

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
CENTRO DE PESQUISAS AGGEU MAGALHÃES  
MESTRADO EM BIOCÊNCIAS E BIOTECNOLOGIA EM SAÚDE

KARLA RAÍZA CARDOSO RIBEIRO

PROSPECÇÃO DE NOVAS DROGAS CONTRA A LEISHMANIOSE CUTÂNEA:  
AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA DA LECTINA DE *Oreochromis niloticus*

RECIFE

2016

KARLA RAÍZA CARDOSO RIBEIRO

**PROSPECÇÃO DE NOVAS DROGAS CONTRA A LEISHMANIOSE CUTÂNEA:  
AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA DA LECTINA DE *Oreochromis niloticus***

Dissertação apresentada ao curso de Mestrado em Biociências e Biotecnologia em Saúde do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, para obtenção do título de mestre em Ciências.

**Orientadora:** Dra. Regina Célia Bressan Queiroz de Figueiredo

RECIFE

2016

**Catálogo na fonte: Biblioteca do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães**

---

- R484p     Ribeiro, Karla Raíza Cardoso.  
              Prospecção de novas drogas contra a leishmaniose cutânea: Avaliação da atividade biológica da lectina de *Oreochromis niloticus* / Karla Raíza Cardoso Ribeiro. - Recife: [s.n.], 2016.  
              96 p. : ilus., graf., tab.
- Dissertação (Mestrado em Biociências e Biotecnologia em Saúde) - Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, 2016.  
              Orientadora: Regina Célia Bressan Queiroz de Figueiredo.
1. Leishmania. 2. Leishmaniose cutânea. 3. Lectinas. 4. Quimioterapia. I. Figueiredo, Regina Célia Bressan Queiroz de. II. Título.

---

CDU 616.995.122

KARLA RAÍZA CARDOSO RIBEIRO

**PROSPECÇÃO DE NOVAS DROGAS CONTRA A LEISHMANIOSE CUTÂNEA:  
AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA DA LECTINA DE *Oreochromis niloticus***

Dissertação apresentada ao curso de Mestrado em Biociências e Biotecnologia em Saúde do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, para obtenção do título de mestre em Ciências.

Aprovado em: 23/02/2016

BANCA EXAMINADORA

---

Dra. Regina Célia Bressan Queiroz Figueiredo (Orientadora)  
Departamento de Microbiologia do CPqAM/FIOCRUZ

---

Dra. Valéria Pereira Hernandes (Titular Interno)  
Departamento de Imunologia do CPqAM/FIOCRUZ

---

Dr. Emmanuel Vianna Pontual (Titular Externo)  
Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal- UFRPE

Aos meus pais José Carlos e Iserilda  
pelo apoio e amor incondicional.

## AGRADECIMENTOS

À Deus por me guiar, proteger e me proporcionar a conquista de mais um objetivo.

Aos meus preciosos pais José Carlos e Iserilda, pelo amor, confiança, apoio e conselhos mais sábios nos momentos difíceis.

À Dr<sup>a</sup> Regina Bressan pela oportunidade e confiança durante esses 5 anos de convivência. Agradeço pelo incentivo e orientação na realização deste trabalho.

À Dr<sup>a</sup> Cynarha Cardoso por ter cedido a lectina avaliada neste trabalho.

À Larissa Oliveira e Taciana Higino, minhas co-orientadoras do coração, pela ajuda fundamental no desenvolvimento deste trabalho. Amigas, muito obrigada por acreditarem no meu potencial e sempre me motivarem, pelos conhecimentos compartilhados e, sobretudo, pela amizade.

Às amigas Amanda Aliança e Jana Sandes por todo companheirismo e motivação, principalmente nessa fase final. Passamos muitas manhãs, tardes e noites na sala “et al.” e juntas no “bloco da corda no pescoço” conseguimos juntar forças e apoiar umas as outras.

Aos amigos do laboratório de Biologia Celular de Patógenos: Ana Carla, Antonio Pereira, Carina Helena, Danilo Cavalcanti, Jana Sandes, Larissa Oliveira, Mary Angela, Rafaela Mororó e Taciana Higino, muito obrigada por tudo.

Às queridas que moram comigo e minhas irmãs de coração: Isabela Amariz, Samara Porfírio e Laylla Leal, agradeço pelos momentos de alegria, companheirismo, respeito, tolerância nos momentos difíceis e estressantes.

À minha grande amiga Aurenice Arruda, todo o meu carinho e consideração por estar sempre ao meu lado e torcendo por minhas vitórias. Sua parceria, amizade e afetuosa acolhida foram essenciais para mim.

À Larissa Alves, minha grande amiga de longas datas e literalmente minha psicóloga, mesmo distante sempre esteve presente em minha vida com seus conselhos, incentivos, força e alegria.

Aos demais amigos que conquistei em Recife e que me apoiaram muito fase de minha vida: Neyla Alves, Lívia Bandeira, Jessica Viana, Wynny Miranda, Eliane Rufino, Cromacio Figueiredo, Leonardo Leandro, Nayala Lima e Enso Silva. Obrigada pessoal por toda torcida, por compreenderem meus apereios pré-defesa e por todos os momentos de descontração.

À Viviane Carvalho e Cássia Docena pela assistência técnica e o Programa de Desenvolvimento Tecnológico em Insumos para Saúde (PDTIS) / FIOCRUZ pelo uso de suas instalações.

À Dr<sup>a</sup> Maria Carolina Brelaz pelo auxílio na aquisição dos dados de citometria de fluxo.

À Dr<sup>a</sup> Virginia Lorena pelo auxílio na aquisição dos dados das dosagens de citocinas.

À equipe do Biotério Experimental do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães.

A FACEPE pelo apoio financeiro.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a construção deste trabalho, que pela presença, pela palavra ou pelo sorriso, me proporcionaram coragem e determinação para seguir em busca de meus ideais.

*“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito.*

*Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes”.*

Marthin Luther King



RIBEIRO, Karla Raíza Cardoso. **Prospecção de novas drogas contra a leishmaniose cutânea: Avaliação da atividade biológica da lectina de *Oreochromis niloticus***. 2016. Dissertação (Mestrado em Biociências e Biotecnologia em Saúde) - Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2016.

## RESUMO

As leishmanioses constituem um grupo de doenças crônicas causadas por protozoários pertencentes ao gênero *Leishmania*. Tendo em vista a complexidade e ineficácia dos tratamentos atuais, o desenvolvimento de novas drogas menos tóxicas ainda é uma necessidade. Na prospecção de possíveis agentes quimioterápicos contra as leishmanioses, as lectinas apresentam-se como candidatos promissores por apresentarem um amplo espectro de atividades biológicas. No presente trabalho nós investigamos o potencial leishmanicida e imunomodulador da lectina Onil. Nossos resultados demonstraram que a Onil apresentou baixa toxicidade sobre células do exsudato peritoneal (CEP) de camundongos ( $CC_{50} = 317,5 \pm 0,6 \mu\text{g/mL}$ ), foi efetiva ao inibir o crescimento de formas promastigotas de *L. braziliensis* ( $IC_{50} = 150,58 \pm 0,78 \mu\text{g/mL}$ ), mostrou-se mais seletiva para o parasito do que para célula do hospedeiro ( $ISE = 2,1$ ). No entanto, não foi capaz de inibir a sobrevivência das amastigotas no interior das CEPs. A lectina Onil causou alterações ultraestruturais no flagelo, bem como mostrou um efeito sobre a divisão celular de formas promastigotas. A marcação das células tratadas com Anexina V (AV) e Iodeto de Propídio (IP) mostrou uma pequena subpopulação de células apresentava marcação para AV/IP compatíveis com o processo de morte celular por necrose/apoptose tardia. A marcação das células controles e tratadas com Onil com Rho 123 revelou que na grande maioria das células o potencial de membrana mitocondrial foi preservado. O tratamento com a lectina (75-300  $\mu\text{g/mL}$ ) não alterou significativamente a produção de NO e não induziu alterações na produção de citocinas em CEPs infectadas *L. braziliensis*. Por outro lado, uma intensa produção de citocinas associadas aos perfis Th1, Th2 e Th17 foi observada em CEPs não infectadas tratadas com 30  $\mu\text{g/mL}$  da Onil. Nossos dados apontam para uma possível utilização da Onil como agente adjuvante ou como carreadora de drogas para o tratamento da leishmaniose cutânea.

**Palavras-chaves:** *Leishmania*. Leishmaniose cutânea. Lectina. Quimioterapia. Biologia celular.

RIBEIRO, Karla Raíza Cardoso. **Prospecting for new drugs against cutaneous leishmaniasis: Evaluation of biological activity of lectin *Oreochromis niloticus***. 2016. Dissertation (Master in Biosciences and Biotechnology Health) - Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2016.

### ABSTRACT

Leishmaniasis comprises a group of disease caused by protozoa belonging to the *Leishmania* genus. Taking in account the complexity and inefficiency of current treatments against leishmaniasis, the development of new, less toxic drugs is still needed. In a search of potential chemotherapeutic agents against leishmaniasis, lectins presented as promising candidates because for presenting a broad spectrum of biological activities. In this regard, in the present study we investigated the leishmanicidal and immunomodulatory activities of Onil *in vitro*. Our results demonstrated that Onil presented low toxicity to mice peritoneal exudate cells (PEC) ( $CC_{50} = 317.5 \pm 0.6 \mu\text{g} / \text{mL}$ ), was effective to inhibit the growth of promastigotes of *Leishmania braziliensis* ( $IC_{50} = 150.58 \pm 0.78 \mu\text{g} / \text{mL}$ ) and was shown to be more selective for the parasite than to the host cell, with  $SeI=2.1$ . However, it was not able to inhibit the survival of amastigotes inside the PEC. The lectin Onil caused ultrastructural changes in the flagellum, and showed an effect on cell division of promastigotes. The labeling of treated and controls cells with Annexin V-FITC (AV) and propidium iodide (PI) showed a small subpopulation of cells presented AV/IP labeling compatible with the process of cell death by necrosis/ late apoptosis. The labelling of control and Onil treated cells with Rho-123 revealed that in most cells the mitochondrial membrane potential was preserved. Treatment with lectin (75-300  $\mu\text{g} / \text{ml}$ ) did not significantly alter the production of NO and did not induce changes in cytokine production in PEC infected with *L. braziliensis*. On the other hand, an intense cytokine production associated with Th1, Th2 and Th17 profiles was observed in uninfected PEC treated with 30  $\mu\text{g} / \text{ml}$  of Onil. Our data point to a possible use of Onil adjunctive agent or as a drug carrier for the treatment of cutaneous leishmaniasis

**Keywords:** *Leishmania*. Cutaneous leishmaniasis. Lectin. Chemotherapy. Cell biology.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	Distribuição mundial das leishmanioses	<b>20</b>
<b>Figura 2</b>	Distribuição de indivíduos infectados no mundo da leishmaniose cutânea	<b>21</b>
<b>Figura 3</b>	Densidade dos casos de LTA notificados no Brasil por município durante o período de 2005 a 2007, e casos em 2008	<b>22</b>
<b>Figura 4</b>	Manifestações clínicas da Leishmaniose Tegumentar Americana	<b>23</b>
<b>Figura 5</b>	Ciclo de vida da <i>Leishmania</i> sp.	<b>24</b>
<b>Figura 6</b>	Representação esquemática da secção longitudinal das formas evolutivas de <i>Leishmania</i> sp	<b>25</b>
<b>Figura 7</b>	Representação de possíveis ligantes de <i>Leishmania</i> e modulação TLR	<b>31</b>
<b>Figura 8</b>	Esquema da regulação orquestrada por macrófagos e células dendríticas contra <i>Leishmania</i>	<b>32</b>
<b>Figura 9</b>	Efeito citotóxico da lectina Onil sobre células do exsudato peritoneal	<b>50</b>
<b>Figura 10</b>	Curva de crescimento de formas promastigotas de <i>L. braziliensis</i> tratadas com Onil	<b>51</b>
<b>Figura 11</b>	Efeito da lectina Onil sobre formas amastigotas de <i>L. braziliensis</i>	<b>52</b>
<b>Figura 12</b>	Efeito da lectina Onil sobre formas amastigotas de <i>L. braziliensis</i> observado por microscópio óptico	<b>52</b>
<b>Figura 13</b>	Efeito da lectina Onil sobre a ultraestrutura de formas promastigotas de <i>L. braziliensis</i> observado pela microscopia eletrônica de transmissão	<b>54</b>
<b>Figura 14</b>	Efeito da lectina Onil sobre a ultraestrutura de formas promastigotas de <i>L. braziliensis</i> observado através da microscopia eletrônica de varredura	<b>57</b>
<b>Figura 15</b>	Análises por citometria de fluxo de formas promastigotas de <i>L. braziliensis</i> marcadas com AV/ IP.	<b>59</b>
<b>Figura 16</b>	Marcação de formas promastigotas de <i>L. braziliensis</i> com AV/IP	<b>60</b>
<b>Figura 17</b>	Análises por citometria de fluxo de formas promastigotas de <i>L. braziliensis</i> marcadas com Rh 123	<b>61</b>
<b>Figura 18</b>	Marcação de formas promastigotas de <i>L. braziliensis</i> com Rh 123	<b>63</b>
<b>Figura 19</b>	Produção de óxido nítrico por macrófagos infectados com <i>L. braziliensis</i>	<b>64</b>
<b>Figura 20</b>	Produção de citocinas por células do exsudato infectadas com <i>L. braziliensis</i> e tratadas com a lectina Onil	<b>65</b>
<b>Figura 21</b>	Produção de citocinas por células do exsudato tratadas com a lectina Onil	<b>67</b>

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** Atividade *in vitro* da lectina Onil contra as formas promastigotas de *L. braziliensis*, citotoxicidade em células de mamífero e índice de seletividade (ISe). **51**
- Tabela 2** Análise através da citometria de fluxo da lectina Onil sobre o potencial de membrana mitocondrial utilizando Rh 123. **61**

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Análise de variância
ArtinM	Lectina de <i>Artocarpus integrifolia</i>
ATPase	Adenosina trifosfatase
AV	Anexina V
CaCl <sub>2</sub>	Cloreto de cálcio
CC <sub>50</sub>	Concentração que causa a perda de viabilidade em 50% das células
CD	Célula dendrítica
CDR	Domínio de reconhecimento de carboidratos
CECAL	Centro de criação de animais de laboratório
CEUA	Comitê de ética em experimentação animal
CFL	Lectina de <i>Cratylia floribunda</i>
CPqAM	Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
Con A	Concanavalina A
ConBr	Lectina de <i>Canavalia brasiliensis</i>
CR	Receptor de complemento
DIC	Contraste interferencial – <i>Differential interference contrast</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
FAZ	Zona de adesão do flagelo - <i>Flagellar attachment zone</i>
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
FS	Fosfatidilserina
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrogênio
H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	Ácido fosfórico
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
IC <sub>50</sub>	Concentração capaz de inibir 50% do crescimento
IL-1 $\beta$	Interleucina 1 beta
IL-2	Interleucina 2
IL-4	Interleucina 4
IL-6	Interleucina 6

IL-10	Interleucina 10
IL-12	Interleucina 12
IL-13	Interleucina 13
IL-17	Interleucina 17
INF- $\gamma$	Interferon gama
iNOS	Óxido nítrico sintase induzível
IP	Iodeto de propídio
ISe	Índice de seletividade
IV	Índice de variação
kDa	Kilodalton
kDNA	DNA mitocondrial
KM+	Lectina de <i>Artocarpus integrifolia</i>
kV	Kilovolt
LBCP	Laboratório de Biologia Celular de Patógenos
LC	Leishmaniose cutânea
LCD	Leishmaniose cutânea difusa
LCL	Leishmaniose cutânea localizada
LMC	Leishmaniose mucocutânea
LTA	Leishmaniose tegumentar americana
LV	Leishmaniose visceral
MAPKs	Proteína kinases ativada por mitógeno - <i>Mitogen Activate Protein Kinases</i>
MBL	Lectina ligadora de manose
MC	Mediana de fluorescência dos parasitos sem tratamento
MET	Microscopia eletrônica de transmissão
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade
MnCl <sub>2</sub>	Cloreto de manganês
MT	Mediana da fluorescência dos parasitos tratados
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina
NK	Natural killer
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintase

Onil	Lectina de <i>Oreochromis niloticus</i>
PAA	Lectina de <i>Pisum arvense</i>
PAMP	Padrão molecular associado a patógenos - <i>Pathogen Associated Molecular Patterns</i>
PBS	Tampão fosfato salino
pH	Potencial hidrogeniônico
PHA	Fitohematoglutinina
PKDL	Leishmaniose dermal pós-kalazar
PRR	Receptor de reconhecimento padrão - <i>Pattern Recognition Receptor</i>
Rh 123	Rodamina 123
RMF	Receptor de manose-fucose
RNA	Ácido Ribonucleico
RPAG	Receptor para produtos avançados de glicosilação
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
ScLL	Lectina de látex de <i>Synadenium carinatum</i>
SFB	Soro Fetal Bovino
TBS	Solução salina tamponada com Tris
TGF- $\beta$	Fator de transformação de crescimento beta
TLR	Receptor tipo Toll - <i>Toll Like Receptor</i>
TNF- $\alpha$	Fator de Necrose Tumoral alfa
TNP	Hapteno trinitrofenil
Treg	T reguladora
UFRPE	Universidade Federal Rural de Pernambuco
V-H <sup>+</sup> -ATPase	Pirofosfatase vacuolar
WHO	Organização Mundial da Saúde - <i>World Health Organization</i>

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>17</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b>	<b>19</b>
<b>2.1</b>	<b>Leishmanioses</b>	<b>19</b>
<b>2.1.1</b>	<i>A leishmaniose cutânea</i>	<b>21</b>
<b>2.2</b>	<b>Ciclo biológico da <i>Leishmania</i> sp.</b>	<b>23</b>
<b>2.3</b>	<b>Biologia celular da <i>Leishmania</i> sp.</b>	<b>25</b>
<b>2.3.1</b>	<i>Citoesqueleto</i>	<b>25</b>
<b>2.3.2</b>	<i>Mitocôndria e Cinetoplasto</i>	<b>27</b>
<b>2.3.3</b>	<i>Acidocalcissomas</i>	<b>28</b>
<b>2.3.4</b>	<i>Glicossomos</i>	<b>28</b>
<b>2.3.5</b>	<i>Megassomos</i>	<b>29</b>
<b>2.4</b>	<b>A resposta imune das leishmanioses</b>	<b>29</b>
<b>2.5</b>	<b>Quimioterapia das leishmanioses</b>	<b>34</b>
<b>2.6</b>	<b>Lectinas</b>	<b>37</b>
<b>2.6.1</b>	<i>Lectina de <i>Oreochromis niloticus</i></i>	<b>39</b>
<b>3</b>	<b>JUSTIFICATIVA</b>	<b>41</b>
<b>4</b>	<b>PERGUNTA CONDUTORA</b>	<b>42</b>
<b>5</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>43</b>
<b>5.1</b>	<b>Objetivo geral</b>	<b>43</b>
<b>5.2</b>	<b>Objetivos específicos</b>	<b>43</b>
<b>6</b>	<b>METODOLOGIA</b>	<b>44</b>
<b>6.1</b>	<i>Lectina de <i>Oreochromis niloticus</i></i>	<b>44</b>
<b>6.2</b>	<b>Animais</b>	<b>44</b>
<b>6.3</b>	<b>Citotoxicidade</b>	<b>45</b>
<b>6.4</b>	<b>Cultivo dos Parasitos</b>	<b>45</b>
<b>6.5</b>	<b>Atividade leishmanicida</b>	<b>45</b>
<b>6.6</b>	<b>Estudo ultraestrutural</b>	<b>46</b>
<b>6.7</b>	<b>Análise do mecanismo de morte celular induzido por Onil</b>	<b>47</b>
<b>6.8</b>	<b>Efeito da lectina Onil sobre o potencial de membrana mitocondrial de <i>L. braziliensis</i></b>	<b>47</b>
<b>6.9</b>	<b>Produção de óxido nítrico</b>	<b>48</b>



6.10	Análise do perfil de citocinas em células de exsudato peritoneal infectadas por <i>Leishmania braziliensis</i>	48
6.11	Análise do perfil de citocinas em células do exsudato peritoneal	49
6.12	Análise estatística	49
7	<b>RESULTADOS</b>	<b>50</b>
7.1	Citotoxicidade	50
7.2	Efeito da lectina Onil sobre o crescimento e viabilidade de formas promastigotas de <i>L. braziliensis</i>	50
7.3	Efeito da lectina Onil sobre a viabilidade de formas amastigotas de <i>L. braziliensis</i>	51
7.4	Efeito da lectina Onil sobre a ultraestrutura de formas promastigotas <i>L. braziliensis</i>	53
7.5	Análise do mecanismo de morte celular induzido pela lectina Onil sobre formas promastigotas de <i>L. braziliensis</i>	58
7.6	Efeito da lectina Onil sobre o potencial de membrana mitocondrial de formas promastigotas de <i>L. braziliensis</i>	61
7.7	Efeito da lectina Onil sobre a produção de óxido nítrico por macrófagos infectados com <i>L. braziliensis</i>	64
7.8	Efeito da lectina Onil sobre a produção de citocinas por células do exsudato peritoneal infectadas com <i>L. braziliensis</i>	64
7.9	Efeito da lectina Onil sobre a produção de citocinas por células do exsudato peritoneal	66
8	<b>DISCUSSÃO</b>	<b>68</b>
9	<b>CONCLUSÕES</b>	<b>76</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>77</b>
	<b>ANEXO A – Certificado do CEUA / CPqAM</b>	<b>95</b>

## 1 INTRODUÇÃO

As leishmanioses são um grupo de doenças crônicas graves causadas por protozoários do gênero *Leishmania* e endêmicas em países tropicais e subtropicais (CARLSEN et al., 2015). Estas patologias são consideradas como altamente negligenciadas, por afetarem a parcela mais pobre da população e por essa razão, não despertarem o interesse da indústria farmacêutica para o desenvolvimento de novos quimioterápicos. (BALASEGARAM et al., 2008; EHRENBURG; AULT, 2005). As leishmanioses são caracterizadas por diferentes formas clínicas com manifestações tegumentar ou visceral, as quais dependem da espécie do parasito envolvido, da interação entre o parasito e a genética do hospedeiro, a presença de co-infecções e do estado imunológico do hospedeiro (MEDEIROS et al., 2011; MURRAY et al., 2005).

A leishmaniose tegumentar americana (LTA) é caracterizada por lesões únicas ou múltiplas na pele, que ocorrem no local da picada do inseto vetor infectado. Estas lesões podem ser caracterizadas por pequenas pápulas eritematosas até lesões granulomatosas (BAPTISTA; WAINRIGHT, 2011). No Brasil, a LTA apresenta ampla distribuição com registros de casos em todas as regiões do país acometendo pessoas de todas as faixas etárias e ambos os sexos, sendo esta endemicidade atribuída a determinantes históricos, sociais e ambientais (ANDRADE et al., 2012).

O tratamento da LTA é baseado em fármacos antimoniais pentavalentes, anfotericina B e pentamidinas. Entretanto, a utilização destes compostos é limitada, por apresentarem efeitos secundários graves associados um tratamento prolongado, o que leva muitas vezes a interrupção do tratamento e a evolução da doença com sérias complicações (IQBAL et al., 2016; SERENO; HOLZMULLER; LEMESRE, 2000). Neste contexto, a descoberta e o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos é uma prioridade, pois além da toxicidade causada pelos medicamentos, ainda há a falta de uma vacina profilática eficaz contra a doença (ARAUJO et al., 2014; MARR et al., 2012).

Na prospecção de possíveis agentes quimioterápicos contra diversas patologias, as lectinas se apresentam como candidatas promissoras. Lectinas são proteínas que têm a habilidade de se ligar especificamente a carboidratos e aglutinar células (PEUMANS; VAN DAMME, 1995). Essas moléculas tem atraído grande interesse devido apresentarem diversas atividades biológicas (SINGH; SARATHI, 2012). Desta maneira, as lectinas podem ser caracterizadas como moléculas valiosas para diversas aplicações biomédicas e médicas (SHARON, 2008; SHARON; LIS, 2004). As lectinas de peixes são essenciais para a resposta

imune inata desses animais frente a infecções, sendo capazes de reconhecer e aglutinar microorganismos patogênicos (EWART et al., 2001). O presente trabalho visou avaliar o potencial leishmanicida da lectina Onil obtida do soro de tilápia (*Oreochomis niloticus*), bem como seu papel na resposta imune *in vitro* de células de exsudato peritoneal frente à infecção por *Leishmania braziliensis*.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Leishmanioses

As leishmanioses constituem um grupo de doenças crônicas causadas por protozoários pertencentes à família Trypanosomatidae, gênero *Leishmania*, os quais são transmitidos por fêmeas de insetos flebotomíneos para hospedeiros vertebrados, incluindo o homem (DOSTÁLOVÁ; VOLF, 2012). Essas patologias representam um sério problema de saúde pública no mundo por serem altamente negligenciadas e pelos seus altos índices de morbidade e mortalidade (ALVAR et al., 2006; SALAM et al., 2014). Diversos fatores são determinantes para que haja a existência de surtos epidemiológicos dessas doenças, tais como os processos migratórios, processos de urbanizações rápidos e desordenados, e riscos individuais como a co-infecção com HIV (LIMA et al., 2014). Além disso, as condições socioeconômicas das populações afetadas e a falta de acesso aos cuidados básicos de saúde também contribuem para maior risco da doença (DAWIT et al., 2013; OKWOR; UZONNA, 2016).

As leishmanioses apresentam um amplo espectro de manifestações clínicas a depender de fatores como espécie infectante, a susceptibilidade e as condições imunológicas do hospedeiro (KATARA et al., 2013). Para efeito de diagnóstico clínico, essas manifestações podem ser divididas em três grupos principais: a) leishmaniose cutânea (LC): causada pelas espécies *L. major*, *L. tropica*, *L. aethiopica* (Velho Mundo), *L. infantum*, *L. chagasi* (Mediterrâneo e Mar Cáspio) e *L. amazonensis*, *L. mexicana*, *L. braziliensis*, *L. panamensis*, *L. peruviana*, e *L. guayanensis* (Novo Mundo); b) leishmaniose mucocutânea (LMC): causada pelas espécies *L. braziliensis*, *L. panamensis*, *L. guyanensis* (Novo Mundo), *L. infantum* e *L. donovani* (Velho Mundo); e c) leishmaniose visceral (LV), também conhecida como Kalazar, febre negra ou febre Dum-dum é causada por espécies do complexo *L. donovani*, o qual consiste principalmente das espécies *L. infantum*, *L. donovani* e *L. chagasi*. (ELMAHALLAWY et al., 2014).

Em escala global estima-se que cerca de 350 milhões de pessoas vivam em áreas caracterizadas como ativas para transmissão de leishmanioses, com 14 milhões de pessoas diretamente afetadas. Entre as doenças parasitárias a leishmaniose figura como a segunda causa de morte, superada apenas pela malária. Além do mais, ela é considerada a terceira causa de morbidade perdendo apenas da malária e da esquistossomose. Os casos de leishmaniose visceral são calculados entre 0.2-0.4 milhões de pessoas/ano, com mais de 90 % dos casos ocorrendo na Índia, Bangladesh, Sudão, Etiópia e Brasil, com mortalidade estimada

em 10-20%, especialmente nas áreas mais pobres. Já a leishmaniose cutânea, considerada pela Organização Mundial de Saúde como uma doença emergente categoria 1, ocorre principalmente no litoral da região Mediterrânea, nas Américas e leste da Ásia, com 75% dos casos concentrados no Brasil, Síria e Afeganistão, enquanto aproximadamente 35 mil casos da forma mucosa da leishmaniose ocorrem anualmente, principalmente no Brasil, Peru e Bolívia. **(Figura 1)** (SAVOIA, 2015).

