



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA E  
PARASITOLOGIA APLICADAS**

**EFEITOS *IN VIVO* E *IN VITRO* DA LECTINA  
DE *Synadenium carinatum* SOBRE A INFECÇÃO  
MURINA POR *Leishmania (Leishmania)*  
*amazonensis***

**SANDRA REGINA AFONSO CARDOSO**

**UBERLÂNDIA – MG  
2006**

**SANDRA REGINA AFONSO CARDOSO**

**EFEITOS *IN VIVO* E *IN VITRO* DA LECTINA  
DE *Synadenium carinatum* SOBRE A INFECÇÃO  
MURINA POR *Leishmania (Leishmania)*  
*amazonensis***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em  
Imunologia e Parasitologia Aplicadas da Universidade  
Federal de Uberlândia, como parte das exigências para  
obtenção do título de Doutor.

**Orientador:**

Prof. Dr. MARCELO SIMÃO FERREIRA

**Co-Orientadora:**

Profa. Dra. MARIA APARECIDA DE SOUZA

**UBERLÂNDIA – MG  
2006**

## FICHA CATALOGRÁFICA

Elaborada pelo Sistema de Bibliotecas da UFU / Setor de  
Catalogação e Classificação

C268e      Cardoso, Sandra Regina Afonso, 1961-  
              Efeitos in vivo e in vitro da lectina de *Synadenium carinatum* sobre  
              a infecção murina por *Leishmania (Leishmania) amazonensis* / Sandra  
              Regina Afonso Cardoso. - Uberlândia, 2006.  
              76 f. : il.  
              Orientador: Marcelo Simão Ferreira.  
              Tese (doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de  
              Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas.  
              Inclui bibliografia.  
              1. Leishmaniose - Teses. I. Ferreira, Marcelo Simão. II. Universidade  
              Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Pa-  
              rasitologia Aplicadas. III. Título.

CDU: 616.993.161

**Ao João Gilberto, Carolina e Felipe**

**Aos meus pais**

**“Maravilhar-se é o primeiro passo para o descobrimento”  
(Louis Pasteur, 1822-1895)**

## AGRADECIMENTOS

Ao professor *Dr. Marcelo Simão Ferreira* pela orientação, dedicação, incentivo e exemplo profissional.

À professora *Dra. Maria Aparecida de Souza* pelos ensinamentos de vida e bancada, sendo um exemplo de profissionalismo, amizade e confiança.

À professora *Dra. Maria Inês Machado* pela longa amizade, incentivo e eterno aprendizado.

Ao *Dr Sílvio Favoretto Junior* pela amizade e valiosa contribuição na realização deste trabalho.

Ao professor *Dr. Ademir Rocha* pela atenção e gentileza na disponibilização e análise dos cortes histológicos.

À professora *Dra. Janethe D. O. Pena* pela atenção, incentivo e gentileza dispensada.

Aos professores *Drs. Marcelo Emílio Belleti, Marcos Silva e Fábio de Oliveira* pelos ensinamentos e sugestões na banca de qualificação.

Ao amigo *Flávio Hercos Rodrigues* pela gentileza, amizade e pré-disposição para ajudar.

Aos colegas e amigos do Laboratório de Biologia Molecular pelo convívio harmonioso, amizade e apoio.

Sobre tudo agradeço a *Deus*, que está sempre ao meu lado, iluminando, permitindo e ensinando. Obrigado Senhor!

## SUMÁRIO

|                                                                        | Páginas |
|------------------------------------------------------------------------|---------|
| <b>LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS</b>                                  |         |
| <b>LISTA DE FIGURAS E TABELAS</b>                                      |         |
| <b>1. RESUMO</b>                                                       | 01      |
| <b>2. ABSTRACT</b>                                                     | 02      |
| <b>3. INTRODUÇÃO</b>                                                   | 03      |
| <b>3.1</b> Leishmaniose                                                | 03      |
| 3.1.1 Considerações Gerais                                             | 03      |
| 3.1.2 Imunopatogênese das Leishmanioses                                | 05      |
| 3.1.3 Tratamento                                                       | 09      |
| 3.1.4 Vacinas                                                          | 11      |
| <b>3.2</b> Lectinas                                                    | 16      |
| 3.2.1 Aspectos Gerais                                                  | 16      |
| 3.2.2 Propriedades biológicas                                          | 18      |
| <b>4. OBJETIVOS</b>                                                    | 24      |
| <b>5. MATERIAIS E MÉTODOS</b>                                          | 25      |
| 5.1 Lectina                                                            | 25      |
| 5.2 Animais                                                            | 25      |
| 5.3 Parasitos                                                          | 26      |
| 5.4 Preparo do antígeno solúvel de <i>Leishmania amazonensis</i> (SLA) | 26      |
| 5.5 Análise eletroforética do SLA                                      | 27      |
| 5.6 Infecção de BALB/c com <i>L. (L.) amazonensis</i>                  | 27      |
| 5.7 Indução e mensuração de DTH                                        | 28      |
| 5.8 Análise sorológica.                                                | 29      |
| 5.9 Análise histopatológica e de carga parasitária                     | 29      |
| 5.10 Macrófagos Peritoneais Inflamatórios                              | 30      |
| 5.11 Cultura de Macrófagos                                             | 30      |
| 5.12 Infecção de Macrófagos por <i>L. (L.) amazonensis</i>             | 31      |

|                                                                                          |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 5.13 Dinâmica da Interação Macrófago- <b><i>Leishmania</i></b>                           | 32 |
| 5.14 Mensuração de nitritos e nitratos                                                   | 33 |
| 5.15 Dosagem de IL-12                                                                    | 33 |
| 5.16 Análise da expressão de citocinas e iNOS por RT-PCR                                 | 34 |
| 5.17 Análise estatística                                                                 | 36 |
| <b>6. RESULTADOS</b>                                                                     | 37 |
| 6.1 Pureza da lectina ScLL                                                               | 37 |
| 6.2 Efeito da imunização de ScLL e / ou SLA na progressão da lesão                       | 38 |
| 6.3 Resposta de DTH a <i>L.(L.) amazonensis</i> em camundongos                           | 40 |
| 6.4 Resposta imune humoral                                                               | 42 |
| 6.5 Histopatologia                                                                       | 44 |
| 6.6 Análise da carga parasitária no coxim plantar                                        | 48 |
| 6.7 Expressão de citocinas e iNOS por RT-PCR na lesão                                    | 50 |
| 6.8 Expressão de citocinas e iNOS por RT-PCR em macrófagos peritoneais                   | 53 |
| 6.9 Análise da infecção por <i>L. amazonensis</i> em macrófagos ativados <i>in vitro</i> | 57 |
| 6.10 Análise da produção de Nitrito por macrófagos inflamatórios murinos                 | 61 |
| <b>7. DISCUSSÃO</b>                                                                      | 63 |
| <b>8. CONCLUSÕES</b>                                                                     | 75 |
| <b>9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>                                                     | 76 |

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

**ABL:** Lectina de *Agaricus bisporus*.

**AIDS:** Síndrome da imunodeficiência humana.

**APC:** Célula apresentadora de antígeno.

**BHI:** Infusão de cérebro e coração (“Brain Heart Infusion”).

**BSA:** Albumina bovina sérica.

**CD:** “Cluster” de diferenciação.

**cDNA:** DNA complementar.

**CMSP:** Células mononucleares do sangue periférico.

**ConA:** Lectina de *Canavalia ensiformis*.

**ConBr:** Lectina de *Canavalia brasiliensis*.

**CpG-DNA:** Seqüências de DNA imunoestimulatórias.

**CTLA-4:** Antígeno 4 citotóxico para linfócitos (“lymphocyte cytotoxic antigen four”).

**DGL:** Lectina de *Dioclea grandiflora*.

**DMEM:** “Dulbecco`s Modified Eagle Médium”.

**DMSO:** Dimetil sulfóxido.

**DNA:** Ácido desoxirribonucléico.

**DO:** Densidade óptica.

**DTH:** Reação de hipersensibilidade tardia (“delayed type hypersensitivity”).

**DVL:** Lectina de *Dioclea violacea*.

**EDTA:** Ácido etileno diaminotetracético.

**ELISA:** Ensaio imunoenzimático (“enzyme ummunosorbent assay”).

**fMLP:** N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine

**GAPDH:** Enzima metabólica (Gliceraldeído- 3-fosfato desidrogenase).

**GM-CSF:** Fator estimulante do crescimento de colônia de granulócitos.

**H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>:** Ácido fosfórico.

**HBSS:** Solução salina balanceada de Hanks.

**HIV:** Vírus da imunodeficiência humana.

**HRP:** “Horseradish peroxidase”.

**IFN- $\gamma$ :** Interferon gama.

**Ig:** Imunoglobulina.

**IL:** Interleucina.

**iNOS:** Óxido nítrico sintase induzível.

**JE:** Quimiocina murina homóloga a proteína quimiotática para monócitos-1 humanos (MCP-1).

**KC:** Quimiocina murina homóloga ao oncogene relacionado ao crescimento- $\alpha$  humano (GRO- $\alpha$ ).

**KLC:** Antígeno “Keyhole limpet hemocyanine”.

**KM(+):** Lectina ligante de manose de *Artocarpus integrifolia*.

**LACK:** “*Leishmania*-homologue of receptor for activated c Kinase”

**LCD:** Leishmaniose cutânea difusa.

**LMC:** Leishmaniose mucocutânea.

**LPG:** Lipofosfoglicano.

**LPS:** Lipopolissacarídeo de *Escherichia coli*.

**LTA:** Leishmaniose tegumentar americana.

**LTB<sub>4</sub>:** Leucotrieno.

**LV:** Leishmaniose visceral.

**MAH:** Lectina de *Maackia amurensis*.

**MBL:** Lectina ligante de manose.

**MCAF:** Fator ativador e quimiotático para monócitos.

**MHC I:** Complexo de histocompatibilidade principal da classe I.

**MHC II:** Complexo de histocompatibilidade principal da classe II.

**NEED:** Dihidrocloridrato de naftilenodiamina.

**NK:** Células “natural killer”.

**NO:** Óxido nítrico.

**PAA:** Lectina de *Pisum arvense*.

**PBS:** Solução salina tamponada com fosfatos (“phosphate buffer saline”).

**PBS-T:** Solução salina tamponada com fosfatos adicionada de Tween 20

**PGE2:** Prostaglandina E2.

**PHA:** Lectina de *Phaseolus vulgaris*.

**PMSF:** Fenil-metil-sulfonil fluoreto.

**PNA:** Lectina de amendoim.

**RCA:** Lectina de *Ricinus communis*.

**SBF:** Soro bovino fetal.

**ScLL:** Lectina do látex de *Synadenium carinatum*.

**SDS:** Sódio dodecil sulfato.

**SLA:** Antígeno solúvel de *Leishmania*

**TGF- $\beta$ :** Fator de crescimento tumoral beta.

**TMB:** 3, 3', 5, 5' - tetrametilbenzidina.

**TNF- $\alpha$ :** Fator de necrose tumoral alfa.

**VAA:** Lectina de *Viscum álbium*.

**WGA:** Lectina de gérmen de trigo.

**WHO:** “World Health Organization” ou OMS (Organização Mundial de Saúde).

## LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Página

**FIGURA 1.** Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) a 12%, demonstrando a pureza da lectina do látex de *S. carinatum* purificada em coluna de afinidade, após coloração pela prata. (MW) padrão de peso molecular; **(A)** extrato total em água; **(B)** primeiro eluato; **(C)** lectina pura.

37

**FIGURA 2.** Efeito de ScLL na progressão da lesão de camundongos BALB/c infectados por *L.(L.) amazonensis*. Camundongos BALB/c imunizados e infectados com  $10^6$  formas promastigotas metacíclicas de *Leishmania* foram monitorados durante 10 semanas após infecção, quando a comparação entre o aumento da lesão no coxim plantar infectado e o coxim plantar contralateral não infectado foi realizada. **(A)** animais imunizados com 25 µg/animal de SLA ou ScLL (10, 50 e 100 µg/animal) e controle (animais que receberam apenas salina). **(B)** animais imunizados com 25 µg/animal de SLA ou SLA associado a ScLL (10, 50 e 100 µg/animal) e controle. As barras indicam a média e o desvio padrão das diferenças entre a média dos coxins plantares infectados e não infectados (n=5).

39

**FIGURA 3.** Mensuração de DTH. Na décima semana após infecção *L. amazonensis* os animais imunizados receberam inoculo 50 µg de antígeno de *Leishmania* no coxim plantar contralateral não infectado. Após 48 horas foi realizada leitura da enduração da pele como descrito em material e métodos. **(A)** Grupos de animais controle ou ScLL (10, 50 e 100 µg/animal. **(B)** Grupos de animais imunizados com 25µg/animal de SLA associado a ScLL (10, 50 e 100 µg/animal) e controle. As barras indicam a mediana das medidas de enduração da pele em cada grupo (n=5).

41

**FIGURA 4.** Níveis séricos de imunoglobulinas específicas anti-*Leishmania*. Na décima semana após infecção os animais foram sangrados e avaliados quanto ao nível de anticorpos específicos por ELISA. Grupos de animais imunizados com 25 µg /animal de SLA associado ou não com ScLL (10, 50 e 100 µg/animal) e controle (salina) foram analisados. C(-) representa o soro de animal não imunizado e não infectado. **(A)** Níveis de IgG total anti-*Leishmania*. **(B)** Níveis de IgG1 anti-*Leishmania*. **(C)** Níveis de IgG2a anti-*Leishmania*. As barras expressam a média e o desvio padrão da densidade óptica (DO) da leitura a 492 nm em amostras de soro de cada grupo (n=5). \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,0084$ ; \*\*\*  $p < 0,0001$ .

43

**FIGURA 5.** Análise histopatológica de fragmentos do coxim plantar de camundongos imunizados e controle após 10 semanas de infecção. **(A)** Controle: Pele. Exsudato mononuclear e neutrofílico em derme e hipoderme. Parasitismo de macrófagos (cabeças de setas). Coloração: hematoxilina-eosina (HE). Aumento original: 1000 X. **(B)** Controle: Linfonodo. Célula gigante multinucleada parasitada. Cabeça de seta indica vacúolo com numerosas amastigotas na periferia. Coloração: HE. Aumento original: 1000 X. **(C)** SLA: Pele. Parasitismo de células alongadas da derme compatíveis com fibroblastos (cabeças de setas). Coloração: HE. Aumento original: 1000 X. **(D)** SLA: Linfonodo. Parasitismo de macrófago (cabeça de seta). Coloração: HE. Aumento original: 1000 X. **(E)** SLA + 10 µg: Pele. Exsudato mononuclear, neutrofílico e eosinofílico. Parasitismo de macrófagos (cabeça de seta). Coloração: HE. Aumento original: 1000 X. **(F)** SLA + 10 µg: Linfonodo. Exsudato

neutrofílico. Parasitismo de macrófagos (cabeças de setas). Coloração: HE. Aumento original: 1000 X. **(G)** SLA + 50 µg; Pele. Exsudato mononuclear neutrofílico. Parasitismo de macrófagos (cabeças de setas). Coloração: HE. Aumento original: 1000 X. **(H)** SLA + 50 µg; Linfonodo. Parasitismo de macrófagos (cabeças de setas). Coloração: HE. Aumento original: 1000 X. **(I)** SLA + 100 µg; Pele. Parasitismo de queratinócitos epidérmicos (cabeça de seta). Coloração: HE. Aumento original: 1000 X. **(J)** SLA + 100 µg; Linfonodo. Exsudato eosinofílico. Parasitismo de macrófagos (cabeças de setas). Coloração: HE. Aumento original: 1000 X. **(L)** 10 µg; Pele. Parasitismo de macrófagos na hipoderme (cabeças de setas). Coloração: HE. Aumento original: 1000 X. **(M)** 10 µg; Linfonodo. Exsudato eosinofílico e parasitismo de macrófagos (cabeças de setas). Coloração: HE. Aumento original: 1000 X. **(N)** 50 µg; Pele. Parasitismo na epiderme. Macrófagos parasitados (cabeça de seta). Coloração: HE. Aumento original: 1000 X. **(O)** 50 µg; Linfonodo. Células gigantes multinucleadas e parasitismo de macrófagos (Cabeças de setas). Exsudato neutrofílico e eosinofílico. Coloração: HE. Aumento original: 1000 X. **(P)** 100 µg; Pele. Parasitismo de macrófagos (cabeça de seta) e fibroblastos dérmicos. Coloração: HE. Aumento original: 1000 X. **(Q)** 100 µg; Linfonodo. Parasitismo de macrófago (cabeça de seta). Coloração: HE. Aumento original: 1000 X.

46

**FIGURA 6.** Carga parasitária no coxim plantar dos camundongos BALB/c imunizados com SLA e/ou ScLL e posteriormente infectados por *L. (L.) amazonensis*. Os resultados expressam a média e o desvio padrão do número de parasitos por campo no interior dos macrófagos infectados. *p* níveis de significância; \*\*\* *p* < 0,0001.

49

**FIGURA 7.** Expressão e intensidade relativa da expressão de citocinas e iNOS por RT-PCR no coxim plantar de camundongos imunizados e controles, infectados por *L. amazonensis*. Iniciadores de GAPDH foram utilizados como padrão da expressão normal de mRNA. C (-) indica controle interno da reação. As barras correspondem a intensidade relativa da expressão de citocinas e iNOS com os respectivos estímulos utilizados no experimento.

52

**FIGURA 8.** Expressão e intensidade relativa da expressão de citocinas e iNOS por em macrófagos peritoneais inflamatórios **(A)** 24 horas e **(B)** 72 horas após infecção por *L. amazonensis*. Iniciadores de GAPDH foram utilizados como padrão da expressão normal de mRNA. As barras correspondem à intensidade relativa da expressão de citocinas e iNOS com os respectivos estímulos utilizados no experimento.

55

**FIGURA 9.** Infecção por *L. amazonensis* em macrófagos peritoneais inflamatórios pré-ativados com (A) 100 µg de ScLL; (B) 50 µg de ScLL; (C) 10 µg de ScLL; (D) LPS; (E) IFN-γ; (F) ConA; (G) Jacalina; (H) PHA; (I) apenas Meio, 24 horas após infecção por *L. amazonensis*. As células foram cultivadas durante 48 horas com os tratamentos, em seguida foram lavadas e então infectadas com formas promastigotas por 3 horas. Após infecção, os parasitos livres foram retirados por meio de lavagens, sendo então adicionado mais meio RPMI completo. Os macrófagos infectados foram acompanhados durante 24, 48 e 72 horas, em estufa a 5% de CO<sub>2</sub>, quando então foram lavados, fixados e corados por Giemsa. A presença dos parasitos no interior dos macrófagos foi analisada em microscopia de luz em aumento de 1000x. Em (A), (B) e (C), macrófagos ativados vacuolizados com parasitos (setas) e elongações

citoplasmáticas. Em (D) e (E), macrófagos ativados com parasitos interiorizados (setas), grandes vacúolos e elongações citoplasmáticas (setas). Em (F), (G) e (H), presença de intenso parasitismo intracelular (setas) e grandes vacúolos (seta). Em (I), grande parasitismo intracelular, macrófagos arredondados, sem prolongamentos citoplasmáticos evidentes. **60**

**FIGURA 10.** Produção de Nitrito por macrófagos peritoneais inflamatórios murinos (A) 24 horas; (B) 48 horas e (C) 72 horas após infecção por *L. amazonensis*. A concentração de nitrito nos sobrenadantes de macrófagos pré-tratados por 48 horas com ScLL nas concentrações de 100, 50 e 10 µg/ml, LPS (10 µg/ml), IFN-γ (40 ng/ml), ConA (5 µg/ml), Jacalina (10 µg/ml), PHA (10 µg/ml) e Meio e infectados por *L. amazonensis* foi determinada pelo método de Griess. A concentração de nitrito foi determinada em µM/ml. (\*) indicam resultados estatisticamente significativos ( $p < 0,05$ ). Os dados são representativos de três outros experimentos realizados independentemente. **62**

**TABELA 1.** Sequências de oligonucleotídeos das citocinas e iNOs amplificados no local da lesão (coxim plantar). **35**

**TABELA 2.** Sequências de oligonucleotídeos das citocinas amplificadas *in vitro* após 24, 48 e 72 horas de infecção por *L. amazonensis*. **36**

**TABELA 3.** Porcentagem de infecção de macrófagos inflamatórios murinos *amazonensis* e número de parasitos por célula após 24, 48 e 72 horas de infecção. **58**

## 1 RESUMO

**Introdução:** As leishmanioses são doenças causadas por protozoários do gênero *Leishmania*, parasitos intracelulares de macrófagos, que se manifestam sob formas clínicas diversas. A resposta imune celular é a resposta protetora efetiva contra estes parasitos intracelulares. Lectinas de plantas são capazes de induzir a produção, por células mononucleares murinas, de IFN- $\gamma$ , IL-12 e TNF- $\alpha$ , moléculas importantes em uma resposta celular Th1, requerida para o controle destas parasitoses.

**Objetivos:** Analisar o efeito biológico da lectina de *Synadenium carinatum* (ScLL), associada ou não ao antígeno solúvel de *Leishmania* (SLA), sobre a infecção murina por *L. (L.) amazonensis*, avaliando seu perfil imunoestimulatório na lesão cutânea e em cultura de macrófagos.

**Materiais e Métodos:** Para avaliar o potencial adjuvante de ScLL, grupos de cinco camundongos foram imunizados com diferentes concentrações desta lectina, associadas ou não ao SLA. A infecção destes animais com  $10^6$  promastigotas de *L. (L.) amazonensis* foi monitorada semanalmente pela medida da pata infectada durante 10 semanas, quando foram avaliadas as respostas celular e humoral por meio de DTH e ELISA, respectivamente, como também a expressão das citocinas IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-12, TNF- $\alpha$  e iNOS no local da lesão. O efeito imunoestimulatório de ScLL foi avaliado em cultura de macrófagos peritoneais murinos estimulados com esta lectina após 24, 48 e 72 horas de infecção por *L. (L.) amazonensis*, quando os sobrenadantes de cultura foram colhidos para determinação da produção de NO e IL-12. A expressão gênica de citocinas como IL-1 $\beta$ , IL-12, TNF- $\alpha$  e iNOS e a carga parasitária intracelular foram analisados após 24, 48 e 72 horas de infecção.

**Resultados:** A lectina ScLL, na concentração de 10  $\mu$ g/ml foi capaz de estimular a expressão das citocinas IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e iNOS, *in vitro*, bem como de reduzir, de modo significativo, a proliferação de parasitos no interior de macrófagos. *In vivo*, esta lectina foi capaz de proteger parcialmente os camundongos imunizados, controlando o desenvolvimento da lesão e induzindo a expressão das citocinas, IFN- $\gamma$ , IL-12, TNF- $\alpha$  e iNOS. Altos níveis de IgG2a e baixos de IgG1 foram detectados nos soros dos animais imunizados, sendo correlacionados com o controle da infecção.

**Conclusões:** A lectina ScLL conferiu proteção parcial aos animais imunizados após desafio por *L. (L.) amazonensis*, induzindo um perfil de resposta imune capaz de controlar o parasitismo *in vivo* e *in vitro*. Em conjunto, os dados obtidos com ScLL sugerem que pode vir a ser utilizada como adjuvante em modelos experimentais de vacinação contra *L. (L.) amazonensis*.

Palavras-chave: *L. (L.) amazonensis*, *Synadenium carinatum*, lectina, adjuvante, infecção murina.

## 2 ABSTRACT

**Introduction:** Leishmaniasis are illnesses caused by protozoan of the genus *Leishmania*, intracellular parasites of macrophages, that appears under diverse clinical forms. The cellular immune response is the effective protective response against these intracellular parasites. Lectins are capable to induce the production, by murine mononuclear cells, of interferon gamma (IFN- $\gamma$ ), IL-12 and TNF- $\alpha$ , important molecules in an immune response for a Th1 profile, required to control this parasitism.

**Objectives:** To analyze the biological effect of the latex lectin of the *Synadenium carinatum* (ScLL), associate or not to the soluble *Leishmania* antigen (SLA), on the murine infection by *L. (L.) amazonensis*, evaluating its immunostimulating profile in cutaneous lesions and in infected macrophages.

**Materials and Methods:** To evaluate the adjuvant potential of ScLL, groups of five mice had been immunized with different concentrations of this lectin associated or not to SLA. The infection of these animals was monitored weekly by measuring the infected paw during 10 weeks, when were evaluated the cellular and humoral immune responses through DTH and ELISA, respectively, as well as the expression of the IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-12, TNF- $\alpha$  and iNOS cytokines in the place of the lesion. The immunostimulating effect of ScLL was evaluated in culture of murine peritoneal macrophages stimulated with this lectin after 24, 48 and 72 hours of infection by *L. (L.) amazonensis*, when the culture supernatants were harvested for the determination of NO and IL-12 production. The genic expression of cytokines as IL-1 $\beta$ , IL-12, TNF- $\alpha$  and iNOS and the intracellular parasitic load were analyzed 24, 48 and 72 hours after infection.

**Results:** The ScLL lectin, in the concentration of 10 $\mu$ g/ml was capable to stimulate the expression of IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  and iNOS cytokines, *in vitro*, as well as reducing in a significant way, the proliferation of parasites in the interior of macrophages. *In vivo*, this lectin was capable to protect the immunized mice partially, controlling the development of the lesion and inducing the expression of IFN- $\gamma$ , IL-12, TNF- $\alpha$  and iNOS cytokines. High levels of IgG2a and low levels of IgG1 were detected in the serum of the immunized animals, being correlated with the control of the infection.

**Conclusions:** The ScLL lectin conferred partial protection to the animals immunized after challenge with *L. (L.) amazonensis*, inducing a profile of immune response capable to control the parasitism *in vivo* e *in vitro*. Jointly, the data obtained with ScLL suggests that it can be used as adjuvant in experimental models of vaccination against *L. (L.) amazonensis*.

**Key Words:** *Leishmania amazonensis*, *Synadenium carinatum*, lectin, adjuvant, murine infection.

## 3 INTRODUÇÃO

### 3.1 *Leishmanioses*

#### 3.1.1 Considerações Gerais

As leishmanioses são doenças parasitárias que acometem o homem, causadas por várias espécies de protozoários do gênero *Leishmania*, Ross (1903).

Este gênero compreende várias espécies de protozoários pertencentes à ordem *Kinetoplastida*, com um ciclo de vida heteroxênico, vivendo alternadamente em hospedeiros vertebrados e insetos vetores, estes últimos sendo responsáveis pela transmissão desses parasitos de um mamífero a outro. Nesses hospedeiros, representados na natureza por várias ordens e espécies, os microorganismos assumem a forma amastigota, que se multiplica obrigatoriamente dentro de células do sistema monocítico fagocitário (LAINSON; SHAW, 1987).

A *Leishmania* no hospedeiro invertebrado é encontrada no intestino de fêmeas dos vetores (gênero *Phlebotomus* no velho mundo e *Lutzomyia* nas Américas) e é transmitida ao hospedeiro mamífero após inoculação na pele das formas promastigotas metacíclicas durante o repasto sangüíneo. Os parasitos invadem macrófagos após interação de glicoconjugados de superfície, sendo o lipofosfoglicano (LPG), o mais importante entre eles (ELHAY et al., 1990) e especificamente o epítipo P5b, no caso da *Leishmania. major* (KELLEHER et al., 1992), com receptores na superfície de células macrofágicas, principalmente CR1 (DA SILVA et al., 1989). No meio intracelular, transformam-se em formas amastigotas (sem flagelo) e se multiplicam por divisão binária no vacúolo parasitóforo até o rompimento do macrófago parasitado, o qual libera novas formas

amastigotas que invadem mais células hospedeiras. Os macrófagos parasitados contendo formas amastigotas são capturados por flebotomíneos durante sua hematofagia. Então, no intestino do vetor, as células se rompem e as formas amastigotas transformam-se em promastigotas, completando assim o ciclo biológico.

As leishmanioses são endêmicas em várias partes do mundo, onde cerca de 400 milhões de indivíduos estão expostos à infecção em 88 países. Estima-se ocorrer 600.000 novos casos de leishmanioses anualmente, com uma prevalência de 12 milhões de indivíduos acometidos (OMS, 2002).

A doença pode causar uma variedade de manifestações clínicas. Os fatores que determinam as formas clínicas das leishmanioses não estão ainda bem esclarecidos, porém, possivelmente dependem da interação inicial da espécie de *Leishmania* com determinada virulência, da resposta imune e da susceptibilidade genética do hospedeiro (CERF et al., 1987; PEARSON; SOUZA, 1996; BLACKWELL, 1996).

As manifestações clínicas no homem podem variar desde uma forma cutânea com formação de uma lesão ulcerada única ou múltipla, que pode desaparecer espontaneamente sem tratamento (Leishmaniose Cutânea, LC), ou uma forma cutânea disseminada sem ulceração (Leishmaniose Cutânea Difusa, LCD) até formas graves com destruição das mucosas (Leishmaniose Mucosa, LM) ou ainda, com envolvimento visceral (Leishmaniose Visceral, LV), que podem ser fatais se não forem diagnosticadas e convenientemente tratadas (DESCOTEAUX; TURCO, 2002; KAFETZIS et al., 2005).

