



UFBA

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ**



FIOCRUZ

Curso de Pós-Graduação em Patologia

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ADJUVANTE DE LECTINAS
VEGETAIS NA VACINAÇÃO CONTRA LEISHMANIOSE
CUTÂNEA EXPERIMENTAL**

CLARISSA ROMERO TEIXEIRA

Salvador - Bahia - Brasil

2002



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ**

Curso de Pós-Graduação em Patologia

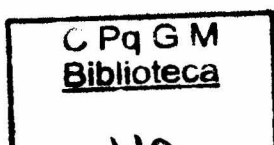
**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ADJUVANTE DE LECTINAS
VEGETAIS NA VACINAÇÃO CONTRA LEISHMANIOSE
CUTÂNEA EXPERIMENTAL**

Clarissa Romero Teixeira

Orientador: Dr. Manoel Barral-Netto

Dissertação apresentada para a obtenção do grau de Mestre em Patologia, área de concentração em Patologia Experimental.

**Salvador – Bahia
2002**



Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca do CPqGM /FIOCRUZ
Salvador - Bahia.

Teixeira, Clarissa Romero
T266a Avaliação do potencial adjuvante de lectinas vegetais na vacinação
contra leishmaniose cutânea experimental / Clarissa Romero Teixeira. —
Salvador: Universidade Federal da Bahia / Centro de Pesquisas Gonçalo
Moniz / FIOCRUZ, 2002.
79p.:ils.

Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental)- Universidade
Federal da Bahia, 2002.

1. Leishmania. 2. Adjuvantes imunológicos. 3. Lectinas. I. Título.

CDU 593.1:577.27

210281

PHL
UFV 1388

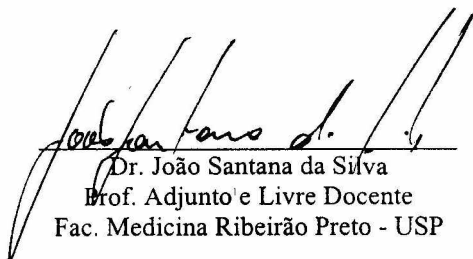
593.1:577.27

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ADJUVANTE DE LECTINAS VEGETAIS NA VACINAÇÃO
CONTRA LEISHMANIOSE CUTÂNEA EXPERIMENTAL

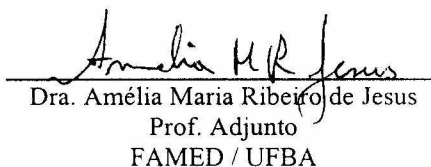
CLARISSA ROMERO TEIXEIRA

FOLHA DE APROVAÇÃO

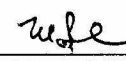
COMISSÃO EXAMINADORA



Dr. João Santana da Silva
Prof. Adjunto e Livre Docente
Fac. Medicina Ribeirão Preto - USP



Dra. Amélia Maria Ribeiro de Jesus
Prof. Adjunto
FAMED / UFBA



Dr. Manoel Barral-Netto
Professor Titular
FAMED / UFBA

*Aos meus pais Carlos Augusto e
Eliana por todo o carinho e incentivo.*

AGRADECIMENTOS

Dr. Manoel Barral-Netto

Pela orientação, dedicação e incentivo.

Dra. Aldina Barral

Pelo apoio e incentivo.

Dr. Benildo Cavada e Dr. Márcio Ramos

Pela amizade, apoio, sugestões e pelo fornecimento das lectinas para realização deste trabalho.

Meus pais e toda minha família

Por todo o carinho, apoio e incentivo em todos os momentos.

Régis Bernardo Brandim Gomes

Por todo carinho, amizade e incentivo todos os dias.

Johan Van Weyenbergh e Cláudia Ida Brodskyn

Pelas sugestões feitas ao longo da realização do trabalho.

Maria Jânia Teixeira

Pela amizade, incentivo e pelo apoio na realização deste trabalho.

Cecília Beatriz Favali, Dirceu Costa, Lílian Afonso e Viviane Conceição

Pela amizade e auxílio na realização dos experimentos com células humanas.

José Carlos Cardoso e Lucyvera Imbroinise

Pela atenção e ajuda nos trabalhos de secretaria do laboratório.

Rosália Meire Oliveira da Silva e Rosecarla Oliveira da Silva

Pela atenção e ajuda em todos os momentos do curso de Mestrado.

Sílvia Cardoso

Pela amizade e ajuda na realização de ELISA para detecção de citocinas humanas.

Colegas e amigos dos Laboratórios de Imuno-regulação e Microbiologia (LIMI) e Imunoparasitologia (LIP)

Pela amizade e apoio no convívio dos laboratórios.

Ana Maria Fiscina Sampaio

Pela normatização da dissertação.

Adelvany Boa Morte e Marcela Feitosa

Pela atenção e auxílio nas pesquisas bibliográficas.

Colegas e amigos do mestrado

Pelo apoio e amizade ao longo do curso.

Todos os pesquisadores, professores e funcionários do CPqGM/FIOCRUZ

Pelo auxílio, incentivo e disponibilidade do espaço físico e recursos que possibilitaram a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	VIII
RESUMO.....	XI
ABSTRACT.....	XII
1 INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Lectinas.....	1
1.1.1 Aspectos gerais.....	1
1.1.2 Propriedades biológicas.....	5
1.2 Leishmaniose.....	10
1.2.1 Considerações gerais.....	10
1.2.2 Imunopatogênese das leishmanioses.....	11
1.2.3 Tratamento.....	16
1.2.4 Vacinas.....	18
2 OBJETIVOS.....	24
2.1 Objetivo geral.....	24
2.2 Objetivos específicos.....	24
3 MATERIAL E MÉTODOS.	25
3.1 Lectinas.....	25
3.2 Preparo do antígeno solúvel de <i>Leishmania amazonensis</i> (SLA).....	26
3.3 Animais.....	26
3.4 Parasitas.....	27
3.5 Esquema e imunização com lectinas e antígeno SLA.....	28
3.5.1 Esquema I.....	28

3.5.2 Esquema II.....	29
3.6 ELISA para determinação da produção de IgG total anti- <i>Leishmania</i> dos animais imunizados.....	30
3.7 Estímulo de cultura de CMSP de doadores normais com lectinas.....	31
3.8 Estímulo de células esplênicas de animais normais com lectinas.....	31
3.9 ELISA para detecção de IFN- γ e IL-4 murinas.....	32
3.10 ELISA para detecção de citocinas humanas.....	33
3.10.1 Dosagem de IFN- γ	33
3.10.2 Dosagem de IL-10.....	34
3.10.3 Dosagem de IL-4.....	35
3.11 Reação de hipersensibilidade tardia (DTH).....	37
3.12 Análise estatística.....	37
4 RESULTADOS.....	38
4.1 Estimulação de CMSP humanas com lectinas.....	38
4.2 Estimulação de células esplênicas murinas com lectinas.....	40
4.3 Avaliação da resposta humoral após a imunização com as lectinas ConBr, PAA e/ou antígeno SLA.....	42
4.4 Imunização de camundongos BALB/c e C57BL/6 com as lectinas ConBr ou PAA e/ou antígeno SLA e desafio com <i>Leishmania amazonensis</i>	44
4.5 Avaliação da resposta humoral após a imunização com a lectina KM(+) e/ou antígeno SLA de <i>Leishmania amazonensis</i>	47
4.6 Imunização de camundongos BALB/c e C57BL/6 com a lectina KM(+) e/ou antígeno SLA e desafio com <i>Leishmania amazonensis</i>	49
4.7 Reação de hipersensibilidade tardia (DTH).....	52
5 DISCUSSÃO.....	56

6 CONCLUSÕES.....	66
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	67

LISTA DE ABREVIATURAS

ABL : lectina de *Agaricus bisporus*.

AIDS : síndrome da imunodeficiência humana.

APC : célula apresentadora de antígeno.

BSA : albumina bovina sérica.

CD : "cluster" de diferenciação.

cDNA : DNA complementar.

CMSP : células mononucleares do sangue periférico.

ConA : lectina de *Canavalia ensiformis*.

ConBr : lectina de *Canavalia brasiliensis*.

CpG-DNA : seqüências de DNA imunoestimulatórias.

CTLA-4 : antígeno 4 citotóxico para linfócitos ("lymphocyte cytotoxic antigen four").

DGL : lectina de *Dioclea grandiflora*.

DMEM : "Dulbecco's Modified Eagle Medium".

DMSO : dimetil sulfóxido.

DNA : ácido desoxiribonucléico.

DO : densidade óptica.

DTH : reação de hipersensibilidade retardada ("delayed type hypersensitivity").

EDTA : ácido etileno diaminotetracético.

ELISA : ensaio imunoenzimático ("enzyme immunosorbent assay").

GM-CSF : fator estimulante do crescimento de colônia de granulócitos.

HIV : vírus da imunodeficiência humana.

HRP : "horseradish peroxidase".

IFN- γ : interferon gama.

Ig : imunoglobulina.

IL : interleucina.

INOS : óxido nítrico sintase induzível.

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

KC : quimiocina murina homóloga ao oncogene relacionado ao crescimento- α humano (GRO- α).

KLH : “keyhole limpet hemocyanine”.

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

LCD : Leishmaniose cutânea difusa.

LMC : Leishmaniose mucocutânea.

LPG : lipofosfoglicano.

LTA : Leishmaniose tegumentar americana.

LTB4 : leucotrieno.

LV : Leishmaniose visceral.

MAH : lectina de *Maackia amurensis*.

MBL : lectina ligante de manose.

MCAF : fator ativador e quimiotático para monócitos.

MHC II : complexo principal de histocompatibilidade principal II.

NK : células “natural killer”.

NO : óxido nítrico.

PAA : lectina de *Pisum arvense*.

PBS: tampão salina fosfato (“phosphate buffer saline”).

PGE2 : prostaglandina E2.

PHA : lectina de *Phaseolus vulgaris*.

PNA : lectina de amendoim.

RCA : lectina de *Ricinus communis*.

SBF : soro bovino fetal.

SLA : antígeno solúvel de *Leishmania amazonensis*.

TGF- β : fator de crescimento tumoral beta.

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

TNF- α : fator de necrose tumoral alfa.

VAA : lectina de *Viscum album*.

WGA : lectina de gérmen de trigo

WHO: Organização Mundial de Saúde ("World Health Organization").

RESUMO

AValiação DO POTENCIAL ADJUVANTE DE LECTINAS VEGETAIS NA VACINAÇÃO CONTRA LEISHMANIOSE CUTÂNEA EXPERIMENTAL. CLARISSA ROMERO TEIXEIRA. As leishmanioses são causadas por parasitas do gênero *Leishmania*, importantes parasitas intracelulares de macrófagos que se manifestam em formas clínicas diferentes. A resposta imune celular é a resposta protetora efetiva contra parasitas intracelulares. Já foi demonstrado que algumas lectinas de plantas foram capazes de induzir a produção, por células mononucleares murinas, de óxido nítrico (NO), interferon gama (IFN- γ) e IL-12, moléculas importantes em uma resposta celular. No presente trabalho nós investigamos o potencial imunoestimulatório de três lectinas vegetais e avaliamos a possibilidade de utilizá-las como adjuvantes em um modelo de vacinação contra leishmaniose cutânea experimental. Para avaliar o potencial estimulatório das lectinas, células esplênicas murinas e CMSP humanas foram estimuladas em cultura com as lectinas *Canavalia brasiliensis* (ConBr), *Pisum arvense* (PAA) ou *Artocarpus integrifolia* (KM(+)) e os sobrenadantes coletados para determinação da produção de IFN- γ , IL-10 e IL-4. Todas as lectinas foram capazes de induzir a secreção de IFN- γ e uma pequena quantidade de IL-4 por células esplênicas murinas e IFN- γ , IL-10 e IL-4 por CMSP humanas. Para avaliação do potencial adjuvante, camundongos C57BL/6 e BALB/c foram imunizados com as lectinas ConBr, PAA ou KM(+) com o antígeno solúvel de *Leishmania amazonensis* (SLA) ou com o antígeno ou lectinas isoladamente. Antes do desafio com *Leishmania amazonensis* BA125, os soros dos animais imunizados foram coletados para determinação de IgG anti-*Leishmania*. A avaliação da infecção foi monitorada semanalmente pela medida da pata infectada. Apenas os animais imunizados com a lectina PAA e PAA+SLA produziram altos títulos de IgG anti-*Leishmania*. A resposta celular foi avaliada por uma reação de hipersensibilidade tardia (DTH), realizada dez semanas após o desafio. Não foi possível relacionar a resposta de DTH a um perfil de resistência. Apenas os animais imunizados com a lectina KM(+) foram protegidos parcialmente contra posterior infecção. Apesar das lectinas ConBr, PAA and KM(+) terem demonstrado estimular a secreção de moléculas capazes de direcionar uma resposta imune celular, nossos resultados sugerem que as lectinas testadas não possuem atividade adjuvante na vacinação contra *Leishmania amazonensis*.

Palavras-chave: *Leishmania*, adjuvantes imunológicos, lectinas.

ABSTRACT

EVALUATION OF PLANT LECTIN'S POTENTIAL AS ADJUVANTS IN EXPERIMENTAL CUTANEOUS LEISHMANIASIS VACCINATION. CLARISSA ROMERO TEIXEIRA. Leishmaniasis is caused by parasites of the genus *Leishmania*, intracellular parasites of macrophages that cause a great variety of diseases. A cell-mediated immune response has shown to be protective against intracellular parasites. It has been demonstrated that plant lectins are capable of inducing nitric oxide (NO), gamma interferon (IFN- γ) and interleukin 12 (IL-12) production, which are key molecules in a cellular immune response by murine mononuclear cells. In the present work, we investigate the possibility of using lectins from *Canavalia brasiliensis* (ConBr), *Pisum arvense* (PAA) or *Artocarpus integrifolia* (KM(+)) as adjuvants to protect against *Leishmania* infection. Murine spleen cells and human PBMC were stimulated in culture with one of the lectins and their supernatants were collected for IFN- γ , IL-10 and IL-4 determination. All lectins were capable of inducing IFN- γ , but a low IL-4 secretion from murine spleen cells. The lectins tested were also capable of inducing IFN- γ , IL-10 and IL-4 secretion from human PBMC. For evaluation of adjuvant potential C57BL/6 and BALB/c mice were immunized with ConBr, PAA or KM(+) lectins, in the presence or absence of soluble *Leishmania amazonensis* antigen (SLA). Before challenge with *Leishmania amazonensis* BA125 strain, serum was obtained for anti-*Leishmania* IgG level determination. The evolution of infection was monitored by weekly measurements of footpad thickness. Only the animals immunized with PAA lectin and PAA+SLA produced higher titers of specific IgG. Moreover, no protection of the mice immunized with either ConBr or PAA lectins was achieved. Delayed type hypersensitivity (DTH) was also assessed ten weeks after challenge. The DTH response could not be related to a resistance profile in the immunized animals. Only the animals immunized with KM(+) lectin alone were partially protected against further infection. Although, ConBr, PAA and KM(+) lectins have shown to induce the production of molecules capable of directing a cell-mediated immune response, our results suggest that the lectins tested are not useful adjuvants to vaccination against *Leishmania amazonensis*.

