

Marina Dal’Bó Pelegrini; Selma Giorgio

INSTITUTO DE BIOLOGIA, UNICAMP

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq

mari.pelegrini@gmail.com

Palavras-chave: *Leishmania* – Resveratrol - Equinomicina

Introdução

A leishmaniose é uma doença causada pelo protozoário *Leishmania*, parasita que possui dois hospedeiros, insetos *Phlebotomus* ou *Lutzomyia* e fagócitos mononucleares de hospedeiros vertebrados. O parasita causa um espectro de doenças e não há tratamento definitivo, havendo necessidade de pesquisa de novos fármacos. O HIF-1 (Hypoxia-Inducible Factor-1) é um fator de transcrição de genes de resposta contra o estresse celular, e é expresso inclusive em infecções com *Leishmania*. Buscando compreender o efeito do HIF-1 α nesta parasitose, analisamos o efeito de dois fármacos inibidores de HIF-1, Resveratrol e Equinomicina. O Resveratrol aumenta a degradação do HIF-1 α , e a Equinomicina bloqueia a transcrição dos genes regulados por ele. Neste trabalho estudamos o efeito da inibição do HIF-1 sobre a infecção *in vitro* e *in vivo*, com *L. amazonensis*.

Metodologia

Tratamentos: Equinomicina (Alexis Biochemicals) 2, 5, e 10 nM e Resveratrol (Sigma) 5, 10, 50 e 100 μ M

Teste de toxicidade MTT: MTT Sigma. Macrófagos J774 tratados por 24h.

Western Blotting: macrófagos de medula óssea infectados com amastigotas (1:1) por 1 hora, tratados com Resveratrol 50 μ M ou Equinomicina 10nM, por 24 horas pós-infecção

Infecção *in vitro*: macrófagos de medula óssea infectados por 1 hora com amastigotas (1:1) com diferentes tratamentos

Infecção *in vivo*: camundongos Balb/c fêmeas infectados com 1×10^5 amastigotas de *L. amazonensis*. Tratamentos intraperitoneais diários a partir 26 $^{\circ}$ dia de infecção

Resultados e Discussão

O Resveratrol foi tóxico para as células apenas na concentração de 100 μ M e a Equinomicina não mostrou toxicidade nas concentrações testada (1, 2, 5 e 10 nM), quando avaliados pelo teste de MTT (dados não mostrados).

No ensaio de Western blotting, observamos menos expressão do HIF-1 α nos tratamentos com Resveratrol e com Equinomicina em comparação com as células não tratadas, evidenciando a atuação destas drogas na inibição do HIF-1 α (Fig.1)

