não se limitarão somente à investigação da eficácia da zidovudina contra protozoários, novos derivados provenientes do AZT estão sendo estudados e são potencialmente importantes para esse novo ramo de investigação.

10. Berman J (2003) Current treatment approaches to Leishmaniasis. *Curr Opin Infect Dis* 16(5):397-401.
11. Bezerra JCB, Kemper A, Becker W (1999) Profile of organic acid concentrations in the digestive gland and hemolymph of *Biomphalaria glabrata* under estivation. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 94(6):779-784.
12. Blum JJ (1993). Intermediary metabolism of *Leishmania*. *Parasitol. Today* 9: 118–122.
13. Blum J, Desjeux P, Schwartz E, Beck B, Hatz C (2004) Treatment of cutaneous leishmaniasis among travellers. *J Antimicrob Chemother* 53(2):158-166.
14. Besteiro S (2002) Succinate secreted by *Trypanosoma brucei* is produced by a novel and unique glycosomal enzyme, NADH-dependent fumarate reductase. *The J Biol Chem* 277(41): 38001-38012.
15. Cabrera-Serra MG, Valladares B, Piñero JE, (2008) *In vivo* activity of perifosine against *Leishmania amazonensis*. *Acta Tropica* 108:20–25.
16. Cazzalini O, Lazze MC, Iamele L, Stivala LA, Bianchi L, Vaghi P, Cornaglia A, Calligaro A, Curti D, Alessandrini A, Prospero E, Vannini V (2001) Early effects of AZT on mitochondrial functions in the absence of mitochondrial DNA depletion in rat myotubes. *Biochem Pharm* 62 : 893–902.
17. Cazzulo JJ, Franke de Cazzulo BM, Engel JC, Cannata JJ (1985) End products and enzyme levels of aerobic glucose fermentation in trypanosomatids. *Mol Biochem Parasitol.* 16(3):329-343.
18. Cazzulo JJ (1992) Aerobic fermentation of glucose by trypanosomatids. *FASEB J* 6(13):3153-3161.

19. CDC, 2008. Leishmaniasis. http://www.dpd.cdc.gov/DPDx/HTML/Leishmaniasis.asp?body=Frames/G-L/Leishmaniasis/body_Leishmaniasis_page1.htm. Capturado em 01-03-2008.
20. Changtam C, Koning HP, Ibrahim H, Sajid MS, Gould MK, Suksamrarn A (2010) Curcuminoid analogs with a potent activity against *Trypanosoma* and *Leishmania* species. *Eur J Med Chem* 45(3):941-56.
21. Coelho AC, Gentil LG, Silveira JF, Cotri PC (2008) Characterization of *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis* promastigotes resistant to pentamidine. *Experim Parasitol* 120:98–102.
22. Croft SL (1997) The current status of antiparasite chemotherapy. *Parasitology*;114 Supl:S3-15.
23. Desjeux P (2004) Leishmaniasis: current situations and a new perspectives. *Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases*; 27:305-318.
24. Dias N, Bailly C (2005) Drugs targeting mitochondrial functions to control tumor cell growth. *Biochem Pharma* 70:1–12.
25. Dórea RCC, Barboza-Filho CG, Moreira DF, Guirro M, Chaves AAM, Dunder RJ, Soares EA, Santos-Júnior V, Spinosa W (2003) Behavior of *Leishmania major* metacyclic promastigotes during the course of infection and immune response development in resistant versus susceptible hosts. *Braz J Microb* 34:17-20.
26. Matos M, Caiza A, Fernandes O, Gonçalves AJS, Pirmez C, Souza CSF, Oliveira-Neto MP (1998) American cutaneous leishmaniasis associated with HIV infection: report of four cases. *J European Academy of Derm and Venereology* 10: 218–225.
27. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. – 2. ed. atual. – Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2007.