### 3.1.2 Imunopatogênese das Leishmanioses

A internalização de microorganismos patogênicos por macrófagos leva à produção de citocinas, quimiocinas e outros fatores que irão mediar algumas das respostas que podem levar à proteção ou susceptibilidade do hospedeiro (BARRAL-NETTO et al., 1998).

A resolução da infecção está associada a expansão de clones de linfócitos T CD<sub>4</sub><sup>+</sup> de perfil Th1 que produzem IFN- $\gamma$  e IL-2 (SCOTT et al., 1989, 1991; MURRAY et al., 1993; CAMPOS NETO, 2005), enquanto que a susceptibilidade é mediada por IL-4, IL-3 e IL-10, que levam a uma supressão da resposta Th1 com predominância de clones de linfócitos T CD<sub>4</sub><sup>+</sup> de perfil Th2 (HEINZEL et al., 1989).

No início da infecção cutânea humana por *L. braziliensis*, por exemplo, ocorre uma produção reduzida de IFN- $\gamma$  e aumentada de IL-10, indicando um perfil de resposta de susceptibilidade (ROCHA et al., 1999). Enquanto linfócitos de pacientes com calazar são incapazes de produzir IFN- $\gamma$  e IL-2 em resposta ao estímulo com antígeno específico (CARVALHO et al., 1985) é possível detectar IFN- $\gamma$  sérico em pacientes portadores de leishmaniose cutânea, fenômeno, este, relacionado à resolução da lesão (BARRAL-NETTO et al., 1989). Outros fatores já favorecem a eliminação do parasito, como a IL-7, uma citocina pró-inflamatória, a qual mostrou reduzir o número de macrófagos murinos infectados com *L. major* após tratamento, sendo este efeito ainda mais evidente quando se associou IL-7 com IFN- $\gamma$  (GESSNER et al., 1993).

No processo de estabelecimento da resposta protetora, a IL-2 tem um papel inicial importante, por ser a citocina chave neste mecanismo de diferenciação e ativação da resposta de linfócitos T CD<sub>4</sub><sup>+</sup> Th1 (SYPEK et al., 1993; VIEIRA et al., 1994; GHALIB et al., 1995), quando presente nos momentos iniciais da infecção (REINER et al., 1994). Esta

citocina é produzida por células mononucleares em camundongos C3H resistentes quando infectados por *L. major* (VIEIRA et al., 1994) e é essencial para a recuperação da produção de IFN- $\gamma$  e proliferação linfocitária em indivíduos curados de calazar (BACELLAR et al., 2000).

Outro tipo de resposta imunológica também pode ser montado levando à susceptibilidade do hospedeiro. Esta resposta é mediada por IL-4 levando a uma supressão da resposta Th1 com predomínio de clones de linfócitos T CD<sub>4</sub><sup>+</sup> Th2. Neste perfil imunológico a ativação de macrófagos pelo IFN- $\gamma$  é inibida pela presença das citocinas IL-3 e IL-4, produzidas por linfócitos T com perfil Th2 (LIEW et al., 1989). IL-4 é uma citocina pleiotrópica secretada primeiramente por células T CD<sub>4</sub><sup>+</sup> e que se liga a receptores de alta afinidade expressos em células hemopoéticas ou não. Em células T, a IL-4 promove a diferenciação de células T naive em células Th2 secretoras e suprime as respostas por IFN- $\gamma$  (TRAUTH, 2000). Outra citocina com perfil Th2, a IL-13, é expressa em altas quantidades na lesão de indivíduos infectados por *L. guyanensis*, ocorrendo simultaneamente a uma redução da expressão do receptor IL-12R $\beta$ 2, o que caracteriza uma resposta predominante Th2 (BOURREAU et al., 2001). A reconstituição de camundongos imunodeficientes com a linhagem H1A com perfil Th1 (produtoras de IL-2 e IFN- $\gamma$ ) ou com a linhagem U1A com perfil Th2 (produtoras de IL-4 e IL-5) de linfócitos T CD<sub>4</sub><sup>+</sup> antes da infecção com *L. major* resultou em resistência e progressão da doença, respectivamente (HOLADAY et al., 1991). Em outro Trabalho, camundongos 129/Sv, com “background” de resistência e transgênicos para o gen de IL-4, tornaram-se susceptíveis a infecção por *L. major*, produzindo altas quantidades de IL-4 e reduzidas de IFN- $\gamma$  (LEAL et al., 1993). A IL-3, outra citocina Th2, favoreceu a multiplicação dos parasitos em outros

tecidos, exacerbando a lesão em camundongos BALB/c infectados por *L. major* quando tratados com esta citocina, bem como ao aparecimento de parasitos em linfonodos de camundongos CBA resistentes (FENG et al., 1988). Camundongos deficientes de IL-6, infectados com *L. major* produziram uma quantidade reduzida de citocinas com perfil Th2 em relação aos animais normais, apesar de terem desenvolvido lesão e carga parasitária comparáveis (TITUS et al., 2001).

Os momentos iniciais, que envolvem a resposta imune inata, são muito importantes na posterior definição da resposta imune adquirida à presença do parasito. A própria penetração do parasito na célula hospedeira leva a alterações que podem favorecer a sobrevivência da *Leishmania*. Na resposta protetora, o IFN- $\gamma$ , produzido por linfócitos T CD<sub>4</sub><sup>+</sup> e células NK nos momentos iniciais da infecção (SCHARTON; SCOTT 1993) ativam macrófagos, levando à morte dos parasitos via produção de óxido nítrico e radicais de oxigênio, um dos mecanismos leishmanicidas resultantes de uma resposta protetora (MURRAY et al., 1983; GREEN et al., 1990). A presença do LPG, produzido pelo parasito e presente em sua superfície, reduz a produção de radicais hidroxila e ânions superóxido (CHAN et al., 1989). A expressão da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS) na lesão e nos linfonodos de camundongos C57BL/6 resistentes ocorre mais rapidamente e em maior quantidade do que em camundongos susceptíveis como o BALB/c, onde foi encontrada uma expressão aumentada de TGF- $\beta$ , um potente inibidor da iNOS (STENGER et al., 1994).

A penetração da *Leishmania* na célula também pode levar a alterações no metabolismo do ácido araquidônico e também inibir a apoptose, mecanismos que podem favorecer a permanência do parasito na célula hospedeira (MOORE; MATLASHEWSKI,

1994). A cultura *ex vivo* de esplenócitos de camundongos infectados com *L. major* resultou em uma alta produção de prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) que foi responsável por uma depressão de IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  e aumento de IL-4. Um aumento do leucotrieno LTB<sub>4</sub>, capaz de recrutar linfócitos T já comprometidos para um fenótipo Th1 ou Th2, também demonstrou-se mais intenso na cultura de células esplênicas de camundongos infectados (MILANO et al., 1996). Macrófagos de camundongos BALB/c infectados com diferentes cepas de *L. major* levam a uma expressão diferenciada de quimiocinas JE e KC, que são importantes no processo de atração de macrófagos ativados e neutrófilos para evitar a expansão da infecção. Os macrófagos infectados com uma cepa avirulenta (Lc79) tiveram uma expressão transitória (primeiras horas) e bem mais evidente destas quimiocinas, enquanto que a infecção por uma cepa virulenta (Lc5) levou a redução da expressão destas quimiocinas, sugerindo um mecanismo de escape do parasito para o estabelecimento da infecção (RACOOSIN et al., 1997).

A infecção também pode ser favorecida por alterações que podem ocorrer não apenas no momento inicial da infecção, mas, posteriormente, no processo de apresentação de antígenos aos linfócitos. Macrófagos murinos infectados com *L. donovani* mostraram uma redução na expressão de MHC classe II induzida por IFN- $\gamma$  (REINER et al., 1988). Já a infecção por *L. amazonensis* leva a internalização das moléculas de MHC classe II como um mecanismo de sobrevivência do parasito (COURRET et al., 2001). A infecção de macrófagos murinos com *L. major* reduziu o potencial destas células na apresentação de antígenos protéicos exógenos, relacionados ou não ao parasito, às células T restritas ao MHC classe II. Esta alteração ocorreu devido a uma possível modificação na expressão de moléculas de MHC classe II (FRUTH et al., 1993). Neste momento de sensibilização de

linfócitos, as moléculas co-estimulatórias exercem um papel importante no estabelecimento de uma resposta imune efetiva. Em camundongos “knock-out” para CD28 e infectados com *L. major*, a interação CD40/CD40L não é necessária para o desenvolvimento de uma resposta protetora, sugerindo o envolvimento de outras moléculas capazes de regular a expressão de IL-12 (PADIGEL et al., 2001). O CTLA-4, expresso em linfócitos T ativados, tem importância no processo de produção de TGF- $\beta$  na infecção por *Leishmania*, favorecendo a infecção (GOMES et al., 2001).

### 3.1.3 Tratamento

Os antimoniais pentavalentes, como estibogluconato de sódio e antimoniato de meglumina, ainda são as drogas mais utilizadas no tratamento dessa doença (BERMAN, 1997; MURRAY, 2000; DUBE et al., 2005), apesar da ocorrência de efeitos colaterais importantes (GASSER et al., 1994; IRAJI; SADEGHINIA, 2005) e do longo período de tratamento. Recentemente, o estibogluconato de sódio mostrou potencializar a produção de radicais tóxicos de oxigênio em camundongos infectados por *L. infantum* que podem contribuir para seu efeito leishmanicida (RAIS et al., 2000). A ocorrência de resistência ao tratamento convencional também constitui um fator que dificulta o controle das leishmanioses (SUNDAR et al., 2001; SINGH; SIVAKUMAR, 2004; KAFETZIS et al., 2005). A anfotericina B permanece como a droga de segunda escolha, apesar de sua importante toxicidade (SUNDAR et al., 2001; CROFT; COOMBS, 2003). Atualmente, um anti-cancerígeno de uso oral, a miltefosina, encontra-se em fase de testes clínicos e vem demonstrando resultados promissores e menos efeitos colaterais durante a sua administração (MOHAN; SETE, 2000; SOTO et al., 2001; FISCHER et al., 2001; GUPTA et al., 2005; SUNDAR; MURRAY, 2005).

A imunoterapia tem sido uma alternativa testada com o intuito de reduzir o período de tratamento convencional e evitar o surgimento de resistência (BARRAL-NETTO et al., 1997). A administração de IL-12 a camundongos infectados com *L. major* levou a um aumento da expressão de iNOS na lesão (SCHOPF et al., 2001). A utilização dessa citocina recombinante sob a forma tópica também mostrou curar camundongos BALB/c tratados pós-infecção com *L. major* (HEINZEL et al., 1993), eliminando a recidiva de novas lesões nos animais tratados com paramomicina (FERNANDES et al., 2001). Camundongos C57BL/6 cronicamente infectados com *L. major* e tratados com anticorpos anti-IL-10R foram curados, eliminando a latência do parasito que normalmente ocorre nesta linhagem de camundongos (BELKAID et al., 2001). O tratamento de pacientes com leishmaniose cutânea utilizando-se IFN- $\gamma$  humano recombinante, de uso tópico, resultou em redução significativa da lesão acompanhada do desenvolvimento de uma resposta inflamatória aguda (HARMS et al., 1989). Além disso, pacientes portadores de leishmaniose visceral, resistentes ao tratamento com antimoniais, também mostraram bons resultados com a utilização associada de IFN- $\gamma$  humano recombinante (BADARO et al., 1990).

Em alguns casos foram obtidos efeitos contrários ao que seria normalmente esperado. Um exemplo seria o tratamento de camundongos BALB/c infectados com *L. major* com GM-CSF recombinante utilizado diariamente. Apesar desta citocina ser um potente ativador de macrófagos *in vitro* e de induzir a proliferação de macrófagos e granulócitos *in vitro* e *in vivo*, o tratamento com esta citocina resultou em lesão ainda mais evidente do que nos animais não tratados que apresentaram carga parasitária mais elevada no linfonodo e no baço (GREIL et al., 1988). Contudo, há o relato do caso de um paciente com lesão mucosa refratária ao tratamento com antimoniais que respondeu quando tratado

com uma combinação de antígenos recombinantes e GM-CSF como adjuvante com resolução da lesão (BADARÓ et al., 2001). Em estudo duplo-cego, pacientes portadores de lesões cutâneas que foram tratados com estibogluconato de sódio via parenteral e GM-CSF na lesão, apresentaram uma cura mais rápida em relação a pacientes tratados apenas com estibogluconato de sódio e salina (ALMEIDA et al., 1999).

### 3.1.4 Vacinas

Tentativas de imunizações já eram realizadas no início do século XX em Bagdá, onde crianças eram inoculadas com material retirado de úlceras de pacientes com leishmaniose para evitar que elas adquirissem posteriormente a infecção (MARZINOWSKI, 1924).

Atualmente, os antígenos candidatos a vacinas podem ser divididos em vacinas de primeira e segunda geração (OMS, 2002). Nas vacinas de primeira geração foram utilizados parasitos mortos, vivos ou atenuados. Existem vários registros de vacinações com promastigotas vivas (SALAZAR, 1965; KOUFMAN et al., 1978; MUKHOPADHYAY et al., 1999) ou mortas (PESSOA; PESTANA, 1940; PESSOA, 1944; MAYRINK et al., 1986; MARZOCHI et al., 1998).

Antígeno preparado com promastigotas de *L. amazonensis* mortas pelo calor, utilizado em testes clínicos em voluntários resultou em conversão no teste de Montenegro, na proliferação de linfócitos específicos e produção de IFN- $\gamma$  (VELEZ et al., 2001; DE LUCA et al., 2001). Imunizações de camundongos utilizando antígeno total de diversas espécies de *Leishmania* já foram realizadas, no entanto, apenas proteção parcial pós-desafio foi obtida (BARRAL-NETTO et al., 1987). Frações protéicas purificadas da vacina Leishvacin® adicionadas de *Corynebacterium parvum*, como adjuvante, demonstraram

diferentes índices de proteção na imunização de camundongos susceptíveis C57BL/10, após desafio com *L. amazonensis* (AFONSO-CARDOSO et al., 2003).

A cepa avirulenta UR6 de *L. donovani* quando utilizada na imunização de camundongos resultou em proteção frente ao desafio com cepa virulenta (SRIRUPA et al., 2000). Vacinas contendo *L. major* “knock-out” para o gene DHFR-TS, ou promastigotas irradiadas, já foram também testadas em modelos de imunizações experimentais (HOWARD et al., 1994; VERAS et al., 1999). Camundongos imunizados com esta cepa DHFR-TS demonstraram o desenvolvimento de uma lesão bem mais reduzida quando desafiados com *L. amazonensis* em relação aos animais controles (VERAS et al., 1999).

Antígenos encapsulados em lipossomas visam o direcionamento de uma resposta Th1 (CHANG et al., 2001). Alguns trabalhos realizados com lipossomas carregados negativamente, contendo antígeno de *L. donovani*, demonstraram uma redução considerável da carga parasitária no fígado e baço de camundongos imunizados intraperitonealmente (AFRIN et al., 2000).

As vacinas de segunda geração envolvem as imunizações com antígenos recombinantes. Os testes com o antígeno recombinante Lcr1 demonstraram estimular células esplênicas de camundongos infectados com *L. chagasi* a secretar IFN- $\gamma$  e não IL-4 ou IL-10 (WILSON et al., 1995). Os recombinantes LmSTI1 e TSA, quando utilizados como vacinas, induziram uma excelente proteção em camundongos BALB/c e macacos *Rhesus* imunizados (CAMPOS-NETO et al., 2001). Uma proteína recombinante A2, um dos fatores de virulência para a sobrevivência do parasito, utilizada na imunização de camundongos, conferiu proteção contra o desafio com *L. donovani* associada a uma resposta mista com produção de anticorpos específicos para A2 e proliferação de

esplenócitos com produção de IFN- $\gamma$  após estímulo com o antígeno específico (GHOSH et al., 2001).

Seqüências de DNA imunoestimulatórias, mais conhecidas como seqüências CpG, capazes de ativar macrófagos e células dendríticas e induzir a secreção de IL-12 e IFN- $\gamma$  (CHACE et al., 1997; LIPFORD et al., 1997; ROMAN et al., 1997; SPARWASSER et al., 1998; STACEY; BLACKWELL, 1999; GURUNATHAN et al., 2000) têm sido utilizadas, apresentando uma ação interessante na promoção de resposta celular protetora contra as leishmanioses (STACEY et al., 1999), sendo inclusive capazes de inibir um quadro de resposta com padrão Th2 já bem estabelecido quando administrados vinte dias após a infecção por *L. major* (ZIMMERMANN et al., 1998).

A proteína LACK (receptores para quinase C homólogos da *Leishmania*), possui um papel imunopatogênico que favorece a infecção no modelo murino (MAILLARD et al., 2001; TORRENTERA et al., 2001), tendo sido alvo de vários testes como possível antígeno para vacinas utilizando a própria proteína ou a seqüência de DNA que a codifica. Uma vacina da seqüência p36/LACK utilizada na imunização de camundongos não resultou em proteção contra infecção desafio por *L. major* ou *L. donovani* apesar de uma forte resposta Th1 específica ao parasito (MELBY et al., 2001). Seqüências de DNA codificando o antígeno mostraram conferir proteção aos camundongos imunizados (GURUNATHAN et al., 1997) e outras seqüências codificando proteinases de cisteína de *L. major*, CPa e CPb, foram utilizadas como um coquetel de imunização, conferindo imunidade com longa duração (RAFATI et al., 2001).

Um estudo comparativo de vacinas de DNA codificando a gp63 e CPb de *L. mexicana* ou gp46 de *L. amazonensis* ou LACK de *L. major*, utilizados em uma imunização

de camundongos BALB/c, resultou em alta produção de IgG específica para *Leishmania* e proteção parcial após desafio de todos os plasmídeos menos o que codificava LACK (DUMONTEIL et al., 2000).

Uma vacina adequada contra leishmaniose deve ser capaz de acessar e ativar o sistema imune inato resultando posteriormente em uma resposta celular eficaz. Para obtenção de uma resposta polarizada, a utilização de um adjuvante adequado seria essencial para potencializar ou modular o efeito de um determinado antígeno que possua propriedade imunoestimulatória desejada. Alguns adjuvantes mais freqüentemente utilizados incluem componentes minerais (alumínio) (SHIRODKAR et al., 1990), *Listeria monocytogenes* mortas pelo calor (HANSEN et al., 2000), emulsões de óleo em água (MF59), toxinas naturais ou sintéticas derivadas de bactérias (toxina da cólera) ou linfotoxina (DEL GIUDICE et al., 1999), muramil dipeptídeos (MTP-PE), saponinas, citocinas, oligonucleotídeos ou a combinação deles (AFONSO et al., 1994; COX; COULTER, 1997; SCHIJNS et al., 2000; SOUZA et al., 2004).

Vacina constituída por promastigotas mortas e BCG (*Mycobacterium bovis*) como adjuvante mostrou ser ineficaz em um ensaio com voluntários no Irã (MOMENI et al., 1998). A imunização de camundongos C57BL/6 com uma mistura de antígenos expressos em amastigotas, testando diferentes adjuvantes (IL-12, Detox, lipídio A 4' – monofosforil, QS-21, *M. bovis*, *C. bovis*), resultou em proteção mais eficaz nos animais imunizados com os antígenos associados a IL-12 ou a Detox, evidenciando que a utilização do adjuvante pode direcionar a resposta imune. Uma cepa do vírus Vaccinia recombinante expressando os antígenos p36/LACK de *L. infantum* com ou sem IL-12 para imunização de camundongos foi eficaz na ativação de uma resposta tipicamente TH1 (GONZALO et al., 2001). Imunizações com a glicoproteína ligante de fucose e manose (FML), também com

saponina, protegeram camundongos contra leishmaniose visceral (PALATINIK-DE-SOUZA et al., 1994; DE SOUZA et al., 2001). Do mesmo modo, a adição de saponina originada de *Quillaja sp* ao antígeno solúvel de *L. major* potencializou a resposta imune conferindo proteção parcial contra infecção murina experimental (SOUZA et al., 2004). O GM-CSF, utilizado como adjuvante em uma vacina anti-*Leishmania* (Leishvacin®) na imunização de voluntários, resultou em resposta imune específica mais evidente com a produção de um DTH positivo na maioria dos voluntários (FOLLADOR et al., 2002). Levando em consideração a complexidade dos eventos envolvidos na resposta imune específica a um determinado antígeno, desde o recrutamento e ativação de células apresentadoras de antígenos, até a maturação e expansão de linfócitos T  $CD_4^+$ , é provável que uma associação de moléculas adjuvantes com um único mecanismo de ação seja necessária para obtenção de uma resposta Th1 ideal (MOINGEON et al., 2001).

A limitação do tratamento e a possibilidade de uma melhor compreensão dos mecanismos que possam levar à cura da doença despertaram o interesse em se avaliar moléculas que possuam capacidade de modular a resposta imune inicial.

Lectinas animais e vegetais têm sido intensivamente testadas quanto aos seus possíveis papéis biológicos, demonstrando serem moléculas que podem ser aplicadas como ferramentas biotecnológicas em potencial. Alguns destes efeitos biológicos já são bem conhecidos: produção de NO por macrófagos induzidas pelas lectinas de *Pisum arvense* (PAA) e *Canavalia braziliensis* (ConBr) (ANDRADE et al., 1999); produção de IFN- $\gamma$  e redução da lesão em camundongos BALB/c infectados com *L. amazonensis* tratados com ConBr (BARRAL-NETTO et al., 1996); indução de IL-12p40 produzida *in vitro* por

macrófagos murinos e proteção contra a infecção por *L. major* conferida após imunização com a lectina KM<sup>+</sup> de *Artocarpus integrifolia* (PANUNTO-CASTELO et al., 2001).

## **3.2 Lectinas**

### **3.2.1 Aspectos Gerais**

Lectinas são um grupo heterogêneo de proteínas ou glicoproteínas de origem não-imune que apresentam pelo menos um sítio de ligação reversível a carboidratos (PEUMANS; VAN DAMME, 1995). A palavra lectina é originada do latim *legere* que significa escolher, recebendo esta denominação devido a seu potencial em diferenciar carboidratos e/ou glicoconjugados. Estas proteínas foram pela primeira vez descritas por Stillmark, 1888, quando, ao estudar a toxicidade das sementes de mamona (*Ricinus communis*), observou que o extrato desta semente aglutinava hemácias de carneiro. As moléculas responsáveis por esta propriedade foram então chamadas de hemaglutininas ou fitohemaglutininas.

As lectinas podem ser encontradas em praticamente todos os organismos vivos: plantas, animais e diversos microorganismos (MOREIRA et al., 1991; KAYESHTA et al., 1993; SHARON et al., 1995; GABIUS et al., 1997). As lectinas isoladas de plantas têm sido as mais intensivamente estudadas (CAVADA et al., 1993) e, apesar da estrutura e especificidade por monossacarídeos de muitas destas lectinas já tenham sido determinadas, sua real função nas plantas de origem ainda permanece duvidosa. Alguns trabalhos já demonstraram um possível papel como proteínas de reserva nas plantas de origem, pelo fato de serem sintetizadas durante o desenvolvimento das sementes e degradadas durante a germinação e crescimento da mesma (PEUMANS et al., 1993). Podem também estar

envolvidas na defesa contra predadores (CHRISPEELS; RAIKHEL, 1991; PEUMANS; VAN DAMME, 1995) pois, após a ser ingerida por algum predador, a lectina não apenas resiste a ação proteolítica durante a passagem pelo trato digestivo, o que favorece sua interação com a membrana de células endoteliais seguida de endocitose, como ainda é capaz de causar efeitos tóxicos nutricionais como a redução dos níveis normais de insulina (PUSZTAI et al., 1993). Além disso, ainda podem funcionar como mediadores da simbiose entre bactérias do gênero *Rhizobium* fixadoras de nitrogênio e as raízes de leguminosas (AYOUBA et al., 1992; HIRSH, 1999).

Lectinas das famílias das leguminosas e euforbiáceas constituem um vasto grupo de lectinas vegetais já bem estudadas com relação à estrutura, especificidade e possíveis funções e aplicações. A família *Leguminosae* é a que possui o maior número de lectinas isoladas, tornando-se o grupo de lectinas melhor caracterizado. Várias lectinas desta família são constituídas de 2 ou 4 subunidades de 25 – 30 kDa, cada uma contendo um sítio de interação para carboidratos com a mesma especificidade e esta interação normalmente requer a presença de íons divalentes, sendo o cálcio e o manganês os mais comuns. O equilíbrio da formação de dímeros e tetrâmeros entre estas subunidades é pH dependente. As subunidades podem ser formadas por uma única cadeia polipeptídica, mas em alguns casos, como o das lectinas da tribo *Viceae*, podem ser formadas por duas cadeias: uma leve denominada alfa (5 -7 kDa) e uma pesada denominada beta (15-19 kDa) (ROUGÉ et al., 1987; SHARON et al., 1990; SHARON et al., 1993).

Lectinas como ConA, ConBr,  $KM^+$  compartilham características estruturais, como seqüência de aminoácidos, estrutura secundária e conformação tridimensional (RAMOS et al., 1996). Apesar do alto grau de homologia entre estas lectinas na seqüência primária de aminoácidos e no sítio de interação com carboidratos, elas apresentam diferenças

significantes nos efeitos, causados pela interação com seus ligantes específicos (BARRAL-NETTO et al., 1992; RODRIGUES et al., 1992; BENTO et al., 1993; GOMES et al., 1994).

Devido a propriedades peculiares quanto ao reconhecimento de glicoconjugados, sem causar alterações estruturais no ligante, as lectinas tornaram-se moléculas de grande interesse em diversas áreas, seja com o objetivo de entender melhor sua real função, ou de estabelecer possíveis aplicações.

### 3.2.2 Propriedades biológicas

A descoberta de que a lectina de *Phaseolus vulgaris* (PHA) apresentava atividade mitogênica para linfócitos (NOWELL et al., 1960) e que a lectina de gérmen de trigo (WGA) diferenciava células normais e malignas (AUB et al., 1963) revolucionou o interesse em explorar estas moléculas na imunologia. Várias lectinas já foram avaliadas quanto as suas capacidades de estimular a proliferação linfocitária, porém, nem todas possuem esta propriedade mitogênica, como a lectina do fungo *Agaricus bisporus* (ABL), a qual inibe a ativação linfocitária (KILPATRICK et al., 1987). Já a ConA, uma lectina com potente atividade mitogênica, leva ao aumento do número de células nos linfonodos e expressão de IL-2R em linfócitos de animais tratados com esta substância (BLACK et al., 1988; BENTO et al., 1993). A administração da lectina *Dioclea grandiflora* (DGL) pela via subcutânea na pata de camundongos resultou em um aumento no número de células no linfonodo poplíteo, causando ainda necrose e inflamação local, sendo estas células capazes de proliferar mesmo em cultura sem qualquer estímulo adicional (BARBOSA et al., 2001).

A superfície celular de mamíferos possui uma grande variedade de glicoconjugados, com diferenças muitas vezes discretas de uma célula para outra. A ligação de lectinas com diferentes tipos celulares pode desencadear inúmeros efeitos biológicos, como a indução de

respostas inflamatórias e secreção de citocinas. A lectina ligante de manose (MBL), presente no soro, tem a capacidade de ativar o sistema complemento devido a sua similaridade com o componente C1q e é também capaz de interagir com macrófagos, induzindo a secreção de TNF- $\alpha$  (BAJTAY et al., 2000).

A lectina WGA, apesar de não apresentar atividade mitogênica, mostrou capacidade de induzir a secreção de IL-12 e IFN- $\gamma$ , de forma independente de linfócitos T e B *in vitro* em cultura de células mononucleares murinas (MURAILLE et al., 1999). Monócitos humanos estimulados com galectina-3 ( $\epsilon$ BP/Mac-2) produziram alta quantidade de IL-1 amplificando uma possível resposta inflamatória (JENG et al., 1994). O estímulo de células esplênicas de camundongo em cultura com a lectina *Pisum sativum* (PSA) resultou em produção de TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ , além de atividade proliferativa. O estímulo com esta lectina, *in vivo*, aumentou a expressão de CD69 e CD122 em linfócitos, evidenciando o potencial imunoestimulatório desta lectina (LIMA et al., 1999).

O tratamento de camundongos BALB/c com a lectina ConBr induziu a produção de IFN- $\gamma$  por células esplênicas *in vitro* e *in vivo*, mostrando-se presente no soro dos animais tratados (BARRAL-NETTO et al., 1996). Esta lectina e as lectinas PAA e DGL foram capazes de estimular diretamente macrófagos murinos e linfócitos *in vitro* a produzir NO (ANDRADE et al., 1999).

A lectina de *Artocarpus integrifolia*, jacalina, além de ser um potente mitógeno e de ativar células B a secretar imunoglobulinas, liga-se especificamente a IgA, possibilitando o isolamento desta imunoglobulina por cromatografia de afinidade (ROQUE-BARREIRA et al., 1985, 1986) e sua detecção em amostras biológicas (GOMES et al., 2006), assim como ativação específica de linfócitos T CD4<sup>+</sup> (LAFONT et al., 1997). Outra lectina também

isolada de *Artocarpus integrifolia*, KM<sup>+</sup>, mostrou-se capaz de estimular a migração de neutrófilos na cavidade peritoneal de ratos de forma semelhante a IL-8 (SANTOS-DE-OLIVEIRA et al., 1994).

