

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

Tatiane Luiza da COSTA^a, José Clecildo Barreto BEZERRA^a, Aline Lima OLIVEIRA^b, Luciano Moraes LIAO^b, Fátima Ribeiro DIAS^c, Milton Adriano Pelli de OLIVEIRA^d, Marina Clare VINAUD^a

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

^b Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear/IQ/UFG

^c Laboratório de Imunobiologia das Leishmanioses/IPTSP/UFG

^d Laboratório de Citocinas/IPTSP/UFG

Email para contato: tatiane_luiza@yahoo.com.br

Palavras-chave: *Leishmania spp*, metabolismo glicolítico, Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

1.INTRODUÇÃO: As formas promastigotas de *Leishmania sp* degradam carboidratos pela via glicolítica e a primeira reação ocorre dentro do glicosomo (Tielens & Hellemond, 2009). Utilizando como fonte de energia a glicose e ainda, aminoácidos e lipídeos presentes no meio de cultura, os produtos excretados/secretados (E/S) podem ser indicadores do perfil metabólico energético desses parasitos (Tielens & Hellemond, 2009). A análise bioquímica do metabolismo de *Leishmania* através da RMN vem atualizar os estudos parasitológicos com técnicas adequadas à avaliação do perfil bioquímico na relação parasito-hospedeiro. Neste trabalho foi utilizada a técnica de $^{13}\text{C}^1\text{H}$ - RMN para a identificação *in vitro* de metabólitos excretados/secretados por formas promastigotas de duas diferentes espécies de *Leishmania spp* e dois isolados de *L. (Viannia) braziliensis* demonstrando possíveis diferenças entre suas vias metabólicas para produção de energia.

2.MATERIAL E MÉTODOS: As formas promastigotas de *L. (V.) braziliensis* (M2903, EFSF6 e WSS5) e *L. (L.) amazonensis* (PH8) foram cultivadas em meio Grace's e o crescimento dos parasitos se iniciou com 1×10^6 *Leishmania*/mL, mantido em garrafas de cultura à 26°C por seis dias. Promastigotas foram coletadas por centrifugação e lavadas três vezes em PBS contendo 1mM de U- ^{13}C -glicose. Num total de 2×10^8 *Leishmania*/mL foram ressuspensas em PBS contendo 5mM de U- ^{13}C -glicose e mantidas à 26°C por 5 horas. Em seguida, o metabolismo foi paralisado em gelo por 5 minutos e centrifugado para a obtenção do sobrenadante. Este foi coletado, adicionado D₂O (10%v/v) e analisado por RMN. Espectros monodimensionais foram obtidos à 25°C em espectrômetro Bruker Avance III 500 (operando a 125,76 MHz para ^{13}C). A atribuição dos sinais de metabólitos foi realizada pelos valores de deslocamento químico e constante de acoplamento ^{13}C - ^{13}C já publicados.