Key words: *Leishmania*, immunological adjuvants, lectins.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Lectinas

1.1.1 Aspectos gerais

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

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

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

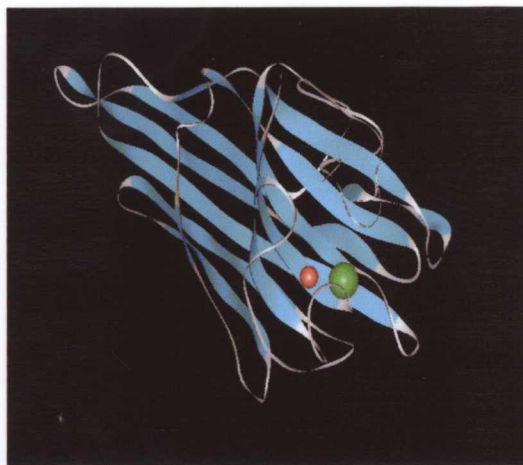
As lectinas das famílias *Leguminosae* e *Euphorbiaceae* constituem um vasto grupo de lectinas vegetais já bem estudadas com relação a estrutura, especificidade e possíveis funções e aplicações. A família *Leguminosae* é a que possui o maior número de lectinas isoladas, tornando-se o grupo de lectinas mais bem caracterizado. Muitas das lectinas desta família são constituídas de 2 ou 4 subunidades de 25-30 kDa, cada uma contendo um sítio de interação para carboidratos com a mesma especificidade e a interação com carboidratos normalmente requer a presença de íons divalentes, sendo o cálcio e manganês os mais comuns. O equilíbrio da formação de dímeros e tetrâmeros entre estas subunidades é pH dependente. As subunidades podem ser formadas por uma única cadeia polipeptídica mas em alguns casos, como o das lectinas da tribo *Viceae*, pode ser formada por duas cadeias: uma leve denominada alfa (5-7 kDa) e uma pesada denominada beta (15-19 kDa) (SHARON et al., 1990; SHARON, 1993; ROUGÉ et al., 1987). A figura 1.1 mostra um esquema da estrutura das lectinas *Canavalia ensiformis* (ConA), a primeira a ter sua estrutura tridimensional

estabelecida, e as lectinas *Canavalia brasiliensis* (ConBr) e *Artocarpus integrifolia* (KM(+)).

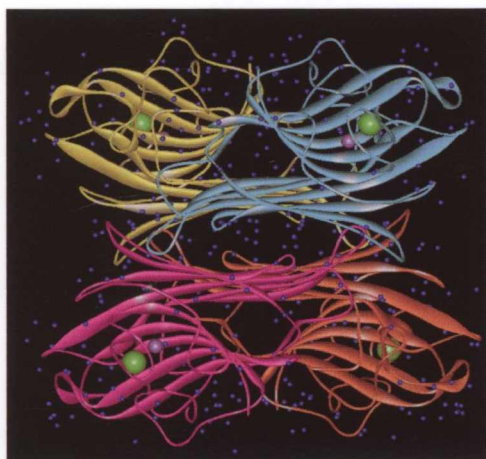
Muitas destas lectinas compartilham características estruturais, como seqüência de aminoácidos, estrutura secundária e conformação tridimensional (RAMOS et al., 1996). Apesar do alto grau de homologia entre estas lectinas na seqüência primária de aminoácidos e no sítio de interação com carboidratos, elas apresentam diferenças significantes nos efeitos, causados pela interação com seus ligantes específicos (GOMES et al., 1994; BARRAL-NETTO et al., 1992; RODRIGUES et al., 1992; BENTO et al., 1993).

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

(a)



(b)



(c)

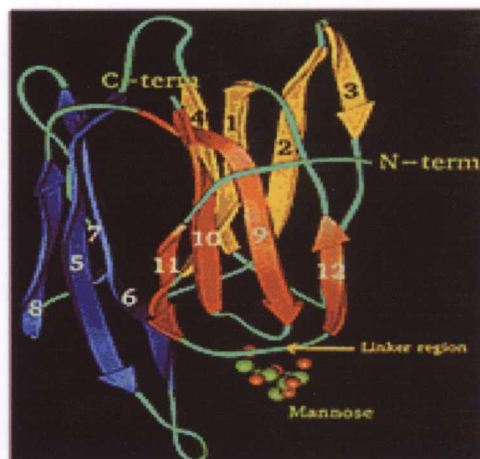


Figura 1.1 Representação esquemática da estrutura resolvida por raio X das lectinas (a)ConA, (b)ConBr, (<http://www.cermav.cnrs.fr/databank/lectine/>) e (c)KM(+), (PRATAP et al., 2002).

1.1.2 Propriedades biológicas

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

As células de mamíferos possuem em sua superfície uma grande variedade de glicoconjugados, com diferenças muitas vezes discretas de uma célula para outra. A ligação de lectinas com diferentes tipos celulares pode desencadear inúmeros efeitos biológicos, como a indução de respostas inflamatórias e secreção de citocinas. A lectina ligante de manose (MBL), presente no soro, tem a capacidade de ativar o sistema complemento devido a sua similiaridade com o componente C1q, também é capaz de interagir com macrófagos, induzindo a

secreção de TNF- α (BAJTAY et al., 2000). A lectina WGA, apesar de não ter atividade mitogênica, mostrou-se capaz de induzir a secreção de IL-12 e IFN- γ de forma independente de linfócitos T e B *in vitro* em uma cultura de células mononucleares murinas (MURAILLE et al., 1999). Monócitos humanos estimulados com galectina-3 (ϵ BP/Mac-2) produziram uma alta quantidade de IL-1, amplificando uma possível resposta inflamatória (JENG et al., 1994). O estímulo de células esplênicas de camundongo em cultura com a lectina *Pisum sativum* (PSA) resultou em produção de TNF- α , IFN- γ e atividade proliferativa. O estímulo com esta mesma lectina *in vivo* aumentou a expressão de CD69 e CD122 em linfócitos, evidenciando o potencial imunoestimulatório desta lectina (LIMA et al., 1999). O tratamento de camundongos BALB/c com a lectina ConBr induziu a produção de IFN- γ por células esplênicas *in vitro* e *in vivo*, mostrando-se presente no soro dos animais tratados (BARRAL-NETTO et al., 1996). Esta lectina e as lectinas PAA e DGL foram capazes de estimular diretamente macrófagos murinos e linfócitos *in vitro* a produzir NO, e *ex vivo* em animais tratados com as lectinas (ANDRADE et al., 1999).

A lectina de *Artocarpus integrifolia*, a jacalina, além de ser um potente mitógeno e de ativar células B a secretar imunoglobulinas, liga-se especificamente a IgA, sendo capaz de isolar esta imunoglobulina por cromatografia de afinidade (ROQUE-BARREIRA et al., 1985, 1986) e de ativar especificamente linfócitos T CD4⁺ (LAFONT et al., 1997). Outra lectina também isolada de *Artocarpus integrifolia*, a KM(+), estimulou a migração de neutrófilos na cavidade peritoneal de ratos de forma semelhante a IL-8 (SANTOS-DE-OLIVEIRA et al., 1994). Enquanto

a KM(+) exerce um efeito pró-inflamatório, outras lectinas glicose-manose específicas inibiram a migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal de camundongos induzida por carragenina e fMLP (ASSREUY et al., 1997), mostrando-se moléculas importantes no estudo e caracterização de oligossacarídeos na superfície celular, essenciais para o processo de migração celular no início de uma resposta inflamatória (ALENCAR et al., 1999). Esta ação anti-inflamatória também foi observada em um modelo de cistite hemorrágica em camundongos induzida por ciclofosfamida, onde os animais pré-tratados com as lectinas *Dioclea grandiflora* (DGL) e *Dioclea violacea* (DVL) por via endovenosa apresentaram uma redução da infiltração leucocitária na bexiga de forma dose dependente (ASSREUY et al., 1988). Várias destas lectinas vegetais também demonstraram induzir a liberação de histamina por mastócitos e basófilos de forma não-tóxica para as células (FERREIRA et al., 1996).

A capacidade destas proteínas de reconhecer glicanos complexos também possibilita discriminar diversos tipos celulares em diversos estágios de diferenciação e maturação. O cDNA que codifica o domínio de reconhecimento de carboidratos da lectina de *Maackia amurensis* (MAH) foi randomicamente mutado e as lectinas mutantes, apesar de continuarem sendo reconhecidas por um anticorpo anti-MAH, foram capazes de distinguir entre eritrócitos de animais diferentes e de formas diferentes (YIM et al., 2001). A lectina de amendoim (PNA), que tem uma maior afinidade em interagir com células imaturas do processo de diferenciação de células humanas linfóides (COOPER et al., 1984) e monócitos imaturos (ROSENBERG et al., 1985; KILPATRICK et al., 1990), mostrou-se capaz de diferenciar os tipos celulares da forma mais grave de um tipo de leucemia

linfoblástica (HAAR et al., 1985). Algumas lectinas podem inclusive indicar o prognóstico de neoplasias, como a lectina do molusco *Helix pomatia*, que tem sido empregada na avaliação do grau de agressividade de carcinoma gástrico em humanos, onde há uma relação direta entre o grau de malignidade e a interação desta lectina com a célula maligna (OKUYAMA et al., 1998). Algumas lectinas não só reconhecem células tumorais, como também são capazes de inibir seu crescimento. A lectina de *Ricinus communis* (RCA) inibe o crescimento de câncer epidermóide em humanos e a lectina isolada de *Viscum album* (VAA) apresenta atividade citotóxica contra melanoma urotelial e glioma. A VAA parece agir através da liberação de citocinas que possam ativar células NK (LENARTZ et al., 1998; HEINY et al., 1998) e através da indução de apoptose de células tumorais e inibição da angiogênese (PARK et al., 2001).

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

Várias lectinas também já foram testadas quanto a seu potencial adjuvante na imunização contra diversos patógenos. A lectina VAA mostrou um grande potencial adjuvante na imunização intranasal de camundongos com o antígeno ovalbumina, resultando em uma alta produção de IgA e IgG específicos na

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

1.2 Leishmaniose

1.2.1 Considerações gerais

O gênero *Leishmania* inclui várias espécies de protozoários, parasitas pertencentes à ordem Kinetoplastida e causadores das leishmanioses (LAINSON, 1987). As leishmanioses são endêmicas em várias partes do mundo, onde cerca de 400 milhões de indivíduos estão expostos à infecção em 88 países. Estima-se ocorrer 600.000 novos casos de leishmaniose todo ano, com uma prevalência de 12 milhões de indivíduos (OMS, 2002). Com a emergência da AIDS, a co-infecção HIV/*Leishmania* tem sido observada em regiões endêmicas (WOLDAY et al., 2001; PINTADO et al., 2001).

Os agentes do gênero *Leishmania* são parasitas intracelulares obrigatórios no hospedeiro mamífero, podendo causar uma ampla variedade de manifestações clínicas. Os fatores que determinam as formas clínicas das leishmanioses não estão ainda bem esclarecidas, porém, possivelmente dependem da interação inicial da espécie de *Leishmania* com determinada virulência, da resposta imune e da susceptibilidade genética do hospedeiro (CERF et al., 1987; PEARSON & SOUSA, 1996, BLACKWELL, 1996).

A *Leishmania* no hospedeiro invertebrado é encontrada no intestino de fêmeas dos vetores (gênero *Phlebotomus* na Europa e *Lutzomyia* nas Américas) e é transmitida ao hospedeiro mamífero após inoculação na pele das formas promastigotas metacíclicas flageladas durante o repasto sanguíneo. Os parasitas invadem macrófagos após interação de glicoconjugados de superfície, sendo o lipofosfoglicano (LPG) o mais importante entre eles (ELHAY et al., 1990) e

especificamente o epítipo P5b, no caso da *L. major* (KELLEHER et al., 1992), com receptores na superfície de células macrofágicas, principalmente CR1 (DA SILVA et al., 1989). No meio intracelular, transformam-se em formas amastigotas sem flagelo e multiplicando-se por divisão binária no vacúolo parasitóforo até o rompimento do macrófago parasitado, o qual libera novas formas amastigotas que invadem novas células hospedeiras. As células parasitadas contendo formas amastigotas podem ainda ser recapturadas por flebotomíneos durante uma alimentação sanguínea. Neste caso, as células rompem-se e as formas amastigotas transformam-se novamente em formas promastigotas no intestino do vetor, completando o ciclo.

As manifestações clínicas no homem podem variar desde uma forma tegumentar com a formação de uma lesão ulcerada única, que pode desaparecer espontaneamente sem tratamento (Leishmaniose tegumentar americana, LTA), ou uma forma cutânea disseminada sem ulceração (Leishmaniose cutânea difusa, LCD) até formas graves com destruição da mucosa (Leishmaniose mucocutânea, LMC) ou ainda visceral (Leishmaniose visceral, LV), a qual pode ser fatal se não diagnosticada e tratada apropriadamente.

1.2.2 *Imunopatogênese das Leishmanioses*

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

A resolução da infecção está associada a expansão de clones de linfócitos T CD4⁺ do tipo Th1 que produzem IFN- γ e IL-2 (MURRAY et al., 1983; SCOTT et al., 1989, 1991), enquanto que a susceptibilidade é mediada por IL-4, IL-3 e IL-10, que levam a uma supressão da resposta Th1 com predominância de clones de linfócitos TCD4⁺ Th2 (HEINZEL et al., 1989).

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

No processo de estabelecimento de resposta protetora, a IL-12 tem um papel inicial importante, por ser a citocina-chave neste mecanismo de diferenciação e ativação da resposta dos linfócitos T CD4⁺ do tipo Th1 (SYPEK et al., 1993; VIEIRA et al., 1994; GHALIB et al., 1995), quando presente nos momentos iniciais da infecção (REINER et al., 1994). Esta citocina é produzida por células mononucleares em camundongo C3H resistentes quando infectados por *L.*

major (VIEIRA et al., 1994) e é essencial para a recuperação da produção de IFN- γ e proliferação linfocitária em indivíduos curados de calazar (BACELLAR et al., 2000).

Outro tipo de resposta também pode ser montada, levando à progressão da doença. Esta resposta é mediada por IL-4, que leva a uma supressão da resposta Th1 com predominância de clones de linfócitos T CD4⁺ Th2. Neste perfil de resposta a ativação de macrófagos pelo IFN- γ é inibida pela presença das citocinas IL-3 e IL-4, produzidas por linfócitos T com perfil Th2 (LIEW et al., 1989). Outra citocina com perfil Th2, a IL-13, é expressa em altas quantidades na lesão de indivíduos infectados com *L. guyanensis*, ocorrendo simultaneamente a uma redução da expressão do receptor IL-12R β 2, o que caracteriza uma resposta predominante Th2 (BOURREAU et al., 2001). A reconstituição de camundongos imunodeficientes com a linhagem H1A com perfil Th1 (produtoras de IL-2 e IFN- γ) ou com a linhagem U1A com perfil Th2 (produtoras de IL-4 e IL-5) de linfócitos T CD4⁺ antes da infecção com *L. major* resultou em resistência e progressão da doença, respectivamente (HOLADAY et al., 1991). Em outro trabalho, camundongos 129/Sv, com “background” de resistência e transgênicos para o gen da IL-4, tornaram-se susceptíveis a infecção por *L. major*, produzindo quantidades altas de IL-4 e reduzidas de IFN- γ (LEAL et al., 1993). A IL-3, outra citocina Th2, favoreceu a multiplicação dos parasitas em outros tecidos, exacerbando a lesão em camundongos BALB/c infectados com *L. major* e tratados com esta citocina, favorecendo o aparecimento de parasitas no linfonodo de camundongos CBA resistentes (FENG et al., 1988). Camundongos deficientes de

IL-6, infectados com *L. major* produzem uma quantidade de citocinas com perfil Th2 mais reduzida do que os animais normais, apesar de desenvolverem lesão e carga parasitária comparáveis (TITUS et al., 2001).