Em contraste com a KM<sup>+</sup> que demonstrou efeito pró-inflamatório, outras lectinas ligantes específicas de glicose e manose inibiram a migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal de camundongos, em um processo inflamatório induzido por carragenina e fMLP, evidenciando as diversas atividades exercidas por estes grupos de proteínas, além da importância destas moléculas como ferramentas para o estudo e caracterização de oligossacarídeos da superfície celular (ASSREUY et al., 1997; ALENCAR et al., 1999). Ação antiinflamatória também foi observada em um modelo de cistite hemorrágica induzida por ciclofosfamida em camundongos, onde os animais pré-tratados, por via endovenosa, com as lectinas *Dioclea guianensis* e *Dioclea violacea* demonstraram efeito inibitório sobre a migração de neutrófilos na bexiga de forma dose dependente (ASSREUY et al., 1999). Várias destas lectinas vegetais também demonstraram induzir a liberação de histamina por mastócitos e basófilos de forma não tóxica para as células (FERREIRA et al., 1996).

A capacidade destas proteínas de reconhecer glicanos complexos também possibilita discriminar diversos tipos celulares em vários estágios de diferenciação e maturação. O cDNA que codifica o domínio de reconhecimento de carboidratos da lectina de *Maackia amurensis* (MAH), por exemplo, sofreu mutação randômica e as lectinas mutantes, apesar de continuarem sendo reconhecidas por um anticorpo anti-MAH, foram capazes de distinguir entre eritrócitos de diferentes espécies animais e de formas diversas (YIM et al., 2001). A lectina do amendoim (PNA), que tem uma maior afinidade para interagir com células imaturas do processo de diferenciação de células linfóides humanas (COOPER et al., 1984) e monócitos imaturos (ROSEMBERG et al., 1985; KILPATRICK et al., 1990),

mostrou-se capaz de diferenciar os tipos celulares da forma mais grave de um tipo de leucemia linfoblástica (HAAR et al., 1985). Algumas lectinas podem inclusive indicar o prognóstico de neoplasias, como a lectina do molusco *Helix pomatia*, que tem sido empregada na avaliação do grau de agressividade do carcinoma gástrico em humanos, onde há uma relação direta entre o grau de malignidade e a interação desta célula com a célula maligna (OKUYAMA et al., 1998). Algumas dessas substâncias não só reconhecem células tumorais, como também são capazes de inibir seu crescimento; a RCA inibe o crescimento de câncer epidermóide em humanos e a lectina isolada de *Viscum album* (VAA) apresenta atividade citotóxica contra melanoma uroepitelial e gliomas. O mecanismo de ação da VAA parece acontecer através da produção e liberação de citocinas que ativam as células NK (LENARTZ et al., 1998; HEINY et al., 1998), induzindo a apoptose das células tumorais e também inibindo a angiogênese (PARK et al., 2001).

Algumas lectinas também têm sido avaliadas em sistemas de carreamento de antígenos e drogas para células alvo. Várias lectinas já foram conjugadas à biotina e mostraram capacidade de se ligar a tecidos da mucosa ocular e oral de ratos (BANCHONGLIKITKUL et al., 1998). Nesse contexto, a imunização intranasal de hamsters com um conjugado da lectina WGA, que reconhece especificamente as células M do epitélio nasal e o antígeno HRP, levou a internalização deste antígeno e produção de IgG específica em maior intensidade do que animais imunizados apenas com o antígeno (GIANNASCA et al., 1997).

O potencial adjuvante na imunização contra diversos patógenos tem sido avaliado com várias outras lectinas. A lectina VAA demonstrou grande potencial adjuvante na imunização intranasal de camundongos com ovalbumina, resultando em alta produção de IgA e IgG específicos na secreção mucosa dos animais (LAVELLE et al., 2001). Esta

mesma lectina também foi utilizada como adjuvante na imunização de camundongos com o antígeno KLH, levando a resposta específica de IgG1, IgG2 e IgG2b, aumento da resposta de DTH e produção de citocinas Th1 e Th2 superior a resposta encontrada apenas com o antígeno (YOON et al., 2001). Do mesmo modo, a jacalina foi testada quanto ao seu efeito adjuvante quando conjugada a epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* na imunização de camundongos, induzindo uma intensa resposta humoral com alta produção de anticorpos específicos para *T. cruzi* e redução significativa da carga parasitária destes animais após o desafio (ALBUQUERQUE, et al., 1999). A imunização de camundongos BALB/c com a lectina KM<sup>+</sup> e o antígeno SLA de *L. major* resultou em proteção parcial destes animais, cujos linfonodos passaram a produzir altos níveis de IFN- $\gamma$  e baixos níveis de IL-4, caracterizando uma resposta celular protetora (PANUNTO-CASTELO et al., 2001). A administração *in vivo* de ConBr resultou em uma redução da lesão em camundongos BALB/c infectados com *L. amazonensis* (BARRAL-NETTO et al., 1996).

*Synadenium carinatum*, uma Euphorbiaceae de origem africana é geralmente encontrada no Brasil como planta ornamental. A preparação aquosa do látex dessa planta tem sido utilizada na medicina popular no tratamento de doenças infecciosas e câncer. Recentemente, foi isolada e purificada por cromatografia de afinidade uma lectina do extrato aquoso do látex desta planta (ScLL), mostrando uma potente atividade hemaglutinante sobre diferentes grupos sanguíneos humano e animal (SOUZA et al., 2005). Estudos iniciais da ScLL em modelo murino de asma tem demonstrado que essa lectina apresenta forte ação antiinflamatória, inibindo significativamente a migração de eosinófilos e neutrófilos (dados ainda não publicados). Neste contexto, levando-se em consideração a utilização do extrato aquoso de *S. carinatum* na medicina popular, os poucos estudos

realizados com ScLL até o momento e as diversas atividades que as lectinas de plantas podem desempenhar, iniciou-se estudos que visam avaliar os efeitos biológicos de ScLL sobre a leishmaniose cutânea murina.

## 4. OBJETIVOS

4.1. Analisar o efeito biológico da lectina ScLL sobre a infecção murina experimental por *L.(L.) amazonensis*.

4.2. Avaliar o efeito adjuvante de ScLL associada ou não ao antígeno solúvel de *L. (L.) amazonensis* (SLA) na imunização de camundongos BALB/c infectados por *L.(L.) amazonensis*.

4.3. Determinar através de RT-PCR o perfil de expressão gênica das citocinas IFN- $\gamma$ , IL-12, TNF- $\alpha$ , IL-4 e iNOS na lesão de camundongos BALB/c imunizados e posteriormente infectados por *L.(L.) amazonensis*.

4.4. Determinar através de RT-PCR o perfil de expressão de citocinas e iNOS e índice de infecção em cultivo de macrófagos peritoneais inflamatórios murinos infectados por *L (L.) amazonensis*.

## 5. MATERIAIS E MÉTODOS

### 5.1 Lectina

*Synadenium carinatum*, comumente conhecida como “Leiteirinha ou folha Santa”, foi colhida em Uberlândia, Minas Gerais, Brasil. Após identificação a espécie foi registrada no Herbário da Universidade Federal de Uberlândia sob o código HUFU 38354. A lectina de *S. carinatum* (ScLL) foi obtida a partir do extrato aquoso do látex, como descrito por Souza e colaboradores (2005). Sumarizando, o extrato aquoso foi submetido a repetidas cromatografias de afinidade em coluna de D-galactose imobilizada em agarose (Pierce) e a fração ligante foi eluída com D-galactose (Sigma) a 0,4M em salina tamponada com borato (BBS) a 0,001M e, em seguida, concentrada e dialisada contra água usando membranas de Amicon YM 10 kDa (Millipore Corp., Belford, MA, USA). A homogeneidade e pureza da lectina foram monitoradas por eletroforese em gel de poliacrilamida a 15%, em presença de SDS e 2-mercaptoetanol (Fig. 1), segundo Laemmli (1970).

### 5.2 Animais

Camundongos BALB/c fêmeas, com idade entre 4 semanas foram utilizados nos experimentos e para manutenção dos parasitos. Os animais foram obtidos do Biotério da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-SP (USP), e mantidos com água e ração comercial balanceada *ad libitum* no Biotério do Laboratório de Experimentação Animal da Universidade Federal de Uberlândia (LEA-UFU).

### 5.3 Parasitos

*Leishmania (L.) amazonensis* (IFLA/BR/67/PH8) foi obtida do Instituto Evandro Chagas/PA e gentilmente cedida pelo Centro de Controle de Zoonoses da Prefeitura Municipal de São Paulo - SP. A cepa foi inoculada no coxim plantar de camundongos BALB/c, e após 3-4 semanas de infecção os animais foram sacrificados e os parasitos colhidos por maceramento do tecido subcutâneo das patas infectadas, em condições assépticas, e cultivados a 28°C em meio líquido de infusão de cérebro e coração (BHI; Sigma, St. Louis, EUA), contendo 10% de soro bovino fetal (SBF, Gibco BRL) e gentamicina (Sigma, St. Louis, EUA). Quando os parasitos atingiram a fase estacionária, novas passagens foram realizadas *in vivo*, para manutenção da virulência da cepa.

### 5.4 Preparo do antígeno solúvel de *Leishmania amazonensis* (SLA)

Para obtenção do antígeno solúvel de *Leishmania* (SLA) foi utilizado o método previamente descrito por Scott e colaboradores (1987), com algumas modificações. De maneira sucinta, formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis*, na fase estacionária obtida de cultura em meio BHI, foram colhidas e lavadas quatro vezes por centrifugação a 4°C por 15 minutos, a 2.200 x *g* (Sigma Laborzentrifugess 2k11, Sigma) em solução salina tamponada com fosfatos (PBS) estéril. A concentração de parasitos foi ajustada de tal forma a conter 1 x 10<sup>9</sup> formas por ml em PBS contendo 50 µg/ml de leupeptina (Sigma, St. Louis, EUA), 1,6 mM de fluoreto fenil-metil-sulfonil (PMSF, Sigma, St. Louis, EUA) e incubadas em banho de gelo por 10 minutos. Em seguida, os parasitos foram lisados por seis ciclos sucessivos de congelamento em nitrogênio líquido e descongelamento a 37°C em banho-maria (Fanem Ltda, São Paulo). O lisado de parasitos foi centrifugado a 2.200 x *g* a

4°C por 15 minutos e o sobrenadante centrifugado novamente a 10.000 x *g* a 4°C por 30 minutos. O sobrenadante foi colhido e filtrado em membranas com poro de 0,22 µm (Millipore Indústria e Comércio Ltda, São Paulo). A concentração protéica foi determinada seguindo-se a metodologia descrita por Lowry (1951), e em seguida, estocado a -70°C até o momento do uso.

### 5.5 Análise eletroforética do SLA

O antígeno SLA foi avaliado quanto ao perfil protéico por eletroforese (Bio-Rad, Hercules, CA) em gel de poliacrilamida a 15%, contendo dodecil sulfato de sódio a 0,1% (SDS-PAGE, Sigma) conforme descrito por Laemmli (1970). As proteínas na amostra foram visualizadas por coloração pela prata e comparadas aos padrões de peso molecular das proteínas fosfatase B de 112 kDa, albumina bovina de 84 kDa, ovalbumina de 53 kDa, anidrase carbônica de 34,9 kDa, inibidor de tripsina de 28,70 kDa e lisozima de 20,5 kDa .

### 5.6 Imunização de camundongos BALB/c

Para avaliar o efeito adjuvante de ScLL, oito grupos de animais, contendo cinco camundongos BALB/c cada, foram imunizados por via subcutânea no coxim plantar e, 33 dias mais tarde, infectados *L. (L.) amazonensis*. O desenvolvimento da lesão no coxim plantar foi determinado semanalmente, durante 10 semanas. Cada grupo foi inoculado com um volume total de 50 µl/animal: grupo I – Solução salina 0,85% (controle); grupo II - SLA (25 µg/animal); grupo III – SLA (25 µg/animal) + 100 µg/animal de ScLL; grupo IV – ScLL (100 µg/animal); grupo V – SLA (25 µg/animal) + 50 µg/animal ScLL; grupo VI - ScLL (50 µg/animal), grupo VII – SLA (25 µg/animal) + 10 µg/animal e grupo VIII –

ScLL (10 µg/animal). O esquema de imunização utilizado foi preconizado por Afonso *et al.* (1994), com algumas modificações. No dia zero, os camundongos foram imunizados no coxim plantar esquerdo com os tratamentos acima referidos, por via subcutânea. Após quinze dias da primeira imunização, os animais receberam o primeiro reforço na dose, volume e via de inoculação, descritos anteriormente, no coxim plantar esquerdo. Após 15 dias da segunda imunização, os animais receberam um reforço na mesma dose e volume, por via subcutânea no mesmo sítio de inoculação. Três dias após a última dose os animais foram então desafiados, no coxim plantar direito com  $1 \times 10^6$  promastigotas de *L.(L.) amazonensis* em fase estacionária de crescimento. A evolução da lesão foi monitorada pela mensuração semanal das patas infectadas e das patas contralaterais não infectadas, utilizando-se um especímetro manual (Mitutoyo, Tóquio, Japão), até à décima semana após o desafio. O aumento de tamanho da lesão foi avaliado pela diferença entre a média das medidas das patas infectadas com a média das medidas das patas contralaterais não infectadas.

### **5.7 Indução e mensuração de DTH**

Para avaliar a resposta imune celular, os animais foram submetidos à reação de hipersensibilidade tardia (DTH) na décima semana após-infecção. O coxim plantar infectado e o contra lateral não infectado foram mensurados utilizando um especímetro manual antes da inoculação do antígeno SLA. O antígeno foi inoculado no coxim plantar dos animais na concentração de 50 µg/animal. A leitura foi realizada 48 horas após o inoculo. A diferença entre as duas medidas foi expressa em milímetros. O teste foi

considerado positivo quando o valor da diferença entre as duas medidas foi maior que 0,05 mm (BARRAL et al., 1983).

### **3.8 Análise sorológica**

Níveis de imunoglobulina G total (IgG) e subclasses (IgG1 e IgG2a) foram determinadas 10 semanas após infecção, utilizando-se o método de ELISA indireto. Placas de poliestireno de 96 poços (Montegrotto, Padova, Itália) foram sensibilizadas com SLA de *L. amazonensis* (10 µg/ml) em tampão carbonato 0,06M, pH 9,6, durante 18 horas a 4°C. Após lavagem das placas com salina tamponada com fosfatos (0,15 M, pH 7,2) acrescido de 0,05% de Tween 20 (PBST), os soros dos camundongos diluídos 1:100 foram adicionados e então incubados a 37°C durante 45 minutos. Em seguida, as placas foram lavadas com PBST, adicionado o anticorpo secundário (IgG de rato anti-isotipo murino ligado a peroxidase) e incubadas a 37°C por 45 minutos. Em seguida, as placas foram lavadas novamente e o substrato enzimático (peridrol em tampão citrato de sódio/ácido cítrico, pH 5, contendo orto-fenilenodiamina - OPD) foi adicionado. Após o desenvolvimento da cor por 15 minutos, a reação foi interrompida com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2N e a leitura efetuada em leitor de microplacas a 492 nm e os resultados expressos em densidade óptica (DO), segundo Souza et al. (2005).

### **5.9 Análise histopatológica e de carga parasitária**

Camundongos BALB/c dos grupos imunizados e controle foram sacrificados de acordo com o Colégio Brasileiro de Experimentação Animal, 10 semanas após infecção. Fragmentos do coxim plantar e linfonodo poplíteo foram removidos, fixados em solução de

formalina a 10% e em seguida desidratados em concentrações crescentes de álcool (50 - 100%). Após a desidratação os tecidos foram embebidos e incluídos em parafina e seccionados em micrótomo (Leica Instruments Gmbh, Nussloch, Alemanha), corados com hematoxilina e eosina (HE) e analisados em microscopia de luz. Além das alterações histopatológicas, a carga parasitária no interior dos macrófagos no coxim plantar dos animais também foi determinada. Para isto, imagens foram capturadas por câmera Olympus 200 acoplada ao microscópio BX 40 (Olympus Optical Co Ltda, Japão) e analisadas utilizando o software HLIImage++97 (Western Vision Software, USA), sendo analisados 30 campos por grupo em objetiva de 100 X (RODRIGUES et al., 2006).

#### **5.10 Macrófagos Peritoneais Inflamatórios**

Macrófagos peritoneais inflamatórios foram obtidos de camundongos BALB/c normais inoculados por via intraperitoneal (IP), com 1 ml de meio de tioglicolato de sódio (Sigma, St. Louis, USA) a 3% em água bidestilada (p/v). Após 72 horas, os macrófagos estimulados foram colhidos da cavidade peritoneal dos camundongos e processados para a cultura.

#### **5.11 Cultura de Macrófagos**

Macrófagos peritoneais inflamatórios colhidos 72 horas após o estímulo com meio tioglicolato de sódio a 3%, foram lavados duas vezes em solução salina balanceada de Hanks (HBSS) gelada, por centrifugação a  $250 \times g$  a  $4^{\circ}\text{C}$  por 10 minutos. Em seguida, foram ressuspenso na concentração de  $1 \times 10^6$  células/200  $\mu\text{l}$  de meio RPMI suplementado

com 10% de soro fetal bovino e antibióticos, e distribuídos em placas de cultura de 24 poços, contendo lamínulas de vidro. Após aderência, os macrófagos foram lavados três vezes em HBSS e incubados por 24, 48 e 72 horas, na presença ou não dos estímulos: ScLL (100, 50 e 10 µg/ml); Jacalina (Sigma, St. Louis, USA) a 10 µg/ml; Concanavalina A (ConA, Sigma, St. Louis, USA) a 5 µg/ml e Fitohemaglutinina (PHA, Sigma, St. Louis, USA) a 10 µg/ml, além de Lipopolissacáride (LPS, Sigma, St. Louis, USA) a 10 µg/ml e Interferon-gama (IFN-γ) a 40 ng/ml. Os sobrenadantes foram colhidos e analisados quanto à produção de nitritos e IL-12. As células foram colhidas em TRIZOL (Sigma) para análise da expressão de citocinas e iNOS.

#### **5.12 Infecção de Macrófagos por *L. (L.) amazonensis***

Placas de cultura de 24 poços (Corning) contendo lamínulas de vidro, redondas, com 13 mm de diâmetro no interior dos poços, foram utilizadas neste experimento. Os macrófagos foram cultivados sobre as lamínulas, na concentração de  $1 \times 10^6$  células/200µl por poço, aguardando-se a aderência das células por 24 horas, em estufa umidificada a 37°C, contendo ar a 5% de CO<sub>2</sub>. Após este período, as placas foram lavadas com HBSS para remoção dos macrófagos não aderentes. Na sequência, foram adicionados os estímulos (100, 50, 10 µg de ScLL, LPS, IFN, ConA, Jacalina, PHA), permanecendo os macrófagos incubados durante 48 horas, em estufa umidificada a 37°C, contendo ar a 5% de CO<sub>2</sub>. Após este período de tempo, as placas foram novamente lavadas com HBSS e procedeu-se à infecção com de *L. amazonensis* ( $1 \times 10^7$  promastigotas/200 µl) por um período de três horas, a temperatura ambiente. Em seguida, as placas foram lavadas com HBSS para

retirada dos parasitos livres e os poços foram completos com 200 µl de meio RPMI completo. As placas foram novamente incubadas em estufa umidificada a 37°C, contendo ar a 5% de CO<sub>2</sub> por 24, 48 e 72 horas. Decorridos estes períodos de tempo, os sobrenadantes foram colhidos para mensuração de nitrito e IL-12. Lamínulas contendo macrófagos foram fixadas com metanol gelado durante 10 minutos e coradas com Giemsa, para posterior análise do índice de infecção. Paralelamente, a outra parte das lamínulas contendo as células foi congelada a -70°C para extração de RNA para análise do perfil de expressão de citocinas e iNOS (Tabela 2). Cada experimento foi realizado em triplicata.

### **5.13 Dinâmica da Interação Macrófago-*Leishmania***

Após infecção com *L. (L.) amazonensis*, os macrófagos foram mantidos por 24, 48 e 72 horas em interação com os parasitos em estufa umidificada a 37°C, contendo ar a 5% de CO<sub>2</sub>. Para analisar esta interação entre macrófagos peritoneais inflamatórios e *Leishmania(L.) amazonensis*, procedeu-se à coloração das lamínulas pelo Giemsa (Merck, Alemanha) durante 20 minutos e montagem das mesmas sobre lâminas de microscopia utilizando-se Entelan (Merck, Alemanha). Os macrófagos foram então contados utilizando-se a microscopia óptica (Olympus, Olympus Optical Co, LTD; Japão). Nestes experimentos de interação macrófago-parasito foram consideradas a proporção de macrófagos infectados e não infectados e também o número de parasitos no interior de macrófagos. Cem macrófagos foram contados por cada lamínula (10 campos, em objetiva de imersão), analisando-se o número de parasitos internalizados e as características morfológicas das células (LANZA et al., 2004).

#### **5.14 Mensuração de nitritos e nitratos**

Sobrenadantes de cultura de macrófagos peritoneais inflamatórios cultivados na presença dos estímulos (100, 50, 10 µg de ScLL, LPS, IFN, ConA, Jacalina, PHA), foram utilizados para mensuração de nitrito pelo método de Griess (GREEN et al., 1982). A um volume de 50 µl de cada amostra, assim como curva padrão e branco, foi adicionado 50 µl do reagente de Griess, em duplicata, utilizando placas de 96 poços (Corning) de fundo redondo. O reagente de Griess foi preparado misturando-se volumes iguais de uma solução de Sulfanilamida (Sigma, St Louis, USA) a 1% em H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> a 2,5 % e uma solução de Dihidrocloridrato de naftilenodiamina (NEED, Sigma, St Louis, USA) a 0,1% em H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> a 2,5 %. A curva padrão foi obtida a partir de 200 µM de Nitrito de Sódio (Vetec, São Paulo, Brasil) até 0,1903 µM, por diluição seriada na base dois e, como branco da reação, utilizou-se meio RPMI completo. Após incubação por 10 minutos em temperatura ambiente foi realizada a leitura da reação a 570 nm em fotocolorímetro (Titertek Multiskan Plus, Flow Laboratories International AS, Lugano, Suíça). A concentração de nitrito contida em cada amostra foi determinada de acordo com a reta da regressão linear, obtida a partir da curva padrão, em programa de computador (Microplate Manager, version 4.0, Hercules, C.A.).

#### **5.15 Dosagem de IL-12**

Para a detecção de IL-12, foi utilizado o teste ELISA de captura segundo Chizzonite e colaboradores (1991), com modificações. Brevemente, placas de poliestireno de alta afinidade foram recobertas com 50 µl do anticorpo monoclonal C17.8 a 10 µg/ml diluído em tampão carbonato 0,06 M, pH 9,6 e incubadas a 4°C por 18 horas. Em seguida, as placas foram lavadas com PBS-T 0,05% e bloqueadas com soro albumina bovina (BSA)

(Sigma) por 2 horas a temperatura ambiente. Curva padrão (rMu-IL-12) a partir de 10 ng/ml até a 10<sup>a</sup> diluição (razão dois) em PBS-BSA 5% e as amostras de sobrenadante de macrófagos foram adicionadas e incubadas por 18 horas a 4°C. Após lavagens das placas, anticorpo monoclonal C15.6 biotinilado, diluído 500 vezes em PBS-BSA 5% foi adicionado e incubado por uma hora a 37°C. Ao final da incubação, as placas foram lavadas novamente e adicionado o complexo avidina-biotina-peroxidase na diluição de 1:2000 em PBS e incubadas a 37°C por uma hora. A reatividade foi determinada em leitor de microplacas (Titertek Multiskan Plus Mkll, Flow Laboratories) a 492 nm e, os valores de densidade óptica (DO) das amostras foram analisados de acordo com a curva padrão, utilizando-se o programa Microplate manager PC versão 4.0 (Bio-Rad Laboratories Inc.).

### **5.16 Análise da expressão de citocinas e iNOS por RT-PCR**

RNA total foi isolado das lesões presentes no coxim plantar dos camundongos imunizados e controle após 10 semanas de infecção por *L. (L.) amazonensis* e de macrófagos peritoneais, após 24, 48 e 72 h de infecção por *L. (L.) amazonensis*; utilizando o kit RNA (RNeasy Mini Kit, Quiagen) de acordo com instruções do fabricante. O cDNA foi obtido usando o kit iScript™ cDNA Synthesis (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). Na reação de PCR foi empregada 8 µl master mix (0.2 mM dNTP, 1µl tampão da PCR 10x, 0.2 µM de cada primer), 4,4 µl de água, 1 U/µl de Taq DNA Polimerase, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub> (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) e 2 µl cDNA de cada amostra. A sequência dos primers utilizados está listada nas tabelas 1 e 2. A reação foi realizada em termociclador (Applied Biosystems, CA, USA) com o seguinte programa:

95°C/2 min, 94°C/1 min, 57°C/1 min, e 72°C/1 min, por 37 ciclos. Terminada a PCR, 8 µl dos produtos amplificados foram adicionados de 2 µl de tampão de amostra e submetidos a eletroforese em gel de agarose 2% contendo 1 µg/ml de brometo de etídio. As bandas foram visualizadas sob luz ultravioleta (Höfer Pharmacia Biotech Inc. San Francisco, CA, USA) e fotografadas (Polaroide FisherBiotech, Cambridge, MA, USA). A intensidade relativa da expressão das citocinas e iNOS foi calculada utilizando como referência a expressão da enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH).

**TABELA 1 - Sequências de oligonucleotídeos das citocinas e iNOs amplificadas no local da lesão (coxim plantar)**

| Iniciadores    | Sequência de oligonucleotídeos (5' – 3') |                          |
|----------------|------------------------------------------|--------------------------|
|                | Senso                                    | Anti-senso               |
| IL-4           | TCATCGGCATTTTGAACGAG                     | GCACCTTGGAAGCCCTACAG     |
| INF - $\gamma$ | GCAACAGCAAGGCGAAAAAG                     | AAATTCAAATAGTGCTGGCAGAA  |
| IL-12 p35      | AGACCAGAGACATGGAGTCATA                   | TGCTTCACACTTCAGGAAAG     |
| TNF - $\alpha$ | GATCTCAAAGACAACCAA CATGTG                | CTCCAGCTGGAAGACTCCTCCCAG |
| iNOS           | GATGGTCAAGATCCAGAGAGGTCT                 | AATTCGAGGCCACCCACC       |
| GAPDH          | CATGGCCTTCCGTGTTTCCTA                    | GGTCCTCAGTGTAGCCCAAGAT   |

**TABELA 2 - Sequências de oligonucleotídeos das citocinas e iNOS amplificadas *in vitro* após 24, 48 e 72 horas de infecção por *L. (L.) amazonensis***

| Iniciadores    | Sequência de oligonucleotídeos (5' – 3') |                          |
|----------------|------------------------------------------|--------------------------|
|                | Senso                                    | Anti-senso               |
| IL-1 $\beta$   | TCATCGGCATTTTGAACGAG                     | GCACCTTGGAAGCCCTACAG     |
| IL-12 p35      | AGACCAGAGACATGGAGTCATA                   | TGCTTCACACTTCAGGAAAG     |
| TNF - $\alpha$ | GATCTCAAAGACAACCAA CATGTG                | CTCCAGCTGGAAGACTCCTCCCAG |
| iNOS           | GATGGTCAAGATCCAGAGAGGTCT                 | AATTCGAGGCCACCCACC       |
| GAPDH          | CATGGCCTTCCGTGTTCTTA                     | GGTCCTCAGTGTAGCCCAAGAT   |

### 5.16 Análise estatística

Todas as determinações estatísticas entre médias dos grupos experimentais, ELISA e DTH foram realizadas utilizando o teste t de Student bi-caudal para amostras não pareadas. As diferenças que proporcionaram  $p < 0,05$  foram consideradas estatisticamente significantes. A análise estatística foi realizada utilizando-se o software GraphPad Prism 4 for Windows (GraphPad Software, Inc.). Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

## 6. RESULTADOS

### 6.1 Pureza da lectina ScLL

O extrato aquoso do látex de *S. carinatum* foi submetido a repetidas cromatografias de afinidade em coluna de D-galactose imobilizada em agarose e a fração ligante foi, então, eluída com D-galactose (D-gal) em BBS. A análise eletroforética do extrato total do látex de *S. carinatum* (Fig. 1 pista A) mostrou diversidade de proteínas com pesos moleculares variando de 14 a 100 kDa, e o primeiro eluato, com proteínas de alto peso molecular (Fig. 1 pista B). Após a eluição com D-gal, foram evidenciadas duas frações protéicas com pesos moleculares aparente de 28 e 30 kDa (Fig. 1 pista C), caracterizadas como lectina ScLL.