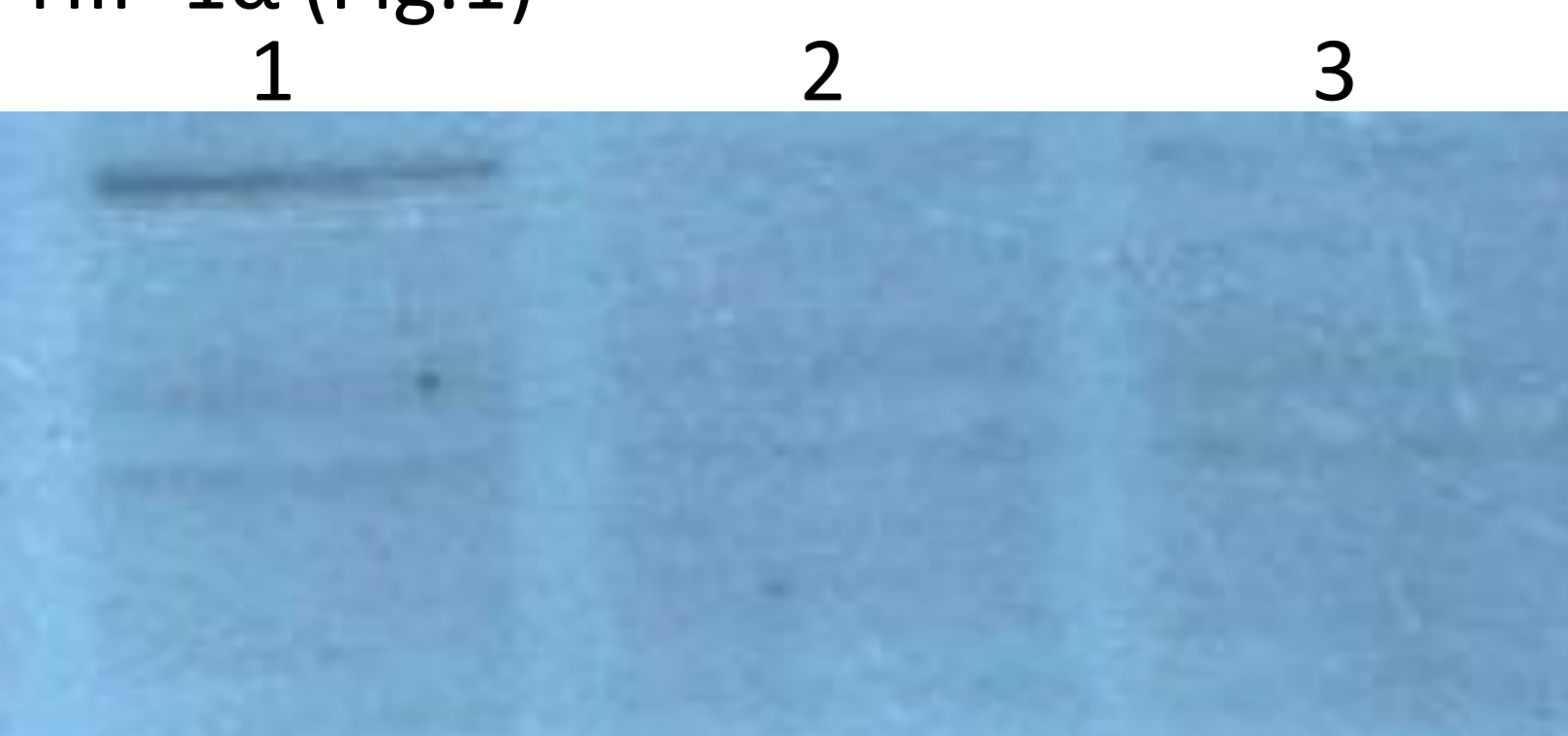


Figura 1. Western blotting de macrófagos infectados. **1:** Não tratado. **2:** Resveratrol 50 μ M. **3:** Equinomicina 10nM

Na infecção *in vitro*, Equinomicina 48 h, Resveratrol 24 h e 48 h aumentaram a taxa de infecção comparados ao controle. Em relação aos amastigotas intracelulares por macrófago infectado, houve diminuição nas culturas com Equinomicina 24 h e com CoCl₂ (estimulador de HIF-1) 48 h (Fig. 2 e 3).