Os momentos iniciais, que envolvem a resposta imune inata, são muito importantes na posterior definição da resposta imune adquirida à presença do parasita. A própria penetração do parasita na célula hospedeira leva a alterações que podem favorecer a sobrevivência da *Leishmania*. Na resposta protetora, o IFN- γ , produzido por linfócitos TCD4⁺ e células NK nos momentos iniciais da infecção (SCOTT et al., 1993, SCHARTON et al., 1993), ativa macrófagos levando à morte dos parasitas via produção de óxido nítrico e radicais de oxigênio, um dos mecanismos leishmanicidas resultantes de uma resposta protetora (MURRAY et al., 1983; GREEN et al., 1990). A presença do LPG, produzido pelo parasita e presente em sua superfície, reduz a produção de radicais hidroxil e ânions superóxido (CHAN et al., 1989). A expressão da NO sintase induzível (iNOS) na lesão e no linfonodo de camundongos C57BL/6 resistentes ocorre mais rapidamente e em maior quantidade do que em camundongos susceptíveis como o BALB/c, onde foi encontrada uma expressão aumentada de TGF- β , um potente inibidor da iNOS (STENGER et al., 1994).

A penetração da *Leishmania* também pode levar a alterações no metabolismo do ácido araquidônico e também inibir a apoptose, mecanismos que podem favorecer a permanência do parasita na célula hospedeira (MOORE & MATLASHEWSHI, 1994). A cultura *ex vivo* de esplenócitos de camundongos infectados com *L. major* resultou em uma alta produção da prostaglandina E₂

(PGE₂) que foi responsável por uma depressão de IFN- γ e TNF- α e aumento de IL-4. Um aumento do leucotrieno LTB₄, capaz de recrutar linfócitos T já comprometidos para um fenótipo Th1 ou Th2, também demonstrou-se mais intenso na cultura de células esplênicas de camundongos infectados (MILANO et al., 1996). Macrófagos de camundongos BALB/c infectados com diferentes cepas de *L. major* levam a uma expressão diferenciada de quimiocinas JE e KC, que são importantes no processo de atração de macrófagos ativados e neutrófilos para evitar a expansão da infecção. Os macrófagos infectados com uma cepa avirulenta (Lc79) tiveram uma expressão transitória (primeiras horas) e bem mais evidente destas quimiocinas, enquanto que a infecção com uma cepa virulenta (Lc5) levou a uma redução da expressão destas quimiocinas, sugerindo um mecanismo de escape do parasita para o estabelecimento da infecção (RACOOSIN et al., 1997).

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

modificação na expressão de moléculas de MHC classe II (FRUTH et al., 1993). Neste momento de sensibilização de linfócitos, as moléculas co-estimulatórias exercem um papel importante no estabelecimento de uma resposta efetiva. Em camundongos “knockout” para CD28 e infectados com *L. major*, a interação CD40/CD40L não é necessária para o desenvolvimento de uma resposta protetora, sugerindo o envolvimento de outras moléculas capazes de regular a expressão de IL-12 (PADIGEL et al., 2001). O CTLA-4, expresso em linfócitos T ativados, tem importância no processo de produção de TGF- β na infecção por *Leishmania*, favorecendo a infecção (GOMES et al., 2001).

1.2.3 Tratamento

A utilização de antimoniais pentavalentes, como stibogluconato de sódio e o antimoniato de meglumina, ainda são a forma de tratamento mais utilizada (BERMAN, 1997), apesar da ocorrência de efeitos colaterais importantes (GASSER et al., 1994) e do longo período de tratamento. Recentemente, o stibogluconato de sódio mostrou potencializar a produção de radicais tóxicos de oxigênio em camundongos infectados por *Leishmania infantum* que podem contribuir para seu efeito leishmanicida (RAIS et al., 2000). A ocorrência de resistência ao tratamento convencional também é um fator que dificulta o controle das leishmaniose. A anfotericina B permanece como a droga de segunda escolha, apesar de sua toxicidade ocasional (SUNDAR et al., 2001). Atualmente, a mitelfosina de uso oral encontra-se em processo de testes clínicos e vem

demonstrando bons resultados com efeitos colaterais mais brandos (MOHAN & SETE, 2000; SOTO et al., 2001; FISCHER et al., 2001)

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

Em alguns casos obteve-se efeitos contrários ao que seria normalmente esperado. Um exemplo seria o tratamento de camundongos BALB/c infectados com *L. major* com GM-CSF recombinante diariamente. Apesar desta citocina ser um potente ativador de macrófagos *in vitro* e de induzir a proliferação de

macrófagos e granulócitos *in vitro* e *in vivo*, o tratamento com esta citocina resultou em uma lesão ainda mais evidente do que nos animais não tratados que apresentaram carga parasitária mais elevada no linfonodo e baço (GREIL et al., 1988). Contudo, há o relato do caso de um paciente com lesão mucosa refratária ao tratamento com antimoniais que respondeu quando tratado com uma combinação de antígenos recombinantes e GM-CSF como adjuvante com resolução da lesão (BADARO et al., 2001). Em um estudo duplo-cego, pacientes com lesão cutânea tratados com stibogluconato de sódio via parenteral e GM-CSF na lesão, apresentaram uma cura mais rápida em relação a pacientes tratados apenas com estibogluconato e salina (ALMEIDA et al., 1999).

1.2.4 Vacinas

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

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

Parasitas atenuados, como um antígeno preparado com *Leishmania amazonensis* mortas pelo calor utilizados em testes clínicos em voluntários,

resultou em uma conversão no teste de Montenegro, na proliferação de linfócitos específicos e produção de IFN- γ (VELEZ et al., 2001; DE LUCA et al., 2001). Imunizações com antígeno total de diversas espécies de *Leishmania* já foram realizados obtendo-se apenas uma proteção parcial pós-desafio (BARRAL-NETTO et al., 1987). A cepa avirulenta UR6 de *L. donovani* quando utilizada na imunização de camundongos resultou em proteção frente ao desafio com uma cepa virulenta (SRIRUPA et al., 2000). A *Leishmania major* knockout do gene *DHFR-TS*, ou promastigotas irradiadas, já foram testadas em modelos de imunização experimentais (VERAS et al., 1999; HOWARD et al., 1984). Camundongos imunizados com esta cepa *DHFR-TS*⁻ demonstraram o desenvolvimento de uma lesão bem mais reduzida quando desafiados com *Leishmania amazonensis* do que os animais controles (VERAS et al., 1999).

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

As vacinas de segunda geração envolvem as imunizações com antígenos recombinantes. Os testes com o antígeno recombinante *Lcr1* demonstraram estimular células esplênicas de camundongos infectados com *Leishmania chagasi* a secretar IFN- γ e não IL-4 ou IL-10 (WILSON et al., 1995). Os recombinantes LmSTI1 e TSA induziram uma excelente proteção em camundongos BALB/c e macacos *Rhesus* imunizados (CAMPOS-NETO et al., 2001). Uma proteína

recombinante A2, um dos fatores de virulência para a sobrevivência do parasita, utilizada na imunização de camundongos, conferiu proteção contra o desafio com *L. donovani* associada a uma resposta mista com produção de anticorpos específicos para A2 e proliferação de esplenócitos com produção de IFN- γ após estímulo com o antígeno (GHOSH et al., 2001).

Mais recentemente, seqüências de DNA imunoestimulatórias, mais conhecidas como seqüências CpG, capazes de ativar macrófagos e células dendríticas e induzir a secreção de IL-12 e IFN- γ (CHACE et al., 1997; LIPFORD et al., 1997; ROMAN et al., 1997; SPARWASSER et al., 1998; STACEY & BLACKWELL, 1999; GURUNATHAN et al., 2000) têm sido utilizados, tendo uma ação interessante na promoção de uma resposta celular protetora nas leishmanioses (STACEY et al, 1999), sendo inclusive capazes de inibir um quadro de resposta Th2 já bem estabelecido quando administrados vinte dias após a infecção por *Leishmania major* (ZIMMERMANN et al., 1998).

A proteína LACK (receptores para a cinase C homólogos da *Leishmania*), que possui papel imunopatogênico que favorece a infecção no modelo murino (MAILLARD et al., 2001; TORRENTERA et al., 2001), tem sido alvo de vários testes como possível antígeno para vacinas utilizando a própria proteína ou a seqüência de DNA que a codifica. Uma vacina da seqüência p36/LACK utilizada na imunização de camundongos não resultou em proteção contra o desafio com *L. major* ou *L. donovani* apesar de uma forte resposta Th1 específica ao parasita (MELBY et al., 2001). Seqüências de DNA codificando o antígeno mostraram conferir imunidade aos camundongos imunizados (GURUNATHAN et al., 1997) e

outras seqüências codificando proteinases de cisteína de *Leishmania major*, CPa e CPb, foram utilizadas como um coquetel de imunização, conferindo uma proteção com longa duração (RAFATI et al., 2001).

Um estudo comparativo de vacinas de DNA codificando gp63 e CPb de *L. mexicana* ou gp46 de *L. amazonensis* ou LACK de *L. major*, utilizados numa imunização de camundongos BALB/c, resultou em uma alta produção de IgG específica para *Leishmania* e proteção parcial após desafio de todos os plasmídeos menos o que codificava LACK (DUMONTEIL et al., 2000).

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

Uma vacina baseada em promastigotas mortas e BCG de *Mycobacterium bovis* como adjuvante mostrou ser ineficaz em um ensaio com voluntários no Irã (MOMENI et al., 1998). A imunização de camundongos C57BL/6 com uma mistura de antígenos expressos em amastigotas, testando diferentes adjuvantes

(IL-12, Detox, lipídio A 4'-monofosforil, QS-21, BCG de *Mycobacterium bovis* e *Corynebacterium bovis*), resultou em uma proteção mais eficaz nos animais imunizados com os antígenos associados a IL-12 ou a Detox, evidenciando que a utilização de adjuvante mais adequado pode direcionar a uma resposta potetora. A geração do vírus *Vaccinia* recombinante expressando os antígenos p36/LACK de *L. infantum* com ou sem IL-12 para imunização de camundongos BALB/c com posterior desafio com *L. major* resultou em proteção parcial destes camundongos e na ativação de uma resposta tipicamente Th1 (GONZALO et al., 2001). Imunizações com a glicoproteína GP36, utilizando saponina como adjuvante, ou com a glicoproteína ligante de fucose manose (FML), também com saponina, protegeram camundongos contra leishmaniose visceral (DE SOUZA et al., 2001; PALATNIK-DE-SOUZA et al., 1994). O GM-CSF, utilizado como adjuvante com uma vacina de *Leishmania* (Leishvacin) na imunização de voluntários, resultou em uma resposta imune específica mais evidente com a produção de um DTH positivo na maioria dos voluntários (FOLLADOR et al., 2002).

Levando em consideração a complexidade dos eventos envolvidos na resposta imune específica a um determinado antígeno, desde o recrutamento e ativação de células apresentadoras de antígeno, até a maturação e expansão de linfócitos T CD4⁺ Th1, é provável que a associação de moléculas adjuvantes e, não apenas um adjuvante com um único mecanismo de ação, seria necessário para a obtenção de um efeito adjuvante Th1 ideal (MOINGEON et al., 2001).

A limitação do tratamento e a possibilidade de uma melhor compreensão dos mecanismos que possam levar à cura da doença elevaram o interesse em

testar moléculas que possuem capacidade de modular a resposta inicial têm recebido uma atenção especial.

As lectinas animais e vegetais têm sido intensivamente testadas quanto a seus possíveis papéis biológicos, demonstrando ser moléculas com aplicação como ferramentas biotecnológicas em potencial. Alguns destes efeitos biológicos, como a produção de NO por macrófagos induzida pelas lectinas PAA e ConBr (ANDRADE et al, 1999); a indução da secreção de IFN- γ e redução da lesão em camundongos BALB/c infectados com *Leishmania amazonensis* tratados com ConBr (BARRAL-NETTO et al., 1996); indução da produção de IL-12p40 *in vitro* por macrófagos murinos e proteção contra a infecção por *Leishmania major* conferida após imunização com a lectina KM(+) (PANUNTO-CASTELO et al., 2001). despertaram nosso interesse em testar estas lectinas.

Neste trabalho, as lectinas ConBr, PAA e KM(+) foram testadas quanto a capacidade de estimular *in vitro* células humanas e murinas (produção de citocinas) e seu potencial como adjuvantes foi avaliado na imunização de camundongos susceptíveis e resistentes contra a infecção experimental por *Leishmania amazonensis*.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Testar o potencial de lectinas como adjuvante em imunoproteção contra leishmaniose cutânea experimental.

2.2 Objetivos específicos

2.2.1 Avaliar o potencial imunoestimulatório (estímulo da produção de citocinas) das lectinas de *Canavalia brasiliensis* (ConBr), de *Pisum arvense* (PAA) e de *Artocarpus integrifolia* (KM(+)) em cultura de células esplênicas murinas e CMSP humanas;

2.2.2 Testar o efeito adjuvante das lectinas ConBr, PAA e KM(+) associadas ao antígeno bruto de *Leishmania amazonensis* (SLA) na proteção de camundongos C57BL/6 e/ou BALB/c contra a infecção por *Leishmania amazonensis*.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Lectinas

A lectina de sementes de *Canavalia ensiformis* (ConA) foi obtida comercialmente (Sigma/ St.Louis, EUA) e as lectinas *Canavalia brasiliensis* (ConBr) e *Pisum arvense* (PAA) foram obtidas de sementes de acordo com técnicas previamente descritas por Moreira e colaboradores (1984) e por Silva e colaboradores (2000) e foram fornecidas pelo BioMol-Lab. da Universidade Federal do Ceará. A lectina KM(+) foi purificada a partir do extrato salino de semente de *Artocarpus integrifolia*, como descrito anteriormente (SANTOS-OLIVEIRA *et al.*, 1994) e fornecida pelo Lab. De Chemie Biol. da Universidade de Ciências e Tecnologia de Lille/França. Todas as lectinas foram preparadas como solução de 1mg/ml em meio RPMI incompleto ou em salina estéril e estocada a -20°C até o momento do uso. A pureza de todas as preparações de cada uma das lectinas foi monitorada por eletroforese em gel de poliacrilamida em presença de SDS e 2-mercaptoetanol seguindo a técnica descrita por Laemli e colaboradores (1970) adaptada para o uso em placas.