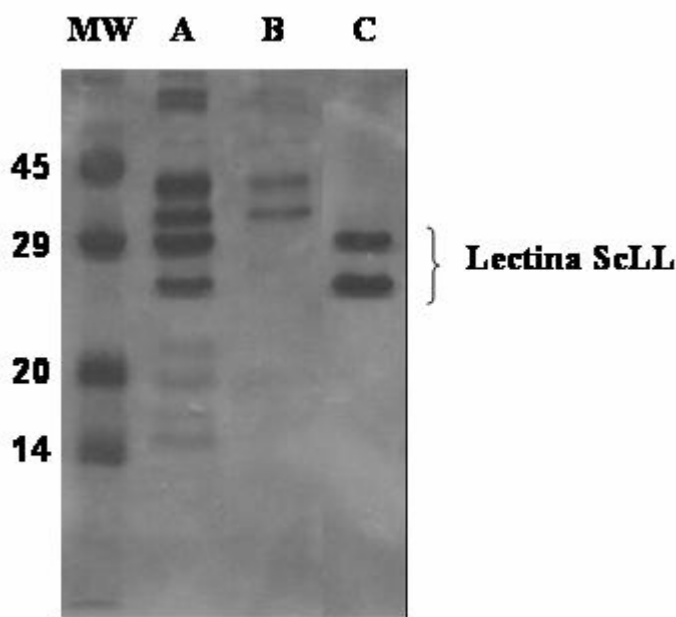


**FIGURA – 1 Perfil eletroforético da lectina ScLL.** Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) a 15%, após purificação em coluna de afinidade do extrato aquoso do látex de *S. carinatum* e coloração pela prata. (MW) padrão de peso molecular; pistas: **(A)** extrato total em água; **(B)** primeiro eluato; **(C)** lectina ScLL obtida após eluição com D-gal-BBS.

## 6.2 Efeito de ScLL e / ou SLA na progressão da lesão

Neste estudo, foi avaliado o efeito protetor de ScLL sobre a infecção por *L. amazonensis* em modelo murino. As imunizações realizadas com SLA associado a ScLL nas concentrações de 10, 50 e 100 µg/animal, conferiram proteção parcial aos animais (Fig. 2A). As diferenças na progressão da lesão entre estes grupos foram estatisticamente significantes a partir da 8ª semana após infecção ( $p < 0,05$ ). Camundongos BALB/c imunizados com ScLL (10, 50 e 100 µg/animal), mostraram-se parcialmente protegidos ao final de 10 semanas, quando comparados aos grupos imunizados com SLA e controle (Fig. 2B;  $p < 0,05$ ). Quando ScLL foi utilizada na concentração de 100 µg/animal, a proteção conferida aos animais foi maior em relação a obtida com SLA associado a ScLL 100 µg/animal, porém este dado não é estatisticamente significativo (Fig. 2). Apesar disto, o grupo imunizado com SLA associado a ScLL 100 µg/animal conferiu precocemente, 6ª semana após infecção, maior proteção aos animais (Fig. 2A;  $p < 0,001$ ), quando comparado ao grupo imunizado apenas com SLA.

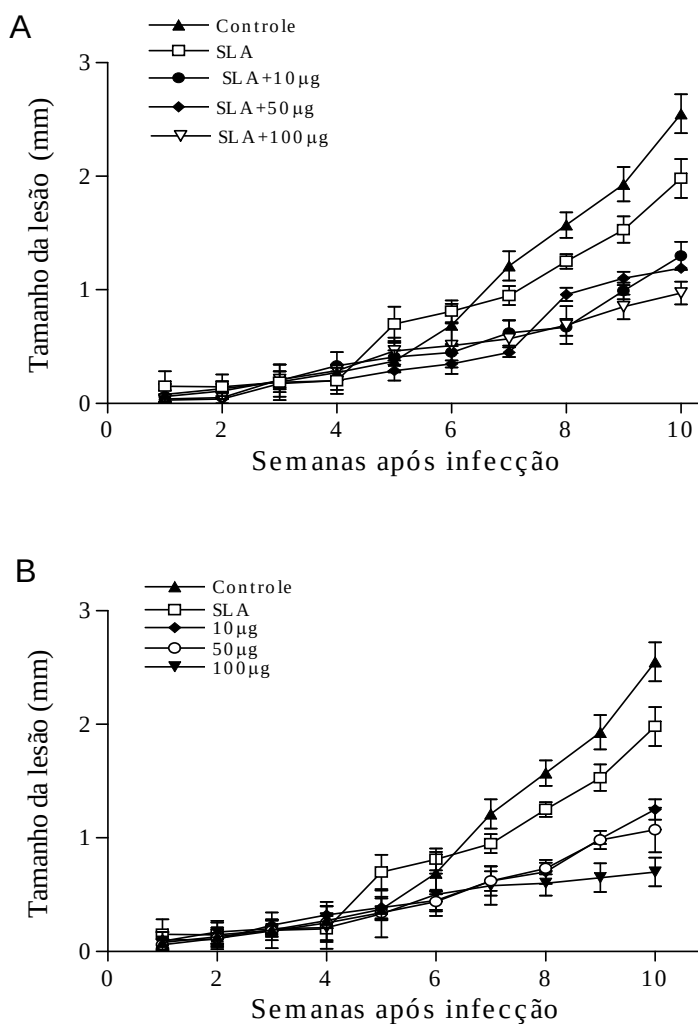


**FIGURA - 2. Efeito de ScLL na progressão da lesão de camundongos BALB/c infectados por *L. amazonensis*.** Camundongos BALB/c imunizados e infectados com  $10^6$  formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis* foram monitorados durante 10 semanas após infecção. O tamanho da lesão foi obtido a partir da diferença entre a medida do coxim plantar infectado e o coxim plantar contralateral não infectado. **(A)** animais imunizados com 25 µg/animal de SLA e SLA associado a ScLL (10, 50 e 100 µg/animal) e controle. **(B)** animais imunizados com 25 µg/animal de SLA e ScLL (10, 50 e 100 µg/animal) e controle (animais que receberam apenas salina). As barras indicam a média e o desvio padrão das diferenças entre a média das medidas dos coxins plantares infectados e não infectados (n=5). \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,001$ . Os dados são representativos de três outros experimentos realizados de maneira independente.

### 6.3 Resposta de DTH a *L. (L.) amazonensis* em camundongos

Após 10 semanas de infecção, a imunidade mediada por células foi determinada pela mensuração de DTH. Os camundongos BALB/c desenvolveram níveis variáveis de DTH. Nas imunizações realizadas com SLA associado ao ScLL (10, 50 e 100 µg/animal) não houve resposta de DTH em nenhum dos grupos. Porém, alguns animais dos grupos imunizados com ScLL (10, 50 e 100 µg/animal) mostraram resposta de DTH, acima ou igual a 0,05 mm (Fig. 3A, B).

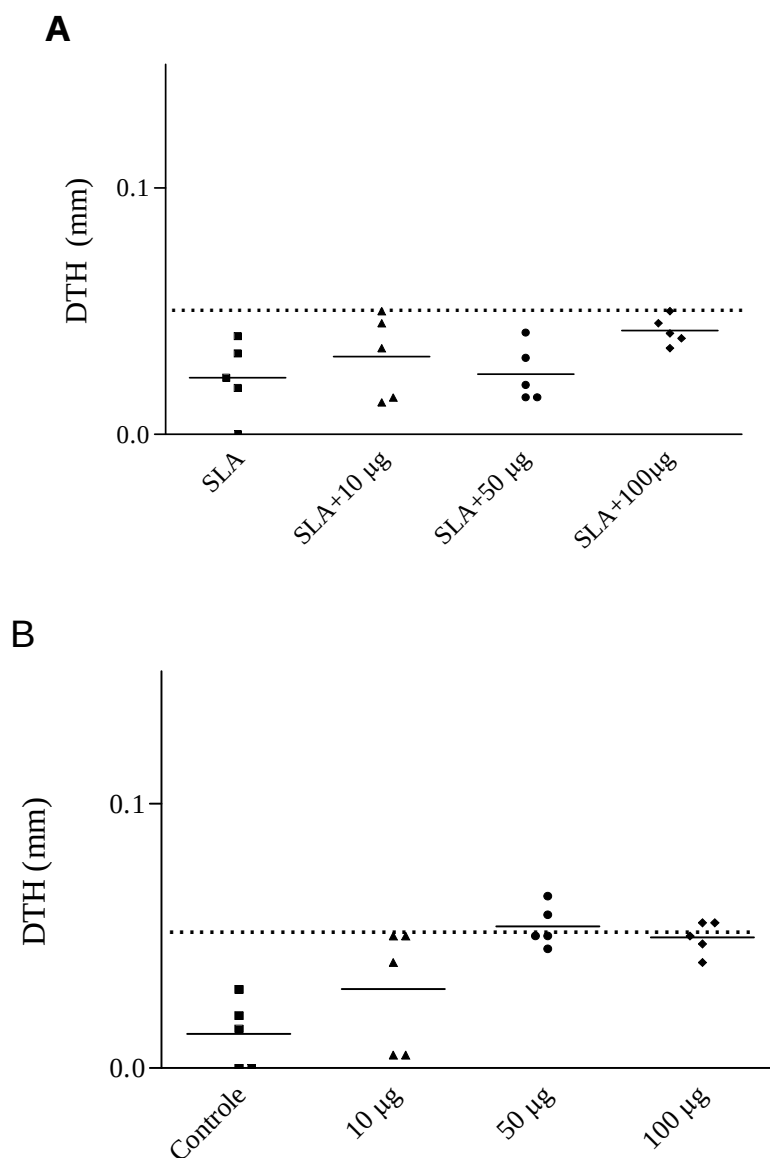


**FIGURA - 3. Mensuração de DTH.** Na décima semana após infecção *L. (L.) amazonensis* os animais imunizados receberam inoculo 50 µg de antígeno de *Leishmania* no coxim plantar contralateral não infectado. Após 48 horas foi realizada leitura da enduração da pele como descrito em material e métodos. **(A)** Grupos de animais controle ou ScLL (10, 50 e 100 µg/animal. **(B)** Grupos de animais imunizados com 25 µg/animal de SLA associado a ScLL (10, 50 e 100 µg/animal) e controle. Os traços cheios indicam a mediana das medidas de enduração da pele em cada grupo (n=5); linha pontilhada indica o limiar de positividade (0,05 mm).

## 6.4 Resposta imune humoral

Todos os animais desenvolveram títulos de anticorpos IgG específicos anti- *L. (L.) amazonensis* (Fig 4A). baixos níveis de IgG total dos grupos imunizados com SLA associado a ScLL (10, 50 e 100 µg/animal) foram detectados, sendo estes dados estatisticamente significativos ( $p < 0,0001$ ) quando comparados com os grupos controle, imunizado com salina e SLA (Fig. 4A). Nos soros dos animais do grupo imunizado com 100 µg/animal de ScLL e SLA associado a 100 µg/animal de ScLL foram detectados baixos níveis de IgG1, os quais, foram estatisticamente significativos em relação aos grupos imunizados com SLA e controle (Fig. 4B;  $p < 0,01$  e  $p < 0,05$ , respectivamente). Nos grupos imunizados com 10, 50 e 100 µg/animal de ScLL detectaram-se níveis de IgG2a significativamente maiores ( $p < 0,05$ ) que o grupo controle (Fig.4C). Ainda, nos soros dos animais imunizados com SLA associado a 10 µg/animal de ScLL, foram detectados níveis de anticorpos IgG2a mais altos que o grupo controle (Fig. 4C;  $p < 0,01$ ).

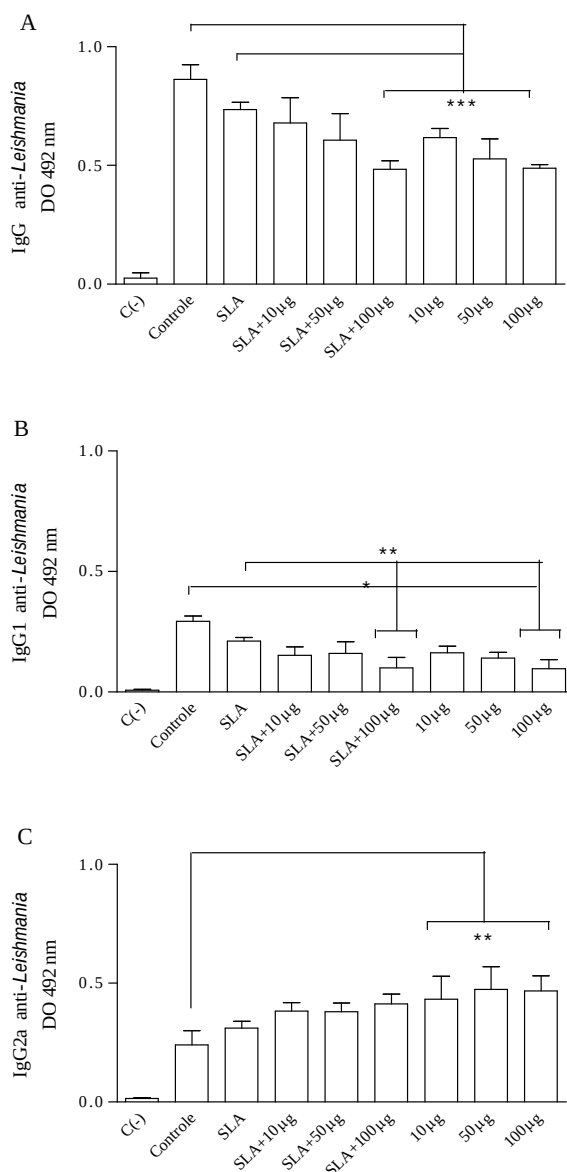
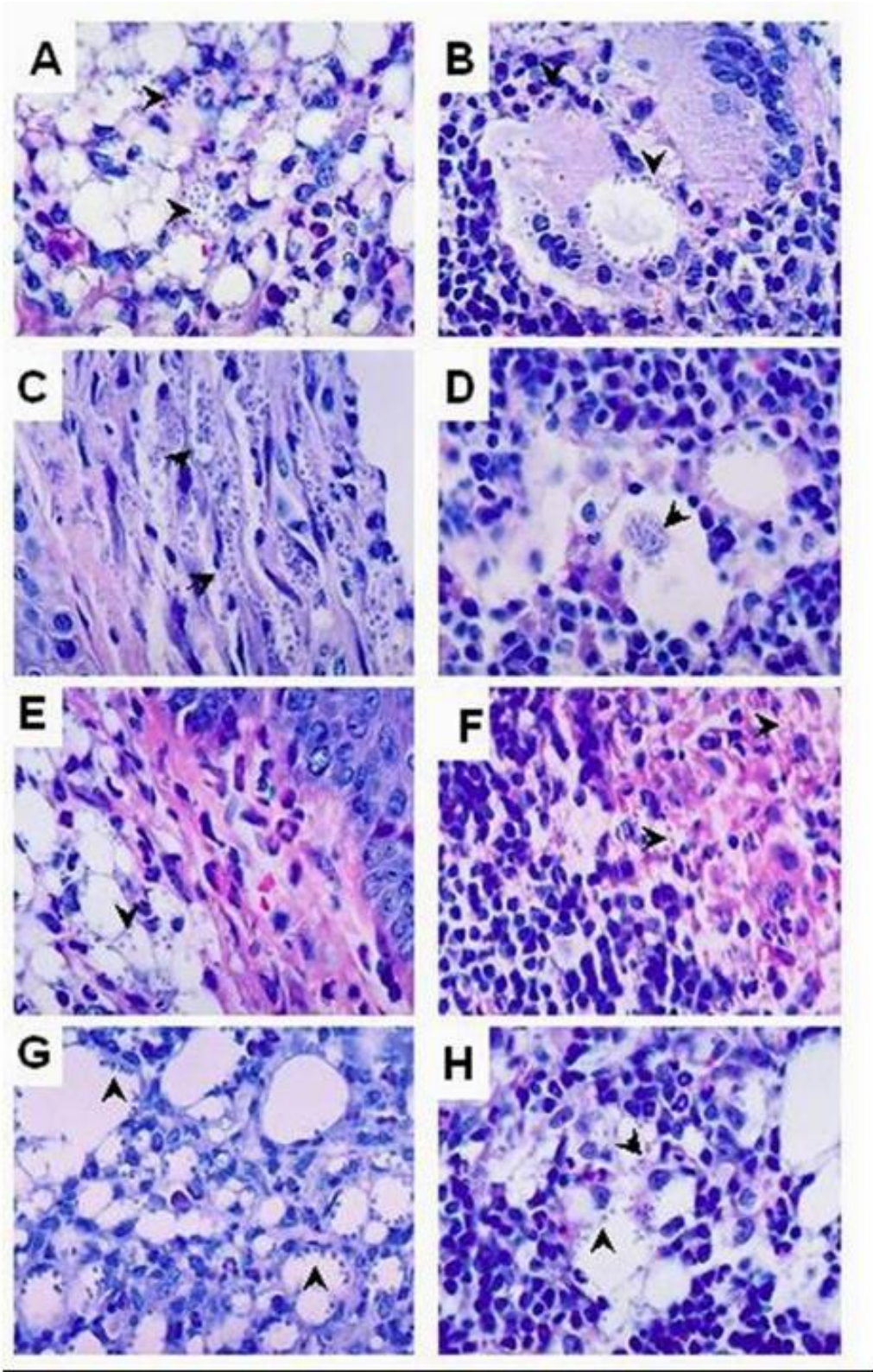


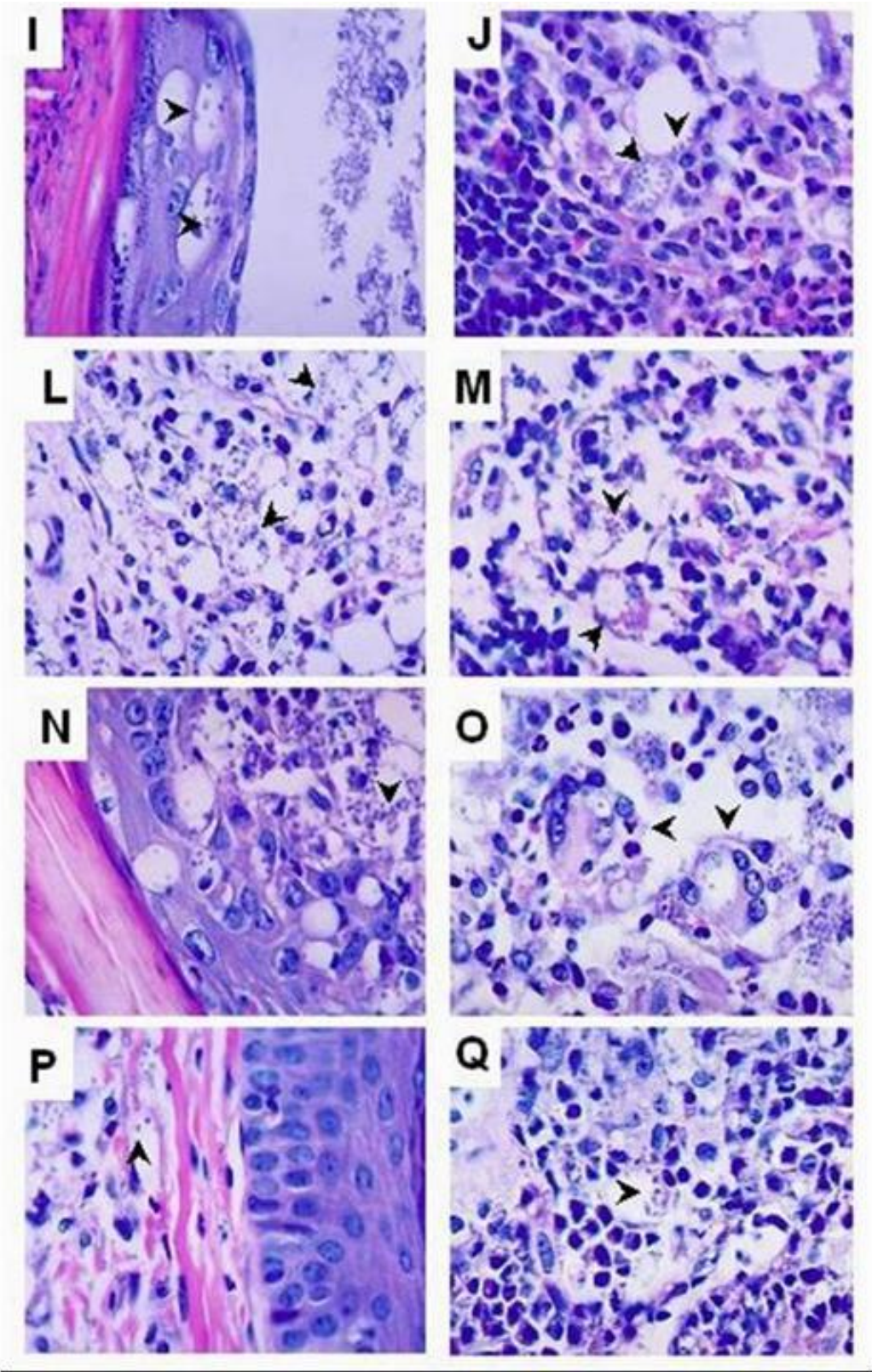
**FIGURA - 4. Níveis séricos de imunoglobulinas específicas anti-*Leishmania*.** Na décima semana após infecção os animais foram sangrados e avaliados quanto ao nível de anticorpos específicos por ELISA. Grupos de animais imunizados com 25 µg /animal de SLA associado ou não com ScLL (10, 50 e 100 µg/animal) e controle (salina) foram analisados. C(-) representa o soro de animal não imunizado e não infectado. **(A)** Níveis de IgG total anti-*Leishmania*. **(B)** Níveis de IgG1 anti-*Leishmania*. **(C)** Níveis de IgG2a anti-*Leishmania*. As barras expressam a média e o desvio padrão da densidade óptica (DO) da leitura a 492 nm em amostras de soro de cada grupo (n=5). \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,0001$ .

## 6.5 Histopatologia

Após 10 semanas de infecção por *L. (L.) amazonensis*, a microscopia de luz revelou que os camundongos de todos os grupos imunizados e controle apresentaram alterações histopatológicas, em intensidade variada. As células da derme, epiderme e hipoderme do coxim plantar dos animais infectados se mostraram parasitadas e com espessamento da queratina que recobre o extrato epidérmico (hiperqueratose). As principais alterações foram encontradas na derme e na hipoderme além de alterações típicas de um processo inflamatório crônico granulomatoso (reação inflamatória, reação reparadora e reação degenerativa), tanto no local da lesão como no linfonodo poplíteo adjacente (Fig. 5A, B). As principais alterações encontradas foram: hiperplasia e hipertrofia das células presentes na derme, especialmente macrófagos e fibroblastos; áreas focais de necrose na pele e linfonodo; infiltrados celulares compostos por linfócitos, plasmócitos, neutrófilos e eosinófilos (Fig. 5A, F). Os macrófagos foram as células mais prevalentes, apresentando-se com citoplasma e núcleo deslocados para a periferia da célula devido à presença de grandes vacúolos (Fig. 5A). O parasitismo presente nestes macrófagos foi intenso nos grupos controle e SLA (Fig. 5A, B e 5C, D). Os grupos imunizados com 10, 50 e 100 µg/animal de ScLL mostraram parasitismo celular diminuído em relação ao grupo controle (Fig. 5L, M; 5N, O e 5P, Q).

**FIGURA - 5.** Análise histopatológica de fragmentos do coxim plantar e linfonodos de camundongos imunizados e controle após 10 semanas de infecção. **(A)** Controle: Pele. Exsudato mononuclear e neutrofílico em derme e hipoderme. Parasitismo de macrófagos (cabeças de setas). Coloração: hematoxilina-eosina (HE). Aumento original: 1000 X. **(B)** Controle: Linfonodo. Célula gigante multinucleada parasitada. Cabeça de seta indica vacúolo com numerosas amastigotas na periferia. Coloração: HE. Aumento original: 1000 X. **(C)** SLA: Pele. Parasitismo de células alongadas da derme compatíveis com fibroblastos (cabeças de setas). Coloração: HE. Aumento original: 1000 X. **(D)** SLA: Linfonodo. Parasitismo de macrófago (cabeça de seta). Coloração: HE. Aumento original: 1000 X. **(E)** SLA + 10 µg: Pele. Exsudato mononuclear, neutrofílico e eosinofílico. Parasitismo de macrófagos (cabeça de seta). Coloração: HE. Aumento original: 1000 X. **(F)** SLA + 10 µg: Linfonodo. Exsudato neutrofílico. Parasitismo de macrófagos (cabeças de setas). Coloração: HE. Aumento original: 1000 X. **(G)** SLA + 50 µg: Pele. Exsudato mononuclear neutrofílico. Parasitismo de macrófagos (cabeças de setas). Coloração: HE. Aumento original: 1000 X. **(H)** SLA + 50 µg: Linfonodo. Parasitismo de macrófagos (cabeças de setas). Coloração: HE. Aumento original: 1000 X. **(I)** SLA + 100 µg: Pele. Parasitismo de queratinócitos epidérmicos (cabeça de seta). Coloração: HE. Aumento original: 1000 X. **(J)** SLA + 100 µg: Linfonodo. Exsudato eosinofílico. Parasitismo de macrófagos (cabeças de setas). Coloração: HE. Aumento original: 1000 X. **(L)** 10 µg: Pele. Parasitismo de macrófagos na hipoderme (cabeças de setas). Coloração: HE. Aumento original: 1000 X. **(M)** 10 µg: Linfonodo. Exsudato eosinofílico e parasitismo de macrófagos (cabeças de setas). Coloração: HE. Aumento original: 1000 X. **(N)** 50 µg: Pele. Parasitismo na epiderme. Macrófagos parasitados (cabeça de seta). Coloração: HE. Aumento original: 1000 X. **(O)** 50 µg: Linfonodo. Células gigantes multinucleadas e parasitismo de macrófagos (Cabeças de setas). Exsudato neutrofílico e eosinofílico. Coloração: HE. Aumento original: 1000 X. **(P)** 100 µg: Pele. Parasitismo de macrófagos (cabeça de seta) e fibroblastos dérmicos. Coloração: HE. Aumento original: 1000 X. **(Q)** 100 µg: Linfonodo. Parasitismo de macrófago (cabeça de seta). Coloração: HE. Aumento original: 1000 X.





## 6.6 Análise da carga parasitária no coxim plantar

A carga parasitária no coxim plantar dos animais imunizados com SLA e/ou ScLL foi avaliada após 10 semanas de infecção por *L. (L.) amazonensis*, pela contagem de amastigotas presentes no interior de macrófagos. A análise das imagens capturadas revelou que os grupos de animais imunizados com ScLL (10, 50 e 100 µg/animal) apresentaram carga parasitária estatisticamente menor quando comparada aos grupos imunizados apenas com SLA e controle (Fig. 6;  $p < 0,0001$ ). O grupo de camundongos imunizados com 100 µg/animal de ScLL apresentou 61,7 % de redução da carga parasitária em relação ao grupo controle, enquanto os animais imunizados com 50 e 10 µg/animal de ScLL reduziram o parasitismo intracelular em 57,4 % e 45,1 %, respectivamente (Fig. 6), demonstrando que a redução do parasitismo intracelular foi dose dependente. Do mesmo modo, observou-se redução estatisticamente significativa do parasitismo, quando a associação de SLA com ScLL (10, 50 e 100 µg/animal) foi utilizada (Fig. 6;  $p < 0,05$ ), em comparação com o grupo imunizado apenas com SLA.