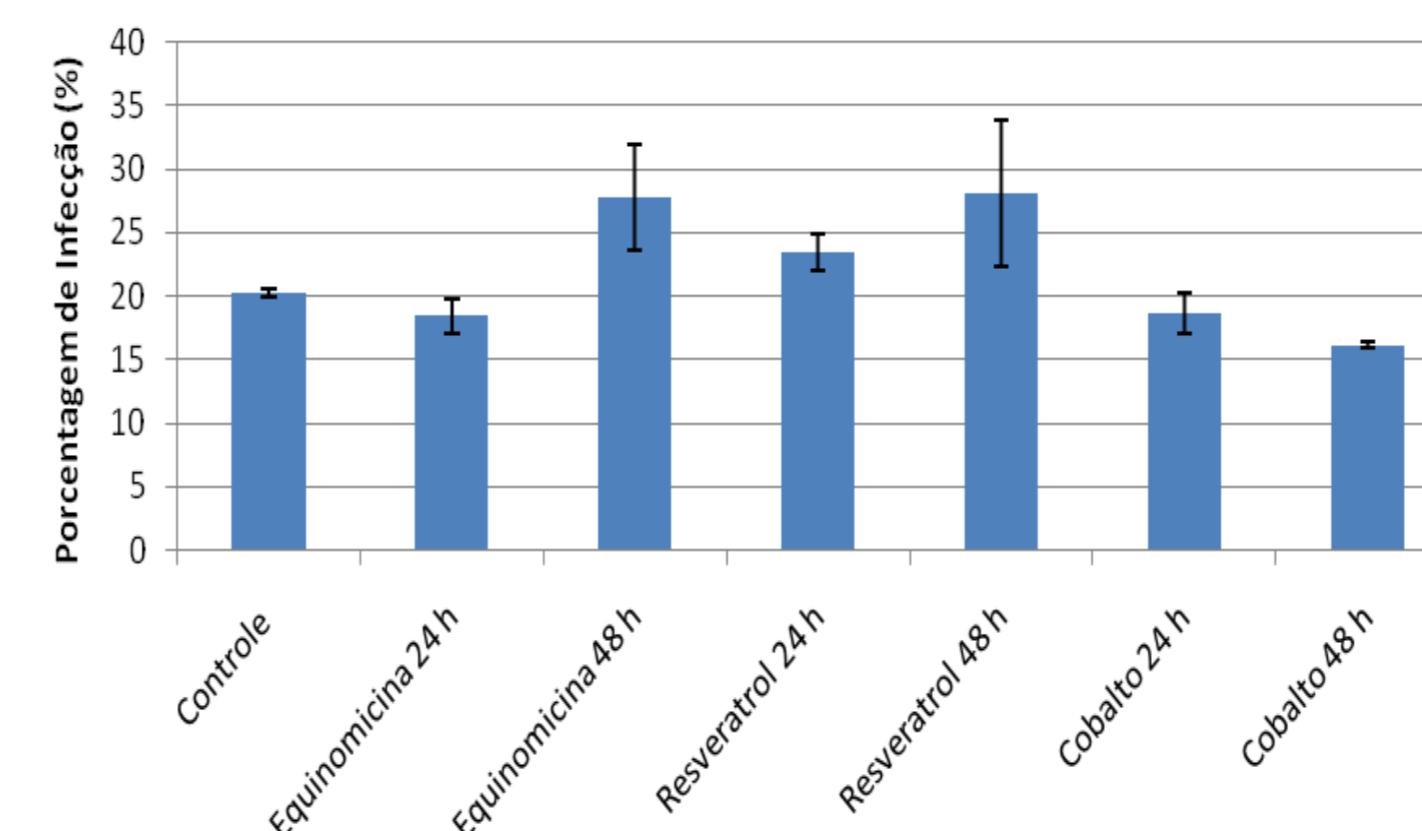


Figura 2. Porcentagem de macrófagos infectados com amastigotas

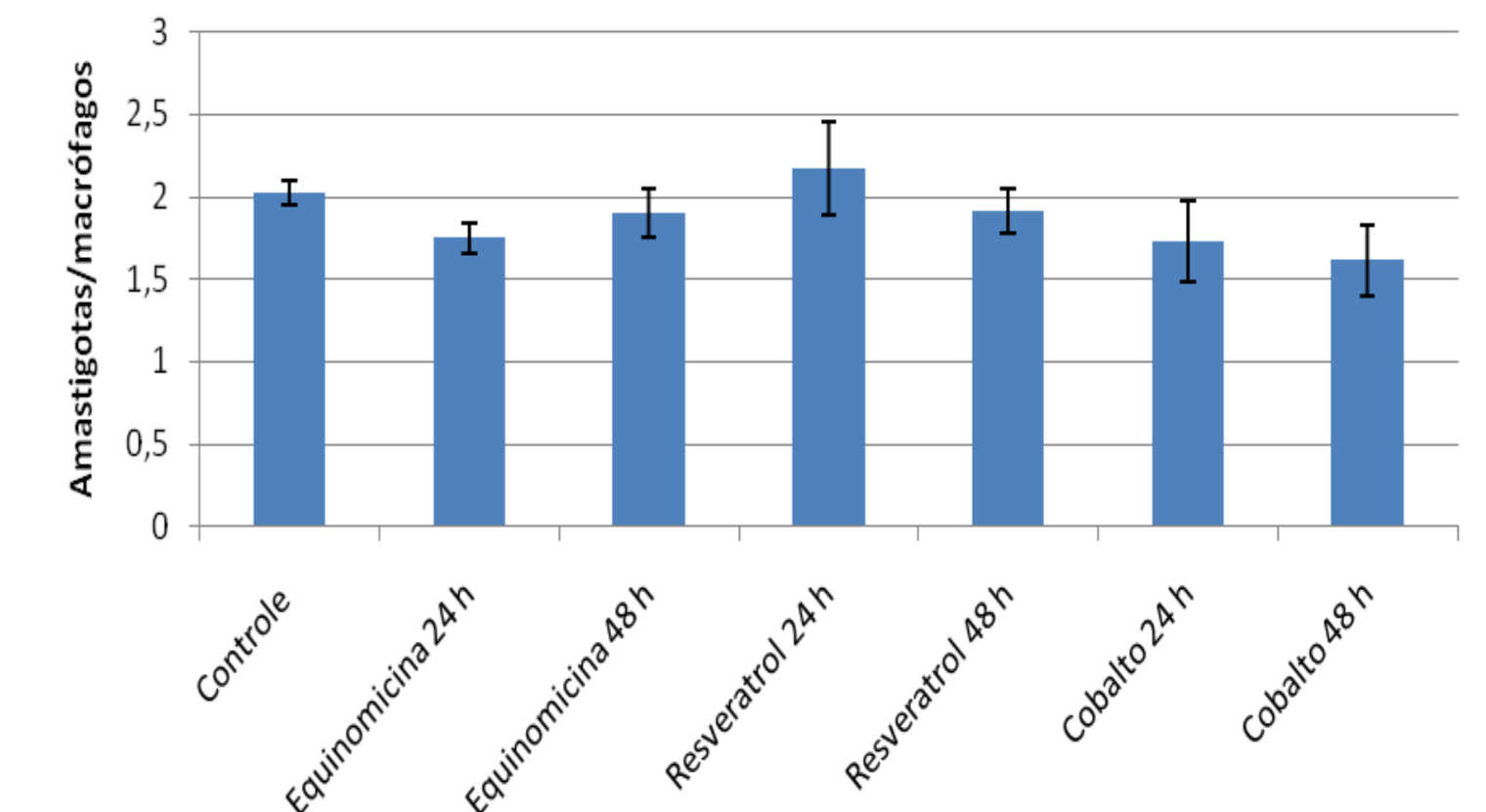


Figura 3. Amastigotas intracelulares por macrófago infectado

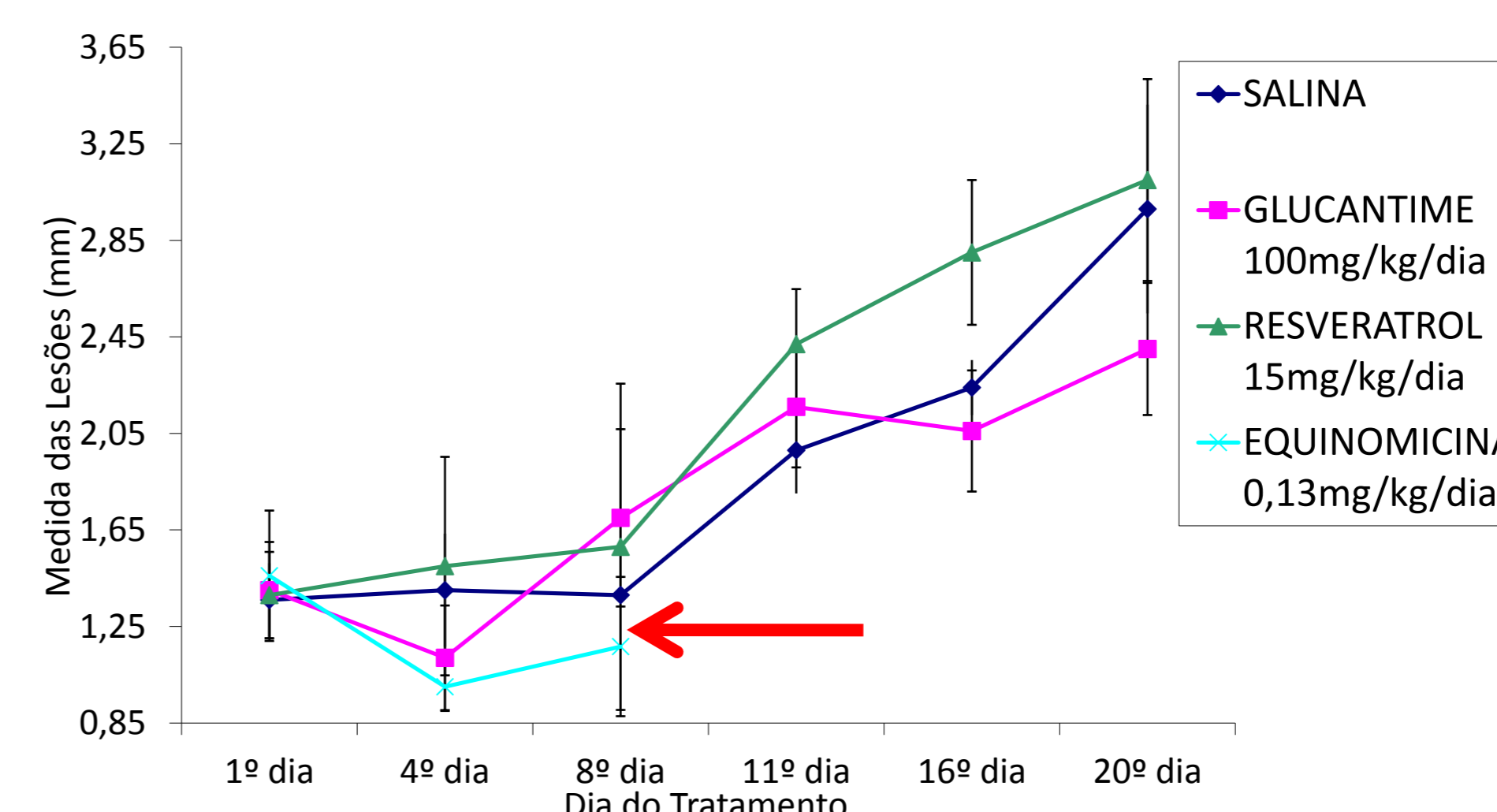


Figura 4. Medidas das lesões em camundongos Balb/c. Seta: último dia de tratamento do grupo Equinomicina

Nos testes *in vivo* não observamos diferença significativa nas lesões dos grupos tratados com salina e Resveratrol sugerindo que a ausência de HIF-1 α não diminuiu a lesão. Foi testada então uma