3.2 Preparo do antígeno solúvel de *Leishmania amazonensis* (SLA)

Formas promastigotas da cepa BA125 na fase estacionária de crescimento, cultivadas em meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Sigma/St.Louis, EUA) foram colhidas e centrifugadas (ajustadas para cerca de 1×10^9 /ml) e os sedimentos congelados a -70°C em tubos eppendorf. Posteriormente, a cada 10 ml de sedimento foi adicionado 1ml de PBS pH 7,2 10x concentrado, 2ml de tampão EDTA 0,5M e 100 μl de leupeptina 10mg/ml (Sigma/St.Louis, EUA). Em seguida são feitos ciclos de congelamento (em nitrogênio líquido) e descongelamento (em banho-maria a 37°C) dos tubos. Após esta etapa o lisado (mantido em gelo) foi submetido a sonicação em uma frequência de 70 Hz por 30 segundos com intervalos de repouso de 1 minuto. Esta última etapa foi repetida três vezes. O material foi então centrifugado por 10 minutos a 3.000g e depois por 30 minutos a 12.000g. Após centrifugação, o sobrenadante foi filtrado em filtros de 0,45 μ e depois 0,22 μ (Millipore). Por último a concentração de proteína total foi determinada (protein assay kit, Sigma diagnostics/St.Louis, EUA).

3.3 Animais

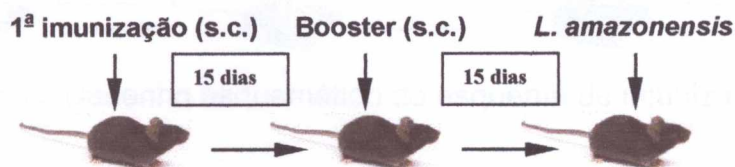
Foram utilizados camundongos BALB/c e C57BL/6 machos e/ou fêmeas, com a idade de 4 a 6 semanas no início dos experimentos. Os animais foram obtidos do Biotério do Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz (CPqGM-FIOCRUZ), onde foram mantidos com água e ração comercial balanceada *ad libitum*.

3.4 Parasitas

Leishmania amazonensis cepa BA125 foi inoculada no coxim plantar de camundongos C57BL/6, e após 3 semanas de infecção os animais foram sacrificados e os parasitas colhidos por maceramento do tecido subcutâneo das patas infectadas em condições assépticas e cultivados a 28°C em meio bifásico composto por NNN (base de agar sangue) e uma fase líquida com Schneider (Schneider's insect medium, Sigma/St.Louis, EUA) contendo 10% de soro bovino fetal (SBF, GibcoBRL), 2% de urina humana estéril e gentamicina (Sigma/St.Louis, EUA). Ao atingirem a fase estacionária eram realizadas novas passagens *in vitro*. Em torno da quarta ou quinta passagem, os parasitas eram reinoculados em camundongos normais para manutenção da virulência da cepa.

3.5 Esquemas de imunização com lectinas e antígeno SLA

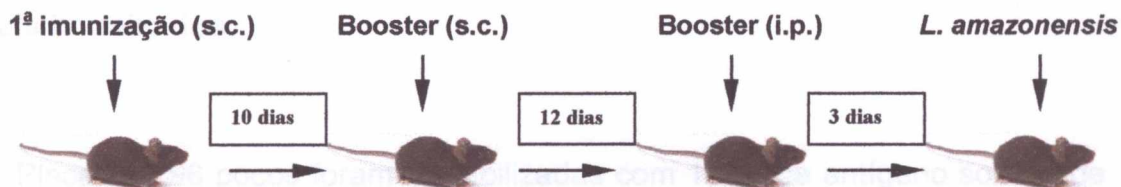
3.5.1 Esquema I



Quadro 1: Desenho esquemático do esquema de imunização I.

Os camundongos C57BL/6 ou BALB/c eram divididos em 4 grupos, cada grupo com 7 animais. Cada grupo foi imunizado com 100 μ l de cada tratamento por animal: grupo I – salina (controle); grupo II – SLA (10 μ g); grupo III – lectina (0,5 ou 50 μ g); grupo IV – SLA (10 μ g) + lectina (0,5 ou 50 μ g). No dia zero, os camundongos foram imunizados na base da cauda (via subcutânea). Após 15 dias da primeira imunização os animais receberam um reforço pela mesma via, dose e volume. Os animais foram infectados após quinze dias do reforço no coxim plantar traseiro direito com 1x10⁶ promastigotas em fase estacionária de crescimento de *Leishmania amazonensis* cepa BA125. O aumento da lesão foi avaliado pela diferença entre a média das medidas das patas contralaterais não infectadas.

3.5.2 Esquema II



Quadro 2: Desenho esquemático do esquema de imunização II.

Os camundongos C57BL/6 ou BALB/c eram divididos em 4 grupos, cada grupo com 7 animais. Cada grupo foi imunizado com 50 μ l de cada tratamento por animal: grupo I – salina (controle); grupo II – SLA (10 μ g); grupo III – lectina (0,5 ou 50 μ g); grupo IV – SLA (10 μ g) + lectina (0,5 ou 50 μ g). No dia zero, os camundongos foram imunizados no coxim plantar. Após dez dias da primeira imunização, os animais receberam o primeiro reforço nas doses e volume, como anteriormente descrito, sendo utilizada a via subcutânea no flanco esquerdo. Após doze dias da última inoculação, os camundongos receberam outro reforço nas mesmas doses e volume, por via intraperitoneal. Os animais foram infectados após três dias do último reforço no coxim plantar traseiro direito com 1×10^6 promastigotas em fase estacionária de crescimento de *Leishmania amazonensis* cepa BA125. O aumento da lesão foi avaliado pela diferença entre a média das medidas das patas contralaterais não infectadas.

3.6 ELISA para determinação da produção de IgG total anti-*Leishmania* dos animais imunizados.

Placas de 96 poços foram sensibilizadas com 100µl de antígeno solúvel de *Leishmania* (SLA) diluído em tampão carbonato pH 9,6, durante a noite a -4°C. Após sensibilização, a placa foram lavadas com o tampão de lavagem (PBS +0,05% de tween) três vezes e então bloqueadas com 250µl de PBS + 0,1% tween por duas horas à 37°C. A placa era novamente lavada três vezes. Os soros foram diluídos (1/100) no tampão de incubação (PBS tween 0,05% + leite desnatado). O soro de um camundongo normal não-infectado foi utilizado como controle negativo e o soro de um camundongo cronicamente infectado com *L.amazonensis* foi utilizado como controle positivo. A placa era incubada com os soros diluídos durante a noite a 4°C. No dia seguinte a placa era lavada quatro vezes. O conjugado (anti-mouse IgG alkaline phosphatase conjugate, Sigma ImmunoChemicals/St.Louis, EUA) era adicionado na diluição de 1/1000, 100µl por poço e incubado a 37°C por 45 minutos. Em seguida, a placa foi lavada mais cinco vezes. O substrato (p-nitrophenyl phosphate tablets disodium, SigmaChemicals/St.Louis, EUA) era então adicionado na concentração de 1mg/ml, 100µl poço e incubado a temperatura ambiente durante 30 minutos. A reação era parada com 50µl de NaOH 3M. A leitura foi realizada a 405 nm em espectrofotômetro.

3.7 Estímulo de cultura de CMSP de doadores normais com lectinas

As CMSP de pelo menos cinco doadores foram obtidas por gradiente de Ficoll-Hypaque (Histopaque, Sigma cell culture/St.Louis, EUA) de “buffy coats” cedidos pelo Hemocentro da Bahia (HEMOBA). As células foram ajustadas para uma concentração de 5×10^5 células/poço e distribuídas em placa de 96 poços em triplicata, com a adição de PAA (10, 50 ou $100 \mu\text{g/ml}$), ConBr (10, 50 ou $100 \mu\text{g/ml}$), KM(+) (0,5, 1,0, 10, 50 ou $100 \mu\text{g/ml}$). Após 24 horas do início da cultura o sobrenadante foi coletado para dosagem de IL-4 e 72 horas após para dosagem de IFN- γ e IL-10.

3.8 Estímulo de células esplênicas de camundongos normais com lectinas

Camundongos C57BL/6 e/ou BALB/c normais foram sacrificados e o baço removido. As células esplênicas foram ajustadas para uma concentração de 5×10^5 células/poço e cultivadas em meio RPMI completo, com ou sem adição de $20 \mu\text{l}$ de ConA ($10 \mu\text{g/ml}$) (Sigma/St. Louis, EUA), ConBr (50 ou $100 \mu\text{g/ml}$), PAA (50 ou $100 \mu\text{g/ml}$) ou KM(+) (0,5 ou $1,0 \mu\text{g/ml}$). Após 24, 48 e 72 horas os sobrenadantes foram coletados e analisados quanto à produção de IL-4 e IFN- γ .

3.9 ELISA para detecção de IFN- γ e IL-4 murinas

O anticorpo primário (anti-IFN- γ /clone RA-642 ou anti-IL4/clone 11B11; Pharmingen) foi diluído em tampão de cobertura (tampão carbonato 0,1M pH 9,6) na concentração 2 μ g/ml. Em placas de 96 poços (Nunc-ImmunoTM/ MaxiSorp Surface, NUNC Brand products) foi distribuído 50 μ l/poço do anticorpo primário. A placa foi então incubada à 4°C durante a noite. Após a etapa de sensibilização, a placa foi lavada com PBS/tween 0,05% duas vezes e bloqueada com 200 μ l/poço da solução de bloqueio (PBS 1x com 5% de soro bovino fetal (Gibco BRL) e incubada à temperatura ambiente por 2 horas. Após incubação foi lavada novamente com PBS/tween 0,05% duas vezes. Em seguida foram adicionados 50 μ l das amostras ou do padrão IFN- γ (Pharmingen) ou IL-4 (Pharmingen) diluídos seriadamente em PBS com 5% de soro bovino fetal (Gibco BRL) com a concentração inicial de 50ng/ml para IFN- γ e 5000 pg/ml para IL-4 em nove diluições em duplicata. As amostras foram incubadas a 4°C durante a noite. A placa foi lavada com PBS/tween 0,05% cinco vezes e o anticorpo secundário biotilado (anti-IFN- γ /clone XMG1.2 ou anti-IL-4/clone BVD6-24G2; Pharmingen) na concentração de 2 μ g/ml (diluído em PBS 1x com 5% de soro bovino fetal (Gibco BRL) é distribuído na placa (100 μ l/poço) e a placa incubada por 45 minutos à temperatura ambiente. A placa foi novamente lavada seis vezes com PBS/tween 0,05%. A solução de avidina peroxidase foi diluída para a concentração de 1:2000 em PBS 1x com 5% de soro bovino fetal (Gibco BRL) e distribuída (50 μ l/poço) e a placa incubada novamente 30 minutos à temperatura

ambiente. A placa foi lavada oito vezes com PBS/tween 0,05%. Por último, é adicionado o substrato TMB (3, 3', 5,5'-tetramethylbenzidine tablets, Sigma/St.Louis, EUA) dissolvido em tampão citrato-fosfato 0,05M pH 5,0 e DMSO com H₂O₂ (1:1). Após revelação, a reação foi parada com 50 µl de ácido fosfórico (1:20). A leitura da reação é feita em espectrofotômetro (Leitor Molecular Devices - microplate reader) com filtro 450 nm e a análise dos resultados foi feita pelo programa Softmax.

3.10 ELISA para detecção de citocinas humanas

3.10.1 Dosagem de IFN- γ

O anticorpo de primário (monoclonal mouse anti-human IFN- γ monoclonal antibody, Pharmingen) foi diluído em tampão de cobertura (tampão carbonato 0,1M pH 9,6) na concentração 2 µg/ml. Em placas de 96 poços (Nunc-ImmunoTM/MaxiSorp Surface, NUNC Brand products) foram distribuídos 100 µl/poço do anticorpo primário. A placa foi então incubada a 4°C durante a noite. Após a etapa de sensibilização, a placa foi lavada cinco vezes com PBS/tween 0,05%. O bloqueio foi realizado com 200 µl/poço da solução de bloqueio (PBS 1x com BSA 1% (Sigma/St.Louis, EUA)) e incubada à temperatura ambiente por 2 horas. Após incubação, a solução de bloqueio foi descartada e em seguida foi adicionado 100 µl das amostras ou do padrão (recombinant human IFN- γ , Pharmingen) diluído seriadamente em RPMI iniciando a curva em 2.000 pg/ml. As amostras foram

incubadas à 37°C por uma hora. A placa foi lavada com PBS/tween 0,05% cinco vezes e o anticorpo secundário (biotinylated mouse anti-human IFN- γ monoclonal, Pharmingen), diluído (1,25 $\mu\text{g/ml}$) em PBS tween 0,05% com BSA 1%, foi distribuído na placa (100 μl /poço) e incubado por uma hora a 37°C. A placa foi novamente lavada cinco vezes com PBS/tween 0,05%. Por último, foi adicionado 100 μl do substrato TMB (3,3',5,5'-tetramethylbenzidine tablets, Sigma/St.Louis, EUA) dissolvido em tampão citrato-fosfato 0,05M pH 5,0 e DMSO (Sigma/St.Louis, EUA) com H₂O₂ (1:1). Após revelação a reação foi parada com 100 μl de ácido sulfúrico (2N). A leitura da reação foi realizada em espectrofotômetro (Leitor Molecular Devices - microplate reader) com filtro 450 nm e a análise dos resultados foi realizada pelo programa Softmax.

3.10.2 Dosagem de IL-10

O anticorpo primário (purified rat anti-human IL-10 monoclonal antibody, Pharmingen) foi diluído em tampão de cobertura (tampão carbonato 0,1M pH 9,6) na concentração 2 $\mu\text{g/ml}$. Em placas de 96 poços (Nunc-ImmunoTM/MaxiSorp Surface, NUNC Brand products) foram distribuídos 100 μl /poço do anticorpo primário. A placa foi então incubada a 4°C durante a noite. Após a etapa de sensibilização, a placa foi lavada cinco vezes com PBS/tween 0,05%. O bloqueio foi realizado com 200 μl /poço da solução de bloqueio (PBS 1x com BSA 1% (Sigma/St.Louis, EUA)) e incubada à temperatura ambiente por 2 horas. Após incubação, a solução de bloqueio foi descartada e em seguida foi adicionado 100

μl das amostras ou do padrão (recombinant human IL-10/Pharmingen) diluído seriadamente em RPMI iniciando a curva em 2.000 pg/ml. As amostras foram incubadas à 37°C por uma hora. A placa foi lavada com PBS/tween 0,05% cinco vezes e o anticorpo secundário (biotinylated rat anti-human and viral IL-10 monoclonal antibody, Pharmingen) diluído (1,25 $\mu\text{g}/\text{ml}$) em PBS tween 0,05% com BSA 1% foi distribuído na placa (100 $\mu\text{l}/\text{poço}$) e incubado por uma hora a 37°C. A placa foi novamente lavada cinco vezes com PBS/tween 0,05%. Por último, foi adicionado 100 μl do substrato TMB (3,3',5,5'-tetramethylbenzidine tablets, Sigma/St.Louis, EUA) dissolvido em tampão citrato-fosfato 0,05M pH 5,0 e DMSO (Sigma/St.Louis, EUA) com H₂O₂ (1:1). Após revelação a reação foi parada com 100 μl de ácido sulfúrico (2N). A leitura da reação foi realizada em espectrofotômetro (Leitor Molecular Devices - microplate reader) com filtro 450 nm e a análise dos resultados foi realizada pelo programa Softmax.