**Figura 1** - Distribuição mundial das leishmanioses.



**Fonte:** Adaptado de Rapsodi Against *Leishmania* (2010).

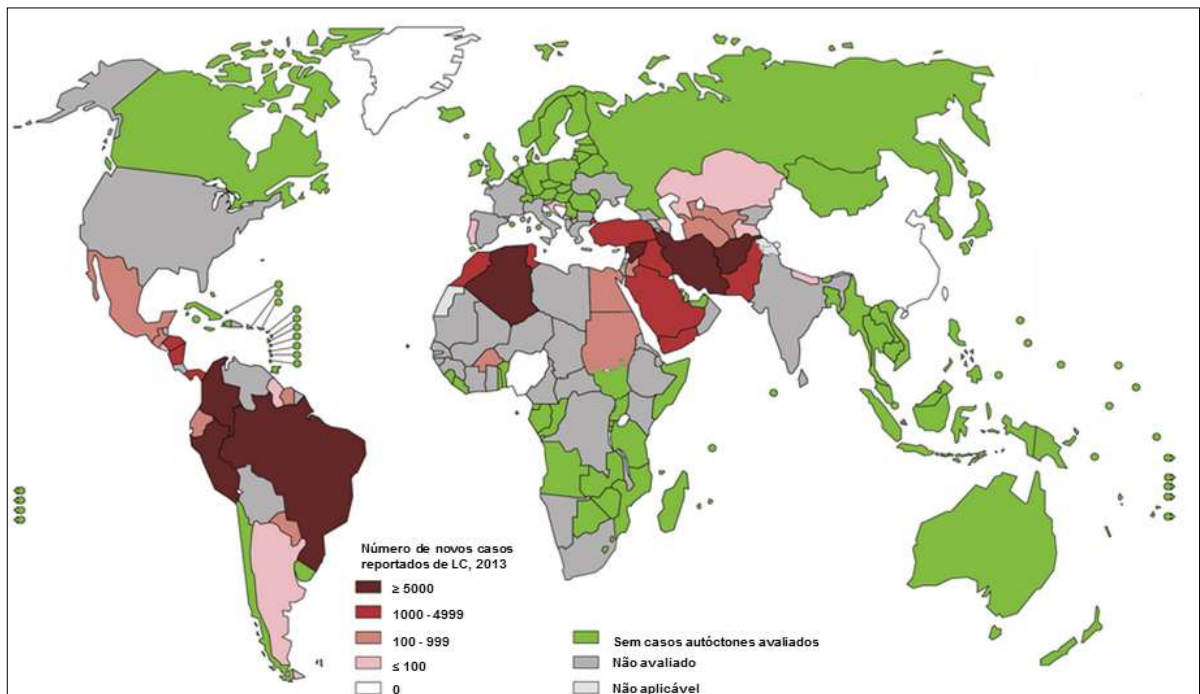
As leishmanioses são transmitidas principalmente por insetos flebotomíneos hematófagos pertencentes à ordem *Diptera*, família *Psychodidae* e subfamília *Phlebotominae*. Cerca de trinta espécies de flebotomíneos pertencentes aos gêneros *Phlebotomus* no Velho Mundo e *Lutzomyia* no Novo Mundo estão implicados como vetores das leishmanioses e podem ser encontrados em áreas de clima tropical, semitropical e temperado (MORAIS-BRAGA et al., 2013; SANTOS et al., 2013; SINGH et al., 2014; SOBRAL-SOUZA et al., 2014). No Brasil, estes insetos são popularmente conhecidos como mosquito palha, tatuquira ou birigui (GOTO; LINDOSO, 2010). Cães e alguns mamíferos silvestres, como roedores, marsupiais, edentados e primatas, são potenciais reservatórios dos parasitos (CARVALHO, 2010). Além da forma vetorial, outras formas menos frequentes de transmissão têm sido responsáveis pela disseminação da doença, tais como transfusão de sangue, acidentes

ocupacionais, infecções venéreas e a via congênita (ELMAHALLAWY et al., 2014; OWENS et al., 2001).

### 2.1.1 A leishmaniose cutânea

A leishmaniose cutânea, objeto de nosso estudo, é a forma clínica mais prevalente de leishmaniose em todo o mundo (DE VRIES et al., 2015), sendo endêmica em 82 países da Europa, África, Ásia e Américas, com 90% de todos os casos ocorrendo apenas em 7 países: Afeganistão, Algeria, Brasil, Irã, Peru, Arábia Saudita e Síria (ALVAR et al., 2012; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2012) (**Figura 2**). Nos últimos anos, ocorreram casos em áreas não endêmicas como Austrália, América do Norte e Norte da Europa devido o aumento de viagens internacionais e imigração para áreas endêmicas (BART et al., 2013; KHAIRNAR et al., 2013; ROBERTS et al., 2015). Estima-se que 0,7 milhões a 1,3 milhões de novos casos ocorrem anualmente em todo o mundo (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2015).

**Figura 2** - Distribuição de indivíduos infectados no mundo da leishmaniose cutânea.



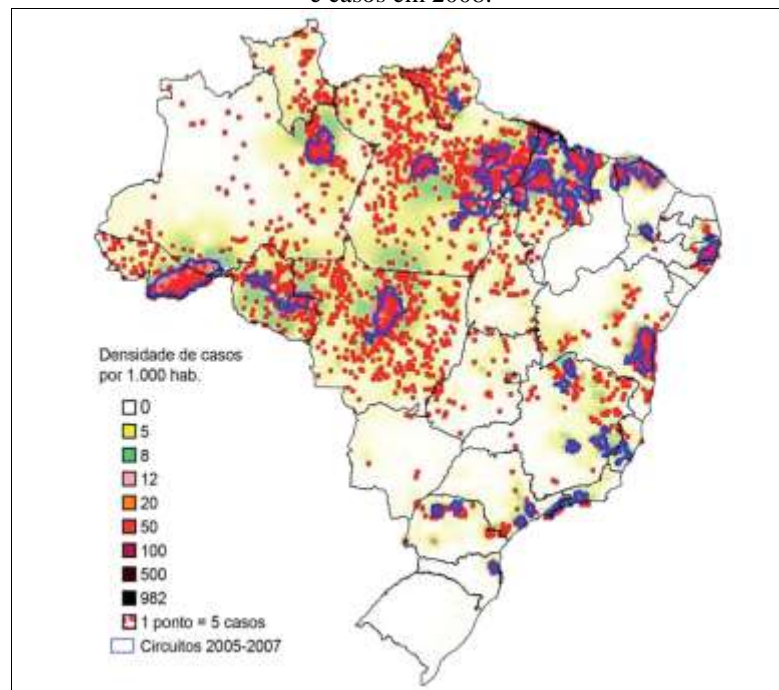
Fonte: Adaptado de Organização Mundial da Saúde (2015).

As espécies responsáveis pela leishmaniose cutânea podem ser divididas em: a) espécies do Velho Mundo: *L. (L.) major*, *L. infantum* e *L. (L.) tropica*, prevalentes na região do Mediterrâneo, Oriente Médio, extremo sul da África e no subcontinente indiano e b) do

Novo Mundo: *L. (L.) amazonensis*, *L. (L.) chagasi*, *L. mexicana* L, *L. (V.) naiffi*, *L. (V.) braziliensis* e *L. (V.) guyanensis*, endêmicas nas Américas Central e do Sul. Enquanto as espécies do Velho Mundo causam úlceras autolimitadas na maioria dos casos, as espécies do Novo Mundo causam uma síndrome denominada de Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) que compreende a leishmaniose cutânea e uma variedade de outras manifestações mais graves da doença (DE VRIES et al., 2015).

A Leishmaniose Tegumentar Americana no Brasil tem sido associada a sete espécies de *Leishmania* pertencentes a dois subgêneros: (1) *Viannia* que incluem as espécies *L. braziliensis*, *L. guyanensis*, *L. lainsoni*, *L. naiffi*, *L. shawi* e *L. lindenberg*, (2) *Leishmania* representado pela espécie *L. amazonensis* (DE BRITO et al., 2012). A LTA encontra-se distribuída nas regiões Norte, Nordeste e Sudeste (AMEEN, 2010) (**Figura 3**). O Estado de Pernambuco está entre os 15 estados com maior incidência da doença com 2.292 casos registrados (BRASIL, 2009; HORTA, 2012). A *L. braziliensis* é o principal agente etiológico da LTA em Pernambuco, assim como na maior parte das zonas endêmicas de diferentes regiões do país (MARTINS et al., 2010).

**Figura 3** – Densidade dos casos de LTA notificados no Brasil por município durante o período de 2005 a 2007, e casos em 2008.



Fonte: Teixeira et al. (2013).

A LTA é subdividida em três grupos principais com diferentes fenótipos clínicos: a) leishmaniose cutânea localizada (LCL), leishmaniose cutânea difusa (LCD) e a leishmaniose mucocutânea (LMC). Uma quarta forma clínica é derivada das sequelas da leishmaniose

visceral, conhecida como leishmaniose dermal pós-kalazar (PKDL) (**Figura 4**) (NYLEN; EIDSMO, 2012). A LCL é caracterizada por úlceras crônicas na pele, que contêm numerosos parasitos e possuem potencial de evoluir para lesões secundárias em mucosas (BRASIL, 2010). A LCD é marcada pela presença de lesões nodulares distribuídas por todo o corpo. Enquanto a LCM é caracterizada pelo acometimento da mucosa do nariz e boca (KOBETS et al., 2012). Embora as características clínicas da LTA e a gravidade da doença possam variar (REVEIZ et al., 2013), uma lesão clássica começa como uma pápula ou nódulo no local da inoculação do parasito (KUMAR; ENGWERDA, 2014; REITHINGER et al., 2007). Essas lesões evoluem lentamente e assumem um aspecto característico de úlcera com contornos circulares, bordas infiltradas, indolor e fundo com granulações grosseiras (COSTA et al., 2009).

**Figura 4** – Manifestações clínicas da Leishmaniose Tegumentar Americana.



**Fonte:** McGwire; Satoskar (2014); Murback et al. (2011); Zerpa; Convit (2009).

**Legenda:** (A) Forma cutânea localizada; (B) Forma cutânea difusa; (C) Forma mucocutânea; (D) Forma dermal pós-kalazar.

## 2.2 Ciclo biológico da *Leishmania* sp.

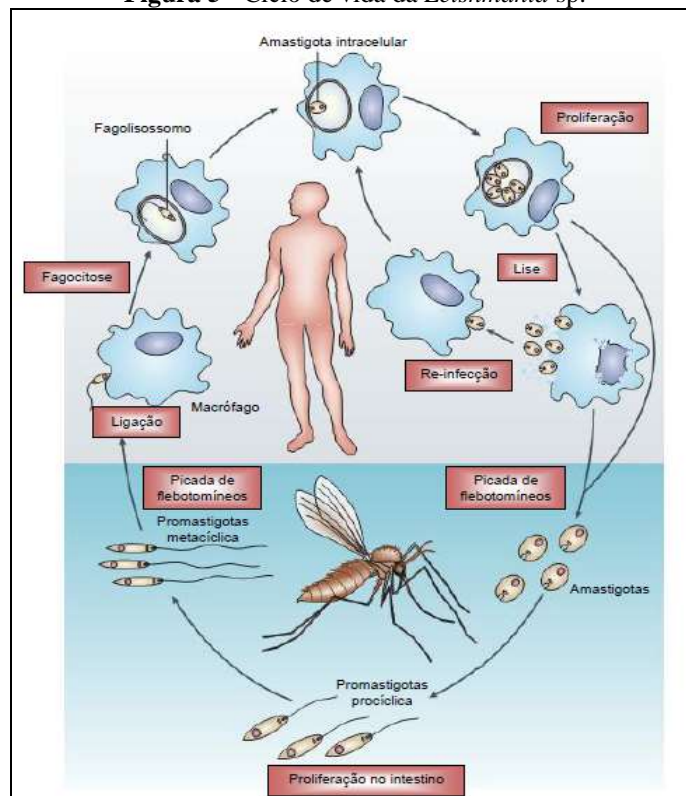
O ciclo de vida de *Leishmania* sp. envolve diferentes estágios evolutivos que se alternam entre hospedeiros vertebrados (mamíferos) e invertebrados (inseto vetor) (DOUGALL et al., 2011). A fim de se adaptar aos diferentes microambientes dos seus hospedeiros, garantindo sua sobrevivência e proliferação, o parasito sofre transformações estruturais e metabólicas assumindo duas formas evolutivas morfológicamente distintas: promastigotas e amastigotas (ALMEIDA-BIZZO et al., 2014). As promastigotas são formas extracelulares, flageladas, multiplicativas encontradas no trato digestivo do inseto vetor (KUMAR; ENGWERDA, 2014; SACKS; KAMHAWI, 2001). Estas formas apresentam



forma fusiforme, flagelo livre e medem aproximadamente 15  $\mu\text{m}$  de comprimento. O cinetoplasto (região onde se concentra o DNA mitocondrial) é anterior ao núcleo e próximo à bolsa flagelar. As amastigotas, por sua vez, são formas intracelulares de células do sistema fagocítico mononuclear, infectando principalmente macrófagos. São arredondadas, medem cerca de 5  $\mu\text{m}$  de diâmetro, possuem flagelo restrito à bolsa flagelar e cinetoplasto em forma de bastão anterior ao núcleo (SANTOS; YOSHIOKA; MIYAGUI, 2008).

O ciclo do parasito se inicia quando a fêmea do inseto vetor ingere formas amastigotas durante o repasto sanguíneo no hospedeiro vertebrado (**Figura 5**). No trato digestivo do flebotomíneo, os parasitos sofrem sucessivas modificações, até que se diferenciam em promastigotas. Estas migram para as glândulas salivares e passam para formas promastigotas metacíclicas, tornando-se novamente infectante ao hospedeiro vertebrado. Quando o inseto realiza um novo repasto, regurgita formas promastigotas metacíclicas juntamente com a saliva. Uma vez dentro do hospedeiro vertebrado, as formas metacíclicas são fagocitadas por células do sistema fagocítico mononuclear, principalmente pelos macrófagos, transformam-se em formas amastigotas e multiplicam-se por divisão binária no interior dos fagolisosomos até provocarem o rompimento da célula. Os parasitos livres são então fagocitados por novos macrófagos ou então são ingeridos pelo inseto, reiniciando o ciclo (KAYE; SCOTT, 2011).

**Figura 5** - Ciclo de vida da *Leishmania* sp.

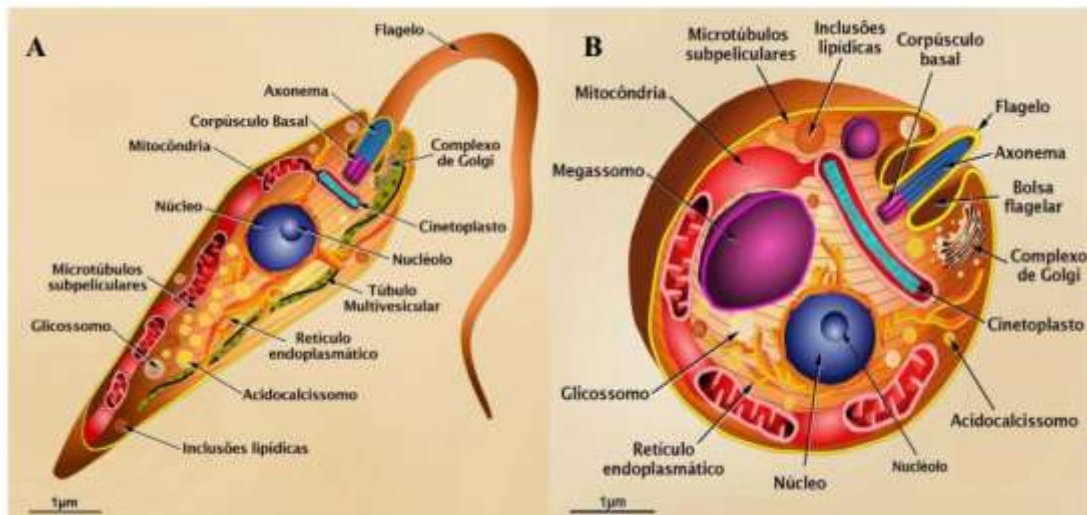


**Fonte:** Adaptado de Chappuis (2007).

### 2.3 Biologia celular da *Leishmania* sp.

*Leishmania* sp., assim como os demais tripanossomatídeos, possui organelas comuns à outras células eucarióticas, como também apresenta estruturas citoplasmáticas e organelas que lhes são peculiares, tais como cinetoplasto, acidocalcissomas, glicossomos e megassomos, além de um citoesqueleto especializado (**Figura 6**) (DE SOUZA, 2008). Estas estruturas possuem características fisiológicas únicas nestes parasitos, as quais podem ser potenciais alvos de novas drogas terapêuticas (FIGALGO; GILLE, 2011).

**Figura 6-** Representação esquemática da secção longitudinal das formas evolutivas de *Leishmania* sp.



**Fonte:** Teixeira et al. (2013).

**Legenda:** A – Forma promastigota; B- Forma amastigota.

#### 2.3.1 Citoesqueleto

Um dos aspectos mais interessantes da biologia celular de tripanossomatídeos é a sua capacidade de sobreviver e interagir com diferentes ambientes durante o seu ciclo de vida. Para melhor se adaptar a estes ambientes, os tripanossomatídeos flagelados possuem um citoesqueleto altamente dinâmico e plástico responsável pela manutenção e modulação da forma celular durante as diferentes etapas do ciclo de vida, além de conferir motilidade a estes microrganismos. Esses protozoários possuem duas estruturas básicas do citoesqueleto: Os microtúbulos subpelviculares que servem como um citoesqueleto de membrana e o aparato do axonema responsável pela motilidade e que participa da interação parasito-hospedeiro (DE SOUZA, 2002a).

Os microtúbulos subpeliculares são os principais componentes do citoesqueleto dos tripanossomatídeos, encontrados abaixo da membrana plasmática e dispostos por todo o corpo do parasito (DE SOUZA; ATTIAS, RODRÍGUEZ, 2009). Os microtúbulos subpeliculares são formados por dímeros de  $\alpha$ - e  $\beta$ - tubulina, e estão conectados entre si, com a membrana plasmática e ao retículo endoplasmático por pequenos filamentos de natureza desconhecida (CASANOVA et al., 2015). Embora a associação entre elementos do citoesqueleto e a membrana celular seja comum em todas as células eucarióticas, em nenhuma outra célula essa interação é tão forte quanto nos tripanossomatídeos, fazendo com que estes parasitos se tornem bastante resistentes ao estresse mecânico ou químico (LIBUSOVÁ et al., 2004; MELOS; ECHEVARRIA, 2012). Os microtúbulos subpeliculares possuem aspectos estruturais e bioquímicos únicos e se comportam de forma diferente dos encontrados nas células de animais superiores. Eles são resistentes à ação de detergentes, altas temperaturas e drogas direcionadas para microtúbulos que são efetivas em células eucarióticas (VEDRENNE et al., 2002).

Todos os tripanossomatídeos possuem um flagelo que emerge de uma invaginação da membrana plasmática denominada bolsa flagelar. Esta região é altamente especializada no transporte celular através de endocitose e exocitose. O flagelo dos tripanossomatídeos possui uma estrutura básica similar a outros flagelos, mostrando um padrão de nove pares de microtúbulos periféricos e um par de microtúbulo central, todos imersos em uma matriz citoplasmática revestida por uma membrana celular em toda a sua extensão (DE SOUZA; DE CARVALHO; BARRIAS, 2010). O flagelo está associado a um corpúsculo basal que, por sua vez, está anexado à membrana mitocondrial externa e ao cinetoplasto. Ao sair da bolsa flagelar torna-se livre na região anterior (TEIXEIRA et al., 2011). De acordo com estágio evolutivo do parasito, o comprimento do flagelo varia. Formas promastigotas apresentam um longo flagelo que é essencial em processos como mobilidade celular e adesão do parasito à superfície da célula dos hospedeiros (DA SILVA et al., 2013), enquanto as formas amastigotas possuem um curto flagelo, restrito à bolsa flagelar, provavelmente capaz de desempenhar papéis importantes na organização celular (GLUENZ; GINDER, MCKEAN, 2010). Em acréscimo, o flagelo também possui um complexo de filamentos altamente organizado conhecido com estrutura paraflagelar, formada por uma rede de filamentos do citoesqueleto que se dispõem lateralmente ao longo do axonema. Um grande número de proteínas tem sido identificado na estrutura paraflagelar. Entre essas proteínas, a PFR1 e a PFR2 são consideradas as principais. A natureza destes componentes fornecem evidências das funções metabólicas, de regulação e de sinalização em tripanossomatídeos. Alguns mutantes

mostram uma motilidade reduzida e padrão de batimento flagelar alterado, ou mesmo uma imobilização completa (PORTMAN; GULL, 2010). Uma rede de filamentos, denominada de FAZ (Flagellar Attachment Zone), pode ser encontrada na região de adesão do flagelo ao corpo celular. Nesta região é possível encontrar um quarteto especializado de microtúbulos, além de inúmeras proteínas altamente imunogênicas. Perturbações na FAZ leva a drásticas alterações morfológicas e podem levar a morte celular (SUNTER et al., 2015).

### ***2.3.2 Mitocôndria e Cinetoplasto***

A característica morfológica mais marcante nos tripanossomatídeos quando comparado às células de eucariotos superiores é a existência de uma única e ramificada mitocôndria que se estende por todo corpo celular do parasito (MENNA-BARRETO; DE CASTRO, 2014). Como nas demais células eucariotas, a mitocôndria de tripanossomatídeos é altamente dinâmica variando em volume e forma de acordo com as condições ambientais. Em uma região específica desta organela, logo abaixo do corpúsculo basal e próximo ao flagelo, está presente uma estrutura complexa formada de DNA, chamada de cinetoplasto (DE SOUZA, 2002b, 2008). O DNA mitocondrial que forma o cinetoplasto é conhecido como kDNA e representa 30% do material genético total da célula. Dois tipos de kDNA podem ser encontrados, os minicírculos e os maxicírculos. Os maxicírculos são estruturalmente e funcionalmente homólogos ao DNA mitocondrial de eucariotos superiores e responsáveis por codificar RNAs ribossomais para inúmeras proteínas, muitas delas com funções vitais à célula, como as envolvidas com os mecanismos de transdução de energia (CAVALCANTI et al., 2009). Os minicírculos correspondem a aproximadamente 90% do total da massa de DNA mitocondrial e sua principal função é codificar pequenos RNAs guias que controlam a especificidade de edição do RNA nesta organela (SCHNEIDER, 2001). A morfologia da crista e da matriz mitocondrial em tripanossomatídeos é bastante variável e o volume da organela depende, entre outras coisas, da disponibilidade de nutrientes, alcançando até 12% do volume do parasito (MENNA-BARRETO; DE CASTRO, 2014).

Alterações morfológicas e fisiológicas observadas através de microscopia eletrônica de transmissão e citometria, em resposta ao tratamento com diferentes compostos naturais e sintéticos, fazem desta organela um alvo potencial para drogas. No entanto, chama-se a atenção de que as alterações observadas podem ser devido a efeitos indiretos que causam a perda da viabilidade celular mais do que provenientes da ação direta sobre esta organela (MENNA-BARRETO; DE CASTRO, 2014).

### 2.3.3 Acidocalcissomas

Os acidocalcissomas são organelas citoplasmáticas presentes em todos os tripanossomatídeos, incluindo os pertencentes ao gênero *Leishmania*. Estas organelas foram primariamente denominadas de acidomas devido ao seu conteúdo ácido e sua sensibilidade ao ionóforo nigericina, sendo considerados como organelas relacionadas aos lisossomos. Posteriormente foi demonstrada a presença da atividade  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase, sendo então designados de acidocalcissomas para indicar que são organelas ácidas que contém cálcio. Os acidocalcissomas são normalmente esféricos com aproximadamente 600 nm de diâmetro, estão distribuídos por todo celular (DOCAMPO et al., 2005; MORENO; DOCAMPO, 2009), e apresentam material eletrondenso no seu interior (DOCAMPO; MORENO, 2008). Estudos por análise de raio X demonstraram a presença de altas concentração de fósforo e cálcio (GOMES, 2007), bem como quantidades consideráveis de magnésio, sódio, potássio e zinco (DOCAMPO; ULRICH; MORENO, 2010). Uma  $\text{V-H}^{+}$ -ATPase vacuolar semelhante as encontradas em bactérias foi identificada na membrana dos acidocalcissomas de vários tripanossomatídeos. Nos últimos anos, estas organelas tem ganhado destaque com os métodos de isolamento, sendo identificada também em células de mamíferos. Parece que a função principal dos acidocalcissomas é o armazenamento de cátions e fósforo, reduzindo o efeito osmótico de grandes quantidades destes compostos no citosol. O papel dos acidocalcissomas na osmoregulação das células fica evidente com a identificação de uma aquoporina nestas organelas (DO CAMPO et al., 2013).

### 2.3.4 Glicossomos

Os glicossomos, organelas relacionadas à peroxissomos, são essenciais na sobrevivência dos tripanossomatídeos por apresentarem um grande número de enzimas importantes da via glicolítica destes protozoários, razão pela qual foram denominadas glicossomos (SCHROEDERELY, 2011). Estas estruturas possuem formato esférico e matriz homogênea, medindo aproximadamente 0.7  $\mu\text{m}$  de diâmetro e são distribuídas por todo o corpo do parasito de maneira aleatória (OPPERDOES; COOMBS, 2007). Os glicossomos compartimentalizam enzimas da  $\beta$ -oxidação de ácidos graxos, metabolismo de peróxido, síntese de éter-lipídios, esteróis, síntese de aminoácidos, pirimidinas e enzimas da via de recuperação de purinas (MICHELS et al., 2000, 2006). No entanto, estas estruturas não possuem um genoma e todas as suas proteínas são codificadas por genes nucleares, transcritas

em ribossomos livres e encaminhadas para dentro da organela (MERCALDI, 2010). O conteúdo enzimático dos glicossomos, bem como o seu número podem variar consideravelmente durante o ciclo de vida da maioria dos tripanossomatídeos, indicando que os diferentes estádios apresentam requerimentos metabólicos e energéticos distintos. Acredita-se que a autofagia seja o principal processo de degradação e reciclagem dos glicossomos senescentes (MICHELS et al., 2006). A compartimentalização das enzimas glicolíticas no interior dos glicossomos conferem aos parasitos uma vantagem evolutiva sobre as demais células eucarióticas, evitando o acúmulo de compostos potencialmente nocivos durante a glicólise (HAANSTRA et al., 2008).

### **2.3.5 Megassomos**

Os megassomos são organelas responsáveis pela atividade lisossomal de formas amastigotas de *Leishmania*, tendo sido primeiramente descritos em leishmanias pertencentes ao complexo mexicana. São estruturas que contêm fosfatase ácida e cisteína-proteinase, capazes de estocar todas as macromoléculas ingeridas pelo parasito durante o processo de endocitose (DE SOUZA, 2002a; DE SOUZA; ATTÍAS; RODRIGUEZ, 2009). Os megassomos são organelas eletrondensas delimitadas por uma matriz heterogênea, que pode apresentar perfis de membrana, além de inclusões densas e vesículas (UEDA-NAKAMURA; ATTÍAS; DE SOUZA, 2001). Análise ultraestrutural de rotina revelou variações no número e no tamanho dos megassomos de acordo com as espécies de *L. amazonensis*, *L. mexicana* e *L. pifanoi*, bem como entre as amastigotas de uma mesma espécie obtidas de cultivo axênico e àquelas derivadas de animais infectados, sugerindo que estas organelas possam estar relacionadas à virulência e infectividade das diferentes espécies de *Leishmania* (UEDA-NAKAMURA; ATTÍAS; DE SOUZA, 2007).

## **2.4 A resposta imune das leishmanioses**

Os aspectos clínicos e a cura das leishmanioses estão relacionados com o desenvolvimento de uma resposta imune eficaz e equilibrada no hospedeiro. O parasito intracelular deve ser contido, enquanto a resposta imunológica deve ser estritamente controlada a fim de evitar maiores danos aos tecidos (LAKHAL-NAOUAR et al., 2015). Células efetoras tais como linfócitos T, macrófagos, células dendríticas, células natural killer

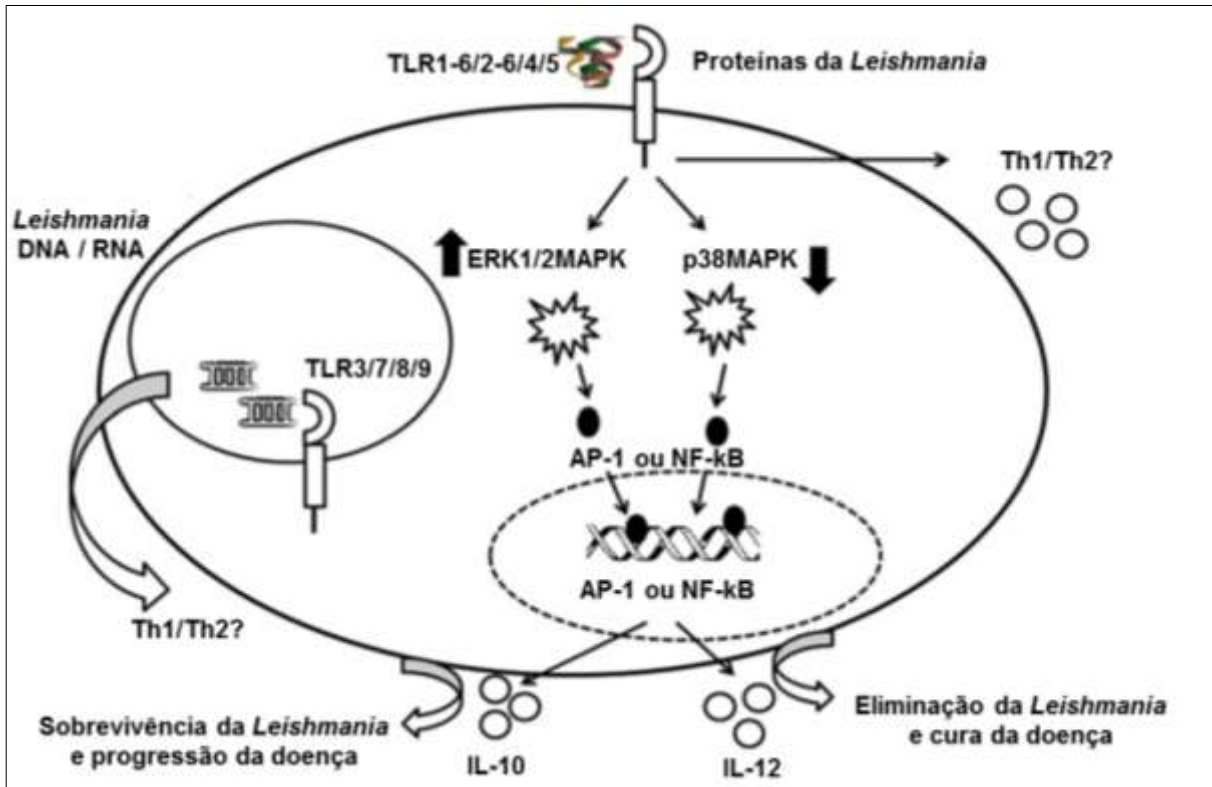
e moléculas efetoras como espécies reativas de nitrogênio e oxigênio, e citocinas estão envolvidas na resposta imune contra o parasito (LIESE; SCHLEICHER; BOGDAN, 2008).