dose menor de Equinomicina (0,065mg/kg/dia) intraperitonealmente em intervalos de três dias, porém também não foram observadas diferenças em relação ao controle (Fig. 4).

Conclusões

A inibição do HIF-1 α pode ter tornado os macrófagos mais vulneráveis à infecção por *L. amazonensis*, o que justificaria o aumento do nível de infecção *in vitro* com ambos os fármacos. Com relação ao fato de não observarmos efeito *in vivo* com os dois fármacos, isso pode estar relacionado com as concentrações ou vias de administração. Nossos dados indicam o HIF-1 α como potencial molécula-alvo no desenvolvimento de fármacos, merecendo mais estudos para o entendimento de seu papel na infecção e da manutenção da parasitose.

Referências Bibliográficas

- Bogdan, C., Rölinghoff, M. Parasitology Today, 15 (1): 22-28, 1999.
 Degrossoli, A., Giorgio, S. Exp. Biol. Med., 232: 88-95, 2007.
 Handman, E. Adv. Parasitology 44: 1-39, 1999.
 Lima, C. B. C., Arrais-Silva, W. W., Cunha, R. L. O. R., Giorgio, S. Korean J. Parasitol, 47 (3): 213-218, 2009.
 Zhang, Q., F., Brown, J., Le, A. D. Mol Cancer Ther 4 (10): 1465-1474, 2005.