3.10.3 Dosagem de IL-4

De acordo com o protocolo da Genzyme Diagnostics:

O anticorpo primário (monoclonal mouse anti-human IL-4) foi diluído em tampão de cobertura (tampão carbonato 0,1M pH 9,6) na concentração 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Em placas de 96 poços (Nunc-ImmunoTM/ MaxiSorp Surface, NUNC Brand products) foi distribuído 100 $\mu\text{l}/\text{poço}$ do anticorpo primário. A placa foi então incubada a 4°C durante a noite. Após a etapa de sensibilização, a placa foi lavada cinco vezes com PBS/tween 0,05%. O bloqueio foi realizado com 200 $\mu\text{l}/\text{poço}$ da

solução de bloqueio (PBS 1x com BSA 1% (Sigma/St.Louis, EUA)) e incubada à temperatura ambiente por 2 horas. Após incubação, a solução de bloqueio foi descartada e em seguida foi adicionado 100 µl das amostras ou do padrão (recombinant human IL-4) diluído seriadamente em RPMI com concentração inicial de 1.500 pg/ml. As amostras foram incubadas a 37°C por uma hora. A placa foi lavada com PBS/tween 0,05% cinco vezes e o anticorpo secundário biotilado (biotinylated polyclonal sheep anti-human IL-4) diluído (1 µg/ml) em PBS tween 0,05% com BSA 1% (Sigma/St.Louis, EUA) foi distribuído na placa (100 µl/poço) e a placa incubada por uma hora a 37°C. A placa foi novamente lavada cinco vezes com PBS/tween 0,05%. A solução de streptavidina peroxidase foi diluída para a concentração de 1:2000 em PBS tween 0,05% com BSA 1% e distribuída (100 µl/poço) e a placa incubada novamente 15 minutos à 37°C. A placa foi lavada cinco vezes com PBS/tween 0,05%. Por último foi adicionado 100 µl o substrato TMB (3, 3', 5,5'-tetramethylbenzidine tablets, Sigma/St.Louis, EUA) dissolvido em tampão citrato-fosfato 0,05M pH 5,0 e DMSO (Sigma/St.Louis, EUA) com H₂O₂ (1:1). Após revelação, a reação foi parada com 100 µl de ácido sulfúrico (2N). A leitura da reação foi realizada em espectrofotômetro (Leitor Molecular Devices - microplate reader) com filtro 450 nm e a análise dos resultados foi realizada pelo programa Softmax.

3.11 Reação de hipersensibilidade tardia (DTH)

Na décima semana pós-infecção os animais imunizados e desafiados foram submetidos a uma reação de hipersensibilidade tardia (DTH). A pata oposta a pata infectada é medida com paquímetro manual antes da inoculação do antígeno. O antígeno SLA foi preparado na concentração de 50 μ g em 25 μ l de solução salina estéril e inoculado (25 μ l) no coxim plantar dos animais. Após 48 horas a mesma pata foi medida novamente. A diferença entre as duas medidas expressa em milímetros foi registrada. O teste foi considerado positivo quando o valor da diferença entre as duas medidas foi maior que 0,05 mm baseado no DTH realizado em camundongos normais (BARRAL et al., 1983).

3.12 Análise estatística

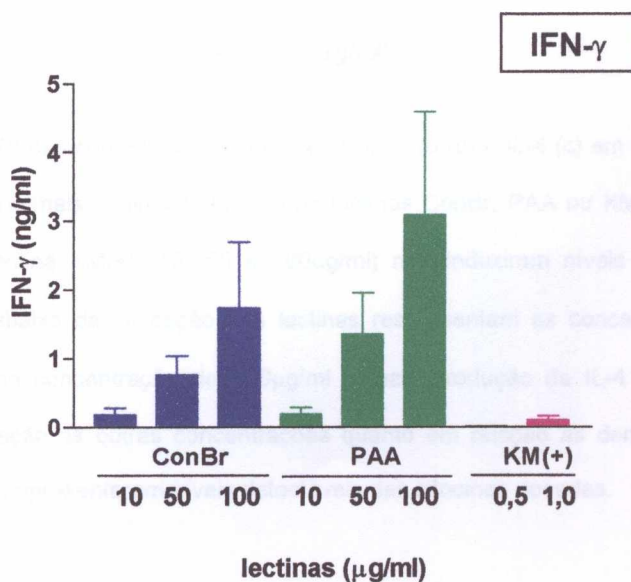
As análises estatísticas dos resultados foram realizadas pelo GraphPad Prism (versão 2.00, GraphPad Software Incorporated/ San Diego, CA). Para comparar as diferenças entre os grupos experimentais foi aplicado o teste *t* de *Student*. Foi mantido o valor fixo para $p < 0,05$ para significância estatística.

4 RESULTADOS

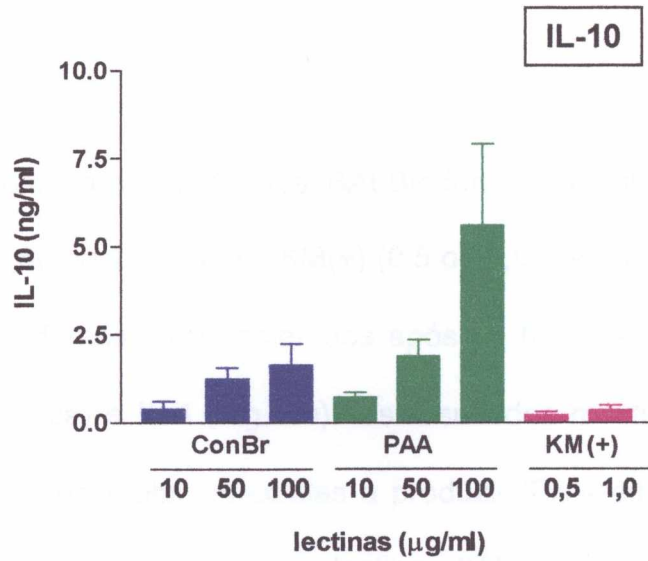
4.1 Estimulação de CMSP humanas com lectinas.

As células mononucleares do sangue periférico (CMSP) isoladas de doadores normais (n=5) foram estimuladas em cultura com as lectinas ConBr, PAA (10, 50, 100 $\mu\text{g/ml}$) ou KM(+) (0,5, 1,0, 10, 50 e 100 $\mu\text{g/ml}$). Os sobrenadantes foram coletados 24 horas após o início da cultura para dosagem de IL-4 e 72 horas após para dosagem de IFN- γ e IL-10. Pode-se observar que as lectinas ConBr e PAA estimularam as CMSP a produzir IFN- γ e IL-10 enquanto a lectina KM(+) mostrou-se incapaz de estimular estas células (Fig. 1a e b). Todas as três lectinas induziram uma produção menor de IL-4 nas primeiras 24 horas, embora somente a ConBr tenha estimulado uma produção estatisticamente significativa na concentração de 100 $\mu\text{g/ml}$ (Fig. c).

(a)



(b)



(c)

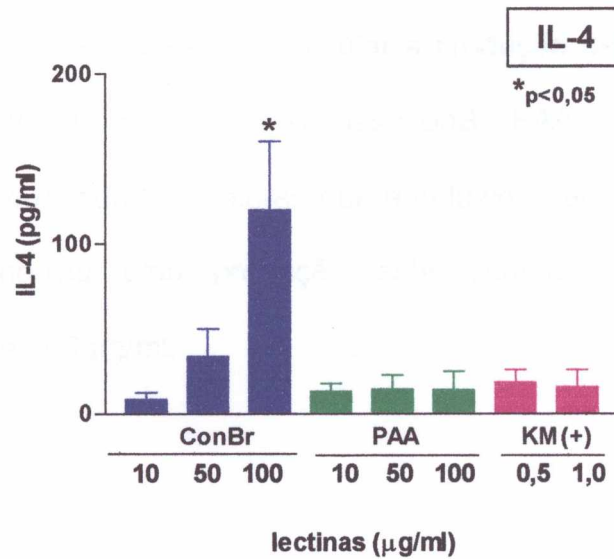
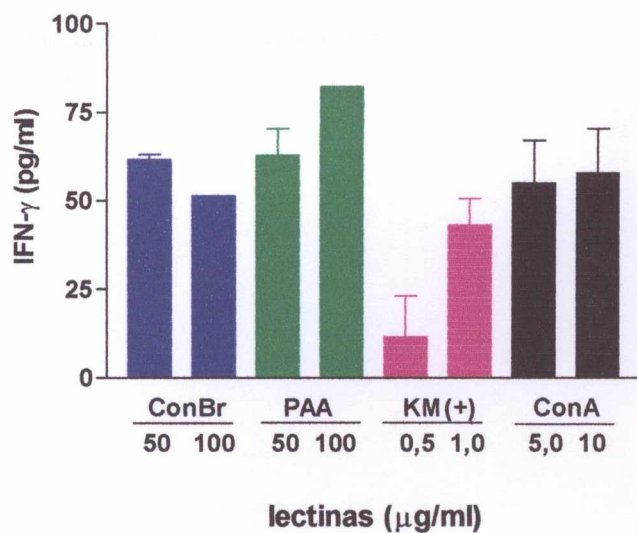


Figura 1: Média \pm erro padrão (EP) das concentrações de IFN- γ (a), IL-10 (b) e IL-4 (c) em sobrenadante de cultura de CMSP de 5 doadores normais, estimuladas com as lectinas ConBr, PAA ou KM(+). As demais concentrações testadas com a lectina KM(+) (10, 50 e 100 μ g/ml) não induziram níveis detectáveis das citocinas dosadas. Os números abaixo da indicação das lectinas representam as concentrações (μ g/ml) testadas. O estímulo da ConBr na concentração de 100 μ g/ml induziu produção de IL-4 estatisticamente significativa ($p<0,05$) tanto em relação as outras concentrações quanto em relação as demais lectinas. As células não estimuladas (meio) não apresentaram níveis detectáveis das citocinas dosadas.

4.2 Estimulação de células esplênicas murinas com lectinas.

Células esplênicas de camundongos BALB/c foram estimuladas com as lectinas ConBr, PAA (50 ou 100 $\mu\text{g/ml}$), KM(+) (0,5 ou 1,0 $\mu\text{g/ml}$) ou ConA (5,0 ou 10 $\mu\text{g/ml}$). Os sobrenadantes foram coletados após 48 horas e dosados para a detecção de IFN- γ (Fig. 2a) e IL-4 (Fig. 2b). Os resultados mostram que as três lectinas são capazes de estimular as células a produzir IFN- γ em concentrações diferentes, sendo que o estímulo da lectina KM(+) ocorre mesmo em concentrações menores que as utilizadas com as demais lectinas (Fig. 2a). Todas as lectinas também foram capazes de estimular a produção de IL-4 em menores quantidades que o IFN- γ (Fig. 2b). As lectinas ConBr, PAA e ConA induziram a produção de IL-4 em quantidades maiores que a induzida pela KM(+), sendo que apenas a ConBr induziu uma produção estatisticamente significativa nas concentrações de 50 e 100 $\mu\text{g/ml}$.

(a)



(b)

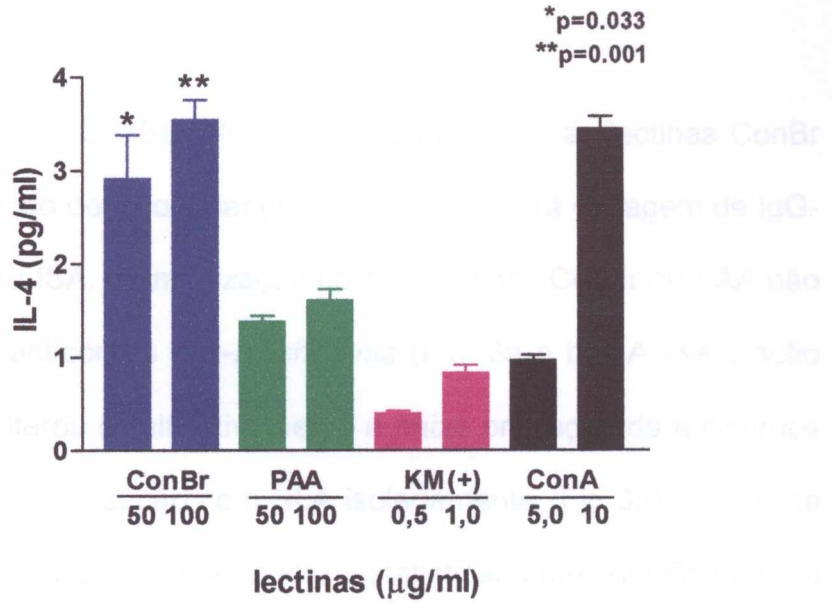
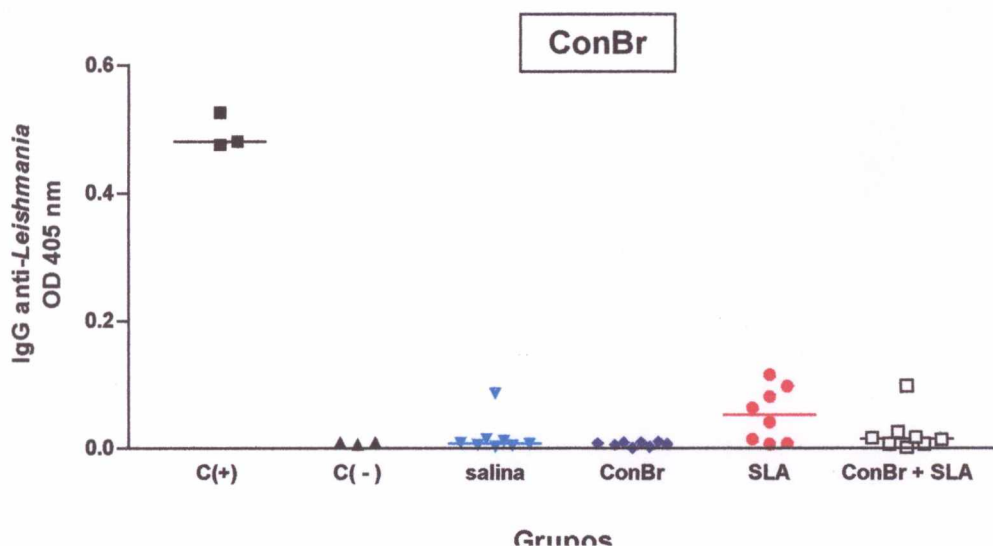


Figura 2: Média \pm erro padrão (EP) das concentrações de IFN- γ (Fig. 2a) e IL-4 (Fig. 2b) pelo método de ELISA, em cultura de células esplênicas de camundongos BALB/c estimuladas com ConBr, PAA, KM(+) ou ConA. Células não estimuladas não produziram níveis detectáveis de IFN- γ . Os números abaixo da indicação das lectinas representam as concentrações ($\mu\text{g/ml}$) testadas. As barras representam as concentrações ($\mu\text{g/ml}$) testadas. O estímulo da ConBr nas concentrações de 50 e 100 $\mu\text{g/ml}$ induziu produção de IL-4 estatisticamente significativa (* $p=0,033$; ** $p=0,001$, respectivamente). As células não estimuladas (meio) não apresentaram níveis detectáveis das citocinas dosadas.