Após a infecção natural, formas promastigotas metacíclicas de *Leishmania* ganham acesso ao hospedeiro onde encontram neutrófilos, macrófagos, células dendríticas e monócitos, as quais servem como células alvos da infecção e são os principais responsáveis pela resposta imune inata contra o parasito. A maneira como a *Leishmania* interage com essas células é determinante para evolução da doença. Tem ficado cada vez mais evidente que todos estes tipos celulares podem ser infectados e que a proporção de cada tipo infectado, o microambiente presente no sítio da infecção, o estado de ativação destas células e a intensidade da infecção podem levar ou ao sucesso da infecção ou a morte do parasito antes que a doença se agrave. Tem sido demonstrado que a infecção de neutrófilos com *Leishmania*, por exemplo, pode levar a morte desta célula por apoptose, a qual é capaz de inibir a ativação de macrófagos e induzir a sua fagocitose, fazendo com que o neutrófilo albergue os parasitos, funcionando como uma espécie de “cavalo de Tróia”, sendo esta uma forma silenciosa de manter a infecção ativa (CECÍLIO et al., 2014; JOHN; HUNTER, 2008).

A interação entre um grande número de receptores de superfície expressos nas células imunes efetoras disparam a atividade fagocítica, permitindo que a *Leishmania* ganhe acesso ao ambiente intracelular. Estes receptores compreendem receptores de manose-fucose (RMF), receptor para fibronectina, receptor para produtos avançados de glicosilação (RPAG), entre outros. Além do mais, receptores de reconhecimento padrão (*Pattern Recognition Receptor*, PRRs), tanto de superfície quanto no interior de compartimentos celulares, como os fagossomos, desempenham um papel importante no reconhecimento de patógenos. Esta família de receptores compreende uma vasta gama de moléculas, incluindo os receptores tipos Toll (*Toll Like Receptors*, TLR) que reconhecem padrões moleculares associados a patógenos distintos (*Pathogen Associated Molecular Patterns*, PAMPs) (KAWAI; AKIRA, 2010). Os TLRs são reguladores essenciais da resposta imune contra vários patógenos e envolvidos em uma variedade de fenômenos incluindo fagocitose, maturação, atividade antimicrobiana do fagossoma, via indução da enzima iNOS e a produção de respostas pró- e anti-inflamatórias responsáveis por primar a resposta imune adaptativa (TUON et al., 2008). A sinalização dos TLRs ocorre através de uma via que pode ser dependente ou independente do fator de diferenciação (MyD88), que leva a ativação de duas proteínas kinases ativadas por mitógeno (*Mitogen Activate Protein Kinases*, MAPKs), ERK1/2 ou p38-MAPK, de ação antagônica que por sua vez, ativam a transcrição de citocinas. Enquanto a regulação positiva de ERK1/2

resulta na supressão de iNOS por produzir IL-10, a regulação positiva de p38-MAPK tem efeito contrário por produzir  $\text{INF-}\gamma$  (**Figura 7**) (SINGH; SRIVASTAVA; SINGH, 2012).

**Figura 7**- Representação de possíveis ligantes de *Leishmania* e modulação TLR.



**Fonte:** Adaptado de Singh, Srivastava e Singh (2012).

**Legenda:** Ativação dos TLRs pela *Leishmania* regula negativamente p38MAPK e a produção de IL-12 (citocina do perfil Th1). Por outro lado, a *Leishmania* regula ERK1/2 MAPK e IL-10 (citocina do perfil Th2). DNA e RNA provenientes das *Leishmanias* podem também funcionar como ligante para vários TLRs citoplasmáticos.

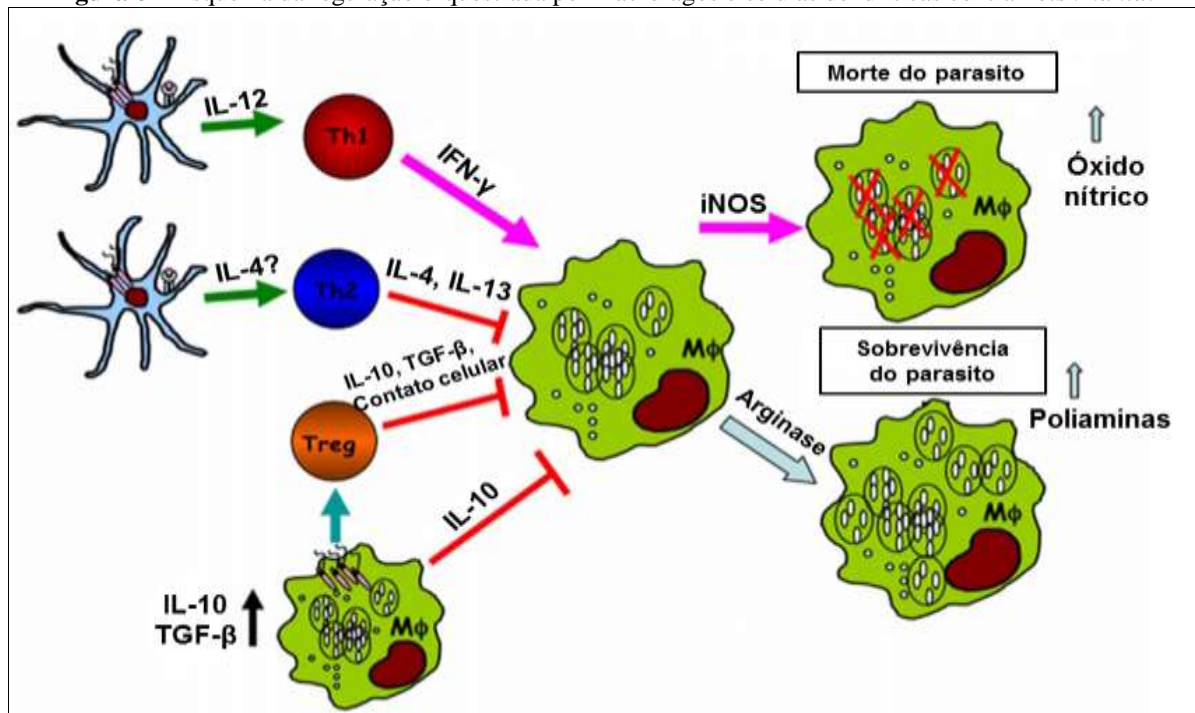
Os macrófagos são as principais células efetoras responsáveis pela destruição dos parasitos. Estas células podem ser ativadas por diferentes sinais, os quais são cruciais para eliminação do parasito. Esta ativação pode ser dividida em duas vias: a via clássica e a via alternativa. A via clássica é mediada por produtos das células Th1 e NK (natural killer), em particular o  $\text{INF-}\gamma$ , os quais estimulam os macrófagos a produzir iNOS (óxido nítrico sintase induzível), também conhecida como NOS2 (óxido nítrico sintase 2), uma enzima que catalisa a L-arginina a gerar óxido nítrico (NO), que é tóxico para o parasito. Por outro lado, a ativação alternativa é induzida pelas citocinas de perfil Th2, tais como IL-4 e IL-13, envolvidas na biossíntese de poliaminas e que favorecem a sobrevivência do parasito nos macrófagos (**Figura 8**) (LIU; UZONNA, 2012).

Células dendríticas (CD) também participam ativamente tanto da resposta imune inata quanto da resposta imune adaptativa contra *Leishmania*. Estas células são derivadas da medula óssea e possuem uma distribuição heterogênea e ampla no corpo. Como uma célula



apresentadora de antígeno, este tipo celular possui um papel central na orquestração da resposta imune, produzindo principalmente IL-12, citocina criticamente importante para polarização da resposta de células Th1 e subsequente produção de IFN- $\gamma$ . A apresentação de antígenos pelas células MHC classe I (células T CD8<sup>+</sup>) e MHC II para células CD4<sup>+</sup>, células NK invariáveis, entre outras, culmina no desenvolvimento de uma resposta adaptativa com a expansão de células T efetoras e intensa produção de citocinas (FEIJÓ et al., 2016; SOONG, 2008).

**Figura 8** – Esquema da regulação orquestrada por macrófagos e células dendríticas contra *Leishmania*.



**Fonte:** Adaptado de Liu e Uzonna (2012).

**Legenda:** Logo após a infecção, tanto macrófagos e células dendríticas fagocitam a *Leishmania* levando a diferentes consequências funcionais. CD produzem IL-12, a qual é crítica para a produção IFN- $\gamma$  pelas células Th1 CD4<sup>+</sup>. O IFN- $\gamma$  age nos macrófagos infectados levando a ativação clássica e a produção de NO. Por outro lado, a produção de IL-4 por outros tipos celulares (incluindo queratinócitos e células T V $\beta$ 4) estimulam a resposta Th2. A produção de IL-4 e IL-13 leva ao aumento da atividade da arginase e a ativação alternativa dos macrófagos favorecendo a sobrevivência do parasito. As células T reguladoras (Treg) e macrófagos infectados também produzem IL-10 e TGF- $\beta$ , que desativam as células infectadas levando a inibição da morte celular do parasito.

Para sobreviver aos mecanismos de defesa de macrófagos ativados, a *Leishmania* deve modular a ativação destas células em favor de sua sobrevivência e proliferação. O balanço entre fatores do parasito e do hospedeiro é determinante para o destino final do parasito dentro dos macrófagos infectados. Vários estudos têm apontado que diferenças no background genético do hospedeiro são importantes para definir se um determinado indivíduo vai conseguir montar uma resposta efetiva ou não contra o parasito (GOLLOB; VIANA;

DUTRA, 2014). No entanto, para todas as formas clínicas da doença, as células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> são requeridas para resposta imune contra *Leishmania*. As células CD4<sup>+</sup> são responsáveis principalmente por induzir ativação dos fagócitos, para que estes eliminem ou controlem a multiplicação dos parasitos, enquanto as células T CD8<sup>+</sup> também possuem um papel protetor e são requeridos para eliminação dos parasitos e a geração de uma resposta de memória imunológica, sendo também denominadas de células T citotóxicas (MUTISO et al., 2013). A resposta imune adaptativa é grandemente dirigida pelas células T CD4<sup>+</sup> Th1, as quais produzem interleucinas IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-12 envolvidas no controle da infecção e eliminação dos patógenos, juntamente com citocinas reguladoras tais como a IL-10. O IFN- $\gamma$  juntamente com TNF- $\alpha$  promovem a síntese de óxido nítrico (NO) através da catálise do óxido nítrico sintase induzível (iNOS) (CUMMINGS; TULADHAR; SATOSKAR, 2010). Assim, a resposta Th1 CD4<sup>+</sup> tem sido correlacionada tanto com a resistência ao parasito, como também pela exarcebação da resposta inflamatória local (MUTISO et al., 2013). Se por um lado o perfil Th1 está fortemente relacionado ao controle do parasito e ao desenvolvimento de uma resposta inflamatória eficiente, indivíduos onde a infecção por *Leishmania* consegue se estabelecer e progredir tendem a apresentar uma resposta imune do tipo T CD4<sup>+</sup> Th2. Neste tipo de resposta ocorre uma predominância da produção de IL-4, TGF- $\beta$  e IL-10. Em modelos experimentais, a IL-4 tem mostrado regular negativamente a expressão de interleucinas do perfil Th1, além de bloquear a produção de NO por macrófagos ativado por IFN- $\gamma$ , favorece a multiplicação parasitaria e falha ao controlar a infecção (SOUZA et al., 2013).

Este paradigma Th1 e Th2 foi estabelecido em modelos murinos infectados com *L. major* que contribuíram para elucidar a resistência ou susceptibilidade à infecção por *Leishmania* gerada por células do hospedeiro (MOSMANN et al., 1986). Entretanto, outros subtipos de células T CD4<sup>+</sup>, como as células Th17 e células T reguladoras (Treg) também desempenham papéis importantes na manutenção do equilíbrio imunológico durante a infecção com *Leishmania* (NYLÉN; GAUTAM, 2010). A função da IL-17 ainda não foi totalmente elucidada nesta doença. Sabe-se que esta citocina é ativada pelo sinergismo das citocinas IL-6 e TGF- $\beta$ , e que seu surgimento pode estar associado com a ineficácia da resposta do tipo Th1 contra os patógenos, sendo necessária uma resposta imunológica exacerbada para eliminá-los (BETTELLI et al., 2008; CASTRO, 2013). Em pacientes com leishmaniose tegumentar causada por *L. braziliensis*, esta citocina pode estar diretamente correlacionada com a TNF- $\alpha$  e a danos nos tecidos do hospedeiro (BACELLAR et al., 2009). Em contrapartida, foi demonstrado por Novoa et al. (2011) que o controle da infecção por

*L.braziliensis* pode ser mediada por resposta imune inata com participação de IL-17. Já as células T reguladoras (Treg) demonstram ser importantes mediadoras da susceptibilidade a infecção por *Leishmania* sp., exercendo principalmente atividade supressora através da produção de IL-10 e TGF- $\beta$  (COSTA et al., 2015).

Tanto em modelos experimentais com animais quanto em seres humanos, o desenvolvimento de uma resposta Th1 é crucial para a eliminação ou controle dos parasitos. Pacientes com LTA infectados por *L. braziliensis* podem desenvolver uma resposta imune frente aos antígenos do parasito e produzir altos níveis de IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ . No entanto, apesar da presença desta resposta imune protetora, o sistema imune destes pacientes não consegue controlar a infecção e o desenvolvimento de lesões (COSTA et al., 2013). A gravidade das infecções causadas *L. braziliensis* tem sido associada à produção de várias citocinas inflamatórias, tais como IL-17, IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  (PASSOS et al., 2015).

Desde o rompimento de barreiras epiteliais, a *Leishmania* possui estratégias para combater os mecanismos empregados pelas células do sistema imunológico do hospedeiro. Os parasitos são capazes de inibir sinais oriundos de antígenos presentes na superfície celular dos fagócitos com a finalidade de atrasar ou dificultar a resposta de células T (RODRIGUES et al., 2014). Além disto, os parasitos possuem outros mecanismos de sobrevivência intracelular tais como: ligação aos macrófagos através da glicoproteína gp63 sem induzir um “burst” oxidativo na célula do hospedeiro; inativação por fosforilação de componentes do sistema complemento (C3, C5 e C9); utilização da superóxido dismutase para quelar reativos intermediários de oxigênio, supressão da iNOS e de citocinas de perfil Th1, além da indução de uma resposta do perfil Th2 exacerbada (SINGH; KUMAR; SINGH, 2012).

## **2.5 Quimioterapia das leishmanioses**

O tratamento das leishmanioses é restrito a poucas drogas, nenhuma delas considerada ideal devido sua alta toxicidade, longo período de tratamento e severos efeitos colaterais, os quais levam frequentemente ao abandono do tratamento. Além do mais, o aparecimento de fenômenos de resistência das diferentes espécies do parasito tem se tornado um desafio a mais ao sucesso do tratamento (COSTA et al., 2014; HALDAR et al., 2011; SOTO et al., 2008).

Desde a década de 40, o tratamento das leishmanioses é feito através de drogas antimoniais pentavalentes, como o estibogluconato de sódio (Pentostan) e o antimoniato de N-methyl glucamine (Glucantime), sendo utilizados como drogas de primeira escolha (OLIVEIRA et al., 2011). Os antimoniais apresentam de moderados a graves efeitos

colaterais, tais como pancreatite, náuseas, vômitos, mialgias, alterações de enzimas hepáticas, toxicidade renal e cardíaca, podendo ocorrer morte súbita (BRASIL, 2007), devido retenção do antimônio nos tecidos (AFONSO- CARDOSO et al., 2011). Desta forma, faz-se necessário a hospitalização dos pacientes e acompanhamento intensivo. Estes efeitos adversos e o longo tempo de tratamento são os principais responsáveis pela não continuidade da terapêutica favorecendo o surgimento de cepas resistentes (IQBAL et al., 2016). Os antimoniais são indicados para o tratamento de todas as formas de LTA, sendo necessário maior cuidado nos casos de leishmaniose mucocutânea devido a respostas mais lentas e maior possibilidade de recidivas (MARINHO JUNIOR, 2010). O mecanismo de ação pelo qual os antimoniais pentavalentes agem sobre as formas evolutivas de *Leishmania* ainda não foi totalmente elucidado. Os compostos antimoniais se ligam a grupos sulfidríla das proteínas e algumas evidências sugerem que antes dessas ligações, a forma pentavalente é reduzida a trivalente (SCHEIBEL, 2005). Os antimoniais trivalentes podem afetar a estrutura celular, a função e a produção de energia através da inibição da fosfofrutoquinase, uma enzima que limita a velocidade da glicólise (FRÉZARD et al., 2001; TESSAROLO et al., 2015). No caso do tratamento da leishmaniose cutânea demonstrou-se que os antimoniais administrados via parenteral são eficientes contra essa forma clínica causada pelas espécies *L. braziliensis*, *L. major* e *L. tropica*. No entanto, tal administração não foi eficaz contra leishmaniose mucocutânea causada por *L. braziliensis* (BAILEY; LOCKWOOD, 2007).

Apesar de sua alta toxicidade, a anfotericina B tem sido recomendada como uma segunda linha de escolha em casos de contraindicação, intolerância ou resistência aos antimoniais. Sua aplicação endovenosa causa rigor, tremores e febre associados à miocardite e nefrotoxicidade. Na tentativa de tentar reduzir os efeitos colaterais desta droga e melhorar a sua farmacocinética e biodisponibilidade, novas formulações da droga tem sido desenvolvidas (complexo lipídico, forma coloidal e lipossomal) (ROY et al., 2012). Embora sejam menos tóxicas, o uso destas formulações apresenta desvantagens como o seu alto custo e a dificuldade de se manter a droga estável em altas temperaturas. Resistência a estes fármacos também tem sido relatada (MONTEIRO, 2009). A anfotericina B é um antibiótico que interage com o ergosterol, esteróide da membrana das leishmanias, causando aumento de permeabilidade e morte do parasito (BRASIL, 2007).

A pentamidina, outra droga frequentemente utilizada como segunda escolha de tratamento também apresenta consideráveis efeitos adversos, tais como diabetes mellitus, uma severa hipoglicemia, hipotensão, miocardite e nefrotoxicidade e pode levar a morte. Seu uso tende a se tornar cada vez menos frequente devido o aparecimento de casos resistentes, sua

alta toxicidade e baixa eficácia. Atualmente a pentamidina é principalmente recomendada em associação em protocolos terapêuticos combinados. No parasito, a pentamidina se liga ao DNA do cinetoplasto inibindo sua replicação, causa efeitos sobre o potencial de membrana mitocondrial, além de inibir a biossíntese de poliaminas (CROFT et al., 2006).

A mitelfosina, originalmente utilizada para tratar neoplasias, tem sido uma droga alternativa no tratamento da leishmaniose e possui uma grande vantagem de ser uma formulação de uso oral. Entretanto seu uso é limitado em mulheres grávidas, visto que possui efeito teratogênico. Além do mais, esta droga afeta o trato gastrointestinal e promove aumento dos níveis de transaminases e creatina fosfoquinase (BERMAN, 2008; SOTO et al., 2004). Outros compostos, incluído rifampicina, tamoxifen, doxycyclina, monomicina, trimethoprim e nifurtimox, também tem sido testados, porém com baixa eficácia contra *Leishmania*. A Paromomicina, um antibiótico aminoglicosídeo que afeta a mitocôndria de *Leishmania*, tem se mostrando eficaz no tratamento tópico das LCs. No entanto o seu uso parenteral causa sérios efeitos colaterais (ALAVI-NAINI; FAZAELI; O'DEMPSEY, 2012; SALAH et al., 2013).

A seletividade das diferentes drogas usadas no tratamento das leishmanioses é bastante variável entre as espécies do parasito. Por exemplo, enquanto os antimoniais podem agir em diferentes espécies de *Leishmania*, a pentamidina possui atividade limitada contra espécies específicas. Por outro lado, a paromicina é bem aceita para uso tópico contra *L. braziliensis*, mas sua eficácia em outras espécies é questionável. Devido ao fato da grande parte dos fármacos contra leishmaniose serem específicos para determinadas espécies e não para outras, a busca de fármacos e protocolos de tratamento com larga abrangência tem sido de grande importância na quimioterapia das leishmanioses (DE MENEZES et al., 2015).

Um outro problema enfrentado no tratamento das leishmanioses é a falta de especificidade das drogas, as quais são também tóxicas para células do hospedeiro. Visando suplantar esse desafio, o uso de sistemas controlados de entrega e liberação de fármacos tem sido apontado como uma alternativa bastante promissora. A vantagem destes sistemas é aumentar a eficácia e segurança das drogas que são adsorvidas ou encapsuladas em carreadores, reduzindo a dose e os efeitos adversos das formulações convencionais. Um exemplo disso é a formulação lipossomal da Anfotericina B, Ambisome™, que tem sido utilizada com melhores resultados em relação ao estibogluconato de sódio. Essa formulação também tem sido indicada nos casos de co-infecção com HIV. Mais recentemente, nanotubos de carbono funcionalizados tem sido utilizados como carreadores de drogas contra a leishmaniose (SAUDAGAR; DUBEY, 2014). Tem sido demonstrado, por exemplo, que

anfotericina B associada à nanotubos de carbono funcionalizados possui uma eficácia superior que a formulação convencional no tratamento de hamster infectados com *Leishmania* (PRAJAPATI et al., 2011, 2012).

O desenvolvimento de novas ferramentas de biologia molecular, bem como das técnicas de alta performance tem sido de grande valia para identificação de novos alvos quimioterápicos tanto nas células do hospedeiro quanto nos parasitos. Além do mais, estudo da interação parasito-célula hospedeira pode facilitar o design de novas drogas mais eficazes contra as infecções causadas por *Leishmania*. De fato, o transcriptoma e a proteômica tem sido importantes instrumentos para o estudo em larga escala da interação *Leishmania*-célula hospedeira que podem levar a descoberta em alvos específicos e vias metabólicas no parasito, não encontradas nas células do hospedeiro vertebrado (DE MENEZES et al., 2015).

Produtos naturais, principalmente os provenientes de plantas tem sido reconhecidos como uma rica fonte de compostos biologicamente ativos contra leishmaniose. Diversos extratos de plantas, óleos essenciais e compostos isolados, a maior parte provenientes do metabolismo secundários destes organismos, tais como compostos fenólicos, esteróides, quinonas, lignanas, terpenos e alcaloides, têm sido testados com resultados promissores, contra diferentes espécies de *Leishmania*. Muitos destes compostos além de agirem diretamente sobre os parasitos também possuem importante atividade imunomoduladora. Desta forma, a procura por moléculas com um largo espectro de atividade leishmanicida e efeito sobre a resposta imune contra o parasito pode permitir a identificação de novas entidades terapêuticas úteis no controle da doença. Muitos estudos neste sentido tem focado sua atenção para os efeitos de óleos essenciais e extratos de planta na produção de interleucinas pro- e anti-inflamatórias. Estes trabalhos sugerem que a indução ou inibição da produção de certas citocinas é um fator crítico capaz de levar a destruição do parasito sem produzir um dano excessivo aos tecidos (RODRIGUES et al., 2015).

## **2.6 Lectinas**

Lectinas são proteínas, de origem não imunológica, que se ligam reversivelmente a carboidratos ou a glicoconjugados de maneira específica (DA SILVA; CORREIA, 2014). Essas proteínas são capazes de reconhecer glicocódigos presentes nos mais diversos tipos celulares, e conseqüentemente estabelecer ligações por intermédio de pontes de hidrogênio e interações hidrofóbicas com carboidratos (GONDIM, 2014) sem ocasionar modificações estruturais nos mesmos (RUDIGER; GABIUS, 2001).

Essas biomoléculas podem ser classificadas em cinco grupos de acordo com o monossacarídeo pelo qual possuem maior afinidade: manose, galactose/N-acetilgalactosamina, N-acetilglucosamina, frutose e ácido N-acetilneuramínico. Lectinas que apresentam especificidade por galactose, frequentemente interagem com N-acetilgalactosamina, e por esta razão são classificadas dentro de um mesmo grupo de especificidade (SHARON; LIS, 2004).

As lectinas estão amplamente distribuídas na natureza, podendo ser encontradas em microorganismos (TSIVILEVA et al., 2008), plantas (SOUZA et al., 2011) e animais (SPRONG et al., 2009). A abundância e o caráter diversificado dessas proteínas têm sido de grande valia no desenvolvimento de sistemas controlados de liberação de fármacos, kits diagnósticos e agentes quimioterápicos (FUJII et al., 2012). As lectinas regulam vários eventos fisiológicos e patológicos importantes, tais como a interação parasito-célula, comunicação célula-célula, reconhecimento e comunicação celular (SITOHY et al., 2007).

Lectinas de animais desempenham papel importante no reconhecimento de polissacarídeos na superfície celular de microorganismos potencialmente patogênicos, além de possuírem uma variedade de funções imunológicas (DRICKAMER; TAYLOR, 1993). Gabius (1997) classificou as lectinas de animais de acordo com suas similaridades estruturais e propriedades de ligação a carboidratos como: tipo P (específica para manose-6-fosfato); tipo I (possuem CDR semelhante a imunoglobulinas); tipo S ou galectinas (dependente de tiol); pentranxinas (possuem arranjo pentamérico de subunidades) e tipo C (dependente de cálcio).

Diversos estudos têm relatado amplo espectro de atividades biológicas que as lectinas possuem, como por exemplo, antimicrobiana (CARVALHO et al., 2012), inseticida (PAIVA et al., 2011), antitumoral (NUNES et al., 2012), anti-inflamatória (MELO et al., 2011), antioxidante (JIMENEZ et al., 2014), antinociceptiva (FIGUEIREDO et al., 2009), antifúngica (AMANO et al., 2012; RUAS et al., 2012) e antiviral (ZUO et al., 2012). Além desses efeitos, funções fisiológicas independentes da sua capacidade de ligar carboidratos, tais como ativação da produção de espécies reativas de oxigênio e modulação do sistema imune tem sido avaliadas (MACIEL et al., 2004; SINGH BAINS et al., 2005).

A Concanavalina A (Con A), lectina extraída de sementes de *Canavalia ensiformis*, exerce atividades anti-hepatoma e anti-proliferativa em células de melanomas A375, por causar alterações no potencial de membrana mitocondrial e conseqüentemente induzir morte celular por apoptose (LEI; CHANG, 2007; LIU et al., 2009). Estudo realizado por Fernandes et al. (2010) demonstrou a eficácia da lectina Cramoll 1,4 em testes *in vitro* contra formas epimastigotas de *T. cruzi*. Vários estudos têm demonstrado que a resposta do hospedeiro

contra a tripanossomatídeos pode ser modulada por vários fatores incluindo células do sistema imunológico e produção de citocinas (BIRNBAUM; CRAFT, 2011). Neste sentido, foi demonstrado por Afonso-Cardoso et al. (2007) que a lectina de látex de *Synadenium carinatum* (ScLL) causa efeito protetor em camundongos Balb/c infectados com *Leishmania amazonensis*. Enquanto, lectinas como a ConBr (*Canavalia braziliensis*) e KM+ (*Artocarpus integrifolia*) estimulam a produção IFN- $\gamma$  e IL-12, respectivamente, promovendo a produção de citocinas padrão Th1 em camundongos Balb/c infectados e resultando em uma ação protetora contra *L. amazonensis* e *L. major* (PANUNTO-CASTELO et al., 2001).

### 2.6.1 Lectina de *Oreochromis niloticus*

A tilápia (*Oreochromis sp.*) é um peixe teleósteo, comercialmente cultivado em água doce em todo mundo graças à sua rápida taxa de crescimento em águas quentes, sua tolerância a condições adversas, relativo baixo custo de produção, qualidade da carne e sabor, conteúdo proteico alto, além de uma alta aceitabilidade por parte dos consumidores (TELLEZ-BAÑUELOS et al., 2009). Entre as espécies de tilápia cultivadas mundialmente, a tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) é uma das espécies mais significativas para estudos biológicos, representando um bom modelo para estudos de imunotoxicidade (GIRÓN-PÉREZ et al., 2009), além de apresentar um sistema imunológico robusto capaz de tolerar estresses bióticos e abióticos (GIRÓN-PÉREZ et al., 2007).

Os peixes teleósteos como *Oreochromis niloticus* apresentam um repertório de lectinas diversificado, incluindo não só os representantes das famílias descritos em animais, mas também membros de lectinas encontrados pioneiramente em peixes, tais como as lectinas ligantes a L-ramnose, tipo X (específica para alfa-galactosídeos) e fucolectinas (ligantes a L-fucose e D-galactose) (VASTA et al., 2011).

Lectinas de peixe apresentam importantes atividades biológicas tais como aglutinação, fertilização e mediação, por ativação do sistema complemento, da morte de agentes patogênicos (RUSSELL; LUMSDEN, 2005). Essas moléculas desempenham um papel ativo na imunidade inata desses vertebrados (ARGAYOSA; LEE, 2009) e podem ser facilmente isoladas a partir do soro, plasma, ovos e até de tecidos que compreendem esses animais (DUTTA et al., 2005). A Onil é uma lectina purificada do soro do peixe tilápia (*Oreochromis niloticus*), caracterizada como glicoproteína ácida com banda única de polipeptídeo de 17 kDa, tipo C e que possui sítio de reconhecimento a carboidratos com especificidade para resíduos de metil- $\alpha$ -D-manopiranosídeo e D-manose (SILVA et al., 2012).



Nosso grupo tem investigado o papel imunomodulador da Onil, e resultados preliminares mostraram que esta lectina estimula preferencialmente a resposta celular Th1, em função da produção de altos níveis de IFN- $\gamma$ , em esplenócitos de camundongos Balb/c (SILVA et al., 2012). Além do mais, a lectina Onil apresenta potencial mitogênico com alta produção de IL-2 e IL-6 a níveis equivalentes da lectina Con A, um mitógeno já bem estabelecido (BECKERT; SHARKEY; 1970). Em estudo similar com esplenócitos murino e exsudato peritoneal, uma lectina do ovário do peixe carpa capim (*Ctenopharyngodon idellus*) induziu resposta mitogênica com produção de IL-2 e IFN- $\gamma$  (LAM; NG, 2002).