28. Galbraith RA (1991) Intermediary metabolism in *Leishmania mexicana*. The J Nutrit Biochem 4(2): 180-184.
29. García-Almago D (2005) Leishmaniasis cutânea. Actas Dermosifiliogr 96(1):1-24.
30. Gettyimages <http://www.gettyimages.com/> Capturado em 18-08-09.
31. Giampieri M , Balbi A, Mauro Mazzei M , La Colla P, Ibba C, Loddo R (2009) Antiviral activity of indole derivatives. Antiviral Res 2490: No. of Pages7.
32. Gontijo B, Carvalho MLR (2003) Leishmaniose tegumentar americana. Rev. Soc. Bras. Med. Trop 36(1): 71-80.
33. Gossage SM, Rogers ME, Bates PA (2003) Two separate growth phases during the development of *Leishmania* in sand flies: implications for understanding the life cycle. Intern J Parasitol 33: 1027-1034.
34. Graham LP (2009) An introduction to medicinal chemistry- 4ª Ed. Oxford University Press.
35. Hart DT, Coombs GH (1982) *Leishmania mexicana*: energy metabolism of amastigotes and promastigotes. Exp. Parasitol. 54: 397–409.
36. Hobbs GA, Keilbaugh SA (1995) Cellular targets of 3'-azido-3'-deoxythymidine: an early (non-delayed) effect on oxidative fosforilation. Biochem Pharm. 50 (3):381-390.
37. Kiyomoto BH, Tengan CH, Godinho RO (2008) Effects of short-term zidovudine exposure on a mitochondrial DNA content and succinate dehydrogenase activity of rat skeletal muscle cells. J. Neur. Scienc. 268:33-39.
38. Lehninger, AL(2006) Princípios de Bioquímica 4.ed.São Paulo. Sarvier.
39. Lipsky JJ (1996) Antiretroviral drugs for AIDS. The Lancet –HIV series; 348: 800–803.
40. Louassini M; Foulquié M; Benítez R; Adroher J (1999) Citric-acid cycle key enzyme activities during *in vitro* growth and metacyclogenesis of *Leishmania infantum* promastigotes. J Parasitol 85(4):595-602.

41. Lynxs MD, McKee EE (2006) 3'-Azido-3'-deoxythymidine (AZT) is a competitive inhibitor of thymidine phosphorylation in isolated rat heart and liver mitochondria. *Biochem Pharm* 72:239-243.
42. Maugeri, Dante Abel (2003) Pentose phosphate metabolism in *Leishmania mexicana*. *Mol and Biochem Parasitol* 117-125.
43. Martin E, Simon MW, Schaefer FW 3rd, Mukkada AJ (1976) Enzymes of carbohydrate metabolism in four human species of Leishmania: a comparative survey. *J Protozool.* 23(4):600-607.
44. Murray HW, Berman JD, Davies CR, Saravia NG (2005). *Advances in Leishmaniasis*. *Lancet* 366(9496):1561-1577.
45. Ngure PK, Kimutai A, Zipporah W, Rukunga G, Tonui WK (2009). A review of Leishmaniasis in Eastern Africa *Journal of Nanjing Medical University* 23(2):79-86.
46. Neves DP (2005) *Parasitologia Humana*. 11 Ed. Atheneu, São Paulo 41p.
47. Opperdoes FR (1995) *Biochem and Mol Biol of Parasites* (Marr, J.J. and Müller, M., eds), pp 19–32, Academic Press.
48. Opperdoes FR, Michels PAM (2001) Enzymes of carbohydrate metabolism as potential drug targets. *Internat J Parasitol.* 31: 482-490.
49. Ouellette M, Drummelsmith J, Papadopoulou B (2004) Leishmaniasis: drugs in the clinic, resistance and new developments. *Drug Resist Updat* 7(4-5):257-266.
50. Padovese V, Terranova M, Toma L, Barnabas G, Morrone A (2009) Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis in Tigray, northern Ethiopia clinical aspects and therapeutic concerns. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 103: 707—711.
51. Peyron C, Benhida R, Bories C, Loiseau PM (2005) Synthesis and *in vitro* antileishmanial activity of 5-substituted-2'-deoxyuridine derivatives. *Bioorganic Chem*; 33: 439-447.