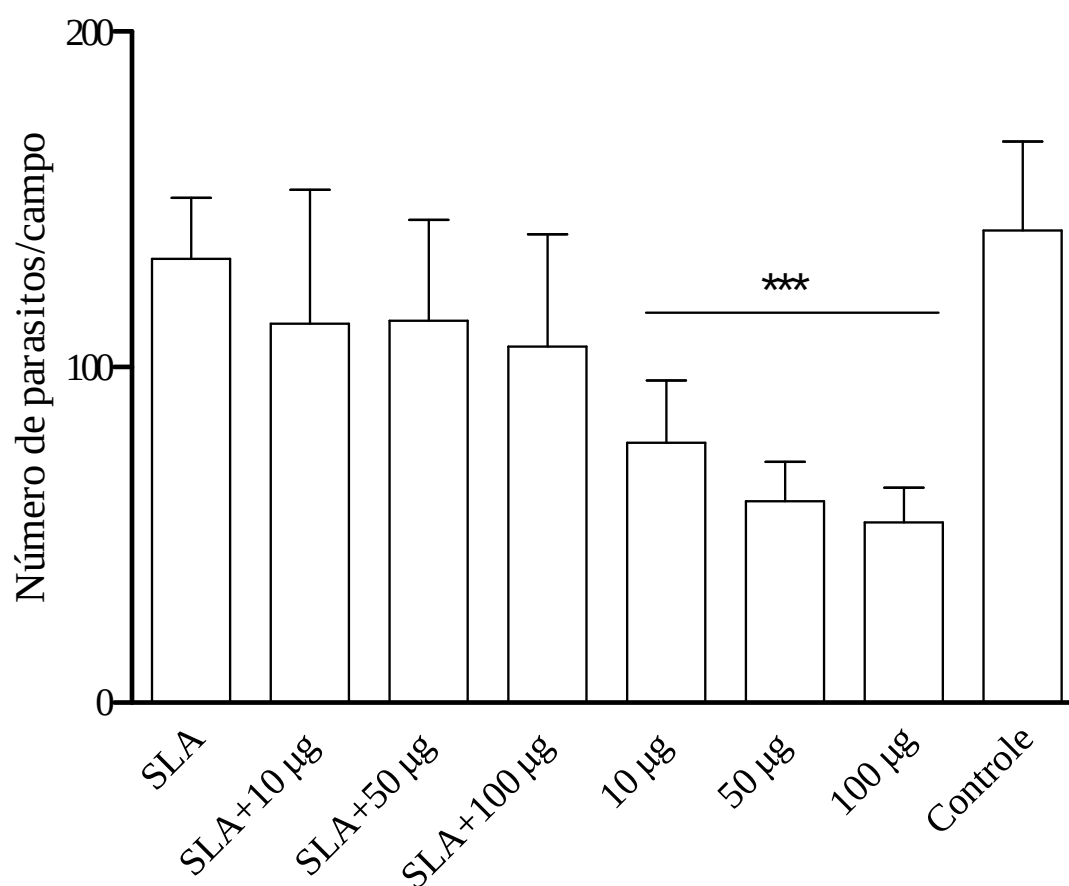
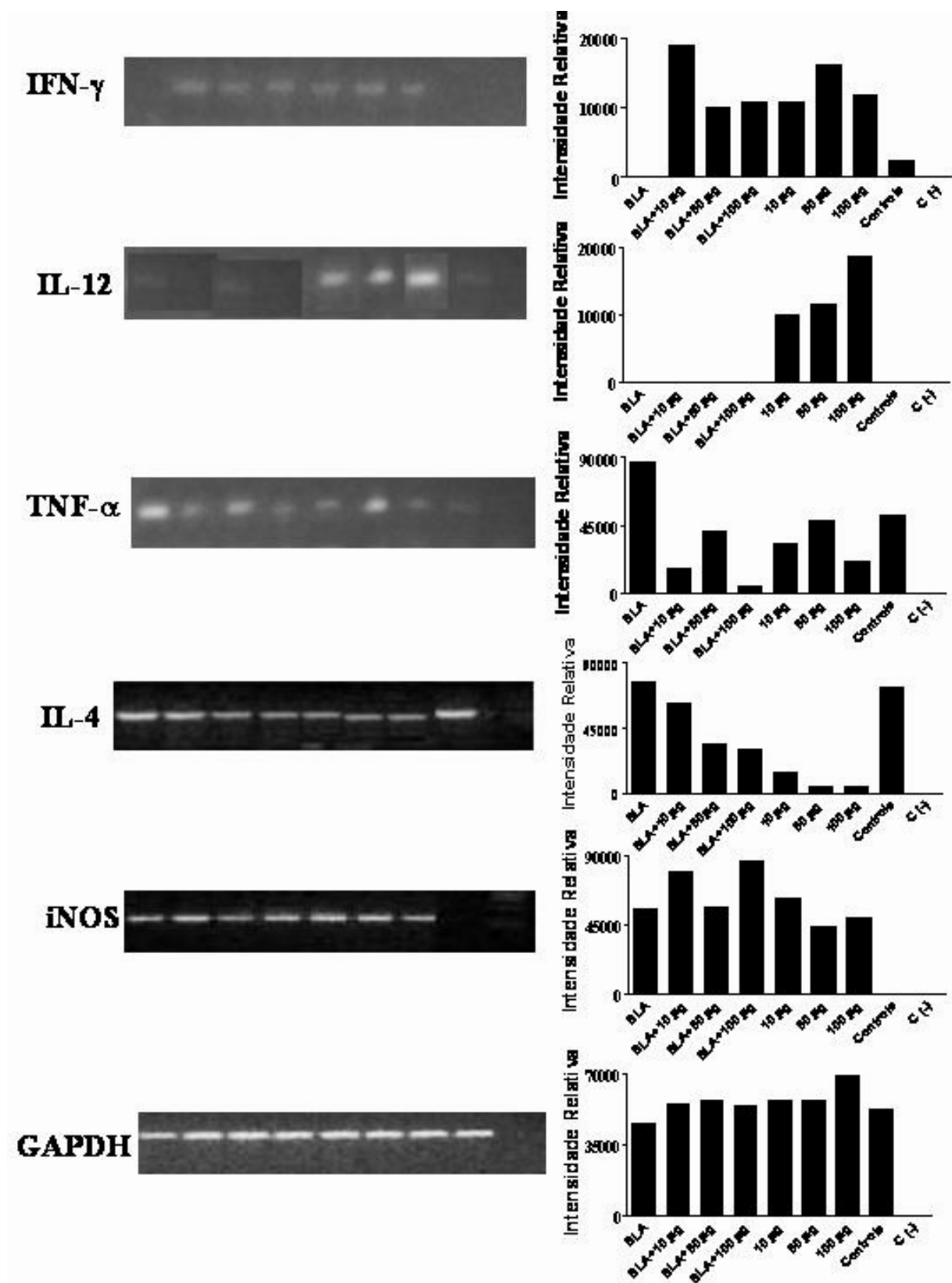


**Figura – 6. Carga parasitária no coxim plantar dos camundongos BALB/c imunizados com SLA e/ou ScLL e posteriormente infectados por *L. (L.) amazonensis*.** Os resultados expressam a média e o desvio padrão do número de parasitos por campo no interior dos macrófagos infectados, após 10 semanas de infecção por *L. (L.) amazonensis*. *p* níveis de significância; \*\*\*  $p < 0,0001$ .

## 6.7 Expressão de citocinas e iNOS por RT-PCR na lesão

Observou-se por RT-PCR, após 10 semanas de infecção com *L. (L.) amazonensis*, que as diferentes concentrações de ScLL utilizadas no esquema de imunização foram capazes de induzir a expressão de diferentes citocinas e iNOS no coxim plantar com lesão (Fig. 7). A citocina INF- $\gamma$  foi expressa em todos os grupos, exceto nos grupos de camundongos imunizados com SLA e controle, enquanto que a IL-12 foi detectada nos animais imunizados com 10, 50 e 100  $\mu\text{g}/\text{animal}$  de ScLL, demonstrando maior intensidade de expressão no grupo imunizado com 100  $\mu\text{g}/\text{animal}$  de ScLL (Fig. 7). Nos grupos de camundongos imunizados com 10, 50 e 100  $\mu\text{g}/\text{animal}$  de ScLL, a intensidade de expressão de IL-4 foi mínima, em comparação com os demais grupos tais como SLA e controle (Fig. 7). Observou-se ainda que TNF- $\alpha$  foi expresso com máxima intensidade no grupo imunizado com SLA, seguido de moderada intensidade de expressão pelos grupos controle, SLA associado a ScLL a 50  $\mu\text{g}/\text{animal}$  e ScLL na concentração de 50  $\mu\text{g}/\text{animal}$ , enquanto que uma baixa intensidade de expressão desta citocina foi detectada no grupo imunizado com 100  $\mu\text{g}/\text{animal}$  de ScLL (Fig.7). A enzima iNOS, por sua vez, demonstrou alta intensidade de expressão em todos os grupos imunizados, com exceção do grupo controle (Fig.7).

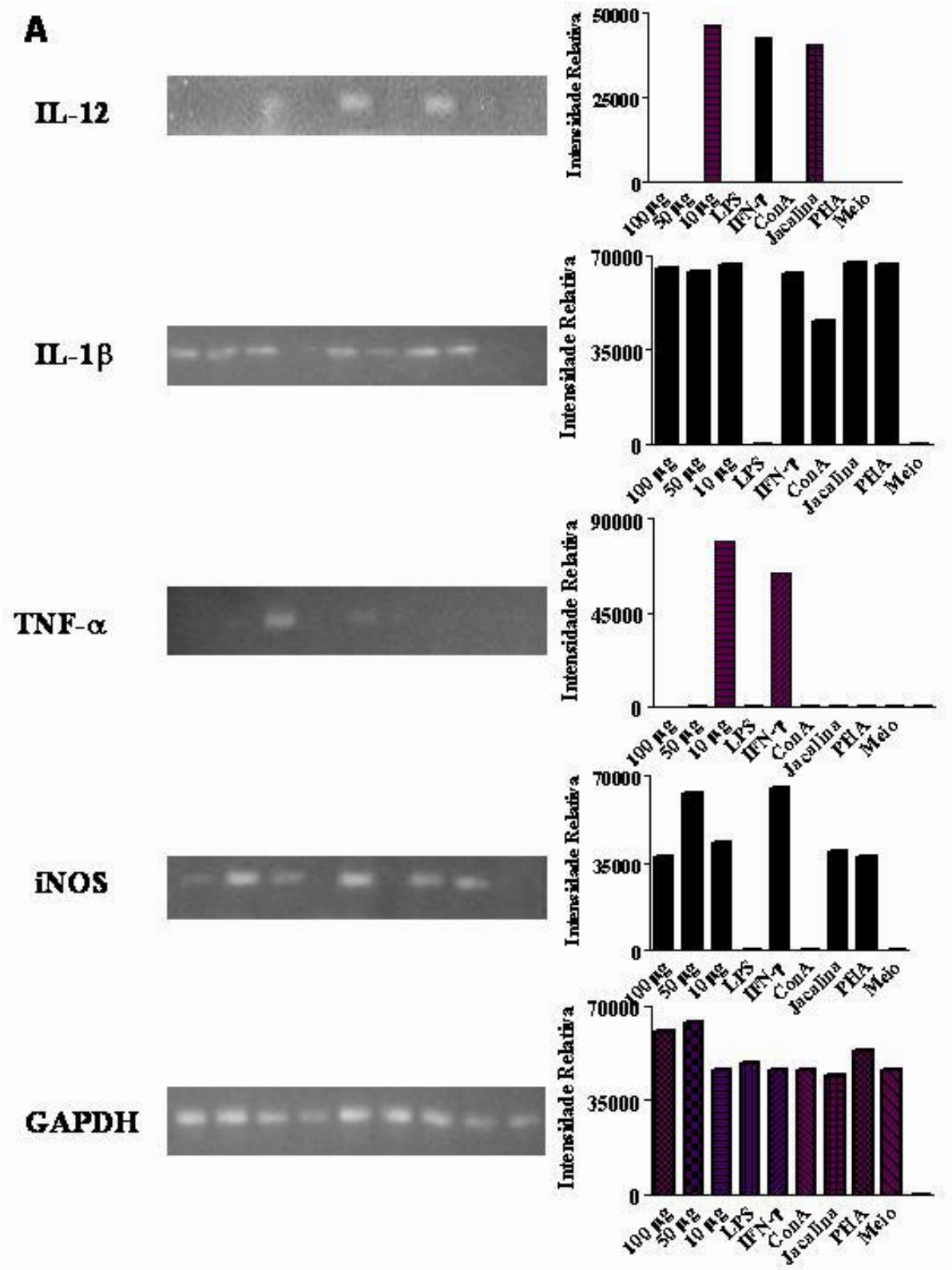
**FIGURA – 7.** Expressão e intensidade relativa da expressão de citocinas e iNOS por RT-PCR no coxim plantar de camundongos imunizados e controle, infectados por *L. amazonensis*. Iniciadores de GAPDH foram utilizados como padrão da expressão normal de mRNA. C (-) indica controle interno da reação. As barras correspondem a intensidade relativa da expressão de citocinas e iNOS com os respectivos estímulos utilizados no esquema de imunização.

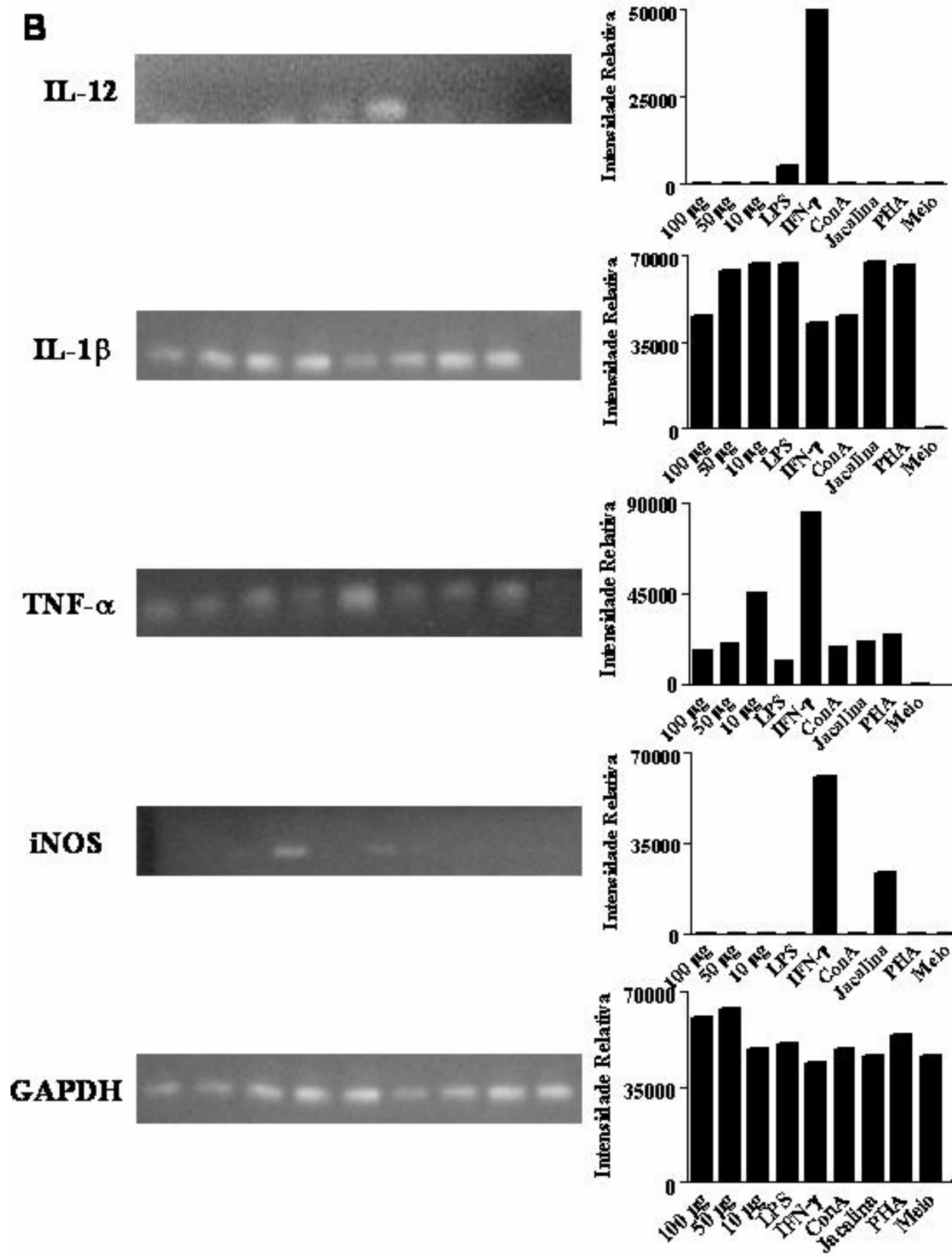


## 6.8 Expressão de citocinas e iNOS por RT-PCR em macrófagos peritoneais inflamatórios infectados *in vitro* por *L. (L.) amazonensis*

Posteriormente à infecção por *L. (L.) amazonensis*, macrófagos inflamatórios previamente estimulados com ScLL (100, 50 e 10 µg/ml), LPS, IFN-γ, ConA, Jacalina, PHA e controle (Meio RPMI 1640) foram mantidos por 24, 48 e 72 horas em interação com os parasitos em estufa umidificada a 37°C, contendo ar a 5% de CO<sub>2</sub>. Decorridas 24 e 72 horas, as células foram colhidas e processadas por RT-PCR para análise da expressão de citocinas (IL-12p35, IL-1β e TNF-α) e iNOS. Após 24 horas, observou-se que IL-12 apresentou elevada intensidade de expressão por macrófagos estimulados com 10 µg/ml de ScLL, IFN-γ e Jacalina, não sendo mais detectada a expressão desta citocina após 72 horas de infecção (Fig. 8A e 8B). A citocina IL-1β, após 24 horas, foi expressa por todas as células estimuladas com ScLL (100, 50 e 10 µg/ml), permanecendo esta condição depois de 72 horas de incubação com os parasitos. A expressão de TNF-α foi observada, após 24 horas, somente em macrófagos estimulados com 10 µg/ml de ScLL e IFN-γ, ocorrendo mudança neste perfil de expressão após 72 horas de infecção, quando todas as concentrações de ScLL utilizadas como estímulos para as células passaram a expressar esta citocina (Fig. 8A e B). A enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS) foi expressa, após 24 horas, por todos os macrófagos estimulados com ScLL (100, 50 e 10 µg/ml), não ocorrendo, no entanto, detecção da expressão desta enzima após 72 horas de infecção (Fig. 8A e B). Lectinas padrões como ConA, jacalina e PHA foram utilizadas como controles neste experimento.

**FIGURA - 8. Expressão e intensidade relativa da expressão de citocinas e iNOS por RT-PCR em macrófagos peritoneais inflamatórios. (A) 24 horas e (B) 72 horas após infecção por *L. (L.) amazonensis*.** Iniciadores de GAPDH foram utilizados como padrão da expressão normal de mRNA. As barras correspondem à intensidade relativa da expressão de citocinas e iNOS com os respectivos estímulos utilizados no experimento.





## 6.9 Análise da infecção por *L. (L.) amazonensis* em macrófagos ativados *in vitro*

Após 24 horas de infecção por *L. (L.) amazonensis* os macrófagos inflamatórios estimulados com ScLL nas concentrações de 100, 50 e 10 µg/ml apresentaram, respectivamente, 55,7; 65,5 e 45,3 % de infecção pelo parasito, enquanto as células tratadas apenas com Meio (RPMI 1640) apresentaram-se 100% infectadas (Tabela 3). Com o decorrer do tempo a porcentagem de infecção dos macrófagos pré-tratados com ScLL (100, 50 e 10 µg/ml), diminuiu em relação às células estimuladas apenas com Meio; após 48 horas (40,3; 50,2; 40,4%) e após 72 horas (41,7; 51,3; 40,5%) (Tabela 3). Do mesmo modo, o número de parasitos no interior das células estimuladas por ScLL diminuiu com o decorrer do tempo (Tabela 3), sendo estes dados estatisticamente significativos quando comparados com o controle (somente Meio). As células estimuladas com IFN-γ apresentaram 50% de infecção e a menor média de parasitos por célula (7,5), ao final de 72 horas (Tabela 3). Os macrófagos pré-tratados com as lectinas ConA, Jacalina e PHA, não apresentaram alterações significativas na taxa de infecção e média de parasitos por células no período de 24 a 72 horas (Tabela 3) quando foram analisadas.

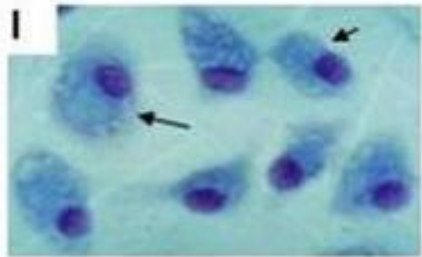
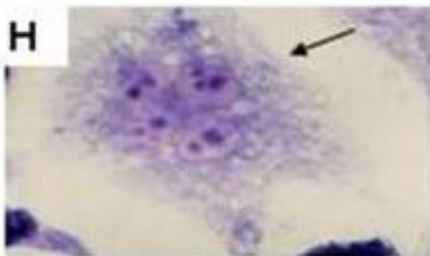
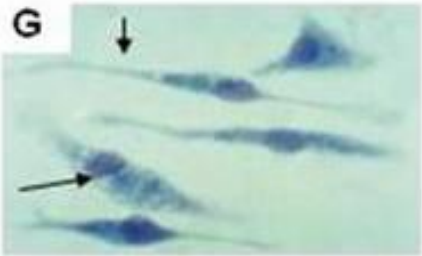
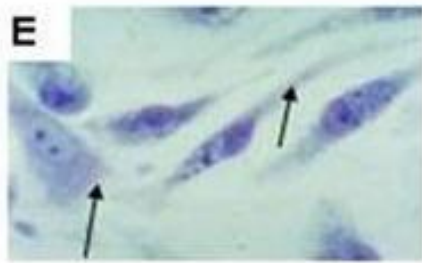
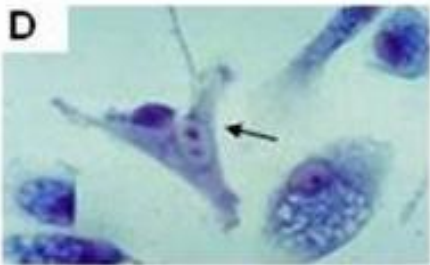
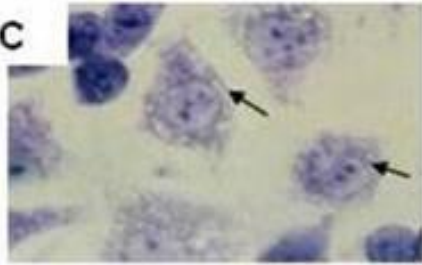
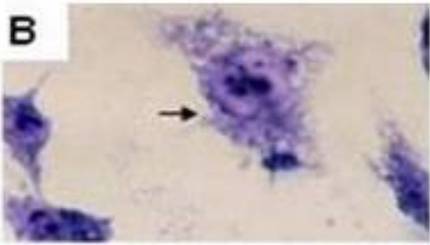
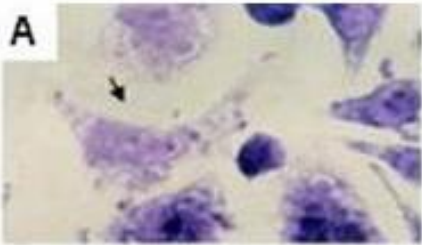
À análise microscópica, macrófagos inflamatórios estimulados com 100, 50 e 10 µg/ml de ScLL mostraram-se espraçados, com prolongamentos citoplasmáticos, vacuolizados e com reduzido parasitismo intracelular (Fig. 9A, B e C) em comparação com as células tratadas com as lectinas ConA, Jacalina e PHA (Fig. 9F, G e H), assim como, às células tratadas apenas com Meio, nas quais observou-se intenso parasitismo, menor grau de espraçamento celular e de prolongamentos citoplasmáticos (Fig. 9I).

**TABELA -3** Percentagem de infecção de macrófagos inflamatórios murinos por *L. (L.) amazonensis* e número de parasitos por célula após 24, 48 e 72 horas de infecção.

| Tratamentos | Tempo de infecção dos macrófagos |                              |              |                              |              |                              |
|-------------|----------------------------------|------------------------------|--------------|------------------------------|--------------|------------------------------|
|             | 24 horas                         |                              | 48 horas     |                              | 72 horas     |                              |
|             | Infecção (%)                     | Parasitos por célula (média) | Infecção (%) | Parasitos por célula (média) | Infecção (%) | Parasitos por célula (média) |
| Meio        | 100,0                            | (75)                         | 100,0        | (75)                         | 100,0        | (65)                         |
| 100 µg      | 55,7                             | (30)                         | 40,3         | (25)                         | 41,7         | (17,5)*                      |
| 50 µg       | 65,5                             | (25)                         | 50,2         | (25)                         | 51,3         | (20)*                        |
| 10 µg       | 45,3                             | (30)                         | 40,4         | (25)                         | 40,5         | (20)*                        |
| LPS         | 57,5                             | (40)                         | 50,5         | (37,5)                       | 46,5         | (30)                         |
| IFN-γ       | 50,0                             | (20)                         | 25,3         | (17,5)                       | 20,5         | (7,5)                        |
| ConA        | 60,7                             | (65)                         | 60,5         | (75)                         | 53,7         | (60)                         |
| Jacalina    | 65,3                             | (45)                         | 60,6         | (60)                         | 63,6         | (45)                         |
| PHA         | 60,6                             | (45)                         | 60,7         | (60)                         | 64,8         | (65)                         |

\*  $p < 0,05$

**FIGURA - 9. Infecção por *L. (L.) amazonensis* em macrófagos peritoneais inflamatórios pré-tratados *in vitro* com: (A) 100 µg de ScLL; (B) 50 µg de ScLL; (C) 10 µg de ScLL; (D) LPS; (E) IFN-γ; (F) ConA; (G) Jacalina; (H) PHA; (I) apenas Meio, 24 horas após infecção por *L. (L.) amazonensis*.** As células foram cultivadas durante 48 horas com os tratamentos, e então infectadas com *Leishmania* durante 3 horas. Após 24, 48 e 72 horas, em estufa a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub> os macrófagos infectados foram lavados, fixados e corados por Giemsa. A presença dos parasitos no interior destas células foi analisada em microscopia de luz em aumento de 1000X. Em (A), (B) e (C), macrófagos ativados, com presença de parasitos no interior de vacúolos (setas) e prolongamentos citoplasmáticos. Em (D) e (E), macrófagos com parasitos interiorizados (setas), grandes vacúolos e prolongamentos citoplasmáticos (setas). Em (F), (G) e (H), presença de intenso parasitismo intracelular (setas) e grandes vacúolos (seta). Em (I), macrófagos arredondados, sem prolongamentos citoplasmáticos evidentes e elevado parasitismo intracelular.



### 6.10 Análise da produção de Nitrito por macrófagos inflamatórios murinos

A concentração de nitrito foi determinada nos sobrenadantes de cultura de macrófagos estimulados com ScLL nas concentrações de 100, 50 e 10 µg/ml, LPS (10 µg/ml), IFN-γ (40 ng/ml), ConA (5 µg/ml), Jacalina (10 µg/ml), PHA (10 µg/ml) e Meio, após 24, 48 e 72 horas de infecção por *L. (L.) amazonensis*. A produção de nitritos por macrófagos estimulados com ScLL (nas três concentrações) detectada após 24 horas (A), 48 horas (B) e 72 horas (C) foi baixa quando comparada aos estímulos de LPS e IFN-γ, apresentando níveis basais, semelhantes ao Meio. Do mesmo modo, com as lectina ConA, Jacalina e PHA foram detectadas baixas concentrações de nitrito nos sobrenadantes, em todos os períodos analisados (Fig. 10).

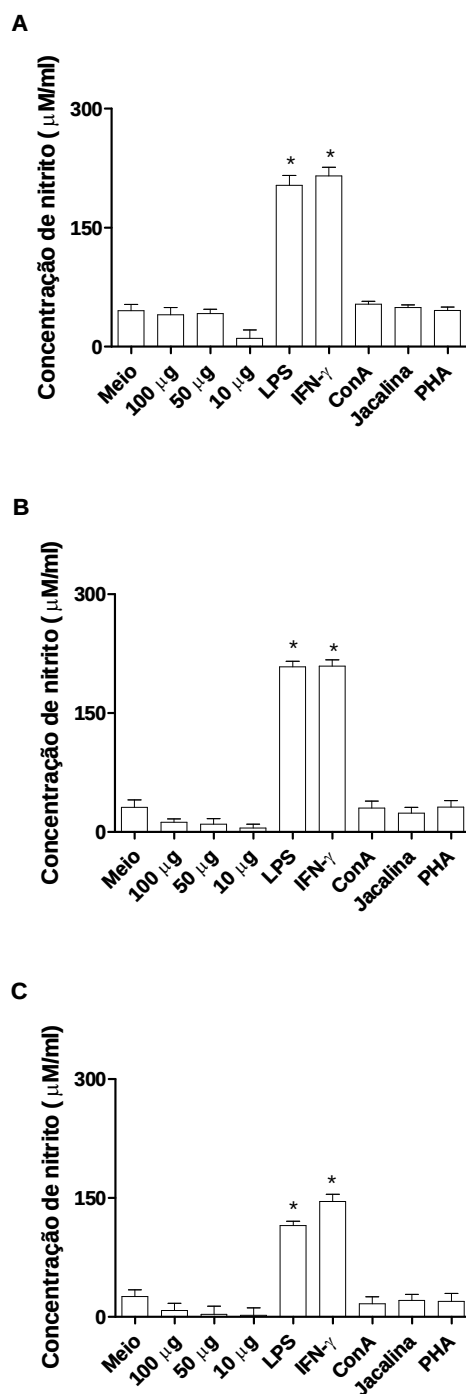


**FIGURA - 10. Produção de Nitrito por macrófagos peritoneais inflamatórios murinos** (A) 24 horas; (B) 48 horas e (C) 72 horas após infecção por *L. (L.) amazonensis*. A concentração de nitrito nos sobrenadantes de macrófagos pré-tratados por 48 horas com ScLL nas concentrações de 100, 50 e 10  $\mu\text{g/ml}$ , LPS (10  $\mu\text{g/ml}$ ), IFN- $\gamma$  (40 ng/ml), ConA (5  $\mu\text{g/ml}$ ), Jacalina (10  $\mu\text{g/ml}$ ), PHA (10  $\mu\text{g/ml}$ ) e Meio e infectados por *L. (L.) amazonensis* foi determinada pelo método de Griess. A concentração de nitrito foi determinada em  $\mu\text{M/ml}$ . (\*) indicam resultados estatisticamente significativos ( $p < 0,05$ ). Os dados são representativos de três outros experimentos realizados independentemente.