Apesar do potencial da Onil como molécula moduladora da resposta imune, o estudo sobre o papel da lectina Onil como agente leishmanicida e como imunomodulador na resposta contra *Leishmania* sp., ainda permanece a ser explorado.

### 3 JUSTIFICATIVA

As leishmanioses representam um sério problema de saúde pública no Brasil, com perda significativa da capacidade produtiva e da qualidade de vida dos indivíduos afetados. Os tratamentos atualmente disponíveis são baseados em drogas tóxicas e de custo elevado, levando muitas vezes a desistência do tratamento. Sabe-se que a cura ou estabelecimento da infecção por *Leishmania* sp. é fortemente dependente da resposta imune do hospedeiro. Considerando a importância da prospecção de fármacos menos tóxicos, associados a um baixo custo e que possam ser utilizados no tratamento da leishmaniose cutânea, pouco incentivo ainda é dado aos grupos que trabalham neste tema, principalmente na região Nordeste do Brasil. Paradoxalmente, os estados desta região são os que mais sofrem com esta endemia. As lectinas, por sua vez, são proteínas que têm se mostrado como valiosas ferramentas de interesse terapêutico para o tratamento da leishmaniose cutânea, uma vez que apresentam um amplo espectro de atividades biológicas já comprovadas. A importância da utilização destas biomoléculas se deve à facilidade de isolamento, abundância com que são encontradas na natureza, além da habilidade de se ligarem a carboidratos de forma específica e reversível. A lectina isolada do soro do peixe *Oreochromis niloticus* tem se mostrado como potente molécula imunomoduladora sobre esplenócitos de camundongos. Tendo em vista que até o presente momento, nenhum trabalho foi desenvolvido com lectinas de peixe como potentes moléculas imunomoduladoras especificamente na infecção contra leishmaniose, além de não existirem agentes quimioterápicos leishmanicidas que atuem com maior seletividade aos parasitos sem causar danos ao hospedeiro do hospedeiro, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a atividade citotóxica, leishmanicida e imunomoduladora da lectina de *Oreochromis niloticus*.

#### **4 PERGUNTA CONDUTORA**

A lectina do soro de *Oreochromis niloticus* (Onil) é um potencial candidato à terapia contra a leishmaniose cutânea?

## 5 OBJETIVOS

### 5.1 Objetivo geral

Avaliar o papel citotóxico, leishmanicida e imunomodulador da lectina Onil.

### 5.2 Objetivos específicos

- a) Avaliar o potencial citotóxico da lectina Onil sobre células do exsudato peritoneal de camundongos;
- b) Avaliar o efeito da lectina Onil sobre o crescimento e viabilidade de formas promastigotas e amastigotas de *Leishmania braziliensis*;
- c) Identificar possíveis alvos intracelulares da Onil em *L. braziliensis*;
- d) Avaliar o papel imunomodulador da lectina Onil sobre células do exsudato peritoneal de camundongos infectadas ou não com *L. braziliensis*.

## 6 METODOLOGIA

### 6.1 Lectina de *Oreochromis niloticus*

A lectina de *Oreochromis niloticus* (Onil) foi purificada no Laboratório de Biologia Celular de Patógenos – LBCP/ CPqAM – FIOCRUZ e gentilmente cedida pela Dr<sup>a</sup> Cynarha Daysy Cardoso da Silva. Segundo protocolo estabelecido por Silva et al. (2012), tilápias (*Oreochromis niloticus*) foram obtidas da Estação de Aqüicultura Continental Johei Koike, Departamento de Pesca e Aqüicultura (UFRPE). O sangue foi coletado, com o menor risco para a saúde dos peixes, que foram em seguida devolvidos ao ambiente. O sangue ficou em repouso por duas horas para obtenção do soro e as proteínas presentes foram precipitadas utilizando sulfato de amônio (20-40% w/v). A fração com maior atividade hemaglutinante foi dialisada contra solução salina tamponada com Tris (TBS, 20 mM Tris-HCl, 150 mM de NaCl, 20 mM CaCl<sub>2</sub>, no pH 8,0). A fração contendo 0,5 mg de proteína foi submetida a cromatografia de afinidade em matriz Concanavalina A-Sepharose 4B (Sigma Co., USA) em coluna de gel previamente equilibrada com 10 mM de CaCl<sub>2</sub> e 10 mM de MnCl<sub>2</sub>, em solução salina tamponada com Tris (TBS), a pH 8,0. A eluição da lectina foi realizada com o carboidrato metil- $\alpha$ -D-mannopyranoside (200 mM), em seguida dialisada. Para avaliar a atividade hemaglutinante da Onil, eritrócitos de coelho foram tratados com glutaraldeído de acordo com Correia e Coelho (1995). Solução estoque da lectina foi preparada em TBS em uma concentração 50 mg/mL. As soluções foram guardadas a -20°C, protegidas da luz. A solução estoque foi diluída em diferentes concentrações para os experimentos.

### 6.2 Animais

Camundongos Balb/c foram adquiridos do Centro de Criação de Animais de Laboratório (CECAL)-FIOCRUZ e usados para obtenção de células do exsudato peritoneal. Todos os experimentos envolvendo animais foram realizados de acordo com os padrões éticos da Fundação Oswaldo Cruz e aprovados pelo comitê de ética em experimentação animal (CEUA- FIOCRUZ n° 77/2014 – ANEXO A).

### 6.3 Citotoxicidade

As análises de citotoxicidade foram realizadas através da técnica do MTT, descrita por Mosmann (1983). Para tal, células do exsudato peritoneal ( $1 \times 10^5$  céls /mL ) foram tratadas com diferentes concentrações da lectina Onil por 48 horas. Em seguida foram lavadas em meio RPMI e incubadas a uma concentração de 5 mg/ mL de MTT (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) diluído no próprio meio, por 3 horas a 37 °C. Posteriormente, as células foram solubilizadas em DMSO (100 µl/poço) e a absorbância foi medida a 490 nm em espectrofotômetro Benchmark plus (Bio-Rad®, Califórnia, EUA). A concentração 50% citotóxica (CC<sub>50</sub>) para as células de mamíferos foi determinada. O índice de seletividade (ISe) da lectina foi calculado através da razão entre os valores da CC<sub>50</sub> e da IC<sub>50</sub> (concentração capaz de inibir em 50 % a proliferação dos parasitos). Cada ensaio foi feito em quadruplicata em dois experimentos independentes.

### 6.4 Cultivo dos Parasitos

Formas promastigotas de *Leishmania braziliensis* (MHOM/BR/1975/M2903) foram mantidas em meio Schneider (Gibco, USA) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) a 26 °C foram utilizadas na fase log de crescimento (3 dias). Formas amastigotas foram obtidas a partir de macrófagos peritoneais de camundongo Balb/c. Macrófagos peritoneais ( $1 \times 10^5$  céls / mL) foram aderidos em placa de 24 poços e cultivados em meio RPMI suplementado com 10% de SFB por 24 horas a 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub>. Por fim, a cultura de macrófagos foi infectada com formas promastigotas de *L. braziliensis* na proporção de 1:10 por 14 horas a 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub>, e utilizadas nos experimentos conforme descrito abaixo.

### 6.5 Atividade leishmanicida

Culturas de promastigotas ( $2 \times 10^6$  parasitos/mL) foram incubadas na ausência ou presença de diferentes concentrações (200 – 12,5 µg /mL) da lectina a 26 °C. O crescimento celular foi avaliado diariamente por contagem direta em câmara de Neubauer e a IC<sub>50</sub> foi determinada após 48 horas de tratamento. Para cada experimento, foram feitos três ensaios independentes em triplicata. Para os ensaios com as formas amastigotas, macrófagos infectados aderidos em lamínulas foram tratados com as concentrações da lectina

correspondentes a  $\frac{1}{2}$  IC<sub>50</sub>, 1x IC<sub>50</sub> e 2xIC<sub>50</sub> determinadas nos ensaios com formas promastigotas. Após 24 horas de tratamento, as células foram fixadas em solução de Bouin (5 minutos) e coradas em solução de Giemsa (15 minutos). O efeito de Onil sobre as formas amastigotas foi avaliado a partir do índice de sobrevivência de amastigotas no interior dos macrófagos. Este índice foi determinado multiplicando-se o número de amastigotas pelo número de células infectadas. Macrófagos infectados e não tratados foram utilizados como controle. Foram realizados 2 ensaios independentes em triplicata.

## 6.6 Estudo ultraestrutural

Para identificação de possíveis alvos intracelulares de ação leishmanicida da lectina Onil, utilizamos formas promastigotas de *L.braziliensis*. Parasitos controles e tratados com 1x IC<sub>50</sub> e 2x IC<sub>50</sub> da lectina foram lavados e fixados em glutaraldeído a 2,5% e paraformaldeído a 4%, em tampão cacodilato de sódio 0,1 M (pH 7,2), durante 2 horas a temperatura ambiente. Posteriormente, as células foram lavadas no mesmo tampão e pós-fixadas em solução de tetróxido de ósmio a 1%, ferricianeto de potássio a 0,8% e cloreto de cálcio a 5 mM em tampão cacodilato 0,1 M por 1 hora. Após a fixação, os parasitos foram desidratados em concentrações crescentes de acetona (50% -100%), infiltrados e incluídos em resina epóxi (Fluka Analytical, Polysciences). Cortes ultrafinos obtidos no ultramicrotomo Leica EMUC6 (Leica Microsystem, Wetzlar, ALE) foram coletados em grades de cobre de malha 300, contrastados com acetato de uranila e citrato de chumbo, e observados ao microscópio eletrônico de transmissão Zeiss EM109 à 80 kV.

A fim de analisarmos as possíveis alterações morfológicas causadas pela Onil, células controles e tratadas foram fixadas e pós - fixadas como descrito para a técnica de microscopia de transmissão. Após a pós-fixação as células foram lavadas no mesmo tampão e aderidas em lamínulas de 13 mm contendo poli-L-lisina (Sigma-Aldrich, Co., St. Louis, MO, USA) por 10 minutos. Após este período as células foram lavadas em PBS para retirada das células não aderidas. Subsequentemente, as amostras foram desidratadas em séries crescentes de etanol (30% a 100%) por 10 minutos e secas pelo método do ponto crítico (HCP-2 critical point dryer, Hitachi). Após este processo, as células foram metalizadas com 20 nm ouro-paládio (Fine Coat Íon Sputter JFC-1100, JEOL) e observadas ao microscópio eletrônico de JEOL.

## 6.7 Análise do mecanismo de morte celular induzido por Onil

Para avaliarmos o possível mecanismo de morte celular induzido pela lectina, parasitos tratados e controles foram marcados com iodeto de propídio (IP) e anexina V (AV). O IP entra nas células onde a integridade da membrana está comprometida se combinando com ácidos nucleicos e emitindo luz no canal do vermelho, enquanto a AV se liga a fosfatidilserina exposta na superfície externa da membrana em células em processo de apoptose, emitindo um sinal fluorescente na faixa do verde. Formas promastigotas de *L. braziliensis* na concentração  $2 \times 10^6$  células/mL em meio RPMI suplementado com 10 % de SFB foram incubadas em placas de 24 poços na ausência ou presença das concentrações referentes à  $IC_{50}$  e  $2 \times IC_{50}$  da Onil por 48 horas em estufa  $37^\circ C$  e 5% de  $CO_2$ . Após incubação, as culturas foram lavadas 2x em PBS e em seguida submetidas à marcação com 30  $\mu g/mL$  de iodeto de propídio e 10  $\mu g/mL$  de anexina V por 10 minutos. Após esse tempo, as células foram lavadas 3x em PBS, ressuspensas em PBS e imediatamente observadas no microscópio confocal a laser Leica SPII/AOBS. As imagens foram adquiridas a 510 nm e 560 para AV e IP, respectivamente processadas através do software Leica Lite 2. Para citometria de fluxo, as células foram marcadas como descrito acima e imediatamente levadas ao citômetro de fluxo FACSCalibur, equipado com software Cell Quest, usando os detectores 530/30 (FL1) para AV e 582/42 para IP (FL2). A intensidade de fluorescência foi adquirida para 20.000 eventos, os dados analisados utilizando o software WinMD12.8., e expressos em porcentagem de células marcadas em cada um dos canais para os seguintes fenótipos: AV<sup>-</sup>/IP<sup>-</sup> (células não apoptóticas/não necróticas); AV<sup>+</sup>/IP<sup>-</sup> (células apoptóticas); AV<sup>+</sup>/IP<sup>+</sup> (apoptose tardia/necrose) e AV<sup>-</sup>/IP<sup>+</sup> (necrose). Células tratadas com  $H_2O_2$  foram consideradas como controle positivo de morte celular.

## 6.8 Efeito da lectina Onil sobre o potencial de membrana mitocondrial de *L. braziliensis*

Para avaliarmos o efeito da lectina sobre o potencial de membrana mitocondrial utilizamos como marcador a rodamina 123, um fluorocromo catiônico que marca mitocôndrias cujo potencial de membrana encontra-se preservado. Formas promastigotas ( $2 \times 10^6$  células / mL) foram tratadas com as concentrações correspondentes a  $IC_{50}$  e  $2 \times IC_{50}$  da lectina por 48 horas, e em seguida lavadas em PBS. As células foram incubadas com rodamina 123 (10  $\mu g/mL$ ) por 15 minutos a  $37^\circ C$ . As análises foram realizadas em citômetro de fluxo e microscopia confocal a laser Leica SPII/AOBS em placas de cultivo utilizando o



laser HeNe 488nm.. As alterações na fluorescência foram quantificadas a partir do índice de variação (IV) calculado pela equação  $MT-MC/MC$ , onde MT é a mediana da fluorescência dos parasitos tratados e MC a mediana de fluorescência dos parasitos sem tratamento.

### **6.9 Produção de óxido nítrico**

A fim de analisarmos o efeito da Onil sobre a produção de óxido nítrico por macrófagos peritoneais infectados com *L.braziliensis*, foram realizados testes de quantificação de nitrito através do reagente de Griess. Os macrófagos foram infectados por 14 horas com formas promastigotas, conforme descrito anteriormente, e tratados com diferentes concentrações da lectina (75, 150 e 300  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) por 24 horas. Em seguida, os sobrenadantes das culturas foram incubados com 100  $\mu\text{l}$  do reagente Griess (1% de sulfanilamida / 0,1% de N- (1-naftil) etilenodiamina, dicloridrato / 2,5% de  $\text{H}_3\text{PO}_4$ ) à temperatura ambiente por 10 minutos. A absorbância foi medida a 540 nm no leitor de ELISA Benchmark plus (Bio-Rad®, Califórnia, EUA). A concentração de nitrito foi determinada usando uma curva padrão com concentrações conhecidas de nitrito de sódio.

### **6.10 Análise do perfil de citocinas em células de exsudato peritoneal infectadas por *Leishmania braziliensis***

Para avaliação do perfil de citocinas (Th1, Th2 e Th17), os sobrenadantes de células de exsudato peritoneal infectadas controles (sem tratamento) e infectadas tratadas com Onil (75, 150, 300  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) por 24 horas, foram submetidas a dosagem das citocinas IL-10, IL-17A, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-6, IL-4, IL-12p40 e IL-1 $\beta$  através do Kit CBA Mouse Cytokine assay kits (BD® Biosciences, CA/EUA) de acordo com as recomendações do fabricante. As medições foram realizadas no citômetro FACS Calibur (Beckton Dickinson, Mountain View, CA, EUA). A aquisição de dados foi realizada utilizando o programa Cell-Quest™ software package fornecido pelo fabricante. A análise dados foi feita no programa FlowJo software 7.6.4 (Tree Star Inc., Ashland, OR, EUA). Foi realizada uma aquisição de 1800 eventos (mínimo de 300 eventos por bead) para cada preparação. Os resultados representam a média de dois experimentos em duplicata.

### **6.11 Análise do perfil de citocinas em células do exsudato peritoneal**

No ensaio com baixas concentrações de Onil, sobrenadantes de cultura de células do exsudato peritoneal controles e tratadas com a lectina (3,25-30 µg/mL), foram coletados após 24 horas de tratamento e submetidas à dosagem de citocinas como descrito no item **6.10**.

### **6.12 Análise estatística**

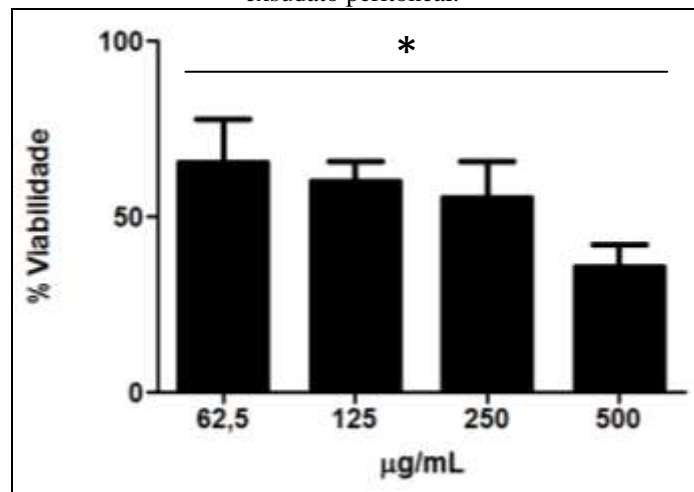
As análises de regressão linear foram feitas no programa SPSS 18.0 (IBM Co., Nova Iorque, EUA) para Windows. As análises de significância, considerado significativo valores  $p < 0.05$ , foram realizadas através do teste ANOVA e o pós-teste de Tukey no programa GraphPad Prism 5.0 (Graphpad, Califórnia, EUA) para Windows.

## 7 RESULTADOS

### 7.1 Citotoxicidade

A incubação da lectina Onil na presença de exsudato peritoneal mostrou uma perda gradativa da viabilidade destas células já na concentração de 62,5 µg/mL correspondendo a aproximadamente 40% nesta concentração e se mantendo nesta proporção nas concentrações de 125 e 250 µg/mL. No entanto, nenhuma das concentrações foi capaz de inibir completamente a viabilidade celular. Na maior concentração testada (500 µg/mL), aproximadamente 40% das células ainda apresentavam-se viáveis. A  $CC_{50}$  da Onil (concentração capaz de inibir 50% a viabilidade celular) foi estimada em  $317,5 \pm 0,63$  µg/mL (**Figura 9**).

**Figura 9** - Efeito citotóxico da lectina Onil sobre células do exsudato peritoneal.



Fonte: Elaborado pela autora (2016).

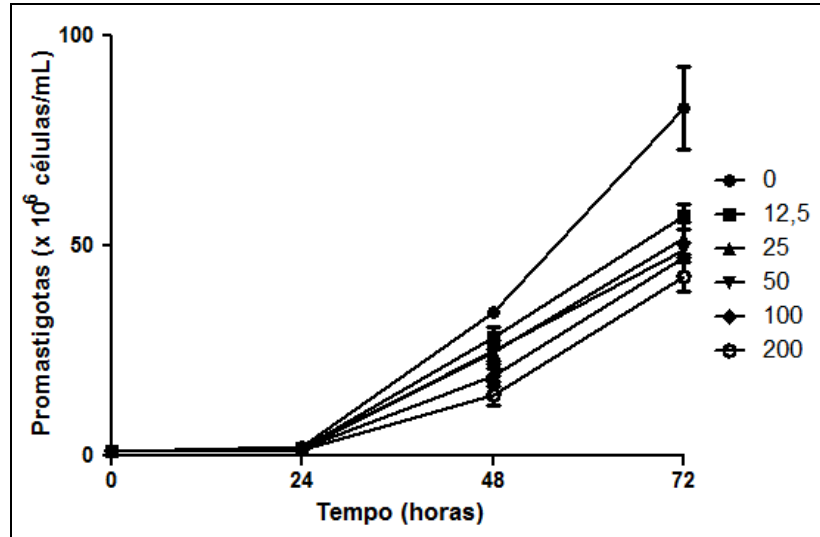
Legenda: \*Valores estatisticamente significativos teste ANOVA ( $p < 0.05$ ), seguido do pós-teste Tukey.

### 7.2 Efeito da lectina Onil sobre o crescimento e viabilidade de formas promastigotas de *L. braziliensis*.

O tratamento de formas promastigotas com a lectina Onil reduziu o crescimento de formas promastigotas na razão direta às concentrações testadas (**Figuras 10**). No tempo de 48 horas, o tratamento das células com a Onil inibiu significativamente o crescimento celular nas maiores concentrações testadas (100 e 200 µg/mL) com  $p = 0.0009$ . Enquanto no tempo de 72 horas apenas a maior concentração apresentou-se significativa em relação ao controle com  $p =$

0.046. A  $IC_{50}$  da lectina foi estimada após 48 horas de cultivo foi de  $150,58 \pm 0,8 \mu\text{g/mL}$ , com índice de seletividade (ISe) equivalente a 2.1 (**Tabela 1**)

**Figura 10-** Curva de crescimento de formas promastigotas de *L. braziliensis* tratadas com Onil.



Fonte: Elaborado pela autora, 2016.

**Tabela 1-** Atividade *in vitro* da lectina Onil contra as formas promastigotas de *L. braziliensis*, citotoxicidade em células de mamífero e índice de seletividade (ISe).

Composto	$IC_{50}$ pro	$CC_{50}$	ISe
	$\mu\text{g/mL}$		
Onil	$150,58 \pm 0,8$	$317,5 \pm 0,6$	2,1

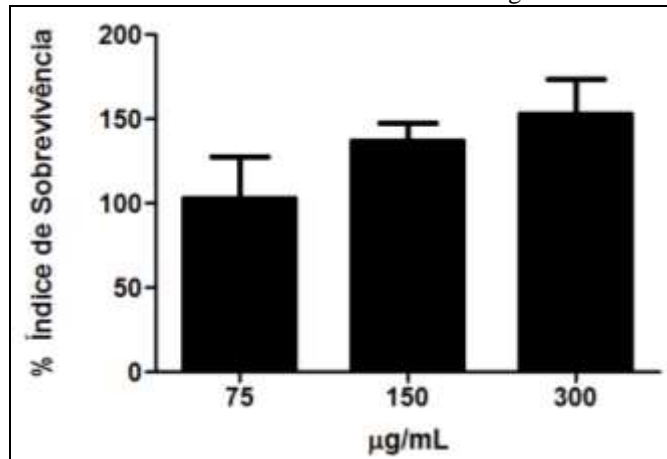
Fonte: Elaborado pela autora, 2016.

**Legenda:**  $IC_{50}$ - concentração que inibe em 50% o crescimento de formas promastigotas;  $CC_{50}$  – concentração que reduz em 50% a viabilidade de células de mamíferos; ISe- índice de seletividade

### 7.3 Efeito da lectina Onil sobre a viabilidade de formas amastigotas de *L. braziliensis*

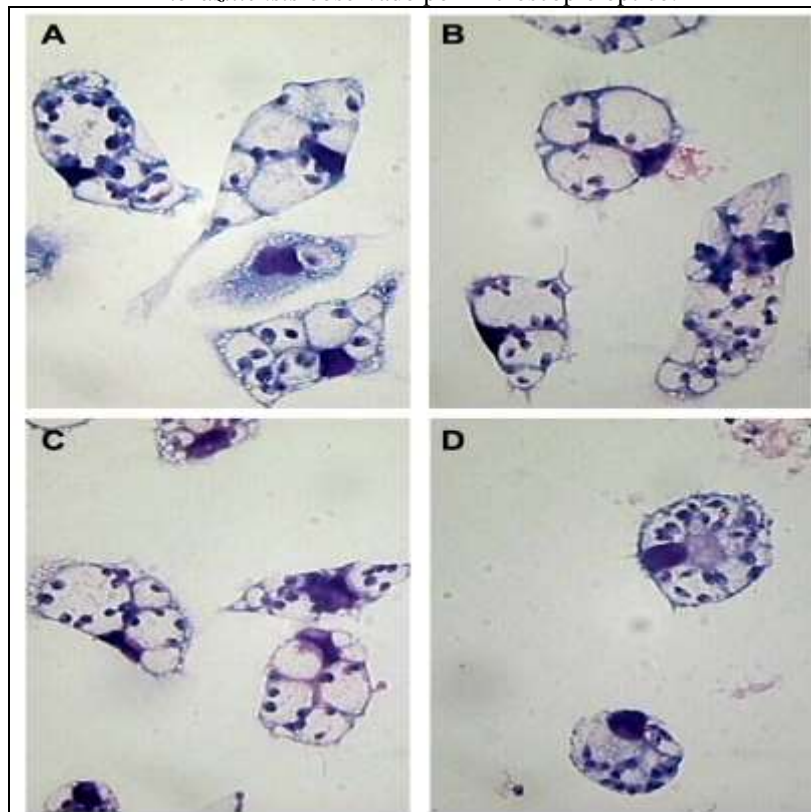
No que diz respeito à atividade da lectina contra as formas intracelulares, o tratamento com a lectina não alterou de forma significativa os índices de sobrevivência das amastigotas intracelulares em macrófagos peritoneais infectados. Ao contrário, um discreto aumento foi observado em todas as concentrações testadas, embora de maneira não significativa (**Figura 11**). As micrografias de células tratadas mostram que a quantidade de amastigotas intracelulares permanece mais ou menos constante em todas as concentrações testadas, quando comparadas com o controle (**Figura 12**).

**Figura 11-** Efeito da lectina Onil sobre formas amastigotas de *L. braziliensis*.



Fonte: Elaborado pela autora, 2016.

**Figura 12-** Efeito da lectina Onil sobre formas amastigotas de *L. braziliensis* observado por microscópio óptico.



Fonte: Elaborado pela autora, 2016.

**Legenda:** A- Controle sem tratamento; B- Células tratadas com 75 µg/mL; C- Células tratadas com 150 µg/mL; D- Células tratadas com 300 µg/mL.

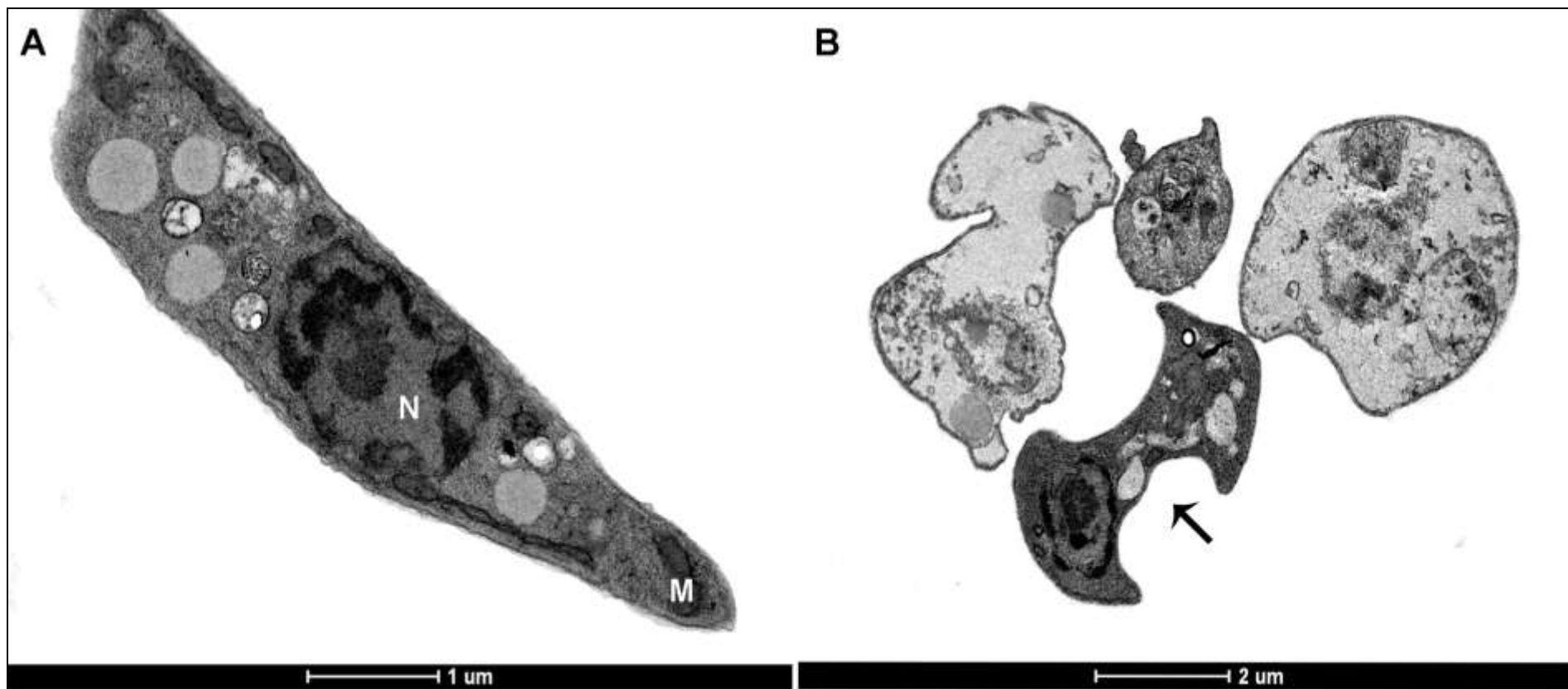
#### 7.4 Efeito da lectina Onil sobre a ultraestrutura de formas promastigotas *L. braziliensis*

Formas promastigotas controles apresentaram morfologia preservada típica, com corpo alongado com flagelo localizado na porção anterior do parasito, núcleo central, apresentando heterocromatina eletrondensa associada ao envelope nuclear. Perfis de mitocôndria apresentando matriz heterogênea puderam ser observados abaixo da membrana plasmática do parasito (**Figura 13A**). Células tratadas com a  $IC_{50}$  apresentaram poucas alterações ultraestruturais em relação ao controle (dados não mostrados). No entanto, parasitos tratados com  $2 \times IC_{50}$  da Onil apresentaram alterações morfológicas significativas (**Figura 13B-F**). Em células mais drasticamente afetadas observa-se intensa perda de material citoplasmático e apenas resquícios de organelas podem ser observados (**Figura 13B**). É possível observar perda da polaridade celular e um grande número de células em processo de divisão, apresentando forma aberrante e citocinese incompleta (**Figura 13B-D**). O cinetoplasto na maioria das células apresentava o kDNA com seu aspecto fibrilar característico (**Figura 13D-E**). Alterações na membrana do axonema com aparecimento de ondulações na superfície da membrana do flagelo, dilatação da membrana do axonema e processo de vesiculação interno também pode ser frequentemente observado nas células tratadas (**Figura 13E-F**).