3.RESULTADOS E DISCUSSÃO: Os metabólitos E/S detectados

no sobrenadante das amostras analisadas por ^{13}C foram: Alanina, lactato, acetato, piruvato, succinato, glicerol, CO_2 , uréia e aminoácidos. Como exceção, pode se observar que o isolado EFSF6 além dos metabólitos supracitados apresentou a valina e glutamina, e na espécie PH8 não foi detectado a presença do lactato. Os metabólitos E/S detectados no sobrenadante das amostras analisadas por ^1H foram: Alanina, lactato, acetato, oxalato, piruvato, succinato, e aminoácidos. Como exceção, pode se observar que somente na espécie PH8 e no isolado WSS5 foi detectado o oxalato e de aminoácidos, e na PH8 verificou-se a presença da arginina. O piruvato e succinato foram detectados apenas na espécie M2903 e no isolado EFSF6. Os metabólitos detectados no pellet das amostras analisadas por ^{13}C foram: Alanina, succinato, glicerol, CO_2 e uréia. Sendo que, somente no isolado EFSF6 foi detectado succinato. E apenas a espécie M2903 e o isolado EFSF6 apresentaram o glicerol. Os metabólitos detectados no pellet de todas as amostras analisadas por ^1H foram: Alanina, lactato, oxalato, aminoácidos e ácidos graxos. Durante os períodos de crescimento parasitário a glicose é catabolizada pela via glicolítica e como produto da glicólise o piruvato, foi detectado nas amostras analisadas. Os produtos do metabolismo intracelular, como oxalato, foram observados nas amostras do pellet. Darling et al. (1987) em promastigotas de *L. braziliensis* utilizando RMN ^{13}C detectou alanina, lactato, acetato, piruvato, succinato e glicerol. Rainey & MacKenzie (1991) utilizando ^{13}C em promastigotas de *L. pifanoi* detectou a presença de alanina, acetato, citrato, malato e succinato no sobrenadante. Singha et al. (1996) em promastigotas de *L. donovani* utilizando a extração do pellet com ácido perclórico detectou através ^1H : valina, lactato, alanina, arginina, acetato, acetoacetato, succinato, α -glicerofosforilcolina, glicina, S-adenosil metionina, inosina monofosfato, tirosina, histidina, fenilalanina, hipurato, adenosina e etanol. O piruvato é produto da

glicólise sendo importado para a mitocôndria e convertido em acetil-CoA. A primeira reação do TCA é a condensação do acetil-CoA com o oxaloacetato para formar o citrato e este pode ser utilizado no catabolismo de aminoácidos ou na biosíntese de ácidos graxos (Bringaud et al. 2006; Saunders et al. 2010). A produção de alanina requer uma fonte de nitrogênio, por exemplo, a uréia, sugerindo ser derivada do catabolismo dos aminoácidos. Darling et al. (1987) utilizando ressonância magnética nuclear verificou que o succinato foi o maior produto metabólico da glicólise em *L. braziliensis*, sob condições aeróbias. O succinato é rapidamente consumido do meio de cultura por ser um importante doador de elétrons na cadeia respiratória mitocondrial. Foi relatada a presença do piruvato E/S por promastigotas de *L. braziliensis* (Darling et al. 1987). O piruvato é o produto final da glicólise sendo transportado para dentro da mitocôndria para sua oxidação e formação de ATP. Acetato é formado intracelularmente em meio de cultura rico em glicose. O acetil-CoA pode ser produto final da β -oxidação dos ácidos graxos (Rivière et al. 2009). O CO₂ presente em todos os sobrenadantes pelo ¹³C sugere que o acetil-CoA produzido a partir do metabolismo da glicose é convertido em CO₂ através do TCA em acetato e succinato, sendo estes uma excelente forma de se obter ATP (Bringaud et al. 2006). O glicerol é formado no glicossomo a partir da glicólise, sendo re-oxidado na membrana mitocondrial em dihidroxiacetona-fosfato que é convertido em metilglioxal e este em lactato, sendo utilizado na gliconeogênese (Saunders et al. 2010). **4.CONCLUSÃO:** Através deste trabalho foi possível observar que há diferenças na excreção/secreção de metabólitos entre diferentes espécies e até mesmo entre isolados de *Leishmania spp* para a obtenção de energia necessária à sua sobrevivência. Mudanças bioquímicas no metabolismo podem indicar possíveis adaptações do parasito às diferentes condições ambientais e fisiológicas durante o

ciclo de vida e essas características bioquímicas individuais poderão ser utilizadas como identificação para cada isolado, além de estabelecer diferenças metabólicas na relação parasito-hospedeiro. **Fonte Financiadora: FAPEG e CNPQ.**

5. REFERÊNCIAS

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

Darling, T.N., Davis, D.G., London, R.E., Blum, J.J., 1987. Products of *Leishmania braziliensis* glucose catabolism: Release of D-lactate and, under anaerobic conditions, glicerol. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of América* 84, 7129-7133.

Greig, N., Wyllie, S., Patterson, S., Fairlamb, A.H., 2009. A comparative study of methylglyoxal metabolism in trypanosomatids. *The Journal of Federation of European Biochemical Societies* 276, 376-386.

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

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

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

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

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