52. Prata A, Silva-Vergara ML, Costa L, Rocha A, Krolewiecki A, Silva JC, de Paula EV, Pimenta Junior FG, Giraldo LE (2003) Efficacy of azithromycin in the treatment of cutaneous leishmaniasis Rev Soc Bras Med Trop; 36(1):65-69.
53. Rabello A, Orsini M, Disch J (2003) *Leishmania*/HIV co-infection in Brazil: an appraisal. Annals of Trop. Medic. & Parasit. 97: 17-28.
54. Real F, Pouchelet M, Rabinovitch M (2008) *Leishmania* (L.) *amazonensis*: Fusion between parasitophorous vacuoles in infected bone-marrow derived mouse macrophages Exp. Parasitol. 119: 15-23.
55. Rey L (2008) Parasitologia - Parasitos e Doenças Parasitárias do Homem nos Trópicos Ocidentais - 4ª Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.
56. Rosatelli JB, Souza CS, Soares FA, Foss NT, Roselino AMF (1998) Generalized cutaneous leishmaniasis in acquired immunodeficiency syndrome J European Academy of Derm and Venereology 10: 229–232.
57. Sacks DL, Hieny S, Sher A (1985) Identification of cell surface carbohydrate and antigenic changes between noninfective developmental stages of *Leishmania major* promastigotes. The Jof Immunol; 135(1):564-569.
58. Sacks DL (1989) Metacyclogenesis in *Leishmania* promastigotes. Exp.Parasitol., 69:100-103.
59. Saraiva EM, Pinto-da-SilvaLH, Wanderley JLM, Bonomo AC, Barcinski MA, Moreira MEC (2005) Flow cytometric assessment of *Leishmania* spp metacyclic differentiation: Validation by morphological features and specic markers. Exp Parasitol 110:39–47.
60. Sauders 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. Parasitol. 10:1-11.

61. Seifert K, Escobar P, Croft SL (2010) In vitro activity of anti-leishmanial drugs against *Leishmania donovani* is host cell dependent. J Antimicrob Chem 65(3):508-11.
62. Sinagra A, Luna C, Abraham D, Iannella MC, Riarte A, Krolewiecki AJ (2007) The activity of azithromycin against *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *Leishmania (Leishmania) amazonensis* in the golden hamster models. Rev Soc Bras Med Trop 40(6):627-30.
63. Shaw JJ (1982). Taxonomia das leishmanias da Amazônia. An. Bras. Dermatol; 57(3):129-132.
64. Souza W, Attias M, Rodrigues JCF (2009). Particularities of mitochondrial structure in parasitic protists (Apicomplexa and Kinetoplastid). Int J Biochemistry & Cell Biology; 41:2069-2080.
65. Storch CH, Theile D, Lindenmaier H, Haefeli WE, Weiss J (2007). Comparison of the inhibitory activity of anti-HIV drugs on P-glycoprotein. Biochem Pharm 73: 1573–1581.
66. Tempone AG, Taniwaki NN, Reimão JQ (2009) Antileishmanial activity and ultrastructural alterations of *Leishmania (L.) chagasi* treated with the calcium channel blocker nimodipine. Parasitol Res 105(2)499-505.
67. Tielens AG, Van Hellemond JJ (1998) The electron transport chain in anaerobically functioning eukaryotes. Biochim Biophys Acta;1365(1-2):71-8.
68. Turrens JF (2004) Oxidative stress and antioxidant defenses: a target for the treatment of diseases caused by parasitic protozoa. Molecular Aspects of Medicine. 25(1-2): 211-220.
69. UNMSM- <http://www.unmsm.edu.pe/clemyp/Mosquitos/Imagenes/lutzomyia.jpg>. Capturado em 18-08-2009.

70. Urbina JA (1994) Intermediary metabolism of *Trypanosoma cruzi*. Parasitol Today10(3): 107-110.
71. Van Hellemond JJ , Tielens AGM (1997). Inhibition of the respiratory chain results in a reversible metabolic arrest in *Leishmania* promastigotes. Mol. Biochem. Parasitol. 85: 135–138.
72. Veal GJ, Back DJ (1995) Metabolism of Zidovudine. Gen. Pharmac. 26: 1469-1475.
73. Verlinde CLMJ (2001) Glycolysis as a target for the design of new anti-trypanosome drugs. Drug Resist Updates(4) 50-65.
74. Vinaud MC, Lino Junior RS, Bezerra JCB (2007) *Taenia crassiceps* organic acids detected in cysticerci. Exp Parasitol 116:335-339.
75. Wikipedia- <http://pt.wikipedia.org/wiki/Ficheiro:Zidovudine.svg>. Capturado em 01-04- 2010.
76. WHO – World Health Organization Statistical Information System Website – <http://www.who.int/leishmaniasis>. Capturado em 01-03-2010.
77. Zakai HA (1998) *In vitro* stimulation of metacyclogenesis in *Leishmania braziliensis*, *L.donovani*, *L.major* and *L.mexicana*. Parasitol; 116:305-309.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)