A observação ultraestrutural através de microscopia eletrônica de varredura demonstrou que formas promastigotas controles não tratadas apresentaram corpo alongado e membrana lisa (**Figura 14A**). As células tratadas com  $IC_{50}$  (**Figura 14B**) e  $2 \times IC_{50}$  (**Figura 14C**) de Onil demonstraram encurtamento do corpo celular, aumento no volume e membrana com aspecto enrugado.

**Figura 13-** Efeito da lectina Onil sobre a ultraestrutura de formas promastigotas de *L.braziliensis* observado pela microscopia eletrônica de transmissão.

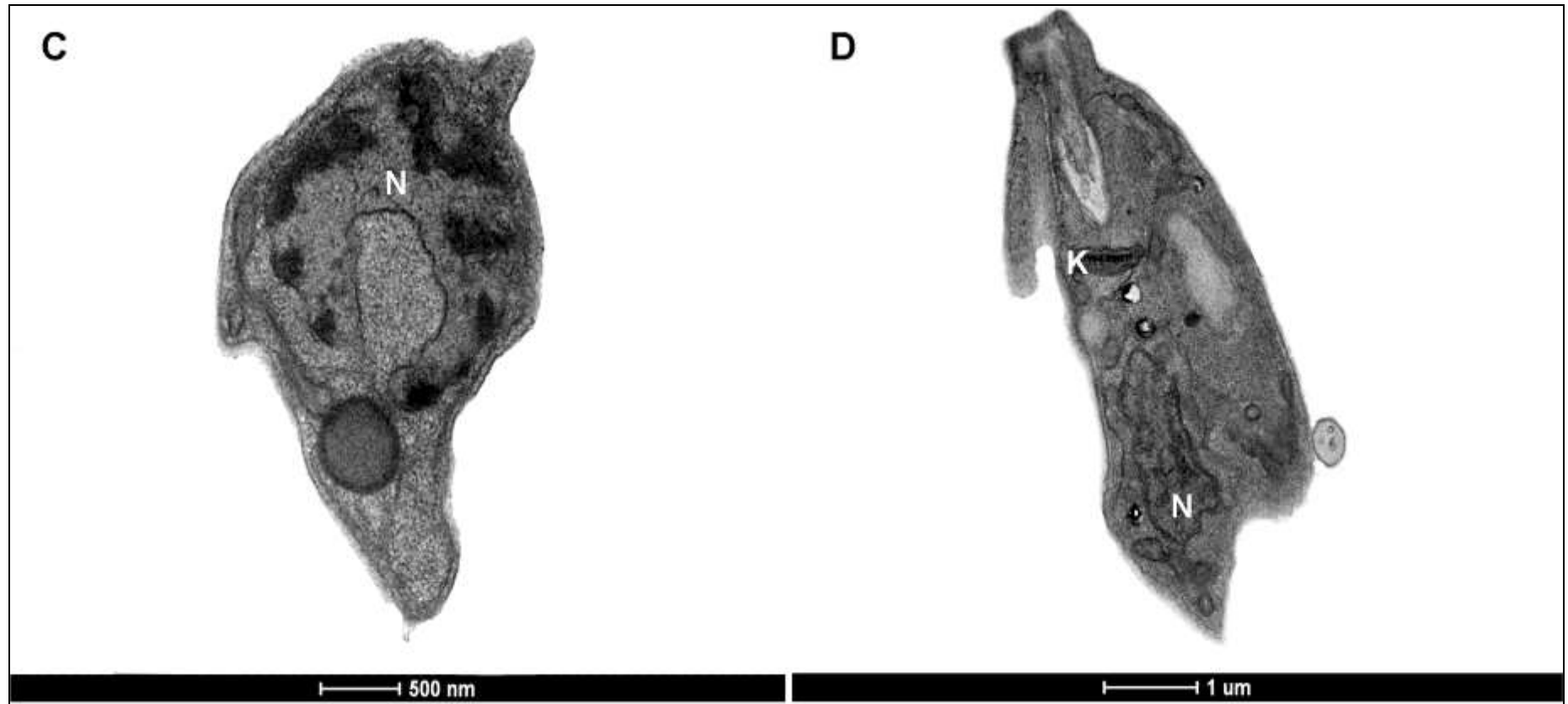
(Continua)



**Legenda:** **A** – Promastigota de *L. braziliensis* sem tratamento; **B**- Promastigotas tratadas com 2x IC<sub>50</sub> da lectina Onil durante 48 horas. (**N**): Núcleo; (**M**): Mitocôndria; (**Seta**): Célula em processo de divisão anormal.

**Figura 13-** Efeito da lectina Onil sobre a ultraestrutura de formas promastigotas de *L.braziliensis* observado pela microscopia eletrônica de transmissão.

(Continuação)

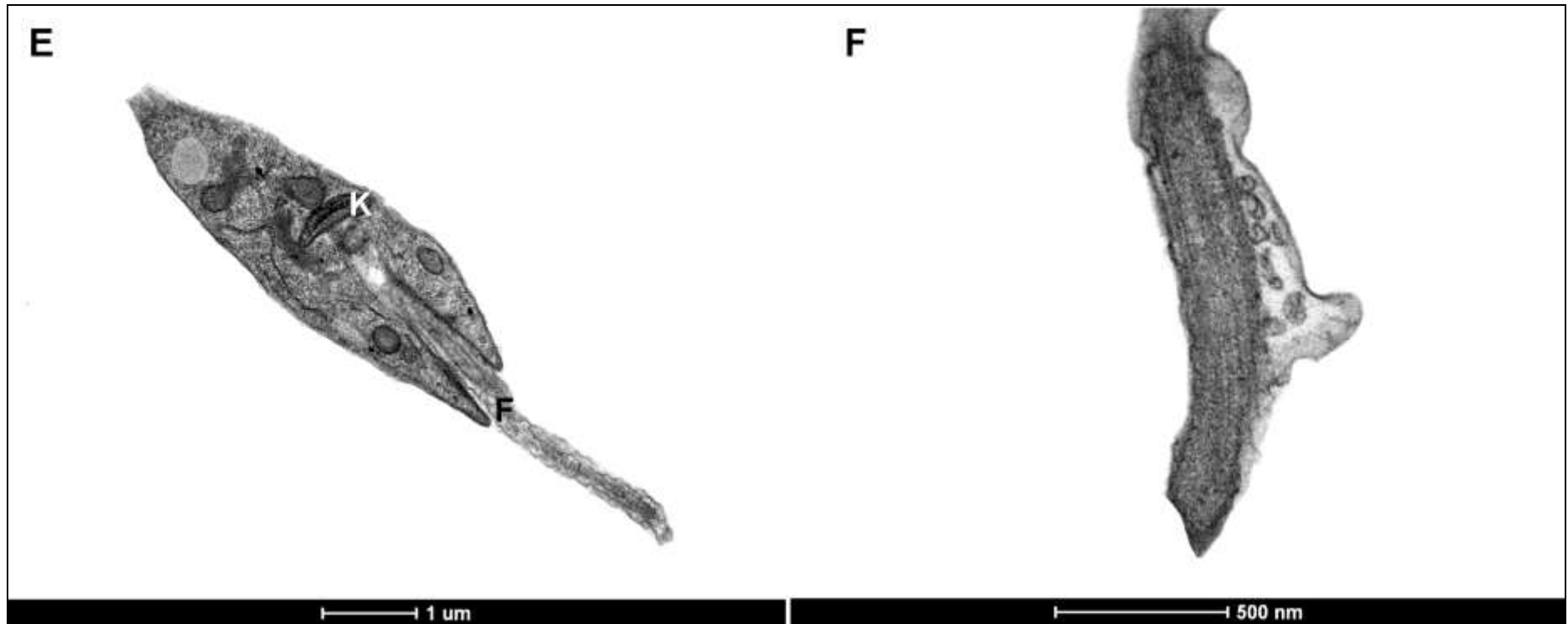


**Legenda:** C - D: Alterações ultraestruturais em formas promastigotas de *L. braziliensis* tratadas com  $2 \times IC_{50}$  da lectina Onil durante 48 horas. (N): núcleo; (K): cinetoplasto.



**Figura 13-** Efeito da lectina Onil sobre a ultraestrutura de formas promastigotas de *L.braziliensis* observado pela microscopia eletrônica de transmissão.

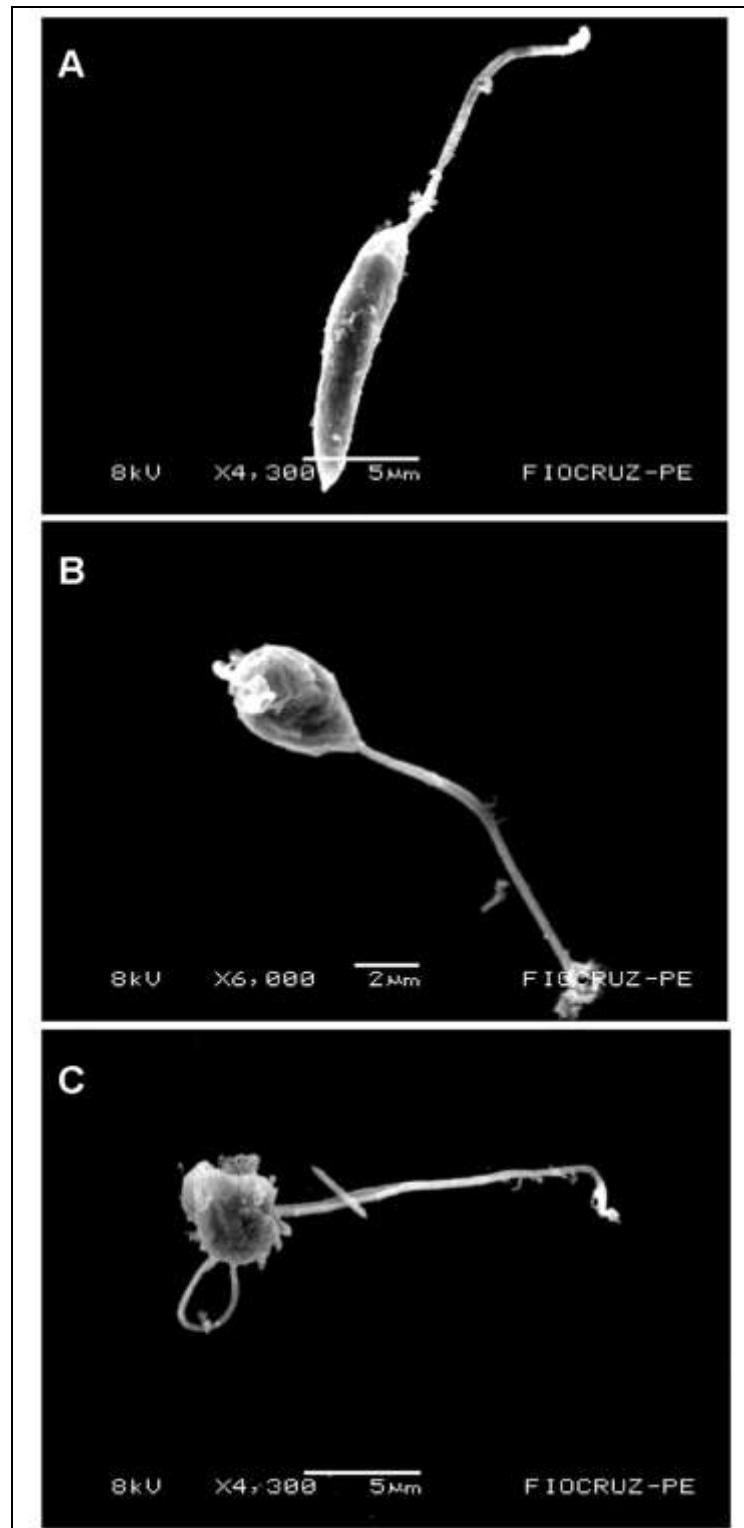
(Conclusão)



**Fonte:** Elaborado pela autora, 2016.

**Legenda:** **E:** Alterações ultraestruturais no flagelo de forma promastigota de *L. braziliensis* tratadas com  $2x IC_{50}$  da lectina Onil durante 48 horas. **F:** Corte longitudinal do flagelo. (F): Flagelo.

**Figura 14**– Efeito da lectina Onil sobre a ultraestrutura de formas promastigotas de *L. braziliensis* observado através da microscopia eletrônica de varredura



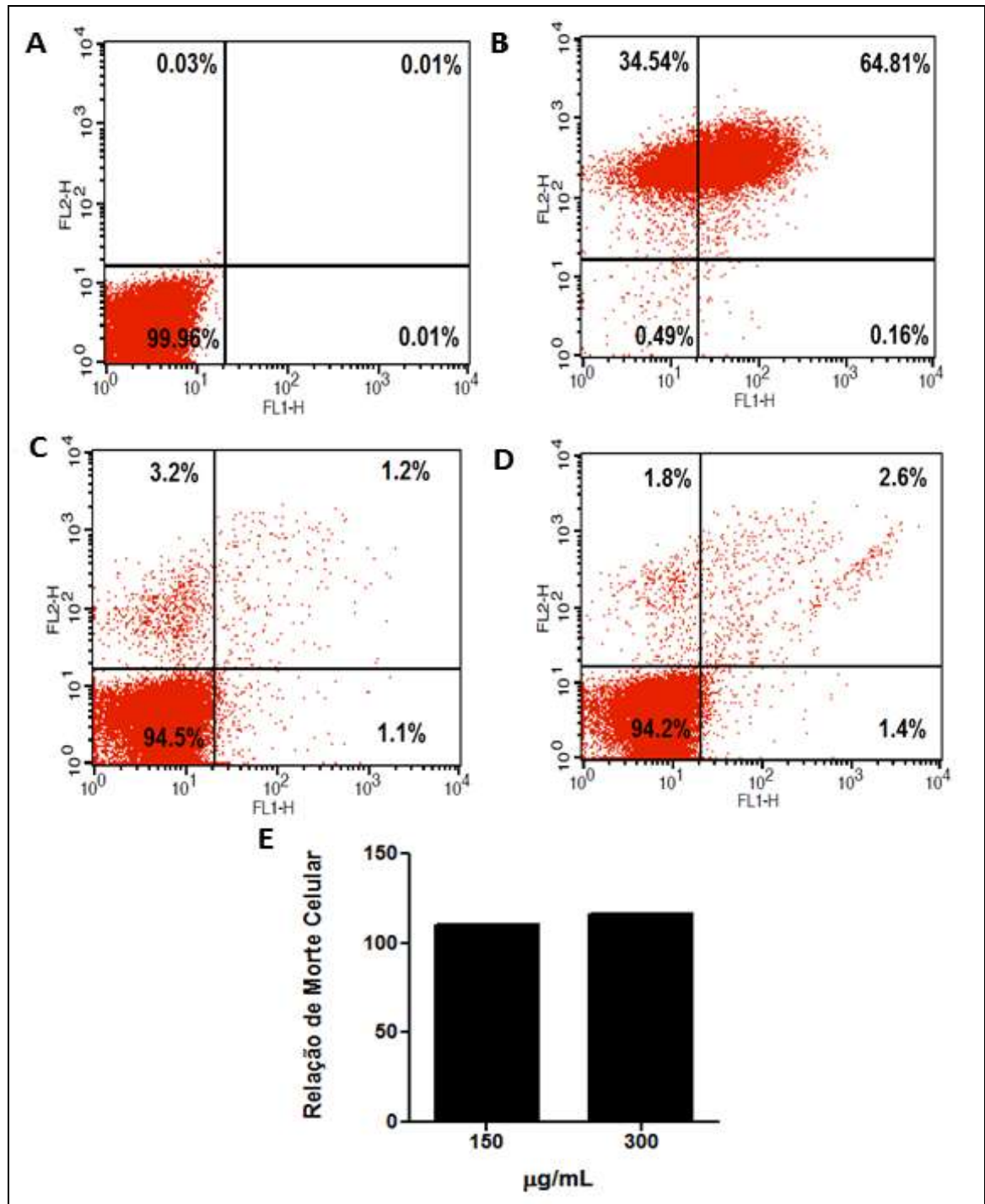
**Fonte:** Elaborado pela autora, 2016.

**Legenda:** A- Controle sem tratamento; B- Células tratadas com 1xIC<sub>50</sub>; C- Células tratadas com 2xIC<sub>50</sub>.

### 7.5 Análise do mecanismo de morte celular induzido pela lectina Onil sobre formas promastigotas de *L. braziliensis*

Para análises do mecanismo de morte celular disparado pela lectina em *Leishmania braziliensis*, células tratadas e controles foram submetidas à marcação com o Anexina V e Iodeto de propídio (AV/IP), marcadores utilizados para distinguir células apoptóticas de células necróticas, respectivamente. Quase a totalidade da população de células controles (99,96%) apresentava fenótipo (AV/IP<sup>-</sup>). Contrariamente, praticamente todas as células tratadas com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> apresentaram dupla marcação, ou era positivo para um dos marcadores de morte celular. O tratamento com a lectina induziu a um incremento de mais de 100 vezes na morte celular do parasito em relação as células controles, embora o total de células não viáveis (AV-/IP<sup>+</sup>, AV+/IP<sup>-</sup> e AV+/IP<sup>+</sup>) não tenha chegado a 10% do total da população em ambas as concentrações de Onil testadas. A análise dos *dot plott* mostram que a necrose/apoptose tardia é o principal tipo de morte celular elicitado pela Onil (**Figura 15**). As imagens obtidas através da microscopia confocal a laser mostraram pouca marcação para AV/IP com a maioria das células não tratadas apresentando a morfologia alongada típica. O tratamento com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foi possível ver um aumento no número de células marcadas, as quais apresentavam sério comprometimento da sua morfologia, como observado por Contraste de Interferência Diferencial (DIC) (**Figura 16**). Não houve alteração significativa no padrão de marcação do parasito quando comparamos as duas concentrações de Onil.

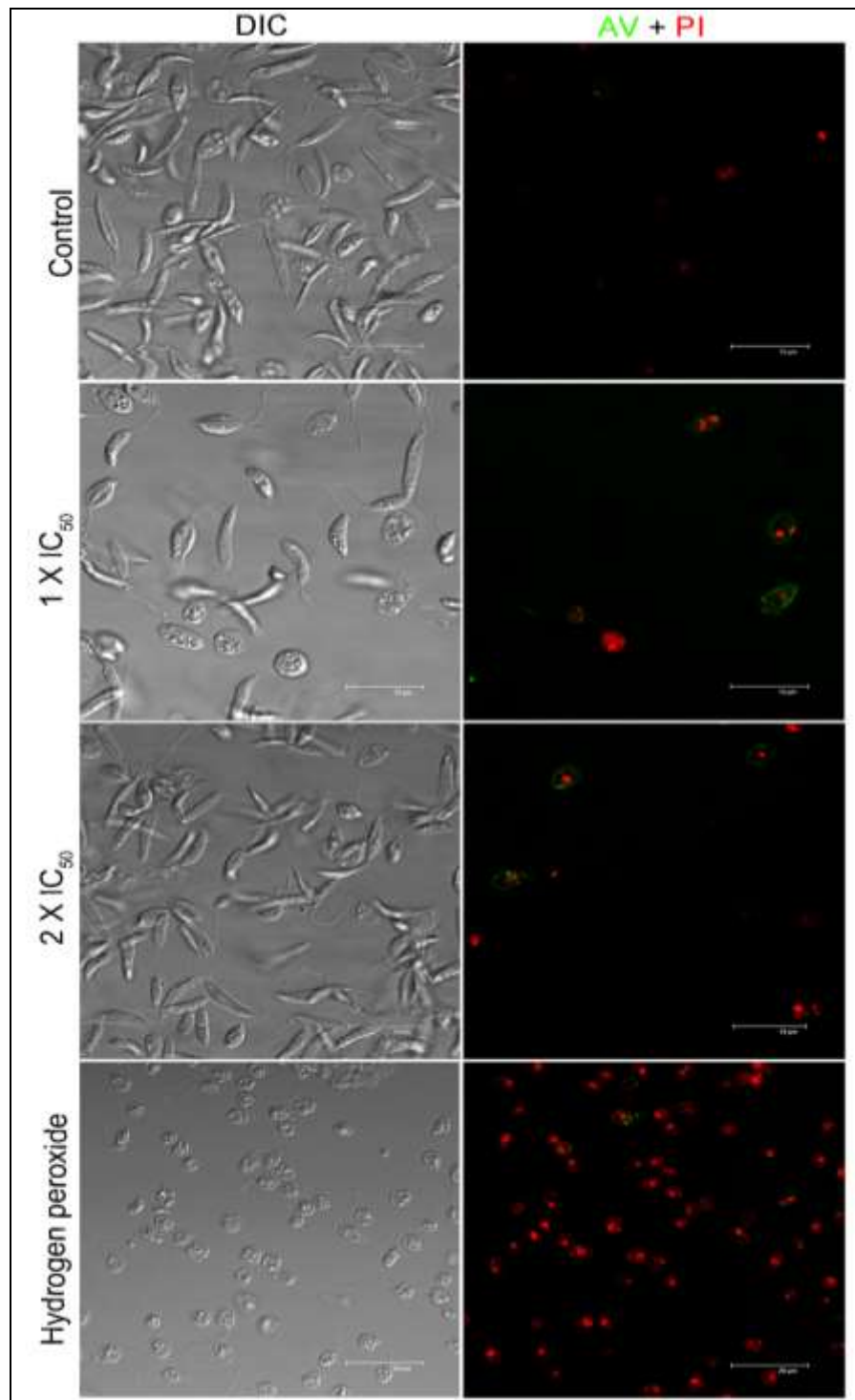
**Figura 15** - Análises por citometria de fluxo de formas promastigotas de *L. braziliensis* marcadas com AV/ IP.



**Fonte:** Elaborado pela autora, 2016.

**Legenda:** FL1-H: Anexina V; FL2-H: Iodeto de propídio; A- Controle sem tratamento; B- Controle com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; C- Células tratadas com 1xIC<sub>50</sub>; D- Células tratadas com 2xIC<sub>50</sub>; E- Relação de Morte Celular ( Células tratadas mortas / Células não tratadas mortas).

**Figura 16** – Marcação de formas promastigotas de *L. braziliensis* com AV/IP



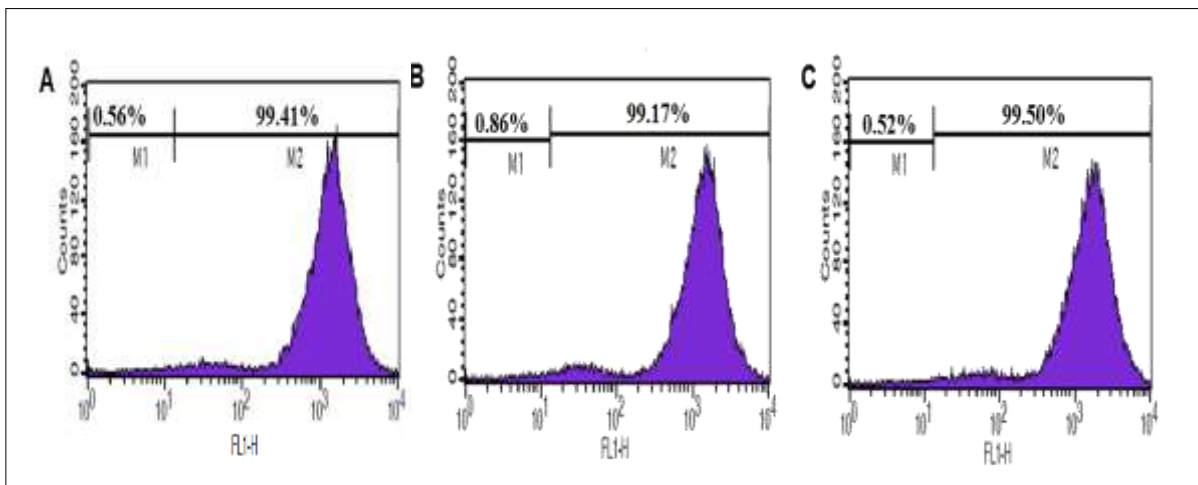
**Fonte:** Elaborado pela autora, 2016.

**Legenda:** (Control) Células controles sem tratamento, (1x IC<sub>50</sub>): células tratadas com 1x IC<sub>50</sub> de Onil, (2 x IC<sub>50</sub>): células tratadas com 2 x IC<sub>50</sub> de Onil; (Hydrogen peroxide): controle tratado com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. **AV + IP**, imagens obtidas no canal correspondente a fluorescência do anexina V/ iodeto de propídio; **DIC** – sobreposição das imagens de contraste de interferência diferencial (Differential Interference Contrast).

## 7.6 Efeito da lectina Onil sobre o potencial de membrana mitocondrial de formas promastigotas de *L. braziliensis*

Para verificar os possíveis efeitos da lectina sobre o potencial de membrana mitocondrial de *L. braziliensis* foi utilizado rodamina 123 (Rh 123). As análises feitas por citometria de fluxo (**Figura 17**) mostram que a lectina Onil não causou efeito significativo sobre o potencial de membrana mitocondrial das células tratadas com as concentrações equivalentes a  $1xIC_{50}$  e  $2xIC_{50}$  em relação as células controles sem tratamento, com a maioria das células tratadas apresentando uma forte marcação para esta sonda, com uma discreta hiperpolarização da membrana, conforme se observa através dos valores positivos de IV (**Tabela 2**).

**Figura 17-** Análises por citometria de fluxo de formas promastigotas de *L. braziliensis* marcadas com Rh 123.



**Fonte:** Elaborado pela autora, 2016.

**Legenda:** A- Controle sem tratamento; B- Células tratadas com  $1xIC_{50}$ ; C- Células tratadas com  $2xIC_{50}$ .

**Tabela 2** - Análise através da citometria de fluxo dos efeitos da lectina Onil sobre o potencial de membrana mitocondrial utilizando Rh 123.

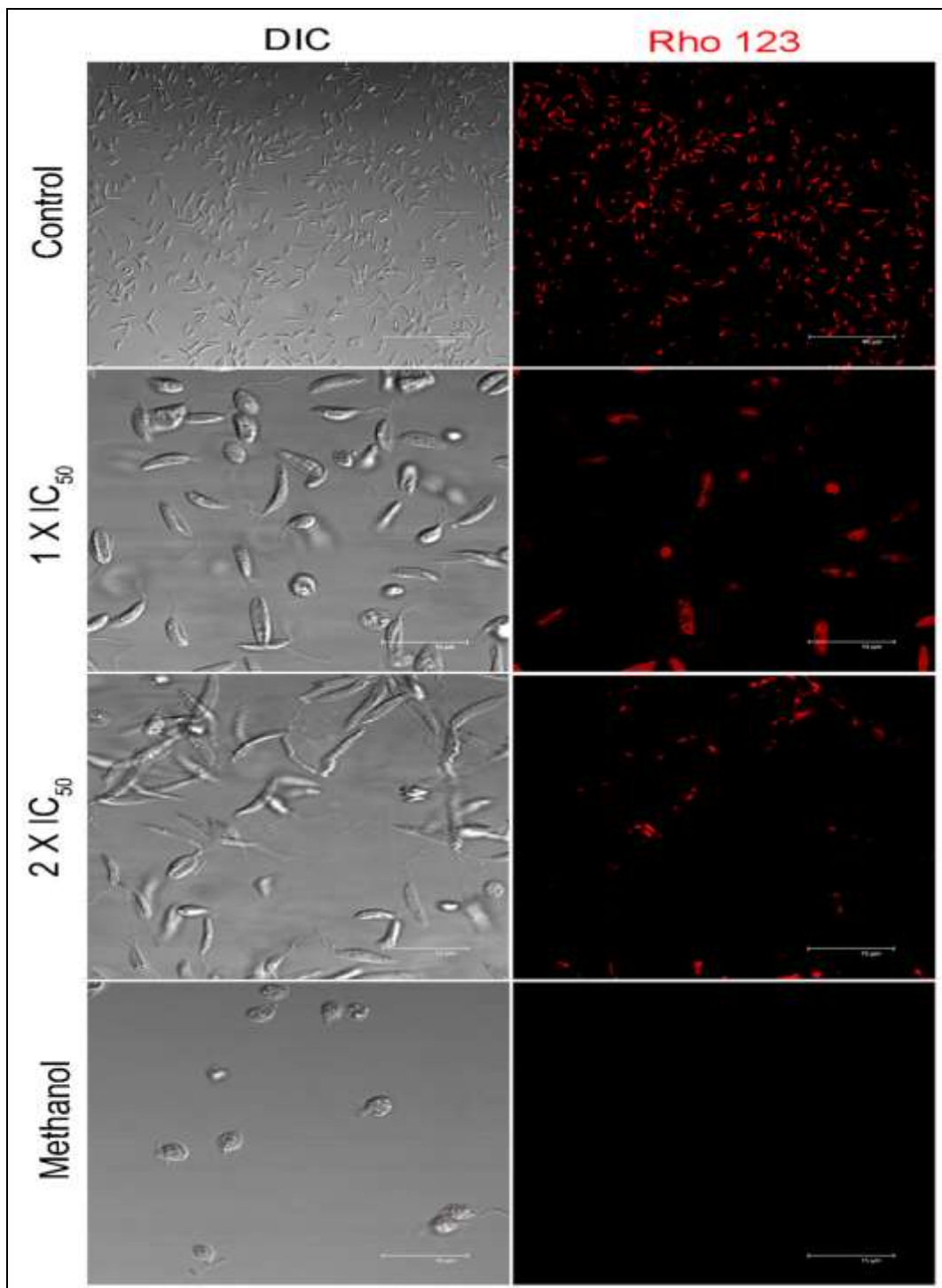
Concentração ( $\mu\text{g/mL}$ )	Mediana	I.V
0	1263,46	0
150	1298,02	+0,03
300	1512,47	+0,20

**Fonte:** Elaborado pela autora, 2016.

**Legenda:**  $IV = (MT - MC) / MC$ , onde MT corresponde a mediana da fluorescência para parasitos tratados e MC aos parasitos controles.