4.3 Avaliação da resposta humoral após a imunização com as lectinas ConBr, PAA e/ou antígeno SLA.

Camundongos BALB/c e C57BL/6 foram imunizados com as lectinas ConBr ou PAA e/ou SLA e no dia do desafio o sangue foi coletado para dosagem de IgG total anti-*Leishmania* por ELISA. A imunização com as lectinas ConBr ou PAA não induziram a produção de anticorpos anti-*Leishmania* (Fig. 3a e b). A associação de ConBr com SLA não alterou significativamente a baixa produção de anticorpos produzidos em resposta à imunização com SLA isoladamente (Fig 3a). O uso da PAA associada ao SLA induziu um aumento estatisticamente significante na produção de anticorpos anti-*Leishmania*, enquanto a imunização com o SLA isoladamente induziu apenas uma tendência ao aumento da produção destes anticorpos (Fig. 2b). Não foi detectada nenhuma diferença quanto a produção de anticorpos anti-*Leishmania* entre as duas linhagens de camundongos (dados não mostrados).

(a) BALB/c



(b) BALB/c

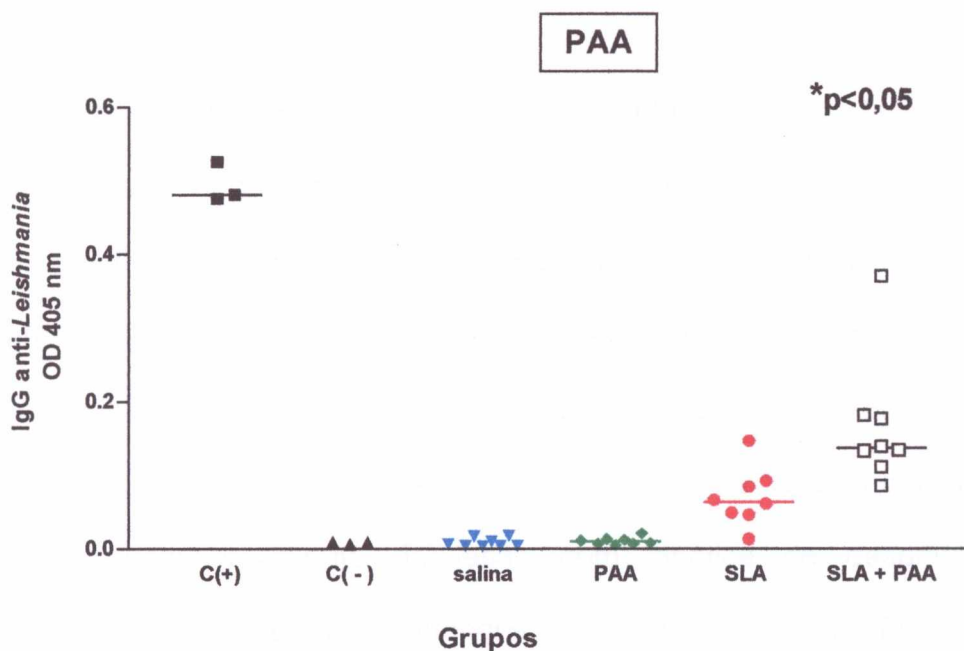
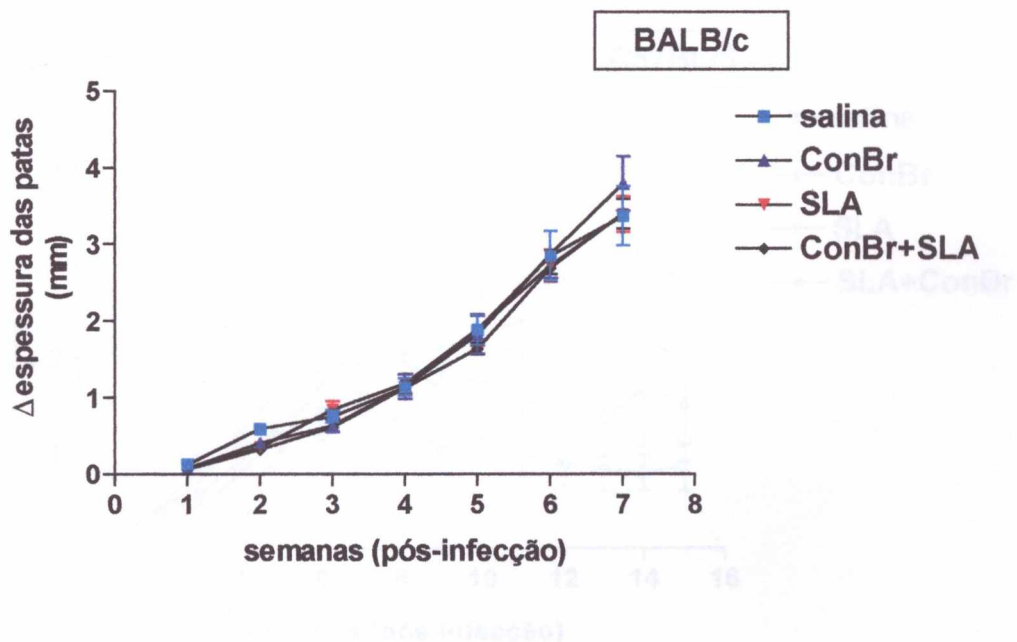


Figura 3: Determinação de níveis de IgG total anti-*Leishmania amazonensis* (ELISA) em soro de camundongos imunizados com lectinas. Os camundongos foram imunizados pelo esquema I, com ConBr ou PAA (50 μ g/ml) com ou sem SLA (10 μ g/ml). O soro dos camundongos foi coletado quinze dias após a última imunização pelo esquema I e três dias após a última imunização pelo esquema II. O soro de camundongos cronicamente infectados com *L.amazonensis* foi utilizado como controle positivo (C(+)) e o soro de camundongos não-infectados foi utilizado como controle negativo (C(-)). Cada ponto representa a dosagem de um camundongo e as linhas horizontais a média de cada grupo. A produção de IgG total anti-*Leishmania* do grupo imunizado com SLA+PAA foi estatisticamente significativa ($p<0,05$) quando comparada com a dos grupos imunizados somente com PAA ou SLA.

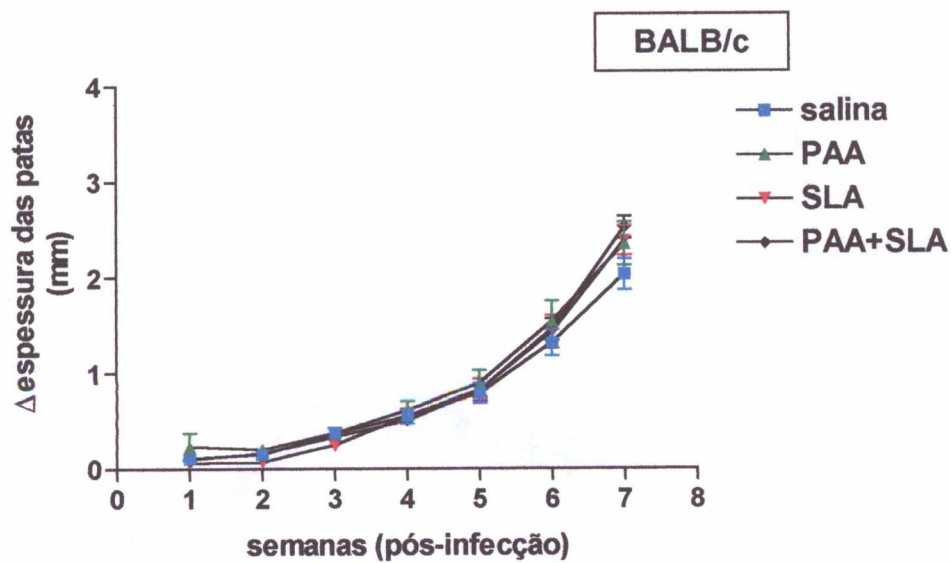
4.4 Imunização de camundongos BALB/c e C57BL/6 com as lectinas ConBr ou PAA e/ou antígeno SLA e desafio com *Leishmania amazonensis*.

Camundongos BALB/c e C57BL/6 imunizados com as lectinas ConBr (50 μ g/ml) ou PAA (50 μ g/ml) e/ou antígeno SLA (10 μ g/ml) foram desafiados quinze dias após a última imunização pelo esquema I, com com 1×10^6 promastigotas de *Leishmania amazonensis* (BA125) em fase estacionária. As imunizações em ambas as linhagens de camundongos não resultaram em proteção quando imunizados esquemas pelo esquema I. Os animais das duas linhagens apresentaram desenvolvimento de lesão com cinética de desenvolvimento semelhante à observada em camundongos que receberam salina (Fig. 4a, b, c e d).

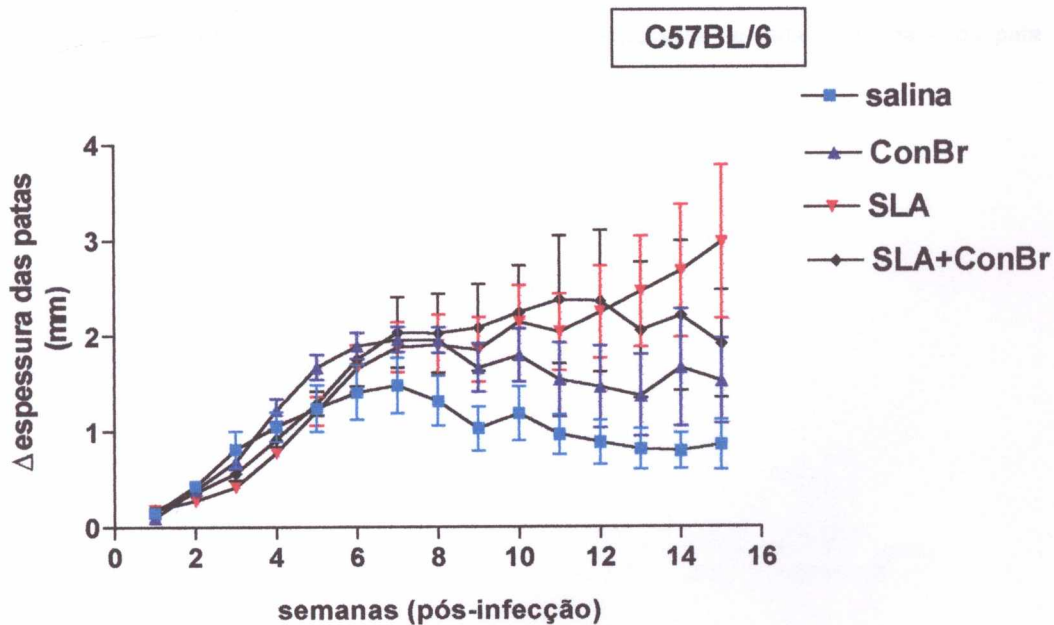
(a)



(b)



(c)



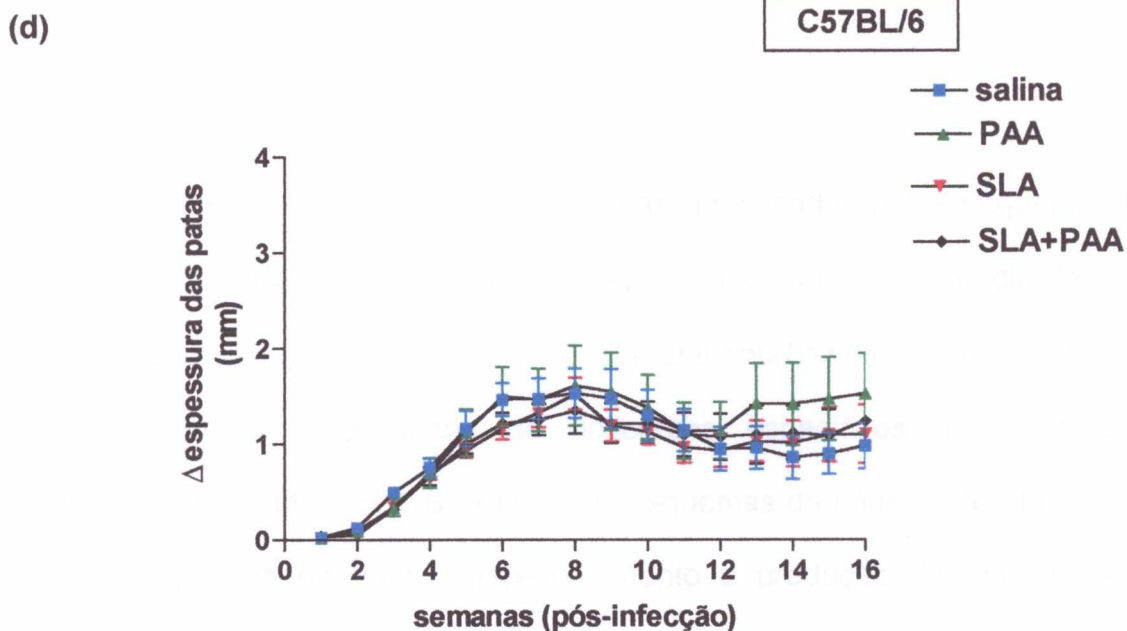
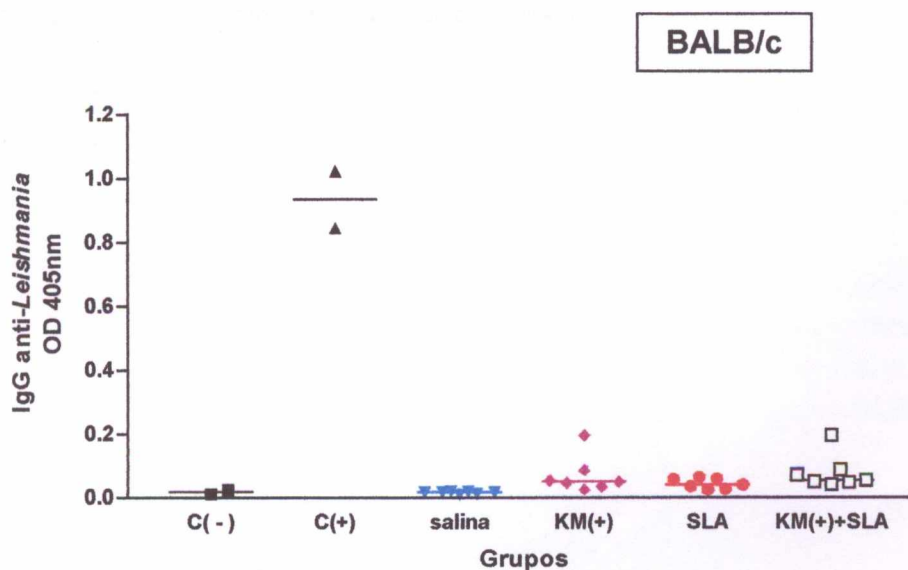


Figura 4: Medida da lesão de camundongos BALB/c (a e b) e C57BL/6 (c e d) imunizados pelo esquema I com as lectinas ConBr (50 μ g/ml) (a e c) e PAA (50 μ g/ml) (b e d) e/ou SLA (10 μ g/ml) e desafiados com 1×10^6 promastigotas de *L. amazonensis* BA125. Os símbolos representam a média de grupos com sete animais e seus respectivos erros padrão. As diferenças entre os grupos não foi estatisticamente significante. A indicação do tratamento da lesão é dada pela diferença (Δ) da espessura da pata infectada e da pata contralateral não infectada.