## 7 – DISCUSSÃO

As lectinas estão envolvidas em fenômenos biológicos que correspondem à primeira etapa de numerosos processos dependentes de interações molécula-molécula como translocação intracelular de glicoproteínas e célula-moléculas solúveis ou célula-células que envolvem a endocitose, regulação de migração, adesão celular e defesa imune. A capacidade das lectinas de interagirem especificamente com carboidratos as transforma em valiosos instrumentos nas mais variadas pesquisas biológicas, e o campo para utilização dessas ferramentas tem se ampliado continuamente.

Neste trabalho avaliou-se o potencial adjuvante da lectina de *Synadenium carinatum* (ScLL) tanto na imunização de camundongos BALB/c associada ou não ao antígeno solúvel de *L. (L.) amazonensis*, quanto na ativação de macrófagos peritoneais inflamatórios murinos. Três concentrações de ScLL foram empregadas neste estudo, já que nenhum estudo prévio utilizando esta lectina tinha sido realizado até então.

A imunização de camundongos BALB/c utilizando a via subcutânea, com diferentes concentrações de ScLL combinadas ou não com SLA evidenciou lesões mais reduzidas ao final do experimento, enquanto a imunização apenas com SLA, resultou em lesões quase tão evidentes quanto a dos animais controles, inoculados apenas com salina. Conforme já descrito por Liew (1985) e Barral-Netto et al. (1987), enquanto a imunização endovenosa ou intraperitoneal com promastigotas mortas pelo calor ou irradiadas promoveu proteção duradoura, a imunização intramuscular e subcutânea com estes mesmos antígenos aumentou a susceptibilidade, agravando ainda mais a lesão, tanto em animais geneticamente resistentes (CBA), quanto nos susceptíveis (BALB/c). A imunização de

camundongos BALB/c, naturalmente susceptíveis, endovenosamente com antígeno solúvel de promastigotas de *L. (L.) amazonensis* resultou em proteção parcial dos animais, que passaram a apresentar um quadro histopatológico com a presença de infiltração granulomatosa, depósito de colágeno e necrose fibrinóide, lesões semelhantes àquela observadas em camundongos resistentes (ANDRADE et al., 1984; BARRAL et al., 1987). O mecanismo responsável por este fenômeno não está esclarecido, porém tem sido observado que linfócitos T específicos para o antígeno de *L. major* estão envolvidos neste mecanismo de inibição da resposta protetora. As células com este fenótipo, em experimentos de transferência adotiva, também são capazes de reverter um quadro de imunidade protetora em animais imunizados pela via parenteral (LIEW et al., 1985; TITUS et al., 1994).

A ativação das células Th1 ou Th2 é influenciada pela associação peptídeo-molécula de classe II, refletindo o modo de processamento e apresentação do antígeno e conseqüente ativação destes grupos celulares. De acordo com Soloway et al.(1991), diferentes variantes do peptídeo dominante 12-26 da proteína cI do repressor do fago  $\lambda$  foram produzidas com a ajuda de mutações pontuais. Estas variantes diferem de forma a induzir uma resposta de hipersensibilidade dependente de IL-4 e produção de anticorpos, o que indica que a natureza do epítipo reconhecido pelas células T CD4<sup>+</sup> pode modificar o tipo das células efectoras.

A dose do antígeno também pode modificar a natureza celular ou humoral da resposta imune por sua influência sobre a orientação da diferenciação Th1 ou Th2. No modelo de infecção murina por *L. major*, camundongos no início da infecção desenvolvem reação de hipersensibilidade quando desafiados com extrato de *Leishmania*. Estes animais se tornam resistentes a infecções subseqüentes com doses de parasitos que levariam a

lesões cutâneas irreversíveis (BRETSCHER et al, 1992). Do mesmo modo, a forma solúvel ou particulada do antígeno pode influenciar na diferenciação dos linfócitos T  $CD_4^+$  ativados. Isto foi demonstrado quando camundongos foram tratados com Ovalbumina (OVA) polimerizada, resultando na diminuição da resposta de anticorpos IgE e no aumento da taxa de IgG2a produzida em resposta à OVA nativa (HAYGLASS; STEFURA, 1991). No presente trabalho, os grupos de camundongos imunizados com ScLL apresentaram menor desenvolvimento da lesão no coxim plantar durante as 10 semanas de observação, evidenciando um quadro histopatológico com presença de infiltrado celular granulomatoso, depósito de colágeno, necrose do tipo fibrinóide e significativa redução da carga parasitária local em relação aos animais controles. Estes resultados sugerem que ScLL foi capaz de proteger parcialmente estes animais, conferindo aos mesmos, lesões características de animais que estão controlando a infecção, o que é corroborado pelo reduzido parasitismo intracelular. Resultados semelhantes foram obtidos por Teixeira (2002), quando após imunizar camundongos BALB/c com a lectina  $KM^+$  de *Artocarpus integrifolia*, associada ou não ao SLA de *Leishmania*, conseguiu proteção parcial dos animais após desafio com *L. (L.) amazonensis*. A reação de hipersensibilidade tardia (DTH) é uma reação que caracteriza o estabelecimento de uma resposta imune celular específica, indicando uma exposição prévia ao antígeno. Liew et al. (1985), demonstraram que células T  $Lyt-1^+2^-$ ,  $L3T4^+$ , que levavam ao agravamento da lesão em animais, após desafio, quando produzidas por camundongos imunizados por via subcutânea com antígeno de *L. major*, se mostravam capazes de mediar DTH positivo, que podia ser transferido sistematicamente para animais não imunizados. Em outro estudo, animais recuperados de infecção por *Leishmania* e considerados resistentes (C57BL/6), apresentaram DTH positivo, sugerindo uma resposta imune celular protetora, enquanto animais susceptíveis (BALB/c) não apresentaram este

tipo de reação, porém a imunização destes camundongos com KM<sup>+</sup> e/ou associada ao SLA resultaram em potente DTH (TEIXEIRA, 2002). Este mesmo autor observou, ainda, que apesar de apresentarem resposta de DTH positiva, nem todos os grupos de animais foram protegidos após o desafio com *L. (L.) amazonensis*, sugerindo que mecanismos supressores estejam modulando a resposta imune nestes camundongos. No presente estudo, todos os animais foram submetidos ao teste de DTH na décima semana após infecção, porém, apenas alguns grupos de animais imunizados com ScLL apresentaram resultados de DTH positivos ou próximos ao limiar pré-estabelecido de positividade, enquanto que os demais se mostraram negativos. Deste modo, em contraste com o que relatou Teixeira (2002), os camundongos que apresentaram DTH positiva foram considerados parcialmente protegidos, pois além da DTH, outros fatores como diminuição da lesão, redução da carga parasitária local, expressão de citocinas relacionadas com perfil Th1 de resposta imune e produção de anticorpos específicos contra o parasito foram considerados.

O papel dos anticorpos em leishmaniose cutânea não está claro. Geralmente é aceito que a resposta protetora contra esta doença é essencialmente celular e que os anticorpos não apresentam papel determinante (LIEW; O'DONNELL, 1993). O resultado da infecção em camundongos tem demonstrado a dominância de linfócitos T CD<sub>4</sub><sup>+</sup>; resistência e resolução da doença tem sido associada com ativação de células Th1 com secreção de IL-2 e IFN- $\gamma$ ; susceptibilidade e não cura, com a ativação de clones Th2 e produção de IL-4 e IL-10 (LIEW; O'DONNELL, 1993). Por outro lado, outros autores têm demonstrado que citocinas liberadas pela ativação de linfócitos T CD<sub>4</sub><sup>+</sup> também são requeridas para o desenvolvimento de resposta humoral dependente de células T. Em camundongos, IL-4 secretada por células do subtipo Th2, induziu a troca ou mudança de classes, de linfócitos B

para IgG1 e IgE, enquanto IFN- $\gamma$  produzido por clones Th1 aumentou a resposta da subclasse de imunoglobulina IgG2a (STAVNEZER, 1996). Além disso, no homem, citocinas secretadas por células Th2 (IL-4, IL-5 e TGF- $\beta$ ) induziram IgG4, IgE e IgA (LUNDGREN et al., 1989; ISLAM et al., 1991). Portanto, tem sido amplamente relatado que os isotipos de imunoglobulinas detectados nos soros podem ser utilizados como indicadores da dominância da resposta celular Th1 ou Th2 (FINKELMAN et al, 1990).

O adjuvante considerado ideal para vacina contra leishmaniose que induza proteção duradoura deverá atrair e ativar a resposta de células apresentadoras de antígenos profissionais a direcionar uma diferenciação da resposta celular tipo Th1 (MOINGEON et al., 2001). A potencialização da resposta imune Th1 pelos adjuvantes através da indução de IFN- $\gamma$  e reação de hipersensibilidade tardia (DTH), também induzem a produção de subclasses de IgG que fixam complemento e se ligam com alta afinidade aos receptores Fc $\gamma$ I como IgG2a em camundongo e IgG1 no homem (PHILLIPS; EMILI, 1992; ALLISON, 1998). Estas subclasses de imunoglobulinas são muito ativas em mediar a lise por complemento e mediar mecanismos efetores de citotoxicidade celular dependente de anticorpo (antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC)). Deplazes et al. (1995), ao estudarem o modelo cão/*L. infantum*, mostraram que os níveis de anticorpos das subclasses IgG1 e IgG2 específicos anti-*Leishmania* detectados nos soros destes animais, podiam ser considerados como indicadores prognósticos de progressão e cura da infecção. A subclasse IgG1 foi associada com o desenvolvimento da doença, enquanto IgG2 foi associada com o controle da mesma. Ainda, segundo os mesmos autores, altos níveis de anticorpos IgG específicos anti-*Leishmania* estariam relacionados com a disseminação do parasito. Na presente investigação, os dados obtidos com a sorologia estão de acordo com

estes autores, onde os níveis de IgG específicos anti- *L. (L.) amazonensis* detectados nos soros dos animais imunizados com as diferentes concentrações de ScLL foram significativamente menores em relação aos níveis de anticorpos encontrados nos soros dos animais controles (que receberam apenas salina), sugerindo que a doença nos camundongos imunizados com ScLL está sendo controlada, enquanto os animais controles mostram desenvolvimento ou progressão da infecção. Além disso, os altos níveis de IgG2a anti-*L. amazonensis* detectados nos soros dos animais imunizados com a lectina ScLL em comparação com os baixos níveis encontrados nos camundongos controles corroboram os dados acima obtidos com IgG, sugerindo que está ocorrendo proteção ou controle da infecção nestes animais, já que esta subclasse de IgG está relacionada com perfil de resolução ou cura desta parasitose. Ainda, os baixos níveis de anticorpos IgG1 detectados no soro dos camundongos imunizados reforçam a idéia de que a infecção por *Leishmania* está sendo controlada nestes animais.

As citocinas são mediadores da resposta imune específica. Estas proteínas solúveis atuam em vários tipos celulares (pleiotropismo), com múltiplos e diferentes efeitos, por vezes redundantes. Em geral, são sintetizadas em resposta a estímulos inflamatórios e antigênicos, atuando localmente, de modo autócrino ou parácrino, por meio de ligação a receptores de alta afinidade existentes nas células-alvo. Podem atuar como fatores de crescimento, como elo de ligação entre a imunidade específica e a imunidade natural ou como reguladores da magnitude da natureza das respostas imunes por influenciar o crescimento e diferenciação de linfócitos (PAUL, 1998; ABBAS et al., 2000).

A partir de estudos com citocinas produzidas por clones de células T CD<sub>4</sub><sup>+</sup> em camundongos, Mosmann et al. (1986), mostraram que havia duas diferentes subpopulações de células T que foram divididas em grupos baseados na função e no padrão de secreção de

citocinas. A subpopulação que produzia IL-2, IFN- $\gamma$  e linfotóxina foi denominada Th1, enquanto a subpopulação que produzia IL-4, IL-5 e IL-10 foi designada como Th2. Citocinas produzidas por células Th1 e Th2 podem regular-se mutuamente, sendo exemplo disto o IFN- $\gamma$ , produzido por células Th1, que inibe a proliferação de células Th2 e produção de IL-10, enquanto citocinas de perfil Th2 inibem a síntese de citocinas Th1.

Na leishmaniose, a produção inicial de IFN- $\gamma$  é crucial para a definição de uma resposta protetora e a produção desta citocina é desencadeada pela presença, principalmente, de IL-12 no micro-ambiente de diferenciação dos linfócitos T CD4<sup>+</sup> (MOSMANN; COFFMAN, 1989). A administração de IL-12 recombinante nos primeiros cinco dias de infecção por *L. major* resultou não só em proteção dos animais como também na expressão elevada de IFN- $\gamma$  e IL-2 e reduzida expressão de IL-4 no linfonodo destes animais (HEINZEL et al., 1993; WANG et al., 1994). A IL-12 produzida após a infecção de camundongos por *Leishmania* é importante para controlar a expansão da resposta tipo Th2 e promover predominância da resposta imune de perfil Th1 (CAMPOS NETO, 2005).

No presente estudo, em camundongos imunizados com ScLL, após dez semanas de infecção por *L. amazonensis*, o mRNA de citocinas que direcionam a resposta imune para perfil Th1 como IFN- $\gamma$ , IL-12, TNF- $\alpha$  e a enzima precursora de NO, iNOS foi detectado, sugerindo que a lectina ScLL foi capaz de induzir a mudança de resposta imune de perfil Th2 para Th1, neste momento da infecção.

TNF- $\alpha$  é uma citocina pró-inflamatória que fornece ao hospedeiro defesa contra a infecção (NACY et al., 1991), mas também pode causar muitos efeitos indesejáveis no hospedeiro (BLACKWELL, 1999). Alta produção de TNF- $\alpha$  pode apresentar um papel importante na proteção contra *Leishmania*, porém pode ser responsável por alguns dos

sinais clínicos e lesões da leishmaniose tais como caquexia, febre e perda de peso, como tem sido relatado no homem (MORSY et al., 1995; DA-CRUZ et al., 1996; DE-MEDEIROS, et al., 1998; RIBEIRO DE JESUS, et al., 1998). Neste trabalho, a expressão de TNF- $\alpha$  no local da lesão foi bem evidente em alguns grupos de camundongos imunizados com ScLL e/ou SLA quando comparados com o grupo controle, que não apresentou evidências de detecção. O grupo de animais imunizado com SLA, que apresenta marcante perfil de resposta Th2, demonstrou expressão máxima desta citocina, estando, provavelmente relacionada aos efeitos indesejáveis causados ao hospedeiro. *In vitro*, a expressão de TNF- $\alpha$  foi detectada após as primeiras 72 horas de infecção, sugerindo que esta citocina é expressa na fase inicial da doença, podendo sua expressão ser detectada ainda após 10 semanas de infecção *in vivo*, demonstrando seu importante papel na leishmaniose. Deste modo, a expressão de citocinas como IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  pode estar relacionada ao controle da infecção no local da lesão em alguns dos grupos imunizados. Por outro lado, a falha em controlar a progressão da infecção pode estar relacionada com a síntese inadequada destas citocinas (particularmente IFN- $\gamma$ ) durante a fase inicial da doença e também a uma possível regulação desta citocina pela IL-4, que apresenta perfil de resposta Th2, a qual foi expressa com intensidade mínima pelos animais imunizados com ScLL. A importância do IFN- $\gamma$  para o controle da infecção, neste estudo, se torna evidente já que apesar de ter ocorrido expressão de iNOS, a produção de NO (a mais potente molécula leishmanicida no hospedeiro) não foi detectada (LIEW et al., 1997).

Macrófagos, na infecção por *Leishmania*, desempenham papel central no curso da doença, atuando não apenas como células hospedeiras para o parasito, mas também como células apresentadoras de antígeno que modulam a resposta imune específica. Além disso,

agem como células efectoras finais na morte do parasito intracelular, após ativação apropriada por citocinas como IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ , exibindo vários graus de atividade microbicida como a liberação de reativos intermediários de oxigênio, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, e nitrogênio, como óxido nítrico (NO), produto da ativação de macrófago, sintetizado a partir da reação da L-arginina, oxigênio molecular e outros co-fatores numa reação catalisada pela enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS) (WOLF, 1997; FLYNN; CHAN, 2001).

Estudos realizados com as lectinas *Canavalia brasiliensis* (ConBr) e *Pisum arvense* (PAA) mostraram que estas são potentes indutoras da produção de NO *in vitro* e *in vivo* (ANDRADE et al., 1999) ou de IFN- $\gamma$  (BARRAL-NETTO et al., 1996). Estes produtos são importantes no processo de eliminação de parasitos intracelulares e no estabelecimento de resposta protetora celular. Estes aspectos, contudo, não foram suficientes para o estabelecimento de efeito adjuvante destas lectinas na proteção de animais susceptíveis e resistentes vacinados contra *L. (L.) amazonensis* (TEIXEIRA, 2002).

No presente trabalho, a expressão de iNOS por macrófagos estimulados *in vitro* com diferentes concentrações de ScLL foi observada após 24 horas de infecção, deixando, no entanto, de ser detectada após 72 horas. Além disso, foi demonstrado que macrófagos tratados *in vitro* por esta lectina exibiram diferentes graus de atividade microbicida sendo capazes de impedir significativamente a proliferação dos parasitos em seu interior, fato ocorrido, provavelmente, devido a utilização de uma via microbicida independente de NO, pois, apesar da iNOS ter sido expressa no início da infecção, a produção de NO não foi detectada nos sobrenadantes de cultura. Este resultado sugere que a lectina ScLL pode estar exercendo papel inibitório pós transcricional da iNOS, diminuindo ou inibindo a produção de NO, ou ainda que por se tratar de uma molécula com características antiinflamatórias,

esta lectina, dependendo da dose utilizada, agiria reduzindo ou mesmo inibindo a produção de NO.

Recentemente, um estudo bioquímico realizado com a leiterinha (*S. carinatum*), utilizando uma extração sequencial do látex com metanol, diclorometano e hexano seguida, posteriormente, por análise cromatográfica, revelou a presença de substâncias como flavonóides e lupeol (SOUZA et al., 2000). Flavonóides são membros de uma classe de pigmentos naturais ubíquos de células vegetais, que apresentam ampla atividade biológica (McCLURE, 1975; HAVSTEEN, 2002). Vários flavonóides naturais são conhecidos por apresentar atividade antiinflamatória em células de mamíferos, e sua ação na inflamação tem sido atribuída à sua atividade antioxidante, bem como a habilidade destas substâncias em suprimir a produção de NO por macrófagos ativados (KIM et. al., 1999; MATSUDA et al., 2003; SCURO et al., 2004).

A síntese de NO por macrófagos depende da expressão de iNOS, que é induzida por IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ , e é crucial para eliminação de patógenos internalizados por estas células. Contudo, a contínua produção elevada de NO pode acarretar desordens severas ao organismo associadas com doenças inflamatórias crônicas (LAMAS et al., 1998; GRISHAM et. al., 2002). Várias classes de flavonóides inibem a produção de NO por células inflamatórias tais como macrófagos peritoneais ativados, células RAW 264.7 e astrócitos C-6 *in vitro* (KROL et. al., 1995; SOLIMAN; MAZZIO, 1998; WANG; MAZZA, 2002; MATSUDA et al., 2003). Deste modo, flavonóides naturais são muito promissores como agentes terapêuticos para o tratamento da inflamação (LAI; YEN, 2002).

Neste contexto, considerando-se as características antiinflamatórias da lectina ScLL se torna possível explicar a ausência ou redução da produção de moléculas como IL-12 e

NO *in vitro*. No modelo murino, neste experimento, parece não ter sido evidente uma ação antiinflamatória de ScLL, visto que, além da expressão de citocinas pró-inflamatórias terem sido detectadas, a análise histopatológica evidenciou a presença de processo inflamatório local com presença de infiltrado neutrofílico e eosinofílico. Assim, este contraste apresentado além do próprio modelo utilizado, *in vivo/in vitro*, ser diferente, a via de inoculação e a dose de ScLL utilizada pode ter sido baixa, não sendo suficiente para induzir uma ação antiinflamatória local, ou ainda, o fato dos animais terem sido imunizados e não tratados com a lectina também pode ter influenciado a ausência de tal característica.

Neste experimento, nas células pré-tratadas com LPS e IFN- $\gamma$ , embora tenha ocorrido produção de NO, não foi observado sinais de interferência na proliferação dos parasitos no meio intracelular. Este resultado reforça o que já foi sugerido anteriormente, de que outras vias de ativação de macrófagos, além do NO, estejam sendo utilizadas para destruição do parasito intracelular.

As lectinas de *Canavalia ensiformis* (ConA), *Artocarpus integrifolia* (jacalina) e *Phaseolus vulgaris* (PHA) foram utilizadas, nesta investigação, como padrão de comparação com a lectina ScLL, devido aos vários estudos já realizados avaliando a ação das mesmas, particularmente, ConA e PHA, classicamente conhecidas por sua atividade mitogênica (LICASTRO et al., 1991; LICASTRO et al., 1993; SANTOS-OLIVEIRA et al., 1994; BLASCO et al., 1995). Os dados aqui obtidos, demonstraram que macrófagos inflamatórios pré-tratados com estas lectinas não apresentaram alterações significativas no percentual de infecção e média de parasitos por células no período de 24 a 72 horas, em comparação com ScLL que demonstrou redução significativa da carga parasitária intracelular. Estes resultados sugerem que, a lectina ScLL agiu com maior eficiência sobre

macrófagos inflamatórios, que então passaram a modular a resposta imune específica, controlando o parasitismo intracelular.

Neste estudo, a lectina de *Synadenium carinatum* (ScLL) (em todas as concentrações utilizadas) foi capaz de diminuir o desenvolvimento de lesão causada por *L. amazonensis*, reduzir a proliferação do parasitismo intracelular e de induzir a expressão de citocinas ativadoras da resposta imune celular. Além disso, a lectina ScLL demonstrou ação adjuvante a qual foi verificada pela proteção parcial conferida a camundongos BALB/c previamente imunizados com a lectina e/ou SLA e posteriormente infectados por *L. (L.) amazonensis*. O mecanismo de ação responsável por estes fenômenos ainda não está esclarecido, visto que o modelo de estudo ScLL/*Leishmania* foi avaliado pela primeira vez neste estudo. Os resultados aqui obtidos em modelo murino de infecção por *L. (L.) amazonensis* mostraram papel promissor da lectina ScLL, devendo seu valor real ser elucidado através de mais pesquisas que esclareçam seu mecanismo de ação, sendo necessário que outros esquemas de imunização e até mesmo possíveis efeitos terapêuticos sobre a leishmaniose cutânea sejam explorados.

## 8. CONCLUSÃO

1. A lectina de *Synadenium carinatum* (ScLL), em todas as concentrações utilizadas neste experimento, conferiu proteção parcial após desafio com *Leishmania amazonensis* a camundongos BALB/c imunizados isoladamente e/ou associada ao antígeno solúvel de *Leishmania amazonensis* (SLA);
2. A Lectina ScLL em todas as concentrações estudadas, mas principalmente, 100 µg reduziu significativamente o parasitismo intracelular, fato este, observado *in vivo* e *in vitro*;
3. A lectina ScLL utilizada *in vitro* mostrou ser imunoestimulatória para células mononucleares murinas;
4. A lectina ScLL foi capaz de modular a resposta imune induzindo a expressão de citocinas de perfil Th1 *in vivo*, levando ao controle da infecção;

## 9 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A. K.; LICHMAN, A. H.; POBER, J. S. Cytokines; Immediate Hypersensitivity. In: Schmitt William. **Cellular and Molecular Immunology**. Philadelphia: W. D. Saunders Company, 4<sup>a</sup> edition, 2000, p. 259-437.

AFONSO, L. C. C.; SCHARTON, T. M.; VIEIRA, L. Q.; WYSOCKA, M.; TRINCHIERI, G.; SCOTT, P. The adjuvant effect of interleukin-12 in a vaccine against *Leishmania major*. **Science**, Washington, v. 263, p. 235-237, 1994.

AFONSO-CARDOSO, S. R.; DA SILVA, J. C. F.; DA COSTA, R. T.; MAYRINK, W.; MELO, M. N.; MICHALICK, M. S. M.; LIU, I. A. W.; FUJIWARA, R. T.; NASCIMENTO, E. Identification and purification of immunogenic proteins from nonliving promastigote polyvalent *Leishmania* vaccine (Leishvacin). **Revista Sociedade Brasileira Medicina Tropical**, Uberaba, v. 36, n. 2, p. 193-199, 2003.

AFRIN, F.; ANAM, K.; ALI, N. Induction of partial protection against *Leishmania donovani* by Promastigotes antigens in negatively charged liposomes. **Journal of Parasitology**, v. 86, p. 730, 2000.

ALBUQUERQUE, D. A.; MARTINS, G. A.; CAMPOS-NETO, A.; SILVA, J. S. The adjuvant effect of jacalin on the mouse humoral immune response to trinitrophenyl and *Trypanosoma cruzi*. **Immunology Letters**, v. 68, p. 375-381, 1999.

ALENCAR, N. M. N.; TEIXEIRA, E. H.; ASSREUY, A. M. S.; CAVADA, B. S.; FLORES, C. A.; RIBEIRO, R. A. Leguminous lectins as tools for studying the role of sugar residues in leukocyte recruitment. **Mediators of Inflammation**, v. 8, p. 107-113, 1999.

ALLISON, A. C. The mode of action of immunological adjuvants. **Dev. Biol. Stand.**, v. 92, p. 3-11, 1998.

ALMEIDA, R.; D'OLIVEIRA, A. Jr.; MACHADO, P.; BACELLAR, O.; KO, A. I.; DE JESUS, A. R.; MOBASSHERY, N.; BRITO SANTOS, J.; CARVALHO, E. M. Randomized, double-blind study of stibogluconate plus human granulocyte macrophage colony-stimulating factor versus stibogluconate alone in the treatment of cutaneous leishmaniasis. **Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 180, p. 1735-1737, 1999.

ANDRADE, J. L.; ARRUDA, S.; BARBOSA, T.; PAIM, L.; RAMOS, M. V.; CAVADA, B. S.; BARRAL-NETTO, M. Lectin-induced nitric oxide production. **Cellular Immunology**, v. 194, p. 98-102, 1999.

ANDRADE, Z. A.; REED, S. G.; ROTERS, S. B.; SADIGURSKY, M. Immunopathology of experimental cutaneous leishmaniasis. **American Journal of Pathology**, v. 114, p. 137-148, 1984.

ASSREUY, A. M. S.; SHIBUYA, M. D.; MARTINS, G. J.; SOUZA, M. L. P.; CAVADA, B. S.; MOREIRA, R. A.; OLIVEIRA, J. T. A.; RIBEIRO, R. A.; FLORES, C. A. Anti-inflammatory effect of glucose-mannose binding lectins isolated from Brazilian beans. **Mediators of Inflammation**, v. 6, p. 201-210, 1997.

ASSREUY, A. M. S.; MARTINS, G. J.; MOREIRA, M. E. F.; BRITO, G. A. C.; CAVADA, B. S.; RIBEIRO, R. A.; FLORES, C. A. Prevention of cyclophosphamide-induced hemorrhagic cystitis by glucose-mannose binding plant lectins. **Journal of Urology**, v. 161, p. 1988-1993, 1999.

AYOUBA, A.; MARTIN, D.; ROUGÉ, P. Recognition of muramic acid and N-acetylmuramic acid by Leguminosae lectins: possible role in plant-bacteria interactions. **Microbiology Letters**, v. 92, p. 41-46, 1992.

BACELLAR, O.; D'OLIVEIRA, A.; JERÔNIMO, S.; CARVALHO, E. IL-10 and IL-12 are the main regulatory cytokines in visceral leishmaniasis. **Cytokine**, v. 12, p. 1228-1231, 2000.

BADARO, R.; LOBO, I.; NAKATAMI, M.; MUINOS, A.; NETTO, E. M.; COLER, R. N.; REED, S. G. Successful use of a defined antigen/GM-CSF adjuvant vaccine to treat mucosal leishmaniasis refractory to antimony : a case report. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, Salvador, v. 5, p. 223-232, 2001.

BADARO, R.; FALCOFF, E.; BADARO, F. S.; CARVALHO, E. C.; PEDRAL-SAMPAIO, D.; BARRAL, A.; CARVALHO, J. S.; BARRAL-NETTO, M.; BRANDLEY, M.; SILVA, L.; BINA, J. C.; TEIXEIRA, R.; FALCOFF, R.; ROCHA, H.; HO, J. L.; JOHNSON, W. Treatment of visceral leishmaniasis with pentavalent antimony and interferon gamma. **New England Journal Medicine**, v. 4, p. 16-21, 1990.

BAJTAY, Z.; JÓZSI, M.; BÁNKI, Z.; THIEL, S.; THIELENS, N.; ERDEL, A. Mannan-binding lectin and C1q bind to distinct structures and exert differential effects on macrophages. **European Journal of Immunology**, Weinheim, v. 30, p. 1706-1713, 2000.

BANCHONGLIKITKUL, C.; SMART, J. D.; GIBBS, R. V.; CAVADA, B. S.; SAMPAIO, A.; COOK, D. J.; ROGERS, D. J. Lectinin drug delivery-the binding of some *Diocleinae* lectins to the mucosal surfaces of the and mouth. **Journal of Pharmacology**, v. 50, p. 104, 1998.