Os dados quantitativos da análise por citometria de fluxo corroboram com as imagens obtidas por microscopia confocal. A incubação de células controles não tratadas com a rodamina 123 evidenciou uma forte marcação no canal do vermelho. Este perfil não sofreu alterações em células submetidas ao tratamento com a Onil, não houve diminuição da intensidade da marcação e no número de células marcadas pela rodamina 123 em relação ao controle (**Figura 18**).

**Figura 18** – Marcação de formas promastigotas de *L. braziliensis* com Rh 123.



**Fonte:** Elaborado pela autora, 2016.

**Legenda:** (Control) Células controles sem tratamento, (1x IC<sub>50</sub>) células tratadas com 1x IC<sub>50</sub> de Onil; (2 x IC<sub>50</sub>) células tratadas com 2 x IC<sub>50</sub> de Onil e (Methanol) controle tratado com metanol.

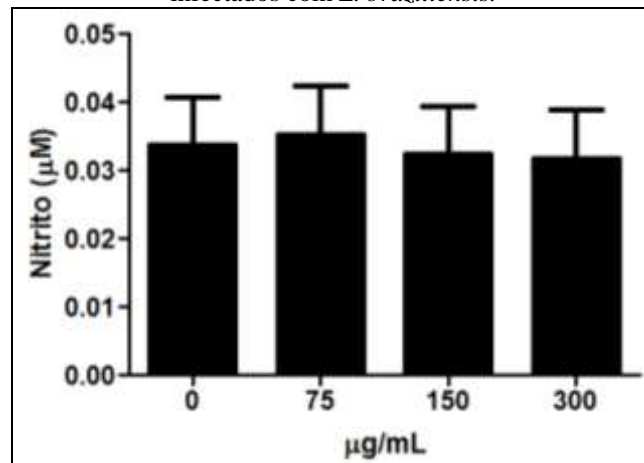
**Rh 123,** imagens obtidas no canal correspondente a fluorescência da rodamina 123; **DIC** – sobreposição das imagens de contraste de interferência diferencial (Differential Interference Contrast).



### 7.7 Efeito da lectina Onil sobre a produção de óxido nítrico por macrófagos infectados com *L. braziliensis*

A fim de avaliarmos se a lectina Onil possui efeito sobre a produção de óxido nítrico (NO) por macrófagos peritoneais infectados com *L. braziliensis*, as concentrações de nitrito na ausência e presença de diferentes concentrações da lectina foram avaliadas através do método de Griess. Nossos resultados demonstram que a Onil não foi capaz de induzir uma alteração significativa na produção de NO por macrófagos em todas as concentrações testadas quando comparadas com o controle infectado e não tratado (**Figura 19**).

**Figura 19-** Produção de óxido nítrico por macrófagos infectados com *L. braziliensis*.

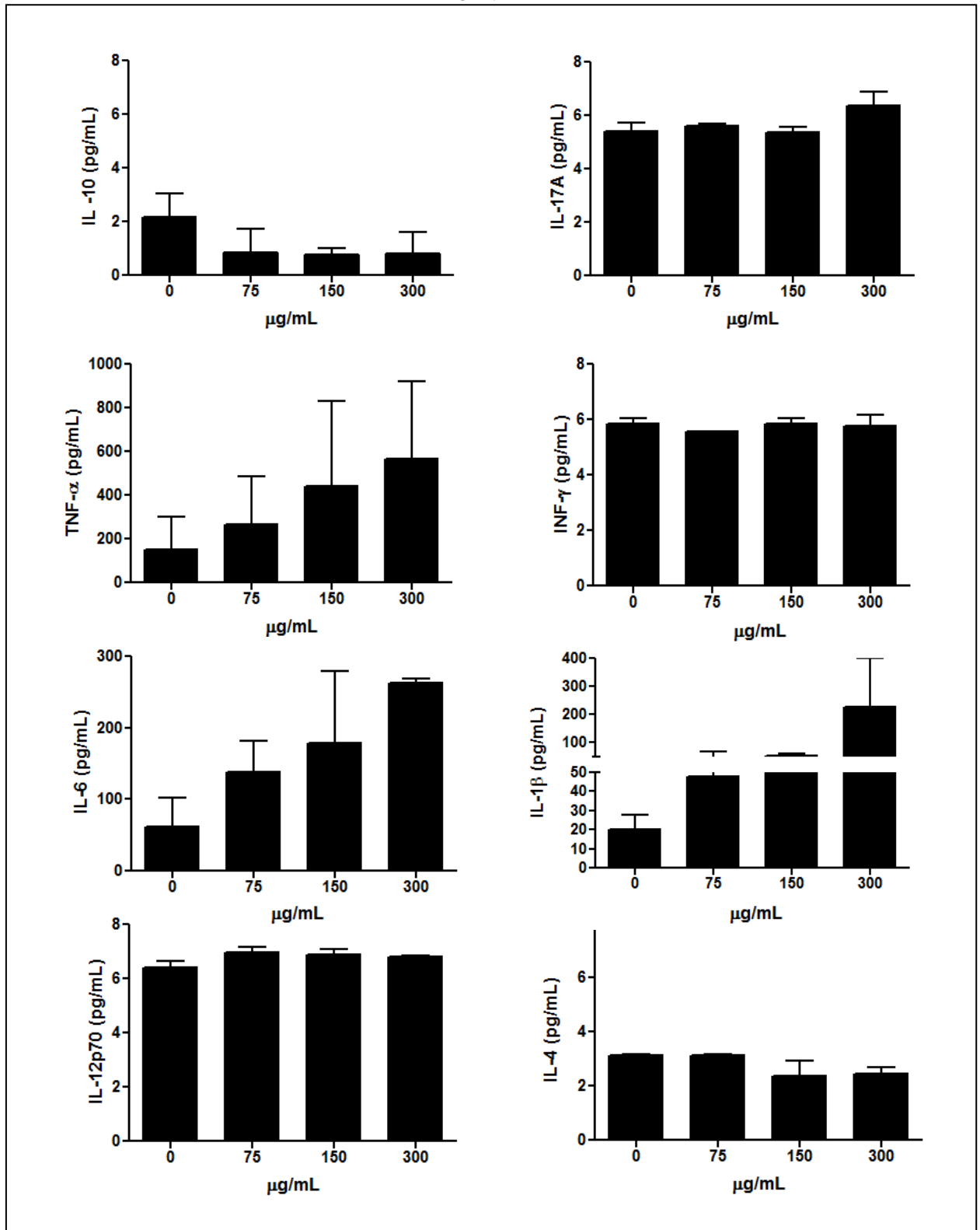


Fonte: Elaborado pela autora, 2016.

### 7.8 Efeito da lectina Onil sobre a produção de citocinas por células do exsudato peritoneal infectadas com *L. braziliensis*

Os efeitos da lectina Onil sobre a produção de citocinas de perfis Th1, Th2 e Th17 foram analisados nos sobrenadantes de células do exsudato peritoneal infectadas com *L. braziliensis*. Embora, diferenças nos perfil de citocinas das células infectadas e tratadas em relação ao as células controles (infectadas não tratadas) tenham sido indentificadas, nossas análises estatísticas demonstraram não serem significativas (**Figura 20**).

**Figura 20**– Produção de citocinas por células do exsudato infectadas com *L. braziliensis* e tratadas com a lectina Onil.



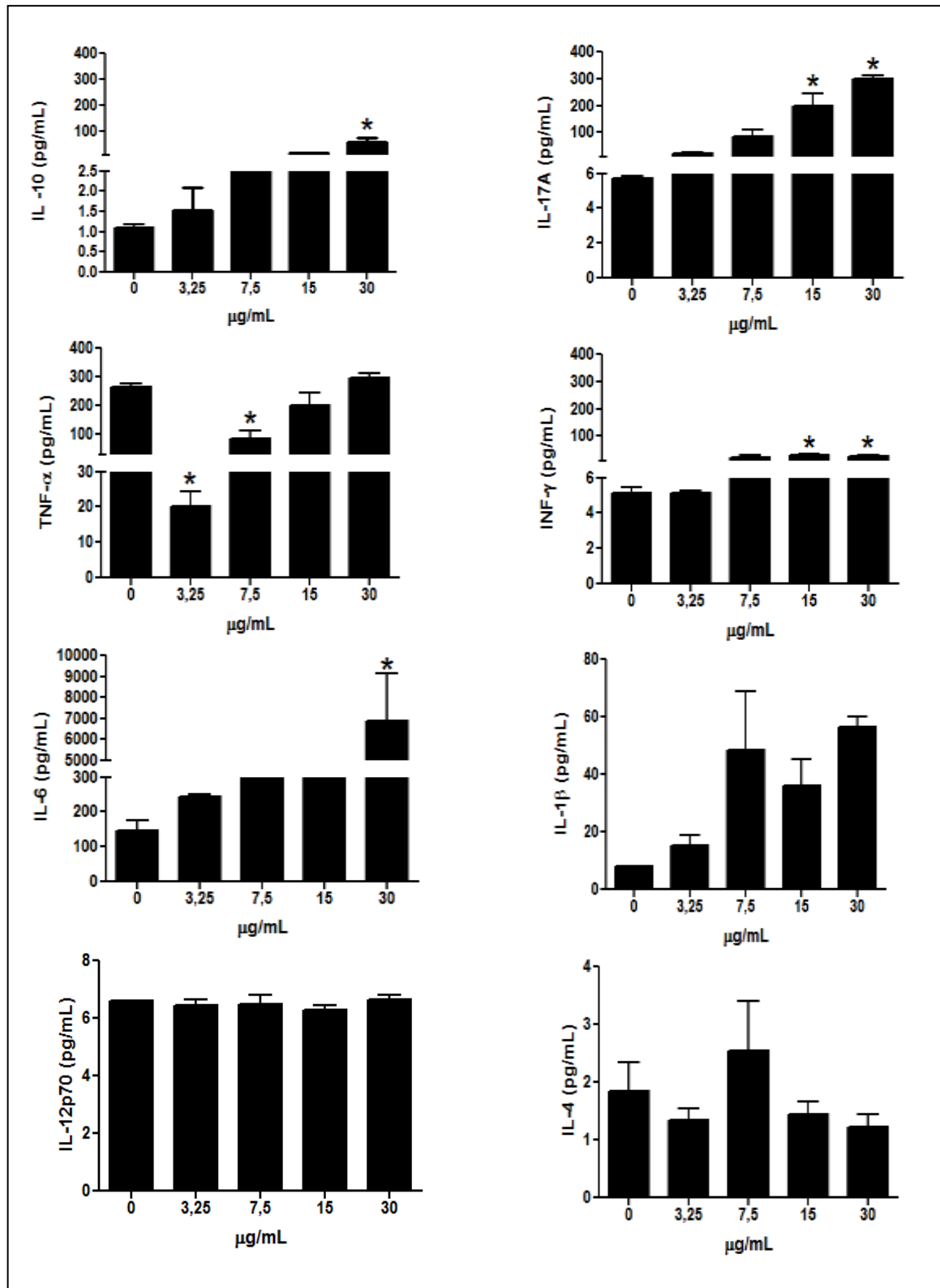
**Fonte:** Elaborado pela autora, 2016.

**Legenda:** \*Valores estatisticamente significativos teste ANOVA ( $p < 0.05$ ), seguido do pós-teste Tukey.

### **7.9 Efeito da lectina Onil sobre a produção de citocinas por células do exsudato peritoneal**

Tendo em vista não ter sido identificadas diferenças significativas na produção de citocinas em células infectadas e tratadas, nós investigamos se a lectina em concentrações menores e sem a pressão exercida pelo parasito era capaz de induzir modificações no perfil de citocinas. Desta forma, os sobrenadantes de culturas de células do exsudato peritoneal foram avaliados para as mesmas citocinas utilizadas nos ensaios de infecção. Nossos resultados mostraram que a Onil é capaz estimular a produção de citocinas do perfil Th1, Th2 e Th17, nas concentrações de 15 e 30  $\mu\text{g/mL}$  e inibir de maneira significativa a produção de  $\text{TNF-}\alpha$  nas menores concentrações. É possível observar que na maior concentração testada, a lectina induziu um aumento significativo na produção de IL-10 de cerca de 54x e aproximadamente 5x para  $\text{INF-}\gamma$ , em relação ao controle não tratado, enquanto a IL-17A teve um incremento de 52 x e IL-6 de 47x quando comparados à produção basal destas citocinas nas células controles. No entanto, as alterações nos níveis das citocinas IL-1 $\beta$ , IL-12p40 e IL-4 não foram significativamente alterados em relação ao controle não tratado (**Figura 21**).

**Figura 21** – Produção de citocinas por células do exsudato tratadas com a lectina Onil.



Fonte: Elaborado pela autora, 2016.

Legenda: \*Valores estatisticamente significativos teste ANOVA ( $p < 0.05$ ), seguido do pós-teste Tukey.

## 8 DISCUSSÃO

As leishmanioses são doenças negligenciadas responsáveis por altos índices de morbidade e mortalidade (BILBE, 2015). A quimioterapia é baseada em medicamentos tóxicos que necessitam de longo período de tratamento e que não eliminam completamente os parasitos de todos os indivíduos infectados (DE MENEZES et al., 2015). Uma vez que estas doenças atingem uma parcela pobre da população em países em desenvolvimento, os investimentos globais em pesquisa e desenvolvimento de fármacos alternativos e de vacinas constituem um mercado pouco atrativo para a indústria farmacêutica privada. (BALASEGARAM et al., 2008). Desta forma, a procura por novos fármacos com baixo custo associado e de fácil obtenção pode ser uma saída para atrair novos investimentos na área da quimioterapia de doenças negligenciadas, como as leishmanioses.

A investigação farmacêutica em produtos naturais representa uma importante estratégia para a descoberta e desenvolvimento de novos medicamentos (TIUMAN et al., 2011) para o tratamento de doenças tropicais negligenciadas, especialmente contra protozoários parasitos (SINGH et al., 2014). Neste contexto, as lectinas, proteínas que se ligam com alta especificidade a carboidratos tem se mostrado promissoras, uma vez que possuem atividades biológicas relevantes constituindo ferramentas úteis para fins terapêuticos e biotecnológicos (KUMAR et al., 2012). Neste sentido, no presente estudo nós investigamos pela primeira vez o potencial leishmanicida e imunomodulador da lectina Onil isolada do soro do peixe *Oreochomis niloticus*.

Inicialmente, avaliamos o potencial citotóxico da lectina Onil sobre células do exsudato peritoneal de camundongos Balb/c. Esta avaliação é de extrema importância, pois um efeito tóxico desta lectina poderia limitar sua aplicação biotecnológica e quimioterápica (ARAÚJO et al., 2013). Algumas lectinas têm sido descritas como citotóxicas para as células do hospedeiro, tais como a Visco (*Viscum album*) e aglutinina de soja (ZANG et al., 2006; SUNG et al., 2013). O teste de citotoxicidade, pela técnica do MTT, demonstrou que a Onil reduziu a viabilidade de 50% das células de mamíferos na concentração de 317 µg/mL. Em comparação as lectinas Conavalina A (ConA), *Canavalia brasiliensis* (ConBr) e *Cratylia floribunda* (CFL), que possuem mesma especificidade de ligação a glicose/manose, a Onil apresenta menor efeito citotóxico (FAHEINA-MARTINS et al., 2012).

A análise do efeito da lectina Onil sobre formas promastigotas de *L. braziliensis* demonstrou que essa lectina possui efeito inibitório sobre o crescimento das formas promastigotas. Estudos prévios demonstraram que a Conavalina A (ConA) e

Fitohematoglutinina (PHA) apresentam efeito inibitório significativo sobre *L.donovani* (SHUBHANKAR et al., 2011). Recentemente, um estudo realizado por Silva et al. (2014) demonstrou a atividade inibitória da Cramoll 1,4 frente a formas promastigotas de *L.amazonensis* e *L.infantum*.

Em relação ao efeito da lectina sobre formas amastigotas de *L. braziliensis*, nossos dados demonstraram que a Onil não foi capaz de inibir a sobrevivência intracelular das amastigotas no interior dos macrófagos. No entanto, nós demonstramos que o número de amastigotas por células infectadas se manteve constante em relação ao controle independente da concentração de lectina testada. É possível que a Onil ligada aos resíduos de manose na superfície do parasito funcione como uma opsonina, aumentando o reconhecimento destes parasitos pelos fagócitos, favorecendo a infecção. Consistentemente, tem sido demonstrado que uma lectina ligante de manose (Mannose Bind Lectin, MBL) produzida pelo fígado e secretada na corrente sanguínea como um componente da imunidade inata em vertebrados, se liga eficientemente a superfície da *Leishmania*, age como uma opsonina e favorece a infecção de macrófagos (SANTOS et al., 2001). Neste sentido, lectinas que se ligam a manose, tais como a MBL e a Onil podem ter papéis antagônicos, funcionando como uma “espada de dois gumes” a depender do tipo celular e da concentração. Níveis intermediários destas proteínas podem ser mais adequados para a resposta inata aos mais diversos patógenos, incluindo a *Leishmania* (GARRED et al., 2003; SANTOS et al., 2001).

Embora a Onil pareça facilitar a entrada dos parasitos e a infecção de macrófagos, parece que mecanismos de defesa contra patógenos intracelulares estejam atuando para manter o nível de infecção sob controle, explicando a manutenção do número de amastigotas em relação às células não tratadas. Receptores Toll (TLR2 e TLR4) (ORSATTI et al., 2010), assim como os receptores de complemento (CR1 /3) e o receptor de manose presentes na superfície celular de macrófagos estão envolvidos no reconhecimento e fagocitose de diversos microorganismos, incluindo *Leishmania* (AKILOV; KHACHEMOUNE; HASAN, 2007). Consistentemente, estudos demonstraram que o tratamento de macrófagos com própolis aumenta a expressão de receptores do tipo Toll e, por conseguinte a infecção com *Leishmania* (DA SILVA et al., 2013).

Tendo em vista que a lectina Onil apresentou efeito inibitório sobre formas promastigotas de *L. braziliensis*, nós investigamos os possíveis mecanismos de ação e os potenciais alvos intracelulares de ação da lectina neste parasito. Nossas análises ultraestruturais demonstraram que as células tratadas com a Onil apresentaram alterações significativas na sua morfologia. Embora não tenha sido possível identificar uma organela

alvo da ação desta lectina, a presença de formas aberrantes, e um grande número de células em processo de divisão incompleto e citocinese anormal sugerem fortemente que a lectina Onil tenha um efeito mais citostático do que citotóxico. Efeitos semelhantes na divisão celular foram observados com o tratamento de formas sanguíneas e procíclicas de *Trypanosoma brucei* tratadas com Con A e a lectina *Ricinus communis*. Estas lectinas interromperam o curso normal da divisão celular do parasito além de causar alterações no volume celular e da bolsa flagelar, que levaram a morte do parasito. Tendo em vista que a Con A e a Onil possuem a mesma especificidade de ligação é possível que estas lectinas atuem de maneira semelhante tanto em *T. brucei* quanto em *Leishmania* (PEARSON et al., 2000).

Foi também possível observar a presença de alterações no flagelo das promastigotas, principalmente na membrana do axonema, sugerindo que talvez a lectina possa interferir na motilidade do parasito. Além da sua função na motilidade do parasito, o flagelo de *Leishmania* participa de várias outras etapas cruciais durante a infecção. Durante o ciclo de vida de *L. donovani*, por exemplo, formas promastigotas entram no macrófago de forma polarizada através da interação do flagelo com a superfície do macrófago, antes de serem interiorizados em compartimentos lisossomais nestas células. A atividade flagelar persistente leva uma reorientação do flagelo em direção à periferia da célula e resulta em um movimento oscilatório responsável pelo escape do parasito e pelos danos a membrana plasmática (GADELHA; CUNHA-E-SILVA; DE SOUZA, 2013). Assim, alterações no flagelo podem acarretar em prejuízos para a sobrevivência intracelular do parasito, como também diminuir a sua infectividade (DÍAZ et al., 2013; GADELHA; WICKSTEAD; GULL, 2007). Alterações no volume celular e na estrutura da membrana plasmática do parasito também puderam ser melhores observados através da microscopia eletrônica de varredura. Estas alterações são compatíveis com a perda da viabilidade celular e morte celular que podem ser resultado da ligação direta da lectina com glicoproteínas da membrana ou de uma ação indireta através de mecanismos de sinalização ainda não conhecidos.

A fim de aprofundarmos nosso conhecimento sobre o modo de ação da Onil em formas promastigotas de *Leishmania* e seu potencial como indutora de morte celular, nós utilizamos as sondas fluorescentes anexina V (AV) e o iodeto de propídio (IP) para discriminar a morte celular por apoptose ou por necrose, respectivamente. A AV é uma proteína de ligação a fosfatidilserina, a qual nas etapas iniciais da apoptose é exteriorizada na membrana plasmática (BRITA et al., 2014; DESOTI et al., 2012). O IP é um fluorocromo impermeável a células, mas que se liga fortemente aos ácidos nucleicos em células nas quais

permeabilidade seletiva da membrana plasmática encontra-se comprometida (KROEMER; GALLUZZI; BRENNER, 2007). Embora nossas análises por citometria e por microscopia confocal tenha mostrado que a maioria das células encontrava-se viável, uma pequena parcela da população apresentou fenótipo compatível com a morte celular por apoptose tardia/necrose (SIBOV et al., 2012).

Tendo em vista que estudos demonstraram o efeito das lectinas Cramoll 1,4 e Con A, glicose/manose específicas, sobre a redução do potencial de membrana mitocondrial de *T. cruzi* (FERNANDES et al., 2010) e de fibroblastos, respectivamente (KULKARNI et al., 1998), nós investigamos o efeito da Onil sobre o potencial de membrana mitocondrial de *L. braziliensis*. A mitocôndria tem papel fundamental no metabolismo celular ao manter os níveis de ATP, modular o estado redox e a homeostase do cálcio. Entre outras funções da organela destaca-se o seu envolvimento nos processos de indução da morte celular (OTT et al., 2007). A mitocôndria participa das duas principais formas de morte celular, necrose e apoptose, por mecanismos que envolvem o aumento da permeabilidade e alterações no potencial de membrana mitocondrial (SÁNCHEZ, 2009). Variações no potencial de membrana, induzidas por diversos compostos com afinidade pela mitocôndria, estão associadas com a morte de tripanossomatídeos parasitos como *Leishmania* e *T. cruzi* (FONSECA-SILVA et al., 2011; MACEDO-SILVA et al., 2011).

A rodamina 123 é um corante catiônico lipofílico que atravessa facilmente a membrana mitocondrial e se acumula no interior da organela inibindo principalmente o transporte de elétrons e consequentemente retardando a respiração celular (HUANG et al., 2007). Quando a membrana mitocondrial está intacta, o gradiente de concentração de rodamina 123 é determinado pelo potencial diferencial transmembranar, resultando em um acúmulo do corante no interior da membrana. Quando a célula se despolariza, ocorre o mecanismo inverso, há menor distribuição de cargas negativas no interior da membrana e o corante se acumula no exterior da membrana, reduzindo a intensidade da fluorescência (KOOPMANN et al., 2005). Embora os nossos resultados não tenham mostrado alterações no potencial de membrana mitocôndria, a análise por microscopia confocal mostrou mudanças no perfil de marcação das células tratadas em relação às células controles. Enquanto as células controles apresentavam uma marcação homogênea, nas células tratadas a marcação apresentava-se mais pontual sugerindo que a permeabilidade das membranas mitocondriais possa estar alterada. Além do mais, uma discreta hiperpolarização da membrana pode ser observada como um resultado do aumento da atividade mitocondrial em resposta ao estresse



causado pela lectina. Estudos futuros ainda são necessários para elucidar o mecanismo de ação da lectina Onil sobre formas amastigotas e promastigotas de *Leishmania braziliensis*.

Dando continuidade ao nosso trabalho, em uma segunda etapa deste estudo nós analisamos o potencial imunomodulador da lectina Onil. Primeiramente, nós exploramos a capacidade dessa lectina em induzir a produção de óxido nítrico (NO) por macrófagos infectados por *Leishmania braziliensis*. O NO é uma potente molécula envolvida no controle da leishmaniose (DESCHACHT et al., 2012). Os macrófagos produzem diferentes níveis de NO, em resposta a estimulação da enzima óxido nítrico sintetase (iNOS), (THOMAS et al., 2008) o qual é rapidamente convertido em outras espécies reativas de nitrogênio que podem estar envolvidas em mecanismos antipatogênicos (BOGDAN, 2001; DO AMARAL, 2011; MACMICKING; XIE; NATAN, 1997). Embora seja cada vez mais evidente o papel do NO no controle da infecção por *Leishmania*, estudos tem demonstrado que este parasito é capaz de bloquear a produção desta espécie reativa. Em macrófagos, a produção de NO é induzida pela interleucina IFN- $\gamma$  em resposta a uma ativação de células Th1 após o reconhecimento do parasito (KIMA, 2007). No entanto, tem sido demonstrado que a *Leishmania* externaliza fosfatidilserina (FS), mimetizando uma célula em processo apoptótico. Quando os parasitos são internalizados via receptores de FS expressos em macrófagos, estas células são estimuladas a secretar IL-10 e TGF- $\beta$ , que bloqueiam a indução de iNOS e por conseguinte a produção de NO, contribuindo para persistência da infecção e o silenciamento dos macrófagos (KIMA, 2007).

Algumas lectinas tais como Con A (*Concavalina A*), ConBr (*Canavalia brasiliensis*) e a PAA (*Pisum arvense*) são capazes de estimular diretamente macrófagos murinos a produzirem NO (ANDRADE et al., 1999). No entanto, em nosso estudo não houve alteração significativa na produção de NO por células infectadas e tratadas com *L. braziliensis* em relação ao controle infectado não tratado. Nossos achados nos levam a supor que a lectina não é capaz de reverter o efeito inibitório que o parasito exerce sobre as células hospedeiras ou esta lectina esteja estimulando a produção de citocinas como a TGF- $\beta$  e IL-10, as quais são potentes inibidoras da atividade da iNOS. (GANTT et al., 2003). De acordo com Green et al. (1994), TNF- $\alpha$  e TGF- $\beta$ , duas citocinas de efeitos antagônicos, estão envolvidas na regulação da produção do NO por células infectadas com *Leishmania* sp. A ativação do gene do TNF- $\alpha$  atua como um sinal autócrino para produção de INF- $\gamma$ , que amplifica a produção do NO favorecendo a destruição dos parasitos. Por outro lado, se há uma regulação positiva da produção de TGF- $\beta$ , este inibe a ação do NO e INF- $\gamma$  produzidos por macrófagos, células

dendríticas e células natural killer, e conseqüentemente favorece a sobrevivência dos parasitos (OLIVEIRA et al., 2014; YOSHIMURA et al., 2010).

Em um segundo momento, nós investigamos o perfil de citocinas em células de exsudato peritoneal infectado tratado ou não com diferentes concentrações de Onil. Os dados obtidos demonstraram que a lectina não induz alterações significativas na produção de citocinas que foram avaliadas no presente estudo. Uma hipótese para explicar esse resultado é que as altas concentrações da lectina estariam bloqueando a ativação dos macrófagos. De fato, tem sido reportado que macrófagos possuem em sua superfície lectinas do tipo C, as quais funcionam como receptores de manose e além de reconhecerem estes resíduos na superfície patogênicos, também são capazes de disparar cascatas de sinalização que levam tanto a produção de espécies reativas de oxigênio quanto de citocinas pró-inflamatórias como IL-1 $\beta$  via inflamassomas (LEFÈVRE et al., 2013). Tendo em vista que a Onil também é uma lectina ligante de manose, sua presença em altas concentrações poderia competir pela manose presente na superfície do parasito impedindo que os receptores de manose presentes na superfície dos macrófagos possam reconhecer e se ligar a estes resíduos. Neste sentido a Onil poderia estar silenciando tanto atividade microbicida do macrófago, isto é, a produção de NO, quanto da resposta inflamatória elicitada por estas células. Esta hipótese também poderia explicar a não indução de NO em células infectadas e tratadas com Onil.

Também não devemos descartar que a *Leishmania* sp. utiliza mecanismos que auxiliam nas estratégias de escape da defesa do hospedeiro. O parasito libera fatores de sobrevivência intracelulares desde sua interação com a célula do hospedeiro e também é capaz de modular a atividade fagocítica das células do sistema imune (PODINOVSKAIA; DESCOTEAUX, 2015; ROTUREAU et al., 2009). Logo, uma segunda hipótese é que os mecanismos de escape utilizados pelo parasito para bloquear a resposta dos macrófagos são superiores a capacidade das lectinas em ativar as células do exsudato a produzir uma resposta eficiente via citocinas.