4.5 Avaliação da resposta humoral após a imunização com a lectina KM(+) e/ou antígeno SLA.

Camundongos BALB/c e C57BL/6 foram imunizados pelos esquemas I e II com a lectina KM(+) (0,5 $\mu\text{g/ml}$) e/ou antígeno SLA (10 $\mu\text{g/ml}$) e no dia do desafio o sangue foi coletado para dosagem de IgG-total anti-*Leishmania* por ELISA. Não houve diferença na produção de anticorpos específicos entre os grupos imunizados com KM(+) e/ou SLA nos dois esquemas de imunização (Fig. 5a e b). Não foi detectada nenhuma diferença quanto a produção de anticorpos anti-*Leishmania* entre as duas linhagens de camundongos ou entre os dois esquemas de imunização (dados não mostrados).

(a) Esquema I



(b) Esquema II

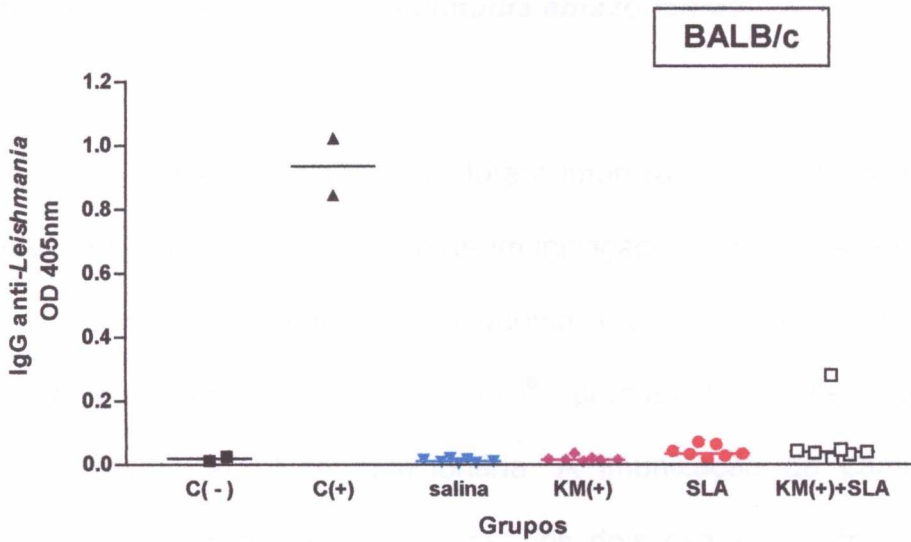
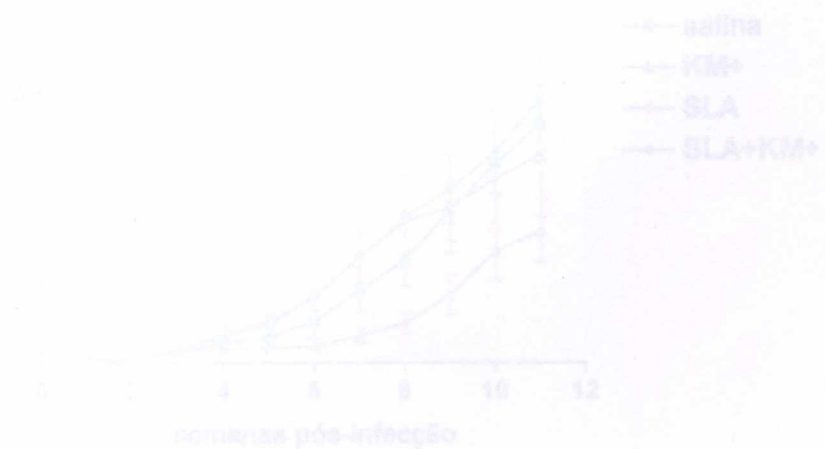


Figura 5: Determinação de níveis de IgG total anti-*Leishmania amazonensis* (ELISA) em soro de camundongos imunizados com lectinas. Os camundongos foram imunizados pelo esquema I e II, com KM(+) (0,5µg/ml) com ou sem SLA (10µg/ml). O soro dos camundongos foi coletado quinze dias após a última imunização pelo esquema I e três dias após a última imunização pelo esquema II. O soro de camundongos cronicamente infectados com *L.amazonensis* foi utilizado como controle positivo (C(+)) e o soro de camundongos não-infectados foi utilizado como controle negativo (C(-)). Cada ponto representa a dosagem de um camundongo e as linhas horizontais a média de cada grupo.

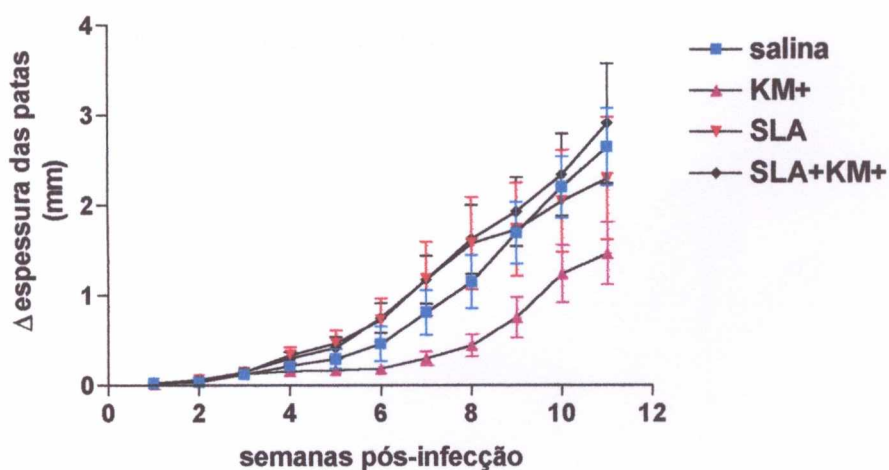


4.6 Imunização de camundongos BALB/c e C57BL/6 com a lectina KM(+) e/ou antígeno SLA e desafio com *Leishmania amazonensis*.

Camundongos BALB/c e C57BL/6 foram imunizados com a lectina KM(+) e/ou antígeno SLA nos esquemas I e II de imunização. Foram desafiados quinze dias após a última imunização pelo esquema I e três dias após a última imunização pelo esquema II com 1×10^6 promastigotas de *Leishmania amazonensis* (BA125) em fase estacionária. A imunização de camundongos BALB/c com a lectina KM(+) isoladamente, nos dois esquemas de imunização avaliados, resultou em proteção parcial dos camundongos. Apenas a imunização pelo esquema II resultou em uma diferença estatisticamente significativa nos dias 9, 10 e 11 pós-infecção com relação ao grupo imunizado com salina (Figura 6b). Tal proteção não foi observada quando a KM(+) foi associada a SLA (Fig. 6a e b). Nenhuma proteção foi observada quando camundongos C57BL/6 foram imunizados com a KM(+), SLA ou KM(+)+SLA (Fig. 6c e d).

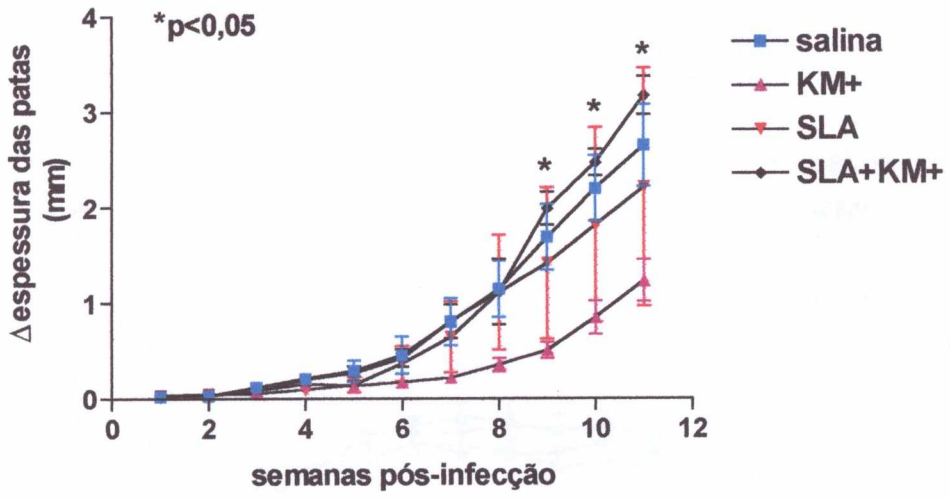
(a) Esquema I

BALB/c



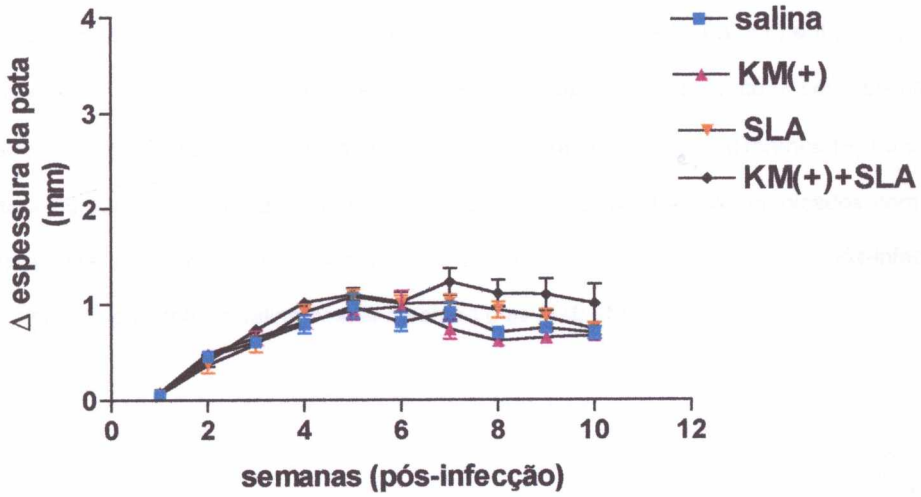
(b) Esquema II

BALB/c



(c) Esquema I

C57BL/6



(d) Esquema II

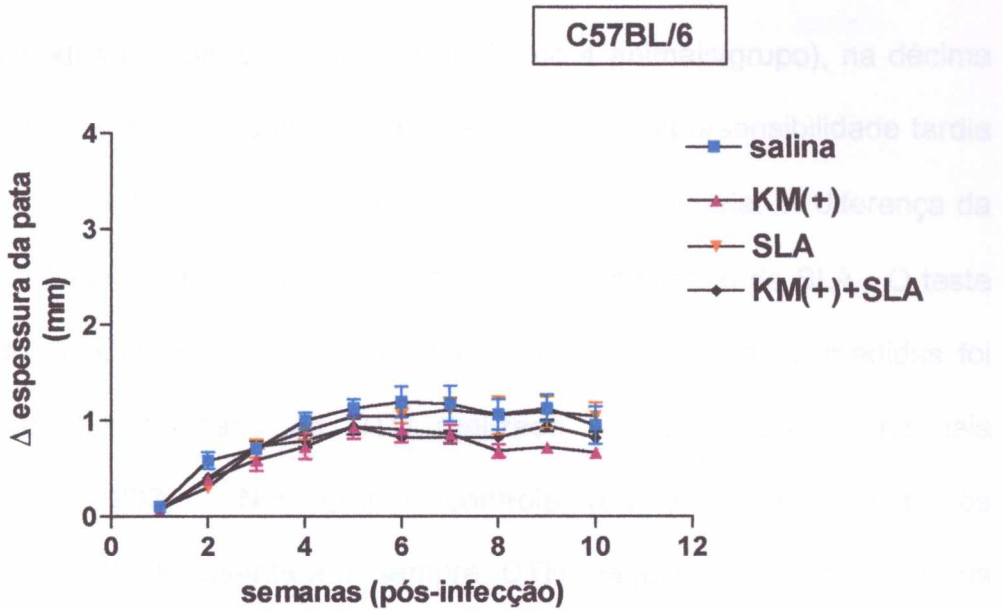
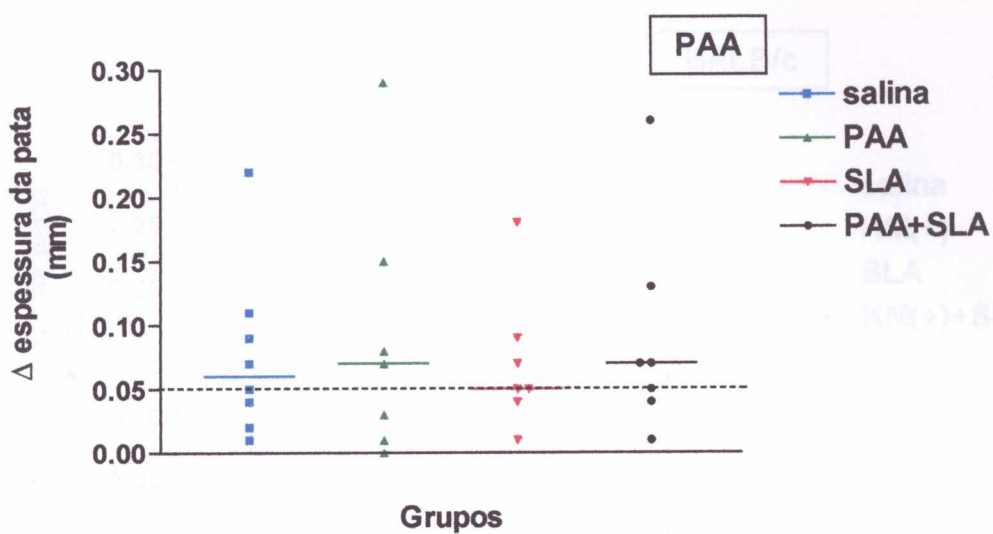


Figura 6: Medida da lesão de camundongos BALB/c (a e b) e C57BL/6 (c e d) imunizados com a lectina KM(+) (0,5 μ g/ml) e/ou antígeno SLA (10 μ g/ml) nos esquemas de imunização I (a e c) e II (b e d) e desafiados com *L.amazonensis* BA125. Os símbolos representam a média de grupos com sete animais e seus respectivos erros padrão (EP). A indicação do tratamento da lesão é dada pela diferença (Δ) da espessura da pata infectada e da pata contralateral não infectada. Os camundongos BALB/c imunizados com KM(+) pelo esquema II apresentaram uma diferença estatisticamente significativa nos dias 9, 10 e 11 pós-infecção quando comparados com o grupo controle salina nestes mesmos dias ($p < 0,05$).