BARBOSA, T.; ARRUDA, S.; CAVADA, B.; GRANGEIRO, T. B.; FREITAS, L. A. R.; BARRAL-NETTO, M. *In vivo* lymphocyte activation and apoptosis by lectins of the *Diocleinae subtribe*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 96, p. 673-678, 2001.

BARRAL-NETTO, M.; VON SOHSTEN, R. L.; TEIXEIRA, M.; DOS SANTOS, W. L. C.; POMPEU, M. L.; MOREIRA, R. A; OLIVEIRA, J. T. A.; CAVADA, B. S.; FALCOFF, E.; BARRAL, A. *In vivo* protective effect of the lectin from *Canavalia brasiliensis* on BALB/c mice infected by *Leishmania amazonensis*. **Acta Tropica**, Stockholm, v. 60, p. 237-250, 1996.

BARRAL-NETTO, M.; BRODSKYN, C.; CARVALHO, E. M.; BARRAL, A. Human [leishmaniasis@cytokines.bahia.br](mailto:leishmaniasis@cytokines.bahia.br) **Brazilian Journal Medical Biology Research**, Ribeirão Preto, v. 31: 149-155, 1998.

BARRAL-NETTO, M.; DIEZ, R.; BADARO, R.; SAMPAIO, D.; BARRAL, A.; CARVALHO, E. M.; FALCOFF, E. Serum interferon activity of patients with leishmaniasis. **Brazilian Journal Medical Biology Research**, Ribeirão Preto, v. 22, p. 1485-1487, 1989.

BARRAL-NETTO, M.; FREITAS, L. A. R.; ANDRADE, Z. A. Histopathologic changes induced by vaccination in experimental cutaneous leishmaniasis of BALB/c mice. **American Journal Pathology**, v. 127, p. 271-278, 1987.

BARRAL-NETTO, M.; MACHADO, P.; BITTENCOURT, A.; BARRAL, A. Recent advances in the pathophysiology and treatment of human cutaneous leishmaniasis. **Current Opinion in Dermatology**, v. 4, p. 51-58, 1987.

BARRAL-NETTO, M.; REED, S. G.; SADIGURSKY, M.; SONNENFELD, G. Specific immunization of mice against *Leishmania mexicana amazonensis* using solubilized promastigotes. **Clinical Experimental Immunology**, v. 67, p. 11-19, 1987.

BARRAL-NETTO, M.; SANTOS, S. B.; BARRAL, A.; MOREIRA, L. I. M.; SANTOS, C. F.; MOREIRA, F. A.; OLIVEIRA, J. T. A.; CAVADA, B. S. Human lymphocyte stimulation by legume lectins from the *Diocleae* tribe. **Immunology Investigations**, v. 21, p. 297-303, 1992.

BELKAID, Y.; HOFFMANN, K. F.; MENDEZ, S.; KAMHAWI, S.; UDEY, M. C.; WYNN, T. A.; SACKS, D. L. The role of interleukin (IL)-10 in persistence of *Leishmania major* in skin after healing and the therapeutic potential of anti-IL-10 receptor antibody for sterile cure. **Journal of Experimental Medicine**, Washington, v. 194, p. 1497-1506, 2001.

BENTO, C. A.; CAVADA, B. S.; OLIVEIRA, J. T.; MOREIRA, R. A.; BARJA-FIDALGO, C. Rat paw edema and leukocyte immigration by plant lectins. **Agents Actions**, v. 38, p. 48-54, 1993.

BERMAN, J. D. Human leishmaniasis: clinical, diagnostic and chemotherapeutic developments in the last 10 years. **Clinical Infectious Diseases**, v. 24, p. 684-703, 1997.

BLACK, C. D. V.; KROCZEK, R. A.; BARBET, J.; WEINSTEIN, J. N.; SHEVACH, E. M. Induction of IL-2 receptor expression *in vivo*: response to Concanavalin A. **Cellular Immunology**, v. 111, p. 420-432, 1988.

BLACKWELL, J. M. Tumour necrosis factor alpha and mucocutaneous leishmaniasis. **Parasitology Today**, v. 15, n. 2, p. 73-75, 1999.

BLASCO, E.; BARRA, A.; NICOLAS, M.; LECRON, J. C.; WIJDENES, J.; PREUD'HOMME, J. L. Proliferative response of human CD4 + T lymphocytes stimulated by the lectin jacalin. **European Journal Immunology**, v. 25, p. 2010-2018, 1995.

BOURREAU, E.; PREVOT, G.; PRADINAUD, R.; LAUNOIS, P. Unresponsiveness of specific t cells to IL-12 is associated with active cutaneous leishmaniasis owing to *Leishmania guyanensis*. **Scandinavian Journal Immunology**, Edinburgh, v. 54, p. 335-339, 2001.

BOURREAU, E.; PREVOT, G.; PRADINAUD, R.; LAUNOIS, P. High intralesional interleukin-10 messenger RNA expression in localized cutaneous leishmaniasis is associated with unresponsiveness to treatment. **Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 184, p. 1628-1630, 2001.

BRETSCHER, P. A.; WEI, G.; MENON, J. N.; BIELEFELDT-OHMANN, H. Establishment of stable, cell-mediated immunity that makes "susceptible" mice resistant to *Leishmania major*. **Science**, Washington, v. 257, n. 5069, p. 539-542, 1992.

CAMPOS-NETO, A.; PORROZZI, R.; GREESON, K.; COLER, R. N.; WEBB, J. R.; SEIKY, Y.A.; REED, S. G.; GRIMALDI, G. Jr. Protection against cutaneous leishmaniasis induced by recombinant antigen in murine and nonhuman primate models of the human disease. **Infective Immunology**, Washington, v. 69, p. 4103-4108, 2001.

CAMPOS-NETO, A. What about Th1/Th2 in cutaneous leishmaniasis vaccine discovery? **Brazilian Journal of Medical Biological Research**, Ribeirão Preto, v. 38, n. 7, p. 979-984, 2005.

CARVALHO, E. N.; BADARO, R.; REED, S. G.; JONES, T. C.; JOHNSON, W. D. Absence of gamma interferon and interleukin 2 production during active visceral leishmaniasis. **Journal of Clinical Investigation**, v. 76, p. 2066-2069, 1985.

CAVADA, B. S.; MOREIRA, R. A.; OLIVEIRA, J. T. A.; GRANGEIRO, T. B. Primary structures and functions of plant lectins. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 5, p. 193-201, 1993.

CERF, B. J.; JONES, T. C.; SAMPAIO, D.; TEIXEIRA, R.; WEBB, J. R.; JOHNSON, W. D. Malnutrition as a risk factor for severe visceral leishmaniasis. **Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 156, p. 1030-1033, 1987.

CHACE, J. H.; HOOKER, N. A.; MILDENSTEIN, K. L.; KRIEG, A. M.; COWDERY, J. S. Bacterial DNA-induced NK cell IFN-gamma production is dependent on macrophage secretion of IL-12. **Clinical Immunology Immunopathology**, v. 84, p. 185, 1997.

CHANG, J.; TSUYOSHI, F.; BRENNAN, P.; McNEIL, M; TURCO, S. J.; SIBILLE, J. C.; SNAPPER, M.; AISEN, P.; BLOOM, B. R. Microbial glycolipids: possible virulence factors that scavenge oxygen radicals. **Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 86, p. 2453-2457, 1989.

CHIZZONITE, R., TRUITT, T., PODLASKI, F. J., WOLITZKY, A. G., QUINN, A. G., NUNES, P.; STERN, A. S. IL-12: monoclonal antibodies specific for the 40-kDa subunit block receptor binding and biologic activity on activated human lymphoblasts. **Journal of Immunology**, Baltimore, v. 147, p. 1548-1553. 1991.

CHRISPEELS, M. J.; RAIKHEL, N. V. Lectins, lectin genes and their role in plant defense. **The Plant Cell**, v. 3, p. 1-9, 1991.

COOPER, H. S. Lectins as probes in histochemistry and immunohistochemistry: the peanut (*Arachis hypogaea*) lectin. **Human Pathology**, v. 15, p. 904, 1984.

COURRET, N. FREHEL, C.; PRINA, E.; LANG, T.; ANTOINE, J. C. Kinetics of the intracellular differentiation of *Leishmania amazonensis* and internalization of host MHC molecules by the intermediate parasite stages. **Parasitology**, v. 15, p. 263-279, 2001.

CROFT, S. L., COOMBS, G. H.. Leishmaniasis – current chemotherapy and recent advances in the search for novel drugs. **Trends in Parasitology**, v. 19, n. 18, p. 502-508, 2003.

COX, J.; COULTER, A. R. Adjuvants – a classification and review of their modes action. **Vaccine**, Surrey, v. 15, p. 248-256, 1997.

DA-CRUZ, A. M.; DE OLIVEIRA, M. P.; DE LUCA, P. M.; MENDONÇA, S. C.; COUTINHO, S. G. Tumor necrosis factor-alpha in human american tegumentary leishmaniasis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 91, n. 2, p. 225-9, 1996.

DA SILVA, R. P.; HALL, B. F.; JOINER, K. A.; SACKS, D. L. CR1, the C3b receptor, mediates binding of infective *Leishmania major* metacyclic promastigotes to human macrophages. **Journal of Immunology**, Baltimore, v. 143, p. 617, 1989.

DE LUCA, P. M.; MAYRINK, W.; PINTO, J. A.; COUTINHO, S. G.; SANTIAGO, M. A.; TOLEDO, V. P.; COSTA, C. A.; GENARO, O.; REIS, A. B.; MENDONÇA, S. C. A

randomized double-blind placebo-controlled trial to evaluate the immunogenicity of a candidate vaccine against American Tegumentary Leishmaniasis. **Acta Tropica**, Stockholm, v. 21, p. 251-260, 2001.

DE MEDEIROS, I. M.; CASTELO, A.; SALOMAO, R. Presence of circulating levels of interferon-gamma, interleukin-10 and tumor necrosis factor-alpha in patients with visceral leishmaniasis. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 40, n. 1, p. 31-4, 1998.

DEL GIUDICE, G.; RAPPUOLI, R. Genetically derived toxoids for use as vaccines and adjuvants. **Vaccine**, Surrey, v. 17, p. 44-52, 1999.

DEPLAZES, P.; SMITH, N. C.; ARNOLD, P.; LUTZ, H.; ECKERT, J. Specific IgG1 and IgG2 antibody responses of dogs to *Leishmania infantum* and other parasites. **Parasite Immunology**, v. 17, p. 451-458, 1995.

DESCOTEAUX, A.; TURCO, S. J. Functional aspects of the *Leishmania donovani* lipophosphoglycan during macrophage infection. **Microbes and Infection**, v. 4, n. 9, p. 975-981, 2002.

DUBE, A.; SINGH, N.; SUNDAR, S.; SINGH, N. Refractoriness to the treatment of sodium stibogluconate in Indian kala-azar field isolates persist in in vitro and in vivo experimental models. **Parasitology Research**, v. 96, n. 4, p. 216-223, 2005.

DUMONTEIL, E.; ANDRADE-NARVAREZ, F.; ESCOBEDO-ORTEGON, J.; RAMIREZ-SIERRA, M. J.; VALENCI-PACHECO, G.; FLORES-SERRANO, A.; CANTO-LARA, S.; ARJONA-TORRES, A. Comparative study of DNA vaccines encoding various antigens against *Leishmania mexicana*. **Dev. Biol.**, v. 104, p. 135-141, 2000.

ELHAY, M.; KELLEHER, M.; BACIC, A.; MCCONVILLE, M. J.; TOLSON, D. L.; PEARSON, T. W.; HANDMAN, E. Lipophosphoglycan expression and virulence in ricin-resistant variants of *Leishmania major*. **Molecular Biochemistry Parasitology**, v. 40, p. 255, 1990.

FENG, Z. Y.; LOUIS, J.; KINDLER, V.; PEDRAZZINI, T.; ELIASON, J. F.; BEHIN, R.; VASSALLI, P. Aggravation of experimental cutaneous leishmaniasis in mice by administration of interleukin 3. **European Journal of Immunology**, Weinheim, v. 18, p. 1245-1251, 1988.

FERNANDES, A. P.; CARVALHO, F. A.; TAVARES, C. A.; SANTIAGO, H. C.; CASTRO, G. A.; TAFURI, W. L.; FERREIRA, L. A.; GAZZINELLI, R. T. Combined interleukin-12 and tropical chemotherapy for established *Leishmania* drastically reduces tissue parasitism and relapses in susceptible mice. **Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 183, p. 1646-1652, 2001.

FERREIRA, R. R.; CAVADA, B. S.; MOREIRA, R. A.; OLIVEIRA, J. T. A.; GOMES, J. C. Characteristics of the histamine release from hamster cheek pouch mast cells stimulated by lectins from Brazilian beans and concanavalin A. **Inflammation Research**, v. 45, p. 422-447, 1996.

FINKELMAN, F. D.; HOLMES, J.; KATONA, I. M. et al. Lymphokine control of *in vivo* immunoglobulin isotype section. **Annual Review in Immunology**, v. 6, p. 303-333, 1990.

FISCHER, C.; VOSS, A.; ENGEL, J. Development status of miltefosine as first oral drug in visceral and cutaneous leishmaniasis. **Medical Microbiology Immunology**, v. 190, p. 85-87, 2001.

FLYNN, J. L.; CHAN, J. Immunology of tuberculosis. **Annual Review of Immunology**, v. 19, p. 93-129, 2001.

FOLLADOR, I.; ARAUJO, C.; ORGE, G.; CHENG, L. H.; CARVALHO, L. P.; BACELLAR, O.; ALMEIDA, R. P.; CARVALHO, E. M. Immune responses to an active vaccine against American cutaneous leishmaniasis together with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. **Vaccine**, Surrey, v. 20, p. 1365-1368, 2002.

FRUTH, U.; SOLIOZ, N. LOUIS, J. A. Leishmania major interferes with antigen presentation by infected macrophages. **Journal of Immunology**, Baltimore, v. 150, p. 1857-1864, 1993.

FUNASA-Fundação Nacional de Saúde, Centro Nacional de Epidemiologia. **Informe Epidemiológico do SUS, Ministério da Saúde, ano VI** : 59-60, 1997.

GABIUS, H. J. Animals lectins. **European. Journal of Biochemistry**, v. 243, p. 543-576, 1997.

GASSER, R. A.; MAGILL, A. J. Jr.; OSTER, C. N.; FRANKE, E. D.; GROGL, M.; BERMAN, J. D. Pancreatitis induced by pentavalente antimonial agents during treatment of leishmaniasis. **Clinical Infectious Diseases**, v. 18, p. 83, 1994.

GESSNER, A.; VIETH, M.; WILL, A.; SCHROPPEL, K.; ROLLINGHOFF, M. Interleukin-7 enhances antimicrobial activity against *Leishmania major* in murine macrophages. **Infection and Immunity**, Washington, v. 61, p. 4008-4012, 1993.

GHALIB, H. W.; WHITTLE, J. A.; KUBIN, M.; HASHIM, F. A.; EL-HASSAN, A. M.; GRABSTEIN, K. H.; TRINCHIERI, G.; REED, S. G. IL-12 enhances Th1-type responses in human *Leishmania donovani* infections. **Journal of Immunology**, Baltimore, v. 154: 4623, 1995.

GHOSH, A.; ZHANG, W. W.; MATLASHEWSKI, G. Immunization with A2 protein results in a mixed Th1/Th2 and humoral response which protects mice against *Leishmania donovani* infections. **Vaccine**, Surrey, v. 20, p. 59-66, 2001.

GIANNASCA, P. J.; BODEN, J. A.; MONATH, T. P. Targeted delivery of antigen to hamster nasal lymphoid tissue with M-cell directed lectins. **Infection and Immunity**, Washington, v. 65, p. 4288-4298, 1997.

GOMES, M. A. B.; RODRIGUES, F. H.; AFONSO-CARDOSO, S. R.; BUSO, A. M.; SILVA, A. G.; FAVORETO-JUNIOR, S.; SOUZA, M. A. Levels of IgA1 and mRNA expression for interferon gamma and tumoral necrosis factor alpha in total saliva from patients with diabetes mellitus type II with chronic periodontal disease. **Journal of Periodontal Diseases**, 2006

GOMES, J. C.; ROSSI, R. R.; CAVADA, B. S.; MOREIRA, L. I. M.; OLIVEIRA, J. T. A. Histamine release induced by glucose (mannose)-specific lectins isolated from Brazilian beans. Comparison with Concanavalin A. **Agents Actions**, v. 41, p. 132-135, 1994.

GOMES, N. A.; DOS REIS, G. A. The dual role of CTLA-4 in *Leishmania* infection. **Trends in Parasitology**, v. 10, p. 487-491, 2001.

GONZALO, R. M.; RODRIGUEZ, J. R.; RODRIGUES, D.; GONZALEZ-ASEGUINOLAZA, G.; LARRAGA, V.; ESTE, M. Protective immune response against cutaneous leishmaniasis by prime/booster immunization regimens with vaccinia virus recombinants expressing *Leishmania infantum* p36/LACK and IL-12 in combination with purified p36. **Microbes and infection**, v. 3, p. 701-711, 2001.

GREEN, L. C.; WAGNER, D. A.; GLOGOWSKI, J.; SKIPPER, P. L.; WISHNOK, J. S.; TANNENBAUM, S. R. Analysis of nitrite, nitrite and nitrate in biological fluids. **Analytical Biochemistry**, v. 126, p. 131, 1982.

GREEN, S. J.; MELTZER, M. S.; HIBBS, J. B.; NACY, C. A. Activated macrophages destroy intracellular *Leishmania major* amastigotes by an L-arginine-dependent killing mechanism. **Journal of Immunology**, Baltimore, v. 144, p. 278, 1990.

GREIL, J.; BODENDORFER, B.; ROLLINGHOFF, M.; SOLBACH, W. Application of recombinant granulocyte-macrophage colony-stimulating factor has a detrimental effect in experimental murine leishmaniasis. **European Journal of Immunology**, Weinheim, v. 18, p. 1527-1533, 1988.

GRISHAM, M. B.; PAVLICK, K. P.; LAROUX, F. S.; HOFFMAN, J., BHARWANI, S.; WOLF, R. E. Nitric oxide and chronic gut inflammation: controversies in inflammatory bowel disease. **Journal of Investigative Medicine**, v, 50, p. 272-283, 2002.

GUPTA, S.; RAMESH, S. C.; SRIVASTAVA, V. M. Efficacy of picroliv in combination with miltefosine, an orally effective antileishmanial drug against experimental visceral leishmaniasis. **Acta Tropica**, Stockholm, v. 94, n. 1, p.41-47, 2005.

GURUNATHAN, S.; WU, C. Y.; FREIDAG, B. L.; SEDER, R. A. DNA vaccines: a key for inducing long-term cellular immunity. **Current Opinion in Immunology**, Philadelphia, v. 12, p. 442-447, 2000.

HAAR, J. L.; RAYNOR, R. H.; RUSSELL, E. C.; BHATNAGAR, A. S.; MOHANAKUMAR, T. Ultra structural analysis of acute lymphoblastic cells: peanut lectin binding correlates with degree of differentiation of the leukemic cells. **Experimental Hematology**, v. 13, p.169, 1985.

HANSEN, G.; YEUNG, V. P.; BERRY, G.; UMETSU, D. T.; DeKRUYFF, R. Vaccination with heat-killed *Listeria* as adjuvant reverses established allergen-induced airway hyperactivity and inflammation: role of CD8<sup>+</sup> T cells and IL-18. **Journal of Immunology**, Baltimore, v. 164: p. 223-230, 2000.

HARMS, G.; CHEHADE, A. K.; RACZ, P.; DOUBA, M.; NAIFF, R. D.; FELDMEIER, H.; ZWINGENBERGER, K.; TALHARI, S.; MOUAKEH, A.; NAKEL, L.; KREMSNER, P. G.; BIENZLE, U. Effects of intradermal gamma-interferon in cutaneous leishmaniasis. **The lancet**, London, v. 10, p.1287-1292, 1989.

HAVSTEEN, B. H. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. **Pharmacology Therapy**, v. 96, p. 67-202, 2002

HAYGLASS, K. T.; STEFURA, B. P. Anti-interferon-g treatment blocks the ability of glutaraldehyde-polymerized allergens to inhibit specific IgG responses. **Journal of Experimental Medicine**, Washington, v.173, p. .279-285, 1991.

HEINY, B. M.; ALBRECHT, V.; BEUTH, J. Correlations of immune cells activities and beta-endorphin release in breast carcinoma patients treated with galactose-specific lectin standardized mistletoe extract. **Anticancer Research**, v. 18, p. 583-586, 1998.

HEINZEL, F. P.; SADICK, M. D.; HOLADAY, B. J.; COFFMAN, R. L.; LOCKSLEY, R. M. Reciprocal expression of interferon-gamma or interleukin-4 during the resolution or progression of murine leishmaniasis. Evidence for the expansion of distinct helper T cells subsets. **Journal of Experimental Medicine**, Washington, v. 169, p. 59-72, 1989.

HEINZEL, F. P.; SCHOENHAUT, D. S.; RERKO, R. M.; ROSSER, L. E.; GATELY, M. K. Recombinant interleukin-12 cures mice infected with *Leishmania major*. **Journal of Experimental Medicine**, Washington, v. 177, p. 1505-1509, 1993.

HIRSH, A. M. Role of lectins (and rhizobial exopolysaccharides) in legume nodulation. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 2, p. 320-326, 1999.

HOLADAY, B. J.; SADICK, M. D.; WANG, Z.; REINER, S. L.; HEINZEL, F. P.; PARSLow, T. G.; LOCKSLEY, R. M. Reconstitution of *Leishmania* immunity in severe combined immunodeficient mice using Th1 and Th2-like cells lines. **Journal of Immunology**, Baltimore, v. 147, p. 1653-1658, 1991.

HOWARD, J. G.; LIEW, F. Y.; HALE, C.; NICKLIN, S. prophylactic immunization against experimental leishmaniasis. II. Further characterization of the protective immunity

against fatal *Leishmania tropica* infection induced by irradiated promastigotes. **Journal of Immunology**, Baltimore, v. 132, p. 450, 1984.

IRAJI, F.; SADEGHINIA, A. Efficacy of paromomycin ointment in the treatment of cutaneous leishmaniasis: results of a double-blind, randomized trial in Isfahan, Iran. **Annual of Tropical Medicine and Parasitology**, Liverpool, v. 99, n. 1, p. 3-9, 2005.

ISLAM, K. B.; NILSSIN, L.; SIDERAS, P.; HAMMARSTRÖM, L.; SMITH, C. I. TGF- $\beta$  induces germ-line transcripts of both IgA subclasses in human B lymphocytes. **International Immunology**, v. 3, p. 1099-1106, 1991.

JENG, K. C. G.; FRIGERI, L. G.; LIU, F. T. Non-endogenous lectin, galectin-3 ( $\epsilon$ BP/Mac-2), potentiates IL-1 production by human monocytes. **Immunology Letters**, v. 42, p. 113-116, 1994.

KAFETZIS, D. A.; VELISSARIOU, I. M.; STABOULI, S.; MAVRIKOU, M.; DELIS, D.; LIAPI, G. Treatment of paediatric visceral leishmaniasis: amphotericin B or pentavalent antimony compounds? **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 25, n. 1, p. 26-30, 2005.

KAYESHTA, R.; BERRY, A.; HAJELA, K. Studies on a glucose-binding lectin from peripheral blood lymphocytes. **Immunology Letters**, v. 38, p. 201-205, 1993.

KELLERHER, M.; BACIC, A.; HANDMAN, E. Identification of macrophage-binding determinant of lipophosphoglycan from *Leishmania major* promastigotes. **Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 89, p. 6-10, 1992.

KILPATRICK, D. C.; STODDART, R. W.; JONES, C. J. P. Glycoprotein oligosaccharide sequences of mast cell granules: a lectin-based study. **Lectins, Biology, Biochemistry, Clinical Biochemistry** – T.C. BOG-HANSEN Eds., Cap. 6, p. 69-80, 1987.

KIM, H. K.; CHEON, B. S., KIM, Y. H., KIM, S. Y., KIM, H. P. Effects of naturally occurring flavonoids on nitric oxide production in macrophage cell line RAW 264.7 and their structure – activity relationships. **Biochemistry Pharmacology**, v. 58, p. 759-765, 1999.

KOTANIDOU, A.; XAGORARI, A.; BAGLI, E.; KITSANTA, P.; FOTISIS, T.; PAPAPETROPOULOS, A.; ROUSSOS, C. Luteolin reduces lipopolysaccharide-induced lethal toxicity and expression proinflammatory molecules in mice. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 165, p. 818-823, 2002.

KOUFMAN, K.; EGOZ, N.; GREENBLATT, C. L.; HANDMAN, E.; MONTILIO, B. Observations on immunization against cutaneous leishmaniasis. **Israel Journal Medicine Science**, Tel-Aviv, v. 14, p. 218-222, 1978.

KROL, W.; CZUBA, Z. P.; TREADGILL, M. D.; CUNNINGHAM, B. D.; PIETSE, G. Inhibition of nitric oxide (NO) production in murine macrophages by flavones. **Biochemistry Pharmacology**, v. 50, p. 1031-1035, 1995.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the bacteriophage T4. **Nature**, London, v. 227, n. 5259, p. 680-685, 1970

LAFONT, V.; HIVROZ, C.; CARAYON, P.; DORNAND, J.; FAVERO, J. The lectin jacalin specifically triggers cell signaling in CD4<sup>+</sup> T lymphocytes. **Cellular Immunology**, v. 181: 23-29, 1997.

LAI, H. H.; YEN, G. C. Inhibitory effect of isoflavones on peroxynitrite-mediated low-density lipoprotein oxidation. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 66, n. 1, p. 22-8, 2002.

LAINSON, R.; SHAW, J. J. Evolution, classification and geographic distribution. In: Peters, W., Killick, R. Eds. The leishmaniasis in biology and medicine. **Vol.1. London: Academic Press**: p. 1-120, 1987.

LAMAS, S.; PÉREZ-SALA, D.; MONCADA, S. Nitric oxide: from Discovery to the clinic. **Trends Pharmacology Science**, v. 19, p. 436-438, 1998.

LANZA, H.; AFONSO-CARDOSO, S. R.; SILVA, A. G.; NAPOLITANO, D. R.; ESPÍNDOLA, F. S.; PENA, J. D. O.; SOUZA, M. A. Comparative effect of ion calcium and magnesium in the activation and infection of the murine macrophage by *Leishmania major*. **Biological Research**, Santiago, v. 37, p. 385-393, 2004.

LAVELLE, E. C.; GRANT, A.; PUSZTAI, A.; PFULLER, U.; O'HAGAN, D. T. The identification of plant lectins with mucosal adjuvant activity. **Immunology**, v. 102, p. 77-86, 2001.

LAI, H. H.; YEN, G. C. Inhibitory effect of isoflavones on peroxynitrite mediated low-density lipoprotein oxidation. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, v. 66, p. 22-28, 2002.

LEAL, L. M. C. C.; MOSS, D. W.; KUHN, R.; MÜLLER, W.; LIEW, F. Y. Interleukin-4 transgenic mice of resistant background are susceptible to *Leishmania major* infection. **European Journal of Immunology**, Weinheim, v. 23, p. 566-569, 1993.

LENARTZ, D.; ANDERMAHR, J.; PLUM, G.; MENZEL, J.; BEUTH, J. Efficiency of treatment with galactose-specific lectin from mistletoe against rat glioma. **Anticancer Research**, v. 18, p. 1011-1014, 1998.

LICASTRO, F.; BARBIER, I. L.; KRAJHANZI, A.; KOCOUREK, J.; STRIPE, F. A cortical lectin from the oocytes of *Rutilus rutilus* stimulates mitogenic activity and release

of soluble factors from human lymphocyte cultures and inhibits protein synthesis in a cell-free system. **International Journal Biochemistry**, v. 23, n. 1, p. 101-5, 1991.

LICASTRO, F.; DAVIS, L. J.; MORINI, M. C. Lectins and super antigens: membrane interactions of these compounds with T lymphocytes affects immune response. **International Journal of Biochemistry**, v. 25, p. 845-852, 1993.

LIEW, F. Y.; HALE, C.; HOWARD, J. D. Prophylactic immunization against experimental leishmaniasis. IV. Subcutaneous immunization against experimental leishmaniasis. **Journal of Immunology**, v. 135, p. 2095-2101, 1985.

LIEW, F. Y.; MILLOTT, S.; LI, Y.; LELCHUK, R.; CHAN, L. W.; ZILTENER, H. Macrophage activation by interferon-gamma from host-protective T cells is inhibited by interleukin-3 and IL-4 produced by disease-promoting T cells in leishmaniasis. **European Journal of Immunology**, Weinhein, v. 19, p. 1227-1232, 1989.

LIEW, F.; O'DONNELL, C. A. Immunology of leishmaniasis. **Advances in Parasitology**, v. 32, 161-260, 1993.

LIMA, J. E.; SAMPAIO, A. L. F.; HENRIQUES, M. G. M. O.; BARJA-FIDALGO, C. Lymphocyte activation and production by *Pisum sativum* agglutinin (PSA) *in vivo* and *in vitro*. **Immunopharmacology**, v. 41, p. 147-155, 1999.