Para elucidar esta questão nós investigamos o efeito da lectina Onil em baixas concentrações sobre células de exsudato peritoneal. Nossos resultados demonstraram que o tratamento com 30  $\mu$ g/mL da Onil aumentou significativamente a produção das citocinas IFN- $\gamma$ , IL-17, IL-6 e IL-10. Sabe-se que no sistema imune inato, interações entre moléculas reconhecedoras de carboidratos e receptores presentes na superfície de fagócitos são de extrema importância para a condução de respostas celulares específicas, como a produção de citocinas (PANUNTO-CASTELO et al., 2001). Sendo esta propriedade bastante característica de lectinas com especificidade a manose (CORIOLANO et al., 2012; JEURINK et al., 2008).

Como demonstrado por Silva et al. (2012), a lectina Onil se mostrou uma potente molécula imunomoduladora sobre esplenócitos de camundongos a uma concentração de 10 µg/ mL, com preferencial perfil Th1 devido alta produção de IFN- $\gamma$  e baixa de IL-10.

A IL-17 é uma potente indutora de inflamação nos tecidos e tem sido associada à patogênese de muitas doenças autoimunes experimentais e condições inflamatórias humanas (KORN et al., 2009). Bem como, pode desempenhar um papel de proteção na defesa do hospedeiro contra certos patógenos (JIN; DONG, 2013). A produção desta citocina está diretamente relacionada com as citocinas IL-6 e TGF- $\beta$  (VELDHOEN et al., 2006). A TGF- $\beta$ , por sua vez, limita as ações inibidoras do IFN- $\gamma$  sobre o IL-17, permitindo assim, o desenvolvimento de células Th17 (MANGAN et al., 2006). Essa elevação dos níveis de IL-17, ocasionada pelo tratamento com a Onil, poderia ser explicada devido aumento dos níveis de IL-6 e por possíveis alterações na produção de TGF- $\beta$ .

Visto que lectinas ligantes de manose apresentam diferentes efeitos dependendo do modelo celular em estudo e da concentração utilizada, uma alternativa para melhor aproveitamento dos benefícios da Onil seria através de uma avaliação dos possíveis efeitos imunoestimulantes e adjuvantes. Estudos têm demonstrado que algumas lectinas exercem estes efeitos sobre diversos modelos experimentais, incluindo a leishmaniose tegumentar. Afonso-Cardoso et al. (2007) demonstraram que a lectina ScII associada ou não com o antígeno solúvel de *L. amazonensis* induz uma resposta imune de perfil Th1, esta caracterizada pela produção de IL-12, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ , o que reduziu as taxas de infecção após o desafio com os parasitos. Cardoso et al. (2011) comprovaram que a lectina ArtinM apresenta efeito imunoestimulatório e adjuvante mais forte do que a lectina jacalina na imunização de animais contra neosporose.

Além de potentes imunoestimuladores, as lectinas podem funcionar como ferramentas biológicas na otimização do transporte seletivo de medicamentos através de suas habilidades em mediar processos de mucoadesão, citoadesão e citoinvasão (GABOR et al., 2004). É importante ressaltar que lectinas que realizam bioadesão não se ligam simplesmente a receptores, mas podem ultrapassar barreiras biológicas e promover transporte ativo de moléculas (LEHR, 2000). Andrade et al. (2004) constataram que a Cramoll 1,4 quando encapsulada em lipossomas intensificava a capacidade de inibição de crescimento do sarcoma 180 *in vivo* na terapia do câncer. A lectina jacalina quando conjugada ao hapteno trinitrofenil (TNP) se mostrou como carreadora e potente adjuvante sobre a resposta imune humoral de camundongos imunizados com formas epimastigotas de *T. cruzi* (ALBUQUERQUE et al., 1999; SELL; DA COSTA, 2000). Neste sentido, a Onil pode ser utilizada para aumentar a

especificidade de fármacos convencionais ou de novas drogas encapsuladas por tecidos alvos e melhorar a eficácia do medicamento administrado para o tratamento da LTA ou de outras patologias.

Nossos achados apontam que a Onil apresenta baixo potencial citotóxico, uma ação direta sobre formas promastigotas do parasito e induz efeitos imunomoduladores sobre células do exsudato peritoneal. Logo, não devem ser descartadas possibilidades de estudos futuros com esta lectina a fim de promover uma melhor compreensão do seu mecanismo de ação sobre parasitos do gênero *Leishmania*, além de investigar seu efeito sobre outros modelos biológicos e sua possível utilização como adjuvante ou em sistemas de liberação controlada de fármacos.

## 9 CONCLUSÕES

- a) A lectina Onil apresenta baixa toxicidade sobre células de exsudato peritoneal;
- b) Os dados mostraram que a lectina foi capaz de inibir o crescimento de formas promastigotas de *Leishmania braziliensis* e apresentou-se mais seletiva ao parasito;
- c) A lectina causa alterações ultraestruturais sobre o flagelo de formas promastigotas, bem como impede o processo de divisão celular sugerindo um efeito mais citostático do que citotóxico;
- d) Os dados indicam que a necrose/apoptose tardia podem estar envolvidas na morte celular induzida pela lectina;
- e) A lectina Onil pode funcionar como opsonina facilitando a fagocitose de formas promastigotas de *L. braziliensis* por células fagocíticas;
- f) Em altas concentrações a lectina Onil pode competir com os receptores de ligação de manose presentes na superfície das células fagocíticas bloqueando a sua ativação;
- g) Em baixas concentrações a Onil apresentou efeito imunomodulador sobre células do exsudato, induzindo aumento da produção de IL-10, INF- $\gamma$ , IL-6 e IL-17, e diminuição de TNF- $\alpha$ ;
- h) Os nossos dados sugerem fortemente a utilização da lectina Onil como molécula adjuvante no tratamento da leishmaniose cutânea, bem como em sistemas de entrega controlada de fármacos.

## REFERÊNCIAS

- AFONSO-CARDOSO, S. R. et al. Protective effect of lectin from *Synadenium carinatum* on *Leishmania amazonensis* infection in BALB/c mice. Korean Journal of Parasitology, Seoul, v. 45, p. 255-266, 2007.
- AFONSO-CARDOSO, S. R. et al. Effect of the *Synadenium carinatum* látex lectin (ScLL) on *Leishmania* (Leishmania) *amazonensis* infection in murine macrophages. Experimental Parasitology, New York, v., 128, p. 61–67, 2011.
- AKILOV, O. E.; KHACHEMOUNE, A.; HASAN, T. Clinical manifestations and classification of Old World cutaneous leishmaniasis. International Journal of Dermatology, Philadelphia, v. 46, p. 132–142, 2007.
- ALAVI-NAINI, R.; FAZAELI, A.; O'DEMPSEY, T. Topical treatment modalities for old world cutaneous leishmaniasis: a review. Prague medical report, Prague, v. 113, n. 2, p. 105-118, 2012.
- ALBUQUERQUE, D. A. et al. The adjuvant effect of jacalin on the mouse humoral immune response to trinitrophenyl and *Trypanosoma cruzi*. Immunology Letters, Amsterdam, v. 68, n. 2-3, p. 375-381, 1999.
- ALMEIDA-BIZZO, J. H. et al. Characterization of the pattern of ribosomal protein L19 production during the lifecycle of *Leishmania* spp. Experimental Parasitology, New York, v. 147, p. 60–66, 2014.
- ALVAR, J. et al. Leishmaniasis and poverty. Trends Parasitology. Oxford, v. 22, p. 552–557, 2006.
- ALVAR, J. et al. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. Plos One, San Francisco, v. 7, p. e35671, 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22693548>>. Acesso em: 10 jan. 2016.
- AMANO, K. et al. *Aleuria aurantia* Lectin Exhibits Antifungal Activity against *Mucor racemosus*. Bioscience, Biotechnology and Biochemistry, Tokyo, v. 76, p. 967-970, 2012.
- AMEEN, M. Cutaneous leishmaniasis: advances in disease pathogenesis diagnostics and therapeutics. Clinical and experimental dermatology, Oxford, v. 35, n. 7, p. 699-705, 2010.
- ANDRADE, C. A. S. et al. Antitumor activity of *Cratylia mollis* lectin encapsulated into liposome. International Journal of Pharmaceutics, Amsterdam, v. 278, n. 2, p. 435-445, 2004.
- ANDRADE, J. L. et al. Lectin-induced nitric oxid production. Cellular Immunology, New York, v. 194, p. 98-102, 1999.
- ANDRADE, T. A. S. et al. Perfil epidemiológico dos casos notificados de leishmaniose tegumentar americana no município de Igarassu (PE) no período de 2008 a 2010. Scire Salutis, Aquidabã, v. 2, n. 2, p. 5-15, 2012.

ARAÚJO, L. C. C. et al. Evaluation of cytotoxic and anti-inflammatory activities of extracts and lectins from *Moringa oleifera* seeds. Plos One, San Francisco, v. 8, n. 12, e819773, 2013. Disponível em: <<http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0081973>>. Acesso em: 10 jan. 2016.

ARAÚJO, M.V. et al. Synthesis, leishmanicidal activity and theoretical evaluations of a series of substituted bis-2-hydroxy-1,4-naphthoquinones. Molecules, Basel, v. 19, p. 15180-15195, 2014.

ARGAYOSA, A. M.; LEE, Y. C. Identification of L-fucose-binding proteins from the Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) serum. Fish & Shellfish Immunology, London, v. 27, p. 478–485, 2009.

BACELLAR, O. et al. Interleukin 17 production among patients with American cutaneous leishmaniasis. Journal Infection Disease, Oxford, v. 200, p. 75-78, 2009.

BAILEY, M. S. LOCKWOOD, D. N. J. Cutaneous leishmaniasis. Clinics in dermatology, Philadelphia, v. 25, p. 203-221, 2007.

BALASEGARAM, M. et al. Neglected diseases in the news: a content analysis of recent international media coverage focussing on leishmaniasis and trypanosomiasis. Plos Neglected Tropical Diseases, San Francisco, v. 2, n. 5, e234, 2008. Disponível em: <<http://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0000234>>. Acesso em: 10 jan. 2016.

BAPTISTA, M. S.; WAINWRIGHT, M. Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT) for the treatment of malaria, leishmaniasis and trypanosomiasis. Brasilian Journal of Medical and Biological Research, Ribeirão Preto, v. 44, n. 1, p. 1-10, 2011.

BART, A. et al. Imported leishmaniasis in the Netherlands from 2005 to 2012: epidemiology, diagnostic techniques and sequence-based species typing from 195 patients. Euro Surveillance, Saint- Maurice, v. 18, n. 30, 20544, 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23929178>>. Acesso em: 10 jan. 2016.

BECKERT, W. H.; SHARKEY, M. M. Mitogenic activity of the jack bean (*Canavalia ensiformis*) with rabbit peripheral blood lymphocytes. International Archive Allergy and Applied Immunology, Basel, v. 39, n. 4, p. 337-341, 1970.

BERMAN, J. J. Treatment of leishmaniasis with miltefosine: 2008 status. Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology, London, v. 4, p. 1209-1216, 2008.

BETTELLI, E. et al. Induction and effector functions of Th17 cells. Nature, London, v. 453, p. 1051-1057, 2008.

BILBE, G. Infectious diseases: Overcoming neglect of kinetoplastid diseases. Science, Washington, v. 348, n. 6238, p. 974-976, 2015.

BIRNBAUM, R.; CRAFT, N. Innate immunity and *Leishmania* vaccination strategies. Dermatology Clinics, Philadelphia, v. 29, p. 89–102, 2011.

BOGDAN, C. Nitric oxide and the immune response. Nature Immunology, New York, v. 2, p. 907-916, 2001.

BRASIL. Ministério da Saúde. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana. 3. ed. Brasília, 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. Sistema Nacional de Vigilância em Saúde Relatório de Situação – Pernambuco. Brasília, 2009.

BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana. Brasília, 2007.

BRITA, E.A. et al. Cell death and ultrastructural alterations in *Leishmania amazonensis* caused by new compound 4-Nitrobenzaldehyde thiosemicarbazone derived from S-limonene. BMC Microbiology, London, v. 14, n. 236, 2014. Disponível em: <<http://bmcmicrobiol.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12866-014-0236-0>>. Acesso em: 12 jan. 2016.

CARDOSO, M. R. D. et al. ArtinM, a Dmannose-binding lectin from *Artocarpus integrifolia*, plays a potent adjuvant and immunostimulatory role in immunization against *Neospora caninum*. Vaccine, Kidlington, v. 29, p. 9183–9193, 2011.

CARLSEN, E. D. et al. Permissive and protective roles for neutrophils in leishmaniasis. Clinical & Experimental Immunology, London, v. 182, n. 2, p. 109-118, 2015.

CARVALHO, E. V. M. M. et al. Detection of the first lectin with antimicrobial activity present in Serum of the Amazonian Fish Tambaqui (*Colossoma macropomum*). Fisheries Science, Ottawa, v. 78, p. 1-9, 2012.

CARVALHO, S. M. S. Caracterização da transmissão da Leishmaniose Tegumentar Americana no município de Ilhéus, Zona da Mata do estado da Bahia. 2010. Tese (Doutorado em Saúde Pública) - Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2010.

CASANOVA, M. et al. Characterisation of polyglutamylases in trypanosomatids. International Journal for Parasitology, New York, v. 45, n. 2-3, p. 121-132, 2015.

CASTRO, M. C. A. B. Estudo do papel de linfócitos T CD4 e CD8 e suas citocinas na leishmaniose tegumentar americana. 2013. Tese (Doutorado em Inovação Terapêutica) - Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2013.

CAVALCANTI, D. P. et al. Expression and subcellular localization of kinetoplast-associated proteins in the different developmental stages of *Trypanosoma cruzi*. BMC Microbiology, London, v. 4, p. 9-120, 2009.

CECILIO, P. et al. Deception and manipulation: the arms of *Leishmania*, a successful parasite. Frontiers in Immunology, Lausanne, v. 5, n. 480, 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4202772/>>. Acesso em: 10 jan. 2016.



CHAPPUIS, F. et al. Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? Nature Reviews Microbiology, London, v. 5, p. 873-882, 2007.

CORIOLOANO, M. C. et al. *Rachycentron canadum* (cobia) lectin promoted mitogenic response in mice balb/c splenocytes. Scandinavian Journal of Immunology, Stockholm, v. 76, n. 6, p. 567-572, 2012.

COSTA, D. L. et al. Characterization of regulatory T cell (Treg) function in patients infected with *Leishmania braziliensis*. Human Immunology, New York, v. 74, n. 12, p. 1491-1500, 2013.

COSTA, D. L. et al. Tr-1-Like CD4+CD25-CD127-/lowFOXP3- Cells are the main source of interleukin 10 in patients with cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania braziliensis*. The Journal of Infectious Diseases, Chicago, v. 211, n. 5, p. 708-718, 2015.

COSTA, J. M. L. et al. Modalidades clínicas, diagnóstico e abordagem terapêutica da leishmaniose Tegumentar no Brasil. Gazeta Médica da Bahia, Salvador, v. 79, p. 70-83, 2009.

COSTA, L. et al. Pterocarpanquinone LQB-118 Induces Apoptosis in *Leishmania (Viannia) braziliensis* and Controls Lesions in Infected Hamsters. Plos One, San Francisco, v. 9, n. 10, p. e109672, 2014. Disponível em: <<http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0109672>>. Acesso em: 10 jan. 2016.

CORREIA, M. T. S.; COELHO, L. C. B. B. Purification of a glucose/mannose specific lectin, isoform 1, from seeds of *Cratylia mollis* mart. (Camaratu Bean). Applied Biochemistry and Biotechnology, Clifton, v. 55, p. 261-273, 1995.

CROFT, S. L.; SUNDAR, S.; FAIRLAMB, A. Drug resistance in leishmaniasis. Clinical Microbiology Reviews, Washington, v. 19, n. 1, p. 111-126, 2006.

CUMMINGS, H. E.; TULADHAR, R.; SATOSKAR, A. R. Cytokines and their STATs in cutaneous and visceral leishmaniasis. Journal of Biomedicine & Biotechnology, Cairo, 2010. Disponível em: <<http://www.hindawi.com/journals/bmri/2010/294389/>>. Acesso em: 10 jan. 2016.

DA SILVA, L. C.; CORREIA, M. T. Plant lectins and Toll-like receptors: implications for therapy of microbial infections. Frontiers in Immunology, Lausanne, v. 5, n. 20, 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3909824/>>. Acesso em: 13 jan. 2016.

DA SILVA, M. S. et al. *Leishmania amazonensis* promastigotes present two distinct modes of nucleus and kinetoplast segregation during cell cycle. Plos One, San Francisco, v. 8, n. 11, p. e81397, 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24278433>>. Acesso em: 3 fev. 2016.

DA SILVA, S. S. et al. Brazilian propolis antileishmanial and immunomodulatory effects. Evidence-based complementary and alternative medicine, New York, 2013. Disponível em: <<http://www.hindawi.com/journals/ecam/2013/673058/>>. Acesso em: 21 jan. 2016.

DAWIT, G.; GIRMA, Z.; SIMENEW, K. A Review on biology, epidemiology and public health significance of leishmaniasis. Journal of Bacteriology & Parasitology, Sunnysvale, v. 4, n. 166, 2013. Disponível em: <<http://www.omicsonline.org/a-review-on-biology-epidemiology-and-public-health-significance-of-leishmaniasis-2155-9597.1000166.php?aid=12399>>. Acesso em: 9 dez. 2015.

DE BRITO, M. E. et al. Cutaneous leishmaniasis in northeastern Brazil: a critical appraisal of studies conducted in State of Pernambuco. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, Brasília, v. 45, n. 4, p. 425-429, 2012.

DE MENEZES, J. P. et al. Advances in development of new treatment for leishmaniasis. Biomed Research International, New York, v. 2015, e815023, 2015. Disponível em: <<http://www.hindawi.com/journals/bmri/2015/815023/>>. Acesso em: 22 dez. 2015.

DE SOUZA, W. From the cell biology to the development of new chemotherapeutic approaches against trypanosomatids: dreams and reality. Kinetoplastid Biology and Disease, London, v. 1, n. 3, 2002a. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC119324/>>. Acesso em: 18 dez. 2015.

DE SOUZA, W. Special organelles of some pathogenic protozoa. Parasitology Research, Berlin, v. 88, n. 12, p. 1013-1025, 2002b.

DE SOUZA, W. Electron microscopy of trypanosomes - a historical view. Memorias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v. 103, n. 4, p. 313-25, 2008.

DE SOUZA, W.; ATTÍAS, M.; RODRÍGUEZ, J.C.F. Particularities of mitochondrial structure in parasitic protists (Apicomplexa and Kinetoplastida). International Journal of Biochemistry Cell Biology, Oxford, v. 41, p. 2069–2080, 2009.

DE SOUZA, W.; DE CARVALHO, T. M.; BARRIAS, E. S. Review on *Trypanosoma cruzi*: Host cell interaction. International Journal of Cell Biology, Oxford, v. 10, 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20811486>>. Acesso em: 21 dez. 2015.

DE VRIES, H. J. C.; REEDIJK, S. H.; SCHALLIG, H. D. F. H. Cutaneous leishmaniasis: recent developments in diagnosis and management. American Journal of Clinical Dermatology, New Zealand, v. 16, p. 99–109, 2015.

DESCHACHT, M. et al. Role of oxidative stress and apoptosis in the cellular response of murine macrophages upon *Leishmania* infection. Parasitology, Cambridge, v. 139, n. 11, p. 1429-1437, 2012.

DESOTI, V. C. et al. Trypanocidal action of (–)-Elatol involves an oxidative stress triggered by mitochondria dysfunction. Marine Drugs, Switzerland, v. 10, n. 8, p. 1631–1646, 2012.

DÍAZ, E. et al. *Leishmania braziliensis*: Cytotoxic, cytostatic and chemotactic effects of poly-lysine–methotrexate-conjugates. Experimental Parasitology, New York, v. 135, p. 134–141, 2013.

- DO AMARAL, A. E. Avaliação dos efeitos de complexos polissacarídeos-oxovanádio (iv/v) sobre macrófagos peritoneais de camundongos e *Leishmania in vitro*. 2011. Dissertação (Mestrado em Ciências - Bioquímica) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2011.
- DOCAMPO, R. et al. Acidocalcisomes - conserved from bacteria to man. Nature reviews, London, v. 3, n. 3, p. 251-261, 2005.
- DOCAMPO, R. et al. New insights into roles of acidocalcisomes and contractile vacuole complex in osmoregulation in protists. International Review of Cell and Molecular Biology, Amsterdam, v. 305, p. 69-113, 2013.
- DOCAMPO, R.; MORENO, S. N. The acidocalcisome as a target for chemotherapeutic agents in protozoan parasites. Current Pharmaceutical Design, Schiphol, v. 14, p. 882–888, 2008.
- DOCAMPO, R.; ULRICH, P.; MORENO, S. N. Evolution of acidocalcisomes and their role in polyphosphate storage and osmoregulation in eukaryotic microbes. Philosophical Transactions of the Royal Society, London, v. 365, p. 775–784, 2010.
- DOSTÁLOVÁ, A.; VOLF, P. *Leishmania* development in sand flies: parasite vector interactions overview. Parasites & Vectors, London, v. 5, n. 276, p. 1-12, 2012.
- DOUGALL, A. M. et al. Evidence incriminating midges (Diptera: Ceratopogonidae) as potential vectors of *Leishmania* in Australia. International Journal for Parasitology, New York, v. 41, p. 571-579, 2011.
- DRICKAMER, K.; TAYLOR, M. E. Biology of animal lectins. Annual Review of Cell Biology, Palo Alto, v. 9, p. 237–264, 1993.
- DUTTA, S. et al. Characterization of a galactose binding serum lectin from the Indian catfish, *Clarias batrachus*: Possible involvement of fish lectins in differential recognition of pathogens. Comparative Biochemistry and Physiology, New York, v. 141, p. 76-84, 2005.
- EHRENBERG, J.; AULT, S. Neglected diseases of neglected populations: Thinking to reshape the determinants of health in Latin America and the Caribbean. BMC Public Health, London, v. 5, n. 119, 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1318484/>>. Acesso em: 10 jan. 2016.
- ELMAHALLAWY, E. K. et al. Diagnosis of leishmaniasis. Journal of Infection in Developing Countries, Sassari, v. 8, n. 8, p. 961-972, 2014.
- EWART, K.V. et al. Lectins of the innate immune system and their relevance to fish health. ICES Journal of Marine Science, London, v. 58, p. 380–385, 2001.
- FAHEINA-MARTINS, G. V. et al. Antiproliferative effects of lectins from *Canavalia ensiformis* and *Canavalia brasiliensis* in human leukemia cell lines. Toxicology in Vitro, New York, v. 26, p. 1161–1169, 2012.

- FEIJÓ, D. et al. Dendritic cells and *Leishmania* infection: Adding layers of complexity to a complex disease. Journal of Immunology Research, Baltimore, v. 2016, 2016. Disponível em: <<http://www.hindawi.com/journals/jir/2016/3967436/>>. Acesso em: 5 fev. 2016.
- FERNANDES, M. P. et al. Mechanism of *Trypanosoma cruzi* death induced by *Cratylia mollis* seed lectin. Journal of Bioenergetics and Biomembrane, New York, v. 42, n. 1, p. 69-78, 2010.
- FIDALGO, L. M.; GILLE, L. Mitochondria and trypanosomatids: targets and drugs. Pharmaceutical Research, New York, v. 28, n. 11, p. 2758-2770, 2011.
- FIGUEIREDO, J. G. et al. Antinociceptive activity and toxicology of the lectin from *Canavalia boliviana* seeds in mice. Naunyn Schmiedebergs Archives of Pharmacology, Berlin, v. 380, p. 407-414, 2009.
- FONSECA-SILVA, F. et al. Reactive oxygen species production and mitochondrial dysfunction contribute to quercetin induced death in *Leishmania amazonensis*. PloS One, San Francisco, v. 6, n. 2, p. 1-12, 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3035610/>>. Acesso em: 3 fev. 2016.
- FRÉZARD, F. et al. Glutathione-induced conversion of pentavalent antimony to trivalent antimony in meglumine antimoniate. Antimicrobial Agents & Chemotherapy, Washington, v. 45, p. 913-916, 2001.
- FUJII, Y. et al. MRP1 expressed on Burkitt's lymphoma cells was depleted by catfish egg lectin through Gb3-glycosphingolipid and enhanced cytotoxic effect of drugs. Protein Journal, Dordrecht, v. 31, p. 15-26, 2012.
- GABIUS, H. J. Animal lectins. European Journal of Biochemistry, Berlin, v. 243, n. 3, p. 543-576, 1997.
- GABOR, F. et al. The lectin-cell interaction and its implications to intestinal lectin-mediated drug delivery. Advanced Drug Delivery Reviews, Amsterdam, v. 56, n. 4, p. 459-480, 2004.
- GADELHA, C.; WICKSTEAD, B.; GULL, K. Flagellar and ciliary beating in trypanosome motility. Cell Motility and the Cytoskeleton, New York, v. 64, p. 629-643, 2007.
- GADELHA, A. P.; CUNHA-E-SILVA, N. L.; DE SOUZA, W. Assembly of the *Leishmania amazonensis* flagellum during cell differentiation. Journal of Structural Biology, Orlando, v. 184, n. 2, p. 280-292, 2013.
- GANTT, K. R. et al. Activation of TGF- $\beta$  by *Leishmania chagasi*: Importance for Parasite Survival in Macrophages. Journal of Immunology, Baltimore, v. 170, p. 2613-2620, 2003.
- GARRED, P. et al. Mannose-binding lectin is a disease modifier in clinical malaria and may function as opsonin for *Plasmodium falciparum* infected erythrocytes. Infection and Immunity, Washington, v. 71, n. 9, p. 5245-5253, 2003.

- GIRÓN-PÉREZ, M. I. et al. Immunotoxicity and hepatic function evaluation in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) exposed to diazinon. Fish & Shellfish Immunology, London, v. 23, p. 760-769, 2007.
- GIRÓN-PÉREZ, M. I. et al. Immunologic parameters evaluations in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) exposed to sublethal concentrations of diazinon. Fish & Shellfish Immunology, London, v. 27, p. 383–385, 2009.
- GLUENZ, E.; GINGER, M. L.; MCKEAN, P. G. Flagellum assembly and function during the *Leishmania* life cycle. Current Opinion in Microbiology, New York, v. 13, p. 473-479, 2010.
- GOLLOB, K. J.; VIANA, A. G.; DUTRA, W. O. Immunoregulation in human American leishmaniasis: balancing pathology and protection. Parasite Immunology, Oxford, v. 36, n. 8, p. 367-376, 2014.
- GOMES, M. T. Estudo das Vias de Sinalização Celular Induzidas pelo Fator de Ativação de Plaquetas (PAF) em *Trypanosoma cruzi*. 2007. Tese (Doutorado em Ciências – Microbiologia) - Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2007.
- GONDIM, A. C. S. Atividade antitumoral e antiviral de lectinas de leguminosas (Tribo Phaseolae, Subtribo Diocleinae): ConBr, ConM, DLasiL, e DSclerL. 2014. Tese (Doutorado em Bioquímica) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2014.
- GOTO, H.; LINDOSO, J. A. Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. Expert Review of Anti Infective Therapeutic, London, v. 8, p. 419-433, 2010.
- GREEN, S. J. et al. Nitric Oxide: Cytokine-regulation of nitric oxide in host resistance to intracellular pathogens. Immunology Letters, Amsterdam, v. 43, p. 87-94, 1994.
- HAANSTRA, J. R. et al. Compartmentation prevents a lethal turbo-explosion of glycolysis in trypanosomes. Proceedings of the National Academy Sciences, Washington, v. 105, n. 46, p. 17718-17723, 2008.
- HALDAR, A. K. et al. Use of antimony in the treatment of leishmaniasis: Current status and future directions. Molecular Biology International, London, v. 2011, p. 1-23, 2011.
- HORTA, F. M. et al. Reactive, oxygen species and nitric oxide in cutaneous leishmaniasis. Journal of Parasitology Research, New York, v. 2012, p. 1-11, 2012.
- HUANG, M. et al. Mitochondrial inner membrane electrophysiology assessed by rhodamine-123 transport and fluorescence. Annals of Biomedical Engineering, New York, v. 35, n. 7, p. 1276 – 1285, 2007.
- IQBAL, H. et al. Therapeutic modalities to combat leishmaniasis, a review. Asian Pacific Journal of Tropical Disease, Hong Kong, v. 6, n. 1, p. 1-5, 2016.

