

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-1α nesta parasitose, analisamos o efeito de dois fármacos inibidores de HIF-1, Resveratrol e Equinomicina. O Resveratrol aumenta a degradação do HIF-1α, 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 μM

**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 50μM 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  $1 \times 10^5$  amastigotas de *L. amazonensis*. Tratamentos intraperitoneais diários a partir 26º dia de infecção

## Resultados e Discussão

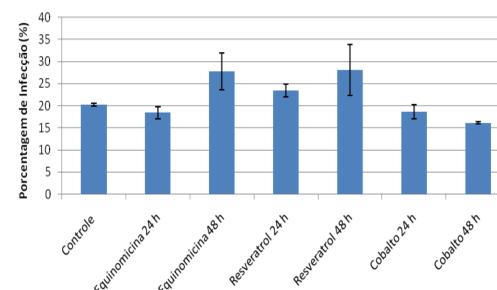
O Resveratrol foi tóxico para as células apenas na concentração de 100 μM e a Equinomicina não mostrou toxicidade nas concentrações testada (1, 2, 5 e 10 nM), quando avaliados pelo teste de MTT (dados não mostrados).

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

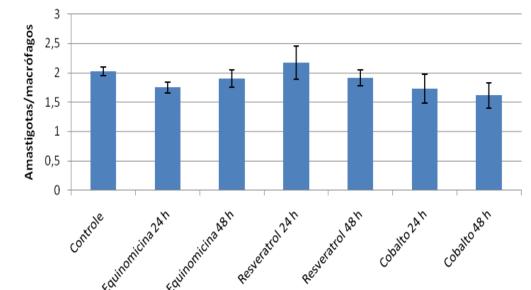


**Figura 1.** Western blotting de macrófagos infectados. **1:** Não tratado. **2:** Resveratrol 50μM. **3:** Equinomicina 10nM

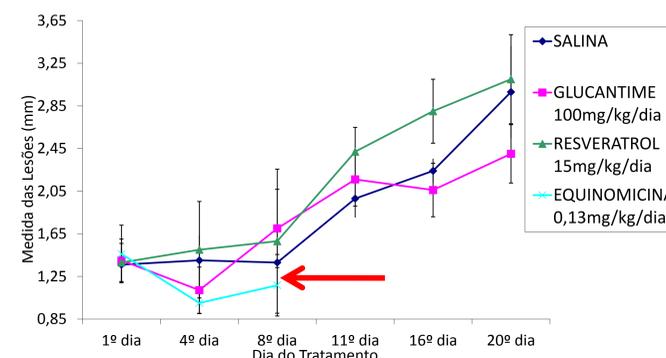
Na infecção *in vitro*, Equinomicina 48 h, Resveratrol 24 h e 48 h aumentaram a taxa de infecção comparados ao controle. Em relação aos amastigotas intracelulares por macrófago infectado, houve diminuição nas culturas com Equinomicina 24 h e com  $CoCl_2$  (estimulador de HIF-1) 48 h (Fig. 2 e 3).



**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-1α 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-1α 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-1α 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.