LIPFORD, G. B.; SPARWASSER, T.; BAUER, M.; ZIMMERMANNAS, S.; KOCH, E. S.; HEEG, K.; WAGNER, H. Immunostimulatory DNA: sequence-dependent production of potentially harmful or useful cytokines. **European Journal of Immunology**, Weinhein, v. 27, p. 3420, 1997.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FAAR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the folin phenol reagent. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 193, n. 1, p. 265-275, 1951.

LUNDGREEN, M.; PERSON, U.; LARSSON, P. et al.. Interleukin 4 induces synthesis of IgE and IgG4 in human cells. **European Journal of Immunology**, v. 7, p. 1311-1315, 1989.

MATSUDA, H.; MORIKAWA, T.; ANDO, S.; TOGUCHIDA, I.; YOSHIKAWA, M. Structural requirements of flavonoids for nitric oxide production inhibitory activity and mechanism of action. **Bioorg Med Chem**, v. 11, p. 1995-2000, 2003.

McCLURE, J. W. Physiology and functions of flavonoids. In **The Flavonoids** Edited by: Harborne JB and Mabry IJ. New York: Academic Press: p. 970-1055, 1975.

MAILLARD, I., LAUNOIS, P.; HIMMERILCH, H.; ACHA-ORBEA, H.; DIGGELMANN, H.; LOCKSLEY, R. M.; LO, J. A. Functional plasticity of the LACK-reactive Vbeta4-Vbeta-8 CD4(+) T cell normally producing the early IL-4 instructing Th2 cell development and susceptibility to *Leishmania major* in BALB/c mice. **European Journal of Immunology**, Weinheim, v. 31, p. 1288-1296, 2001.

MARZINOWSKI, E. I.; SCHURENKOWA, A. Oriental sore and immunity against it. **Transaction Royal Society Tropical Medicine and Hygiene**, London, v. 18, p. 67, 1924.

MARZOCHI, K. B.; MARZOCHI, M. A.; SILVA, A. F.; GRATIVOL, N.; DUARTE, R.; CONFORT, E. M.; MODABBER, F. Phase I study of an inactivated vaccine against American tegumentary leishmaniasis in normal volunteers in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 93, p. 205-212, 1998.

MAYRINK, W.; ANTUNES, C. M.; DA COSTA, C. A.; MELO, M. N; DIAS, M.; MICHALICK, M. S. M.; MAGALHÃES, P. A.; LIMA, A. O.; WILLIAMS, P. Further trials of a vaccine against new world cutaneous leishmaniasis. **Transaction Royal Society Tropical Medicine and Hygiene**, London, v. 80, p. 1001-1006, 1986.

MELBY, P. C.; YANG, J.; ZHAO, W.; PEREZ, L. E.; CHENG, J. *Leishmania donovani* p36 (LACK) DNA vaccine is highly immunogenic but not protective against experimental visceral leishmaniasis. **Infection and Immunity**, Washington, v. 69, p. 4719-4725, 2001.

MILANO, S.; ARCOLEO, F.; DIELI, M.; D'AGOSTINO, R.; DE NUCCI, G.; D'AGOSTINO, P.; CILLARI, E. *Ex vivo* evidence for PGE2 and LTB4 involvement in cutaneous leishmaniasis: relation with infection status and cytokine production. **Parasitology**, v. 112, p. 13-19, 1996.

MODABBER, F. Tropical Disease Research. **Eds Maurice, J. and Pearce, A.M, WHO**, p. 99-112, 1987.

MOHAN, A.; SETH, S. Oral miltefosine in the treatment of kala-azar. **National Medical Journal India**, v. 13, p. 202-203, 2000.

MOINGEON, P.; HAENSER, J.; LINDBERG, A. Towards the rational design of Th1 adjuvants. **Vaccine**, Surrey, v. 19, p. 4363-4372, 2001.

MOMENI, A. Z.; JALAYER, M.; EMAMJOMEH, A.; KHAMESIPOUR, F.; ZICKER, R. L.; GHASSEMI, Y.; DOWLATI, Y.; SHARAFI, I.; AMINJAVAHARI, A.; SHAFIEI, M. H.; ALIMOHAMMADIAN, R.; HASHEMI-FESHARKI, K.; NASSERI, T.; GODAL, P. G.; SMITH, G.; MODABBER, F. A randomized, double-blind, controlled trial of a killed *L. major* vaccine plus BCG against zonal cutaneous leishmaniasis in Iran. **Vaccine**, Surrey, v. 17, p. 466-472, 1998.

MOORE, K. J.; MATLASHEWSKI, G. Intracellular infection by *Leishmania donovani* inhibits macrophage apoptosis. **Journal of Immunology**, Baltimore, v. 152, p. 2930-2937, 1994.

MOREIRA, R. A.; AINOUS, I. L.; OLIVEIRA, J. T. A.; CAVADA, B. S. Plant lectins, chemical and biological aspects. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 86, p. 211-218, 1991.

MORSY, T. A.; EL MISSIR, Y. A. G.; SARWAT, M. A.; EL RASSED, M. M.; HABIB, F. S.; ABOU GAMRA, M. M. Tumour necrosis factor-alpha (cachectin) in human visceral leishmaniasis. **Journal Egypt Society Parasitology**, v. 25, n. 1, p. 31-51, 1995.

MOSMANN, T. R.; CHERWISNK, H.; BOND, M. W.; GREDLIN, M. A.; COFFMANN, R. L. Two types of murine helper T cells clone. I. Definition according to profile of lymphokine activities and secreted proteins. **Journal of Immunology**, v. 136, p. 2348-2357, 1986.

MOSMANN, T. R.; COFFMANN, R. L. Th1 and Th2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. **Annual of Review in Immunology**, v. 7, p. 145-173, 1989.

MUKHOPADHYAY, S.; SEM, P.; BHATTACHARYA, S.; MAJUMDAR, S.; ROY, S. Immunoprophylaxis and immunotherapy against experimental visceral leishmaniasis. **Vaccine**, Surrey, v. 17, p. 291-300, 1999.

MURAILLE, E.; PAJAK, B.; URBAIN, J.; LEO, O. Carbohydrate-bearing cell surface receptors involved in innate immunity: interleukin-12 induction by mitogenic and nonmitogenic lectins. **Cellular Immunology**, v. 191, p. 1-9, 1999.

MURRAY, H. W.; RUBIN, B. Y.; ROTHERMEL, C. D. Killing of intracellular *Leishmania donovani* by lymphokine-stimulated human mononuclear phagocytes. **Journal of Clinical Investigation**, v. 72, p. 1506-1510, 1983.

MURRAY, H. W. Treatment of visceral leishmaniasis (kal-azar): a decade of progress and future approach. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 4, n. 3, p. 158-177, 2000.

NACY, C. A., MEIEROVICS, A. I., BELOSEVIC, M., GREEN, S. J. Tumor necrosis factor-alpha: central regulatory cytokine in the induction of macrophage antimicrobial activities. **Pathobiology**, v. 3; n. 59, p. 182-4, 1991.

NAPOLITANO, D. R.; MINEO, J. R.; DE SOUZA, M. A.; DE PAULA, J. E.; ESPINDOLA, L. S.; ESPINDOLA, F. S. Down-modulation of nitric oxide production in murine macrophages treated with crude plant extracts from the Brazilian Cerrado. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 99, p. 37–41, 2005.

NOWELL, P. C. Phytohemagglutinin: an initiator of mitosis in cultures of normal human leukocytes. **Cancer Research**, v. 20, p. 462-466, 1960.

OMS: Organização Mundial de Saúde. Disponível em:

<http://www.who.int/ctd/html/leish.html> Acesso em 30 de setembro de 2004.

OKUYAMA, T.; MAEHARA, Y.; KAJEDI, Y.; TSUIJITANI, S.; KORENAGA, D.; SUGIMACHI, K. Interrelation between tumor-associated cell surface glycoprotein and host immune response in gastric carcinoma patients. **Cancer**, v. 82, p. 1468-1475, 1998.

PADIGEL, U. M.; PERRIN, P. J.; FARRELL, J. P. The development of a Th1-type response and resistance to *Leishmania major* infection in the absence of CD40-Cd40L costimulation. **Journal of Immunology**, Baltimore, v. 167, p. 5874-5879, 2001.

PALATNIK-DE-SOUSA, C. B.; PARAGUAI-DE-SOUSA, E.; GOMES, E. M.; BOROJEVIC, R. Experimental murine *Leishmania donovani* infection: immunoprotection by the fucose-mannose ligand (FML). **Brazilian Journal Medical Biological Research**, Ribeirão Preto, v. 27, p. 547-551, 1994.

PANUNTO-CASTELO, A.; SOUZA, M. A.; ROQUE-BARREIRA, M. C.; SILVA, J. S. KM (+), a lectin from *Artocarpus integrifolia*, induces IL-12 p40 production by macrophages and switches from type 2 to type 1 cell-mediated immunity against *Leishmania major* antigens, resulting in BALB/c mice resistance to infection. **Glycobiology**, v. 11, p. 1035-1042, 2001.

PARK, W. B.; LYU, S. Y.; KIM, J. H.; CHOI, S. H.; CHUNG, H. K.; AHN, S. H.; HONG, S. Y.; YOON, T. J.; CHOI, M. J. Inhibition of tumour growth and metastasis by Korean mistletoe lectin is associated with apoptosis and antiangiogenesis. **Cancer Biotherapy Radiopharm.** v. 16: 439-447, 2001.

PAUL, W. E. **Fundamental of Immunology**. 4<sup>a</sup> edition, Philadelphia: Lippincott – Raven, 1998, p. 1998.

PEARSON, R.; SOUSA, A. Q. Clinical spectrum of leishmaniasis. **Clinical Infectious Diseases**, v. 22, p. 1-13, 1996.

PESSOA, S. B. Segunda nota sobre a vacinação preventiva na leishmaniose tegumentar americana com *Leptomonas* mortas – **Leishmaniose tegumentar Americana**. PESSOA, S. B.; BARRETO, M. P. Eds., Ministério da Educação e Saúde, p.464-8, 1944.

PESSOA, S. B.; PESTANA, B. R. Ensaio sobre a vacinação preventiva na leishmaniose tegumentar americana com germes mortos. **Rev. Biol. Hig.**, v. 10: 112-118, 1940.

PEUMANS, W. J.; VAN DAMME, E. J. M. The role of lectins in the defense of plants – **Lectins, Biology, Biochemistry, Clinical Biochemistry**. T.C. BOC-HANSEN Eds., p.82-91, 1993.

PEUMANS, W. J.; VAN DAMME, E. J. M. The role of lectins in plant defense. **Histochemistry Journal**, v. 27, p. 253-271, 1995.

PHILLIPS, N. C.; EMILI, A. Enhanced antibody response to liposome-associated protein antigens: preferential stimulation of IgG2a/b production. **Vaccine**, Surrey, v. 10, n. 3, p. 151-8, 1992

PUSZTAI, A.; EWEN, S. W. B.; CARVALHO, F. F. U.; GRANT, G.; STEWART, J. C.; BARDOCZ, S. Lectins as metabolic signals for the gut and body. **Lectins, Biology, Biochemistry, Clinical Biochemistry** – T.C. BOG-HANSEN Eds., cap.8 p. 250-7, 1993.

RACOOSIN, E. L.; BERVERLEY, S. M. *Leishmania major* promastigotes induce expression of a subset of chemokine genes in murine macrophages. **Experimental Parasitology**, v. 85, p. 283-295, 1997.

RAFATI, S.; SALMANIAN, A. H.; TAHERI, T.; VAFA, M; FASEL, N. A protective cocktail vaccine against murine cutaneous leishmaniasis with DNA encoding cystein proteinases of *Leishmania major*. **Vaccine**, Surrey, v. 19, p. 3360-3375, 2001.

RAIS, S.; PERIANIN, A.; LENOIR, M.; SADAK, A.; RIVOLLET, D.; PAUL, M.; DENIAU, M. Sodium stibogluconate (Pentostan) potentates oxidant production in murine visceral leishmaniasis and in human blood. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 44, p. 2406-2410, 2000.

RAMOS, M. V.; BONFIM, L. R.; CAVADA, B. S.; SAMPAIO, A. H.; MADEIRA, S. V. F. Investigação sobre o papel biológico de lectinas vegetais com base na especificidade por monossacarídeos e glicanos complexos. **Revista Univille**, v. 3, p. 53-59, 1998.

RAMOS, M. V.; MOREIRA, R. A.; OLIVEIRA, J. T. A.; CAVADA, B. S.; ROUG , P. Structural similarities among *Diocleae* lectins. **Lectins, Biology, Biochemistry, Clinical Biochemistry**. T.C. BOG-HANSEN Eds., cap.11, p.44-49, 1999.

REINER, N. E.; WINNIE, N.; MA, T.; McMASTER, R. Kintetics of interferon gamma binding and induction of major histocompatibility complex class II mRNA in *Leishmania*-

infected macrophages. **Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 85, p. 4330-4334, 1988.

REINER, S. L.; ZHENG, S.; WANG, Z. E.; STOWRING, L.; LOCKSLEY, R. M. *Leishmania* promastigotes evade interleukin 12 induction by macrophages and stimulate a broad range of cytokine from CD4<sup>+</sup> T cells during initiation of infection. **Journal of Experimental Medicine**, Washington, v. 179, p. 447-456, 1994.

RIBEIRO-DE-JESUS, A.; ALMEIDA, R. P.; LESSA, H.; BACELLAR, O.; CARVALHO, E. M. Cytokine profile and pathology in human leishmaniasis. **Brazilian Journal Medical Biology Research**, v. 31, n. 1, p. 143-8, 1998.

ROCHA, P. N.; ALMEIDA, R. P.; BACELLAR, O.; JESUS, A. R.; FILHO, D. C.; FILHO, A. C.; BARRAL, A.; COFFMAN, R. L.; CARVALHO, E. M. Down-regulation of Th1 type of response in early human American cutaneous leishmaniasis. **Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 180, p. 1731-1734, 1999.

RODRIGUES, F. H.; AFONSO-CARDOSO, S. R.; GOMES, M. A. B.; ROCHA, A.; GUIMARÃES, A. H. B.; CANDELORO, I.; SOUZA, M. A. Effect of imidocarb and levamisole on the experimental infection of BALB/c mice by *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. **Veterinary Parasitology**, IN PRESS, 2006.

RODRIGUEZ, D.; CAVADA, B. S.; OLIVEIRA, J. T. A.; MOREIRA, R. A.; RUSSO, M. Differences in macrophages stimulation and leukocyte accumulation in response to intraperitoneal administration of glucose/mannose-binding plant lectins. **Brazilian Journal of Medical Biological Research**, Ribeirão Preto, v. 25, p. 823-826, 1992.

ROMAN, M.; MARTIN-OROZCO, E.; GOODMAN, J. S.; NGUYEN, M. D.; SATO, Y.; RONAGHY, A.; KORNBLUTH, R. S.; RICHMAN, D. D.; CARSON, D. A. Immunostimulatory DNA sequences function as T helper-1-promoting adjuvants. **Natural Medicine**, v. 3, p. 849, 1997.

ROQUE-BARREIRA, M. C.; CAMPOS-NETO, A. Jacalin: an IgA-binding lectin. **Journal of Immunology**, Baltimore, v. 134, p. 1740-1743, 1985.

ROQUE-BARREIRA, M. C.; PRAZ, F.; HALBWACHS-MECARELLI, L.; GREENE, L. J.; CAMPOS-NETO, A. IgA-affinity purification and characterization of the lectin jacalin. **Brazilian Journal Medical Biology Research**, Ribeirão Preto, v. 19, p. 149-157, 1986.

ROSA, J. C.; OLIVEIRA, P. S. L.; GARRATT, R.; BELTRAMINI, L.; RESING, K.; ROQUE-BARREIRA, M. C. KM<sup>+</sup>, a mannose-binding lectin from *Artocarpus integrifolia*: amino acid sequence, predicted tertiary structure, carbohydrate recognition, and analysis of the beta-prism fold. **Protein Science**, v. 8, p. 13-24, 1999.

ROSEMBERG, M. D.; CHITAYAT, D.; TZEHOVAL, E.; WAXDAL, M. J.; SHARON, N. detection and enumeration of monocytes in human blood with peanut agglutinin. **Journal of Immunology Methods**, v. 81, p. 7, 1985.

ROSS, R. Further Notes on *Leishmania*'s bodies. **British Medical Journal**, London, v. 11, p. 1401, 1903.

ROUGÉ, P.; RICHARDSON, M.; RANFAING, P.; YAWOOD, A.; CAVADA, B. S. Single-and two-chain legume lectins as phylogenetic markers of speciation. **Biochemistry Systematics and Ecology**, v. 15, p. 341-348, 1987.

SALAZAR, J. H. Aspectos imunologicos de la leishmaniasis Americana. Ensayos profilacticos mediante vacunaciones com formas Leptomonas vivas de cultivo de *Leishmania brasiliensis* Vianna. **Arquivos Venezoelanos de Medicina Tropical Y Parasitologia Medica**, Caracas, v. 5, p. 365-384, 1965.

SANTOS-DE-OLIVEIRA, R.; DIAS-BARUFFI, M.; THOMAZ, S. M.; BELTRAMINI, L. M.; ROQUE-BARREIRA, M. C. A neutrophil migration-inducing lectin from *Artocarpus integrifolia*. **Journal of Immunology**, Baltimore, v. 153, p. 1798-1807, 1994.

SCHARTON, T. M.; SCOTT, P. Natural killer cells are a source of interferon-gamma that drives differentiation of CD4<sup>+</sup> T cell subsets and induces early resistance to *Leishmania major* in mice. **Journal of Experimental Medicine**, Washington, v. 178, p. 567-577, 1993.

SCHOPF, L. R.; ERCKSON, J.; HAYES, L.; CHUNG, C.; LAVIGNE, L.; SYPEK, J. Alterations of intralesional and lymph node gene expression and cellular composition induced by IL-12 administration during leishmaniasis. **Parasite Immunology**, v. 23, p. 71-84, 2001.

SCOTT, P. IFN- gamma modulates the early development of Th1 and Th2 responses in a murine model of cutaneous leishmaniasis. **Journal of Immunology**, Baltimore, v. 147, p. 3149-3155, 1991.

SCURO, L. S.; SIMIONI, P. U.; GRABRIEL, D. L.; SAVIANI, E. E.; MODOLO, L. V.; TAMASHIRO, W. M. S. C.; SALGADO, I. Suppression of nitric oxide production in mouse macrophages by soybean flavonoids accumulated in response to nitroprusside and fungal elicitation. **BMC Biochemistry**, v. 5, p. 1-8, 2004.

SHARON, N. Lectin-carbohydrate complexes of plants and animals: an atomic view. **Trends in Biochemistry Science**, v. 18, p. 221-226, 1993.

SHARON, N.; LIS, H. Lectins – proteins with a sweet tooth: functions in cell recognition. **Assays in Biochemistry**, v. 30, p. 59-75, 1995.

SHARON, N.; LIS, H. Legume lectins, a large family of homologous proteins. **FASEB Journal**, v. 4, p. 3198-3208, 1990.

SHIRODKAR, S. HUTCHINSON, R. L.; PERRY, D. L.; WHITE, J. L.; HEM, S. L. Aluminium compounds used as adjuvant sin vaccines. **Pharmmacology Research**, v. 7, p. 1282-1288, 1990.

SING, S.; SIVAKUMAR, R. Challenges and new discoveries in the treatment of leishmaniasis. **Journal Infection Chemotherapy**, v. 10, p. 310-315, 2004.

SOLIMAN, K. F.; MAZZIO, E. A. In vitro attenuation of nitric oxide production in C6 astrocyte cell culture by various dietary compounds. **Proceedings Society Experimental Biology and Medicine**, v. 218, n. 4, p.390-7, 1998.

SOLOWAY, P.; FISH, S.; PASSMORE, H.; GEFTER, M.; COFFEE, R.; MANSER, T. Regulation of the immune responses to peptide antigens: differential induction of immediate-type hypersensitivity and T cell proliferation due to changes in either peptide structure or major histocompatibility complex haplotype. **Journal of Experimental Medicine**, Washington, v. 174, n. 4, p. 847-858, 1991.

SPARWASSER, T.; KOCH, E. S.; VABULAS, R. M.; HEEG, K.; LIPFORD, G. B.; ELWART, J. W.; WAGNER, H. Bacterial DNA and immunostimulatory CpG oligonucleotides trigger maturation and activation of murine dendritic cells. **European Journal of Immunology**, Weinheim, v. 28, p. 2045, 1998.

SOLIMAN, K. F.; MAZZIO, E. A.: *In vitro* attenuation of nitric oxide production in C6 astrocyte cell culture by various dietary compounds. **Proceeding Society Experimental Biology and Medicine**, v. 218, p.390-397, 1998.

SOTO, J. T.; GUTIERREZ, P.; NICHOLLS, R. S.; PADILHA, J.; ENGEL, J.; FISCHER, C.; VOSS, A. Treatment of American cutaneous leishmaniasis with miltefosine , an oral agent. **Journal Clinical Infectious Diseases**, v. 33, p. 57-61, 2001.

SOUZA, C. P.; MODESTO, M. M.; ALVES, T. M. A. Estudo químico da caramboleira e da leiterinha. FESB - O jovem e a ciência no futuro - Abstract 15.P.7, 2000. Disp. in: [\[http://www.fesbe.org.br/ra/fesbe2000/ojcf.html\].](http://www.fesbe.org.br/ra/fesbe2000/ojcf.html)

SOUZA, M. A.; AFONSO-CARDOSO, S. R.; MACHADO, A. P.; CHAVES-BORGES, F. A.; LANZA, H.; PENA, J. D. O. The adjuvant effect of saponin (Quilara bark) in the vaccine against murine cutaneous leishmaniasis. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 20, n. 1, p. 109-116, 2004.

SOUZA, M. A.; AMANCIO-PEREIRA, F.; BARROS-CARDOSO, C. R.; GOMES-SILVA, A.; SILVA, E. G.; ANDRADE, L. R.; PENA, J. D. O.; LANZA, H.; AFONSO-CARDOSO, S. R. Isolation and partial characterization of a D-galactose-binding lectin from the látex of *Synadenium carinatum*. **Brazilian Achives Biology and Technology**, Curitiba, v. 48, n. 5, p. 705-716, 2005.

SRIRUPA, M.; BHATTACHARYYA, S.; MAJHI, R.; DE, T.; NASKAR, K.; MAJUMDAR, S.; ROY, S. Use of an attenuated leishmanial parasite as an immunoprophylatic and immunotherapeutic agent against murine visceral leishmaniasis. **Clinical Diagnostic Laboratories Immunology**, v. 7, p. 233-240, 2000.

STACEY, K. J.; BLACKWELL, J. M. Immunostimulatory DNA as adjuvant in vaccination against *Leishmania major*. **Infection and Immunity**, Washington, v. 67, p. 3719-3726, 1999.

STAVNEZER, J. Immunoglobulin class switching. **Current Opinion in Immunology**, v. 8, p. 199-205, 1996.

STENGER, S.; THURING, H.; ROLLINGHOFF, M.; BOGDAN, C. Tissue expression of inducible nitric oxide sintase is closely associated with resistance to *Leishmania major*. **Journal of Experimental Medicine**, Washington, v. 180, p. 783-793, 1994.

SUNDAR, S. Treatment of visceral leishmaniasis. **Medical Microbiology Immunology**, v. 190, p. 89-92, 2001.

SUNDAR, S.; MURRAY, H. W. Availability of miltefosine for the treatment of kala-azar in India. **Bulletin of World Health Organ.**, v. 83, n. 5, p. 394-395, 2005.

SYPEK, J. P.; CHUNG, C. L.; MAYOR, E. H.; SUBRAMANYAM, J. M.; GOLDMAN, S. J.; SIEBURTH, D. S.; WOLF, S. F.; SCHAUB, R. G. Resolution of cutaneous leishmaniasis interleukin-12 initiates a protective T helper type 1 immune response. **Journal of Experimental Medicine**, Washington, v. 177, p. 1797-1802, 1993.

TAIMI, M., DORNAND, J., NICOLAS, M., MARTI, J., FAVERO, J. Involvement of CD4 in interleukin-6 secretion by U937 monocytic cells stimulated with the lectin Jacalin. **Journal Leukocytes Biology**, v. 55, p. 214-220, 1994.

TEIXEIRA, C. R. Avaliação do potencial adjuvante de lectinas vegetais na vacinação contra leishmaniose cutânea experimental. Dissertação de Mestrado, 85p, 2002.

TITUS, R.; De KREY, G. K.; MORRIS, R. V.; SOARES, M. B. Interleukin-6 deficiency influences cytokine expression in susceptible BALB/c mice infected with *Leishmania major* but does not alter the outcome of disease. **Infection and Immunity**, Washington, v. 69, p. 5189-5192, 2001.

TITUS, R. G.; LIMA, G. C.; ENGERS, H. D.; LOUIS, J. A. Exacerbation of murine cutaneous leishmaniasis by adoptive transfer of parasite specific helper T cell populations capable of mediating *Leishmania major* specific delayed-type hypersensitivity. **Journal of Immunology**, Weinheim, v. 133, p. 1594-1600, 1994.

TORRENTERA, F. A.; GLAICHENHAUS, N.; LAMAN, J. D.; CARLIER, Y. T-cell responses to immunodominant LACK antigen do not play a critical role in determining susceptibility of BALB/c mice to *Leishmania mexicana*. **Infection and Immunity**, Washington, v. 69, p. 617-621, 2001.

TRAUTH, N. N. Susceptibility to *Leishmania major* infection in the absence of IL-4. **Immunology Letters**, v. 75, p. 41-44, 2000.

VELEZ, I. D.; DEL PILAR, A. S.; ARBEALAEZ, M. P.; GILCHRIST, K.; ROBLEDO, S. M.; PUERTA, J. A.; BERMAN, J.; MODABBER, F. Safety and immunogenicity of a killed *Leishmania (L) amazonensis* vaccinated against cutaneous leishmaniasis in Colombia: a randomized controlled trial. **Transaction Royal Society Tropical Medicine and Hygiene**, London, v. 94, p. 698-703, 2001.

VERAS, P. S. T.; BRODSKYN, C. I.; BALESTIERI, F. M. P.; FREITAS, L. A. R.; RAMOS, A. P. S.; QUEIROZ, A. R. P.; BARRAL, A.; BEVERLEY, S. M.; BARRAL-NETTO, M. A *dhfr-ts Leishmania major* knock out mutant cross-protects against *Leishmania amazonensis*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 94, p. 491-496, 1999.

VIEIRA, L. Q.; HONDOWICZ, B. D.; AFONSO, L. C. C.; WYSOCKA, M.; TRINCHIERI, G.; SCOTT, P. Infection with *Leishmania major* induces interleukin-12 production in vivo. **Immunology Letters**, v. 40, p. 157-161, 1994.

WANG, J.; MAZZA, G. Inhibitory effects of anthocyanins and other phenolic compounds on nitric oxide production in LPS/IFN $\gamma$  activated RAW 264.7 macrophages. **Journal of Agriculture Food Chemistry**, v. 50, p. 850-857, 2002.

WANG, Z. E.; ZHENG, S.; CORRY, D. B.; DALTON, D. K.; SEDER, R. A.; REINER, S. L.; LOCKSLEY, R. M. Interferon- $\gamma$ -independent effects of interleukin 12 administered during acute or established infection due to *Leishmania major*. **Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 91, p. 12932-12936, 1994.

WILSON, M. E.; YOUNG, B. M.; ANDERSEN, K. P.; WEINSTOCK, J. V.; MEWALI, A.; ALI, M.; DONELSON, J. E. A recombinant *Leishmania chagasi* antigen that stimulates

cellular immune responses in infected mice. **Infection and Immunity**, Washington, v. 63, p. 2062, 1995.

WOLF, S. F.; TEMPLE, P. A.; KOBAYASHI, M.; YOUNG, D.; DICIG, M.; LOWE, L.; DZIALO, R.; FITZ, L.; HAN, S. H.; TRINCHIERI, G.; PERUSSIA, B. Cloning of cDNA for natural killer cell stimulatory factor, a heterodimeric cytokine with multiple biologic effects on T and natural killer cell. **Journal of Immunology**, Baltimore, v. 146, p. 3074-3081, 1997.

YIM, M.; ONO, T.; IRIMURA, T. Mutated plant lectin library useful to identify different cells. **Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 98, p. 2222-2225, 2001.

YOON, T. J.; KANG, T. B.; HER, E.; KIM, S. H.; AZUMA, I.; KIM, J. B. Cellular and humoral adjuvant activity of lectins isolated from Lorean mistletoe (*Viscum album coloratum*). **International Immunopharmacology**, v. 5, p. 881-889, 2001.

ZIMMERMANN, S.; EGETER, O.; HAUSMANN, S.; LIPFORD, G. B.; ROCKEN, M.; WAGNER, H.; HEEG, K. CpG oligodeoxynucleotides trigger protective and curative Th1 responses in lethal murine leishmaniasis. **Journal of Immunology**, Baltimore, v. 160, p. 3627, 1998.