- JEURINK, P. V. et al. Immunomodulatory capacity of fungal proteins on the cytokine production of human peripheral blood mononuclear cells. International Immunopharmacology, Amsterdam, v. 8, p. 1124–1133, 2008.
- JIMENEZ, P. et al. Effects of short-term heating on total polyphenols, anthocyanins, antioxidant activity and lectins of different parts of dwarf elder (*Sambucus ebulus* L.). Plant Foods for Human Nutrition, Dordrecht, v. 69, p. 168–174, 2014.
- JIN, W.; DONG, E. IL-17 cytokines in immunity and inflammation. Emerging Microbes and Infections, England, v. 2, e60, 2013. Disponível em: <<http://www.nature.com/emi/journal/v2/n9/full/emi201358a.html>>. Acesso em: 10 fev. 2016.
- JOHN, B.; HUNTER, C. A. Immunology neutrophil soldiers or trojan horses? Science, Washington, v. 321, n. 5891, p. 917–918, 2008.
- KATARA, G. K. et al. Analysis of localized immune responses reveals presence of Th17 and Treg cells in cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania tropica*. BMC Immunology, London, v. 14, n. 52, 2013. Disponível em: <<http://bmcimmunol.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2172-14-52>>. Acesso em: 10 fev. 2016.
- KAWAI, T.; AKIRA, S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: up date on Toll- like receptors. Nature Immunology, New York, v. 11, p. 373–384, 2010.
- KAYE, P.; SCOTT, P. Leishmaniasis: complexity at the host–pathogen interface. Nature Reviews Microbiology, London, v. 9, n. 8, p. 604-615, 2011.
- KHAIRNAR, K. et al. Molecular diagnosis of leishmaniasis at the subgenus and species level. Parasitology Research, Berlin, v. 115, n. 1, 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24189975>>. Acesso em: 8 dez. 2015.
- KIMA, P. E. The amastigote forms of *Leishmania* are experts at exploiting host cell processes to establish infection and persist. International Journal for Parasitology, New York, v. 37, n. 10, p.1087-1096, 2007.
- KOBETS, T. et al. Leishmaniasis: Prevention, parasite detection and treatment. Current Medicinal Chemistry, Schilphol, v. 19, p. 1443-1474, 2012.
- KOOPMANN, W. J. H. et al. Simultaneous quantitative measurement and automated analysis of mitochondrial morphology, mass, potential, and motility in living human skin fibroblasts. International Society for Analytical – Cytology Cytometry, Hoboken, v. 69A, p. 1–12, 2005.
- KORN, T. et al. IL-17 and Th17 cells. Annual Review of Immunology, Palo Alto, v. 27, p. 485-517, 2009.
- KROEMER, G.; GALLUZZI, L.; BRENNER C. Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. Physiological Reviews, Washington, v. 87, n. 1, p. 99-163, 2007.
- KULKARNI, G.V. et al. Role of mitochondrial membrane potencial in Concavaline A induced apoptosis in human fibroblasts. Experimental Cell Research, New York, v. 245, p. 170-178, 1998.

- KUMAR, R.; ENGWERDA, C. Vaccines to prevent leishmaniasis. Nature, London, v. 3, e13, 2014. Disponível em: < <http://www.nature.com/cti/journal/v3/n3/full/cti20144a.html>>. Acesso em: 30 jan. 2016.
- KUMAR, K. K. et al. Biological role of lectins: A review. Journal of Orofacial Sciences, Guntur, v. 4, p. 20-25, 2012.
- LAKHAL-NAOUAR, I. et al. The immunology of a healing response in cutaneous leishmaniasis treated with localized heat or systemic antimonial therapy. PLoS Neglected Tropical Diseases, San Francisco, v. 9, n. 10, e0004178, 2015. Disponível em: <<http://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0004178>>. Acesso em: 2 fev. 2016.
- LAM, Y. W.; NG, T. B. Purification and characterization of rhamnose binding lectin with immunoenhancing activity from grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) ovaries. Protein Expression and Purification, San Diego, v. 26, p. 378-385, 2002.
- LEFÈVRE, L. et al. The C-type lectin receptors dectin-1, MR, and SIGNR3 contribute both positively and negatively to the macrophage response to *Leishmania infantum*. Immunity, Cambridge, v. 38, n. 5, p. 1038-1049, 2013.
- LEHR, C. M. Lectin – mediated drug delivery: the second generation of bioadhesives. Journal of Controlled Release, Amsterdam, v. 65, n. 1, p. 19-29, 2000.
- LEI, H. Y.; CHANG, C. P. Induction of autophagy by concanavalin A and its application in antitumor therapy. Autophagy, Georgetown, v. 3, n. 4, p. 402-404, 2007.
- LIBUSOVÁ, L. et al.  $\gamma$ -Tubulin in *Leishmania*: cell cycle-dependent changes in subcellular localization and heterogeneity of its isoforms. Experimental Cell Research, New York, v. 295, n. 2, p. 375-386, 2004.
- LIESE, J.; SCHLEICHER, U.; BOGDAN, C. The innate immune response against *Leishmania* parasites. Immunobiology, Stuttgart, v. 213, p. 377-387, 2008.
- LIMA, S. C. G. et al. In vitro and in vivo leishmanicidal activity of *Astronium fraxinifolium* (Schott) and *Plectranthus amboinicus* (Lour.) spreng against *Leishmania (Viannia) braziliensis*. BioMedical Research International, New York, v. 2014, 2014. Disponível em: <<http://www.hindawi.com/journals/bmri/2014/848293/>>. Acesso em: 26 jan. 2016.
- LIU, D.; UZONNA, J. E. The early interaction of *Leishmania* with macrophages and dendritic cells and its influence on the host immune response. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, Switzerland, v. 2, n. 83, 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3417671/>>. Acesso em: 4 fev. 2016.
- LIU, B. et al. Antiproliferative activity and apoptosis-inducing mechanism of Concanavalin A on human melanoma A375 cells. Archive Biochemistry Biophysic, New York, v. 482, n. 1-2, p. 1-6, 2009.

- MACEDO-SILVA, S. T. et al. Antiproliferative, ultrastructural, and physiological effects of amiodarone on promastigote and amastigote forms of *Leishmania amazonensis*. Molecular Biology International, London, v. 2011, p. 1-12, 2011.
- MACIEL, E. V. M. et al. Mitogenic activity of *Cratylia mollis* lectin on human lymphocytes. Biologicals, London, v. 32, n. 1, p. 57-60, 2004.
- MACMICKING, J.; XIE, Q.; NATHAN, C. Nitric oxide and macrophage function. Annual Review of Immunology, Palo Alto, v. 15, p. 323–350, 1997.
- MANGAN, P. R. et al. Transforming growth factor-beta induces development of the T(H)17 lineage. Nature, London, v. 441, n. 7090, p. 231-234, 2006.
- MARINHO JÚNIOR, J. F. Infecção natural por leishmania spp. em pequenos mamíferos silvestres e sinantrópicos envolvidos na manutenção da leishmaniose tegumentar americana em área endêmica da zona da mata norte de Pernambuco, Brasil. 2010. Dissertação (Mestrado Acadêmico em Saúde Pública) - Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2010.
- MARR, A. K. et al. Modes of action of leishmanicidal antimicrobial peptides. Future Microbiology, London, v. 7, p. 1047–1059, 2012.
- MARTINS, L. et al. Detecção de DNA de *Leishmania braziliensis* em pacientes. Revista de Saúde Pública, São Paulo, v. 44, n. 3, 2010. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0034-89102010000300023](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-89102010000300023)>. Acesso em: 9 dez. 2015.
- MCGWIRE, B. S.; SATOSKAR, A. R. Leishmaniasis: clinical syndromes and treatment. QJM: An International Journal of Medicine, Oxford, v. 107, n. 1, p. 7-14, 2014.
- MEDEIROS, G. F. et al. In vitro antileishmanial activity and cytotoxicity of essential oil from *Lippia sidoides*. Parasitology International, Amsterdam, v. 60, p. 237–241, 2011.
- MELO, C. M. L. et al. Mitogenic response and cytokine production induced by Cramoll 1,4 lectin in splenocytes of inoculated mice. Scandinavian Journal of Immunology, Oslo, v. 73, n. 2, p. 112–121, 2011.
- MELOS, J. L. R.; ECHEVARRIA, A. Sistemas enzimáticos de tripanossomatídeos como potenciais alvos quimioterápicos. Revista Virtual Química, Niterói, v. 4, n. 4, p. 374-392, 2012. Disponível em: <<http://rvq.s bq.org.br/index.php/rvq/article/viewArticle/260>>. Acesso em: 17 dez. 2015.
- MENNA-BARRETO, R. F.; DE CASTRO, S. L. The double-edged sword in pathogenic trypanosomatids: the pivotal role of mitochondria in oxidative stress and bioenergetics. Biomedical Research International, New York, v. 2014, 2014. Disponível em: <<http://www.hindawi.com/journals/bmri/2014/614014/>>. Acesso em: 17 dez. 2015.
- MERCALDI, G. F. Fosfoglicerato Mutase de Trypanosoma brucei: estrutura e mecanismo de reação. 2010. Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo, São Carlos, SP, 2010.



MICHELS, P. A. et al. Metabolic aspects of glycosomes in trypanosomatids- new data and views. Parasitology Today, Cambridge, v. 16, n. 11, p. 482-489, 2000.

MICHELS, P. A. et al. Metabolic functions of glycosomes in trypanosomatids. Biochimica et biophysica acta, Amsterdam, v. 1763, n. 12, p. 1463-1477, 2006.

MONTEIRO, C. M. C. C. Leishmaniose Tegumentar Americana: Uma abordagem farmacológica. 2009. Dissertação (Mestrado em Gestão, pesquisa e desenvolvimento em tecnologia farmacêutica) - Universidade Estadual de Goiás, Goiânia, 2009.

MORAIS-BRAGA, M. F. B. et al. Phenol composition, cytotoxic and antikinoplastidae activities of *Lygodium venustum* SW. (Lygodiaceae). Experimental Parasitology, New York, v. 134, p. 178–182, 2013.

MORENO, S. N.; DOCAMPO, R. The role of acidocalcisomes in parasitic protists. Journal of Eukaryotic Microbiology, Cincinnati, v. 56, n. 3, p. 208 – 213, 2009.

MOSMANN, T. R. et al. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. Journal of Immunology, Baltimore, v. 136, p. 2348–2357, 1986.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. Journal of Immunological Methods, Amsterdam, v. 16, n. 65, p. 55-63, 1983.

MURBACK, N. D. N. et al. American cutaneous leishmaniasis: clinical, epidemiological and laboratory studies conducted at a university teaching. Anais Brasileiros de Dermatologia, Rio de Janeiro, v. 86, n. 1, p. 55-63, 2011.

MURRAY, H. W. et al. Advances in leishmaniasis. Lancet, London, v. 366, p. 1561–1577, 2005.

MUTISO, J. M. et al. *Leishmania* parasite specific CD4+ synergizes and correlates positively with CD8+ T cells in the production of gamma interferon following immunization of the vervet monkey (*Chlorocebus aethiops*) model. Scientia Parasitologica, Romania, v. 14, n. 1, p. 7-19, 2013.

NOVOA, R. et al. IL-17 and regulatory cytokines (IL-10 and IL-27) in *L. braziliensis* infection. Parasite Immunology, Oxford, v. 33, p. 132–136, 2011.

NUNES, E. S. Cytotoxic effect and apoptosis induction by *Bothrops leucurus* venom lectin on tumor cell lines. Toxicon, Oxford, v. 59, p. 667-671, 2012.

NYLEN, S.; EIDSMO, L. Tissue damage and immunity in cutaneous leishmaniasis. Parasite Immunology, Oxford, v. 34, p. 551-561, 2012.

NYLEN, S.; GAUTAM, S. Immunological perspectives of leishmaniasis. Journal of Global Infectious Diseases, Mumbai, v. 2, n. 2, p. 135-146, 2010.

OKWOR, I.; USONNA, J. Social and economic burden of human leishmaniasis. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, Baltimore, v. 15, n. 0408, 2016.

OLIVEIRA, C. et al. Cytotoxic effects of native and recombinant frutalin, a plant galactose-binding lectin, on Hela cervical cancer cells. Journal of Biomedicine and Biotechnology, Cairo, v. 2011, 2011. Disponível em: <<http://www.hindawi.com/journals/bmri/2011/568932/>>. Acesso em: 19 dez. 2015.

OLIVEIRA, W. N. et al. (2014). The role of inflammatory and anti-inflammatory cytokines in the pathogenesis of human tegumentary leishmaniasis. Cytokine, San Diego, v. 66, n. 2, p. 127-132, 2014.

OPPERDOES, F. R.; COOMBS, G. H. Metabolism of *Leishmania*: Proven and predicted. Trends in Parasitology, Oxford, v. 23, p. 149-158, 2007.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Leishmaniasis. Geneva, 2012. Disponível em: <[http://new.paho.org/hq/index.php?option=com\\_content&view=category&layout=blog&id=3835&Itemid=4098&lang=en](http://new.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=category&layout=blog&id=3835&Itemid=4098&lang=en)>. Acesso em: 25 fev.2015.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Leishmaniasis. Geneva, 2015. Disponível em: <[http://gamapserver.who.int/mapLibrary/Files/Maps/Leishmaniasis\\_2013\\_CL.png?ua=1](http://gamapserver.who.int/mapLibrary/Files/Maps/Leishmaniasis_2013_CL.png?ua=1)>. Acesso em: 5 fev.2016.

ORSATTI, C. L. et al. Propolis immunomodulatory action *in vivo* on toll-like receptors 2 and 4 expression and on pro-inflammatory cytokines production in mice. Phytotherapy Research, London, v. 24, p. 1141–1146, 2010.

OTT, M. et al. Mitochondria, oxidative stress and cell death. Apoptosis, London, v. 12, p. 913-922, 2007.

OWENS, S. D. et al. Transmission of visceral leishmaniosis through blood transfusion from infected English foxhounds to anemic dogs. Journal of the American Veterinary Medical Association, Chicago, v. 219, p. 1076-1083, 2001.

PAIVA, P. M. G. et al. Plant compounds with *Aedes aegypti* larvicidal activity and other biological properties. Bioprocess Sciences and Technology, New York, p. 271-296, 2011.

PANUNTO-CASTELO, A. et al. KM+, a lectin from *Artocarpus integrifolia*, induces IL-12p40 production by macrophages and switches from type 2 to type 1 cell mediated immunity against *L. major* antigens, resulting in BALB/c mice resistance to infection. Glycobiology, Oxford, v. 11, p. 1035-1042, 2001.

PASSOS, S. et al. Intermediate monocytes contribute to pathologic immune response in *Leishmania braziliensis* infections. Journal of Infectious Diseases, Chicago, v. 211, n. 2, p. 274-282, 2015.

PEARSON, T. W. et al. The major cell surface glycoprotein procyclin is a receptor for induction of a novel form of cell death in African trypanosomes *in vitro*. Molecular and Biochemical Parasitology, Amsterdam, v. 111, n. 2, p. 333-349, 2000.

- PEUMANS, W. J.; VAN DAMME, E. J. Lectins as plant defense proteins. Plant Physiology, Lancaster, v. 109, n. 2, p. 347–352, 1995.
- PODINOVSKAIA, M.; DESCOTEAUX, A. *Leishmania* and the macrophage: a multifaceted interaction. Future Microbiology, London, v. 10, n. 1, p. 111–129, 2015.
- PORTMAN, N.; GULL, K. The paraflagellar rod of kinetoplastid parasites: From structure to components and function. International Journal for Parasitology, London, v. 40, n. 2, p. 135–148, 2010.
- PRAJAPATI, V. K. et al. Targeted killing of *Leishmania donovani* in vivo and in vitro with amphotericin B attached to functionalized carbon nanotubes. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, London, v. 66, n. 4, p. 874–879, 2011.
- PRAJAPATI, V. K. et al. An oral formulation of amphotericin B attached to functionalized carbon nanotubes is an effective treatment for experimental visceral leishmaniasis. Journal of Infectious Diseases, Chicago, v. 205, n. 2, p. 333–336, 2012.
- RAPSODI: AGAINST LEISHMANIASIS. Context. [S.l., 2010?]. Disponível em: <<http://www.fp7-rapsodi.eu/150/>>. Acesso em: 10 fev. 2016.
- REITHINGER, R. et al. Cutaneous leishmaniasis. Lancet Infectious Diseases, New York, v. 7, p. 581–596, 2007.
- REVEIZ, L. et al. Interventions for American cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis: a systematic review update. PloS One, San Francisco, v. 8, n. 4, e61843, 2013. Disponível em: <<http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0061843>>. Acesso em: 27 dez. 2015.
- ROBERTS, T. et al. Molecular epidemiology of imported cases of leishmaniasis in Australia from 2008 to 2014. PloS One, San Francisco, v. 10, n. 3, e0119212, 2015. Disponível em: <<http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0119212>>. Acesso em: 22 dez. 2015.
- RODRIGUES, I. A. Natural products: insights into leishmaniasis inflammatory response. Mediators of Inflammation, New York, v. 2015, 2015. Disponível em: <<http://www.hindawi.com/journals/mi/2015/835910/>>. Acesso em: 4 fev. 2016.
- RODRIGUES, V. et al. Impairment of T cell function in parasitic infections. Plos Neglected Tropical Diseases, San Francisco, v. 8, n. 2, e2567, 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24551250>>. Acesso em: 4 fev. 2016.
- ROTUREAU, B. et al. The flagellum-mitogen-activated protein kinase connection in trypanosomatids: a key sensory role in parasite signalling and development? Cellular Microbiology, Oxford, v. 11, n. 5, p. 710–718, 2009.
- ROY, P. et al. Biological targeting and drug delivery in control of leishmaniasis. Journal of cell and animal biology, Cairo, v. 6, n. 6, p. 73–87, 2012.

- RUAS, L. P. et al. ArtinM offers new perspectives in the development of antifungal therapy. Front Microbiology, Amsterdam, v. 3, p. 218-236, 2012.
- RUDIGER, H.; GABIUS, H.J. Plant lectins: occurrence, biochemistry, functions and applications. Glycoconjugate Journal, London, v. 18, n. 8, p. 589-613, 2001.
- RUSSELL, S.; LUMSDEN, J. S. Function and heterogeneity of fish lectins. Veterinary Immunology and Immunopathology, Amsterdam, v. 108, p. 111-120, 2005.
- SACKS, D.; KAMHAWI, S. Molecular aspects of parasite-vector and vector-host interactions in leishmaniasis. Annual Review of Microbiology, Palo Alto, v. 55, p. 453-483, 2001.
- SALAH, B. A. et al. Topical paromomycin with or without gentamicin for cutaneous leishmaniasis. New England Journal of Medicine, Boston, v. 368, p. 524-532, 2013.
- SALAM, N. et al. Leishmaniasis in the Middle East: Incidence and epidemiology. Plos Neglected Tropical Diseases, San Francisco, v. 8, n. 10, e3208, 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4183486/>>. Acesso em: 22 dez. 2015.
- SÁNCHEZ, S. C. M. Efeitos do composto mesoiônico mi-d e da imida cíclica s2.2 sobre mecanismos relacionados à indução de morte celular por via mitocondrial. 2009. Tese (Doutorado em Ciências-Bioquímica) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2009.
- SANTOS, I. K. et al. Mannan-binding lectin enhances susceptibility to visceral leishmaniasis. Infection and Immunity, Washington, v. 69, n. 8, p. 5212-5215, 2001.
- SANTOS, K. K. A. et al. Atividade leishmanicida in vitro de *Eugenia uniflora* e *Momordica charantia*. Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada, Araraquara, v. 34, p. 47-50, 2013.
- SANTOS, T. A. B.; YOSHIOKA, M. K.; MIYAGUI, M. L. Leishmaniose visceral. Publicações em Medicina Veterinária e Zootecnia, Londrina, v. 2, n. 25, p. 260, 2008. Disponível em: < <http://pubvet.com.br/material/Santos260.pdf>>. Acesso em: 19 dez. 2015.
- SAUDAGAR, P.; DUBEY, V. K. Carbon nanotube based betulin formulation shows better efficacy against *Leishmania* parasite. Parasitology International, Amsterdam, v. 63, n. 6, p. 772-776, 2014.
- SAVOIA, D. Recent updates and perspectives on leishmaniasis. Journal of Infection in Developing Countries, Sassari, v. 9, n. 6, p. 588-596, 2015.
- SCHEIBEL, L.W. Antiprotozoários. In: CRAIG, C. R.; STITZEL, R. E. Farmacologia moderna: com aplicações clínicas. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005. p. 572-585.
- SCHNEIDER, A. Unique aspects of mitochondrial biogenesis in trypanosomatids. International Journal Parasitology, Oxford, v. 31, p. 403-415, 2001.

SCHROEDERELY, C. Amplificação e Clonagem da região codificante do gene da enzima glicerol quinase de *Trypanosoma evansi*. 2011. Dissertação (Mestrado) - Universidade do Estado de Santa Catarina, Lages, 2011.

SELL, A. M.; DA COSTA, C. P. Atividades biológicas das lectinas PHA, WGA, jacalina e artocarpina. Acta Scientiarum, Maringá, v. 22, n. 2, p. 297-303, 2000.

SERENO, D.; HOLZMULLER, P.; LEMESRE, J. L. Efficacy of second line drugs on antimonyl-resistant amastigotes of *Leishmania infantum*. Acta Tropica, Basel, v. 74, n. 1, p. 25-31, 2000.

SHARON, N. Lectins: past, present and future. Biochemical Social Transactions, London, v. 36, n. 6, p. 1457-1460, 2008.

SHARON, N.; LIS, H. History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules. Mitogenic and anti-proliferative activity of a lectin from the tubers of Voodoo lily (*Sauromatum venosum*). Glycobiology, Oxford, v. 14, p. 53-62, 2004.

SHUBHANKAR, K.S. et al. *Leishmania donovani*: Assessment of leishmanicidal effects of herbal extracts obtained from plants in the visceral leishmaniasis endemic area of Bihar, India. Experimental Parasitology, New York, v. 127, p. 552–558, 2011.

SIBOV, T. T. et al. Evaluation of umbilical cord mesenchymal stem cell labeling with superparamagnetic iron oxide nanoparticles coated with dextran and complexed with poly-L-lysine. Einsten, São Paulo, v. 10, n. 2, p. 180-188, 2012.

SILVA, C. D. C. et al. Purification and characterization of a mannose recognition lectin from *Oreochromis niloticus* (Tilapia Fish): cytokine production in mice splenocytes. Applied Biochemistry and Biotechnology, Clifton, v. 16, p. 424-435, 2012.

SILVA, C. H. Avaliação dos mecanismos de ação da lectina de *Cratylia mollis* (Cramoll 1,4) sobre *Leishmania* spp. 2014. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2014.

SINGH BAINS, J. S. et al. Mitogenic and anti-proliferative activity of a lectin from the tubers of Voodoo lily (*Sauromatum venosum*). Biophys Acta, Amsterdam, v. 1723, p. 163–174, 2005.

SINGH, R. K.; SRIVASTAVA, A.; SINGH, N. Toll-like receptor signaling: a perspective to develop vaccine against leishmaniasis. Microbiology Research, Germany, v. 167, n. 8, p. 445-451, 2012.

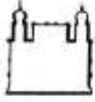
SINGH, H.; SARATHI, S. P. Insight of lectins – A review. International Journal of Scientific & Engineering Research, Jagadhari, v. 3, n. 4, p. 1-8, 2012. Disponível em: <<http://www.ijser.org/researchpaper%5CInsight-of-Lectins-A-review.pdf>>. Acesso em: 27 dez. 2015.

SINGH, N.; KUMAR, M.; SINGH, R. K. Leishmaniasis: Current status of available drugs and new potential drug targets. Asian Pacific Journal of Tropical Medicine, Hong Kong, v. 5, n. 6, p. 485-497, 2012.

- SINGH, S. et al. Changing trends in the epidemiology, clinical presentation, and diagnosis of *Leishmania*-HIV co-infection in India. International Journal of Infectious Diseases, Hamilton, v. 9, p. 103–112, 2014.
- SITOHY, M. Isolation and characterization of a lectin with antifungal activity from Egyptian *Pisum sativum* seeds. Food Chemistry, Barking, v. 104, p. 971-979, 2007.
- SOBRAL-SOUZA, C. E. et al. Cytotoxic and antiparasitic in vitro activities of  $\alpha$ -pinene and carvacrol. Acta Toxicologica Argentina, Buenos Aires, v. 22, n. 2, p. 76-80, 2014.
- SOONG, L. Modulation of dendritic cell function by *Leishmania* parasites. Journal of Immunology, Baltimore, v. 180, p. 4355-4360, 2008.
- SOTO, J. et al. Miltefosine for New World cutaneous leishmaniasis. Clinical Infectious Diseases, Chicago, v. 38, p. 1266-1272, 2004.
- SOTO, J. et al. Efficacy of miltefosine for Bolivian cutaneous leishmaniasis. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, Baltimore, v. 78, n. 2, p. 210–211. 2008.
- SOUZA, J. D. et al. A new *Bauhinia monandra* galactose-specific lectin purified in milligram quantities from secondary roots with antifungal and termiticidal activities. International Biodeterioration & Biodegradation, Barking, v. 65, p. 696-702, 2011.
- SOUZA, M. A. et al. Cytokines and NO in American tegumentary leishmaniasis patients: Profiles in active disease, after therapy and in self-healed individuals. Microbial Pathogenesis, London, v. 57, p. 27-32, 2013.
- SPRONG, T. et al. Mannose-binding lectin is a critical factor in systemic complement activation during meningococcal septic shock. Clinical Infectious Diseases, Chicago, v. 49, p. 1380-1386, 2009.
- SUNG, N.Y. et al. Effect of gamma irradiation on mistletoe (*Viscum album*) lectin-mediated toxicity and immunomodulatory activity. FEBS Letters, Amsterdam, v. 3, p. 106-111, 2013.
- SUNTER, J. D. et al. Dynamic coordination of flagellum and cytoplasmic cytoskeleton assembly specifies cell morphogenesis in trypanosomes. Journal of Cell Science, London, v. 128, p. 1580-1594, 2015.
- TEIXEIRA, D. E. et al. Atlas didático: Ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi*. Rio de Janeiro: Fundação CECIERJ : Consórcio CEDERJ, 2011.
- TEIXEIRA, D. E. et al. Atlas didático: Ciclo de vida da *Leishmania*. Rio de Janeiro: Fundação CECIERJ: Consórcio CEDERJ, 2013.
- TELLEZ-BAÑUELOS, M. C. et al. Oxidative stress in macrophages from spleen of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) exposed to sublethal concentration of endosulfan. Fish & Shellfish Immunology, London, v. 27, p. 105–111, 2009.

- TESSAROLO, N. G. et al. Functional analysis of iron superoxide dismutase-A in wild-type and antimony-resistant *Leishmania braziliensis* and *Leishmania infantum* lines. Parasitology International, Amsterdam, v. 64, p. 125–129, 2015.
- THOMAS, D. D. et al. The chemical biology of nitric oxide: implications in cellular signaling. Free Radical Biology & Medicine, New York, v. 45, p. 18-31, 2008.
- TIUMAN, T. S. Recent advances in leishmaniasis treatment. International Journal of Infectious Diseases, Hamilton, v. 15, n. 8, p. 525-532, 2011.
- TSIVILEVA, O. M. et al. Isolation and characterization of *Lentinus edodes* (Berk.) singer extracellular lectins. Biochemistry, Washington, v. 73, p. 1154-1161, 2008.
- TUON, F. F. et al. Toll-like receptors and leishmaniasis. Infection and Immunity, Washington, v. 76, n. 3, p. 866–872, 2008.
- UEDA-NAKAMURA, T.; ATTIAS, M.; DE SOUZA, W. Megasome biogenesis in *Leishmania amazonensis*: a morphometric and cytochemical study. Parasitology Research, Berlin, v. 87, n. 2, p. 89-97, 2001.
- UEDA-NAKAMURA, T.; ATTIAS, M.; DE SOUZA, W. Comparative analysis of megasomes in members of the *Leishmania mexicana* complex. Research in Microbiology, Paris, v. 158, n. 5, p. 456-462, 2007.
- VASTA, G. R. et al. Structural and functional diversity of the lectin repertoire in teleost fish: Relevance to innate and adaptive immunity. Development Comparative Immunology, Elmsford, v. 35, n. 12, p. 1388–1399, 2011.
- VEDRENNE, C. et al. Two related subpellicular cytoskeleton-associated proteins in *Trypanosoma brucei* stabilize microtubules. Molecular Biology of the Cell, Bethesda, v. 13, n. 3, p. 1058–1070, 2002.
- VELDHOEN, M. et al. TGF beta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. Immunity, Cambridge, v. 24, n. 2, p. 179-189, 2006.
- YOSHIMURA, A. et al. Cellular and molecular basis for the regulation of inflammation by TGF-beta. Journal of Biochemistry, Tokyo, v. 147, p. 781-92, 2010.
- ZANG, J. et al. Effects of soybean agglutinin on body composition and organ weights in rats. Archives of Animal Nutrition, Abingdon, v. 60, p. 245-253, 2006.
- ZERPA, O.; CONVIT, J. Diffuse cutaneous leishmaniasis in Venezuela. Gazeta Médica da Bahia, Salvador, v. 79, n. 3, p. 30-34, 2009.
- ZUO, Z. et al. Purification and characterization of a novel plant lectin from *Pinellia ternata* with antineoplastic activity. SpringerPlus, Switzerland, v. 1, n. 13, 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3725870/>>. Acesso em: 21 dez. 2015.

## ANEXO A – Certificado de Aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães

### COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

#### Certificado de Aprovação

Certificamos que o projeto intitulado: **Prospecção de novas drogas contra leishmaniose: Estudo da atividade de lectinas sobre *Leishmania sp.***, protocolado sob nº 77/2014 pelo (a) pesquisador (a) Regina Célia Bressan Queiroz de Figueiredo. Está de acordo com a Lei 11.794/2008 e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/Fundação Oswaldo Cruz (CEUA/CPqAM) em 21/08/2015. **Este projeto está aprovado e terá licença emitida após regularização desta CEUA junto ao CONCEA.**

Quantitativo de Animais Aprovados	
Espécie	Nº de Animais
Camundongo Balb/c machos	820

We certify that project entitled **Prospecção de novas drogas contra leishmaniose: Estudo da atividade de lectinas sobre *Leishmania sp.*** Protocol nº 77/2014, coordinated by Regina Célia Bressan Queiroz de Figueiredo. Is according to the ethical principles in animal research adopted by the Brazilian law 11.794/2008 and so was approved by the Ethical Committee for Animal Research of the Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/Fundação Oswaldo Cruz on August, 21, 2015. **This project has been approved and its license will be issued upon regularization of this CEUA by the CONCEA.**

Recife (PE, Brazil) August, 21, 2015.

Drª Sheilla Andrade de Oliveira  
Coordenadora CEUA/CPqAM

Drª Sheilla Andrade de Oliveira  
Coordenadora da Comissão de Ética  
no Uso de Animais – CEUA  
Mat. SIAPE 1554975  
e-mail: sheilla@cpqam.fiocruz.br  
CPqAM/Fiocruz