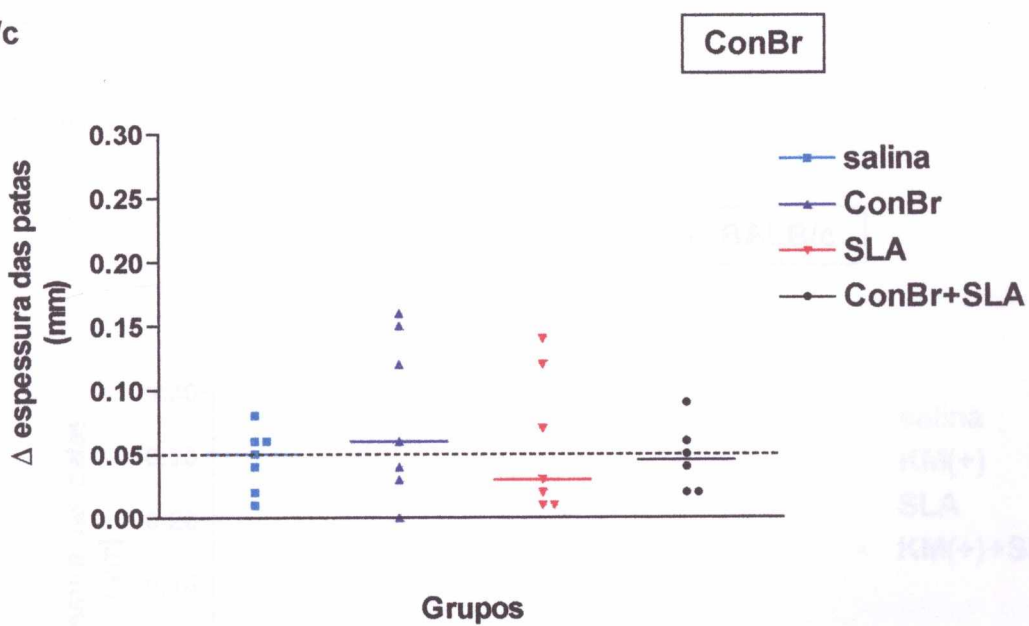
4.7 Reação de hipersensibilidade tardia (DTH).

Camundongos BALB/c e C57BL/6 (no mínimo 4 animais/grupo), na décima semana pós-desafio, foram submetidos a uma reação de hipersensibilidade tardia recebendo 50 μ g de antígeno SLA na pata oposta à pata infectada. A diferença da medida da pata foi avaliada antes e 48 horas após a inoculação de SLA. O teste foi considerado positivo quando o valor da diferença entre as duas medidas foi maior que 0,05 mm baseado no DTH realizado em camundongos normais (BARRAL et al., 1983). Nos grupos controle (tratados com salina), os camundongos BALB/c apresentaram sempre DTH negativo enquanto que os camundongos C57BL/6 apresentaram DTH positivo. A imunização com PAA de camundongos BALB/c não resultou em resposta DTH positiva, a qual não foi alterada pela combinação PAA+SLA (Fig. 7a). Na imunização com ConBr, também não houve o aparecimento de resposta de DTH nos grupos imunizados com ConBr, SLA ou ConBr+SLA (Fig. 7b). A imunização de camundongos BALB/c com KM(+) e KM(+)+SLA pelo esquema I levou a uma resposta DTH potente, a qual foi parcialmente abolida na presença de apenas SLA (Fig. 7c). Já a imunização com a KM(+) no esquema II não resultou em aparecimento de resposta DTH em qualquer um dos grupos (Fig. 7d). A imunização de camundongos C57BL/6 com KM(+) no esquema I resultou em DTH positivo apenas para o grupo imunizado com SLA (Fig. 7e), enquanto que pelo esquema II apenas o grupo imunizado com KM(+)+SLA teve um DTH positivo (Fig. 7f).

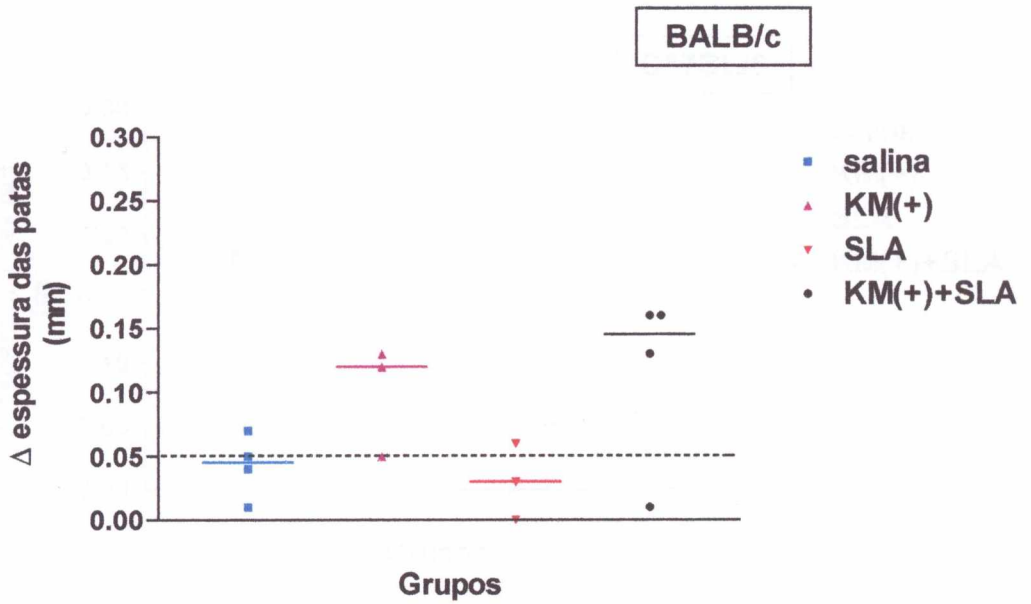
(a) BALB/c



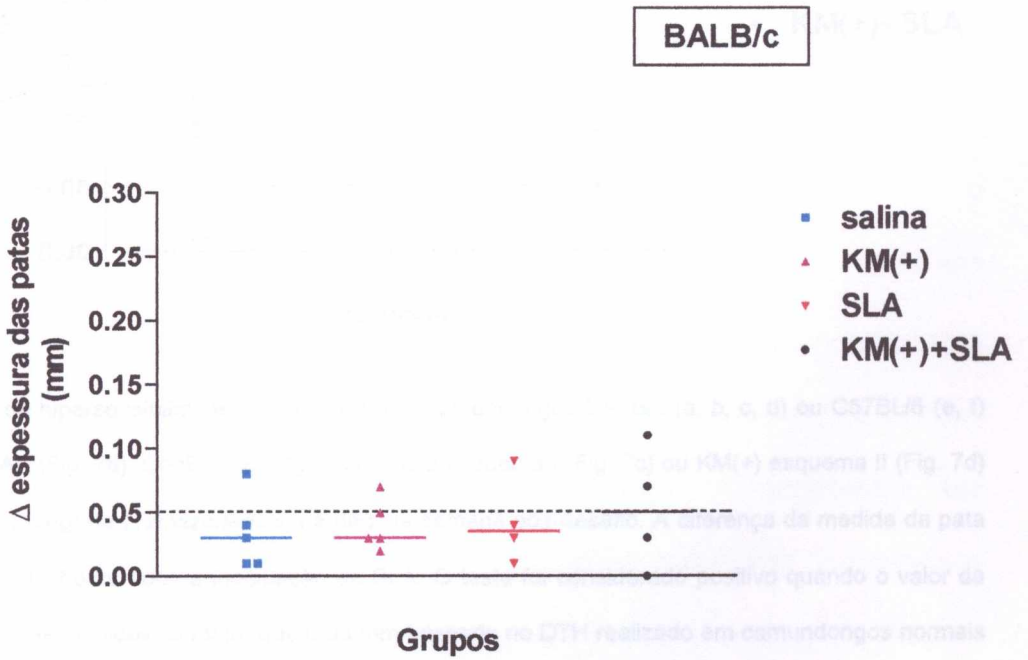
(b) BALB/c



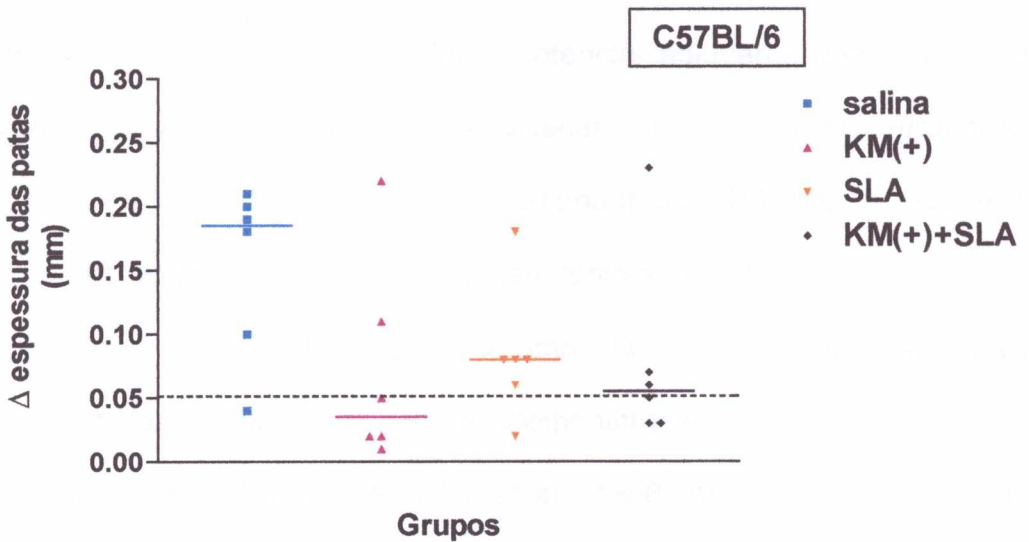
(c) Esquema I



(d) Esquema II



(e) Esquema I



(f) Esquema II

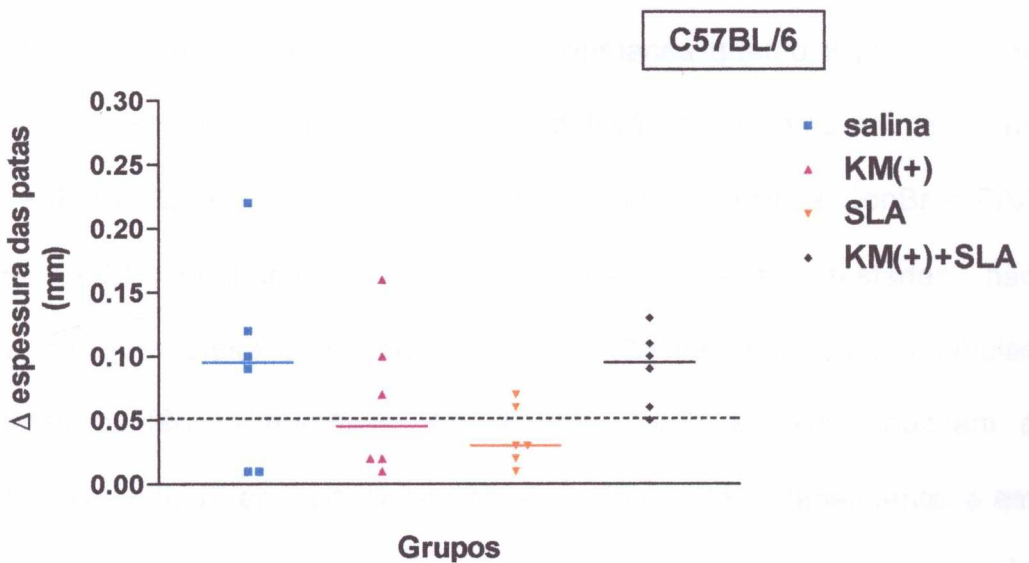


Figura 7: Reação de hipersensibilidade tardia (DTH) em camundongos BALB/c (a, b, c, d) ou C57BL/6 (e, f) imunizados com PAA (Fig. 7a), ConBr (Fig. 7b), KM(+) pelo esquema I (Fig. 7c) ou KM(+) esquema II (Fig. 7d) com antígeno SLA (50 μ g) de *L. amazonensis*, na décima semana pós-desafio. A diferença da medida da pata foi avaliada antes e 48 horas após a inoculação de SLA. O teste foi considerado positivo quando o valor da diferença entre as duas medidas foi maior que 0,05 mm baseado no DTH realizado em camundongos normais (BARRAL et al., 1983).

5 DISCUSSÃO

Neste trabalho, procuramos avaliar o potencial adjuvante das lectinas de *Pisum arvense* (PAA), de *Canavalia brasiliensis* (ConBr) e de *Artocarpus integrifolia* (KM(+)) na imunização de camundongos BALB/c e C57BL/6 associados ou não ao antígeno solúvel de *Leishmania amazonensis*.

As dosagens empregadas de cada uma das lectinas utilizadas nesta avaliação foram estabelecidas com base na demonstração de atividade biológica em trabalhos anteriores (BARRAL-NETTO et al., 1996; ANDRADE et al., 1999; PANUTO-CASTELO et al., 2001). Nas dosagens testadas, as lectinas mostraram estimular células esplênicas murinas e CMSPs humanas quanto à produção de citocinas importantes para o mecanismo de modulação do sistema imune, como IFN- γ , IL-4 e IL-10. Quanto ao potencial estimulatório, as lectinas ConBr e PAA estimularam CMSP, enquanto que a KM(+), nas dosagens testadas, não demonstrou qualquer efeito com relação à produção de citocinas por células mononucleares periféricas humanas. As lectinas ConBr e PAA induziram a produção de IFN- γ e IL-10 em cultura de CMSP, de forma dose dependente, e em uma quantidade bem superior à produzida por células esplênicas murinas quando estimuladas pelas mesmas lectinas nas mesmas concentrações. A lectina ConBr, assim como várias outras lectinas da tribo *Diocleinae*, já mostraram ser imunoestimulatórias para linfócitos humanos em trabalhos anteriores, induzindo a proliferação e produção de IFN- γ pelos linfócitos estimulados *in vitro* (BARRAL-NETTO et al., 1992). Quanto à produção de IL-4, apenas a lectina ConBr induziu

uma pequena produção desta citocina nas primeiras 48 horas de forma dose dependente, sendo que na concentração 100µg/ml esta produção foi estatisticamente significativa.

As lectinas testadas também foram capazes de estimular células murinas a produzir IFN- γ e IL-4. Todas as três lectinas foram capazes de estimular a produção destas citocinas por células esplênicas. Mesmo em concentrações baixas (0,5 e 1µg/ml) a lectina KM(+) estimulou a produção IFN- γ , enquanto a indução da produção de IFN- γ pelas demais lectinas, PAA e ConBr, necessita de doses mais elevada (10 e 50 µg/ml) das mesmas. A presença de IFN- γ no início da infecção é importante em camundongos C3H/HeN, naturalmente resistentes à infecção por *Leishmania*. O tratamento destes animais com anticorpo monoclonal anti-IFN- γ os tornam susceptíveis à *L.major*, levando à formação de lesão com padrão de desenvolvimento parecido com o do camundongo BALB/c susceptível (BELOSEVIC et al., 1989).

Já uma produção inicial mais elevada de IL-4 pode favorecer o desenvolvimento de um fenótipo Th2 favorável à infecção (LIEW et al., 1989). As lectinas testadas também foram capazes de induzir a secreção de apenas uma pequena quantidade de IL-4 pelas células esplênicas. A lectina ConBr, novamente, foi quem mostrou uma maior produção desta citocinas, com uma produção estatisticamente significativa nas concentrações testadas.

Devido às suas capacidades imunomodulatórias, estas lectinas foram testadas quanto ao seu potencial como adjuvante na imunização de camundongos contra *Leishmania amazonensis*. Neste estudo, empregamos um protocolo de

imunização já utilizado em nosso laboratório (esquema I), e, no caso da KM(+), comparamos este esquema com aquele empregado por Panunto-Castelo e colaboradores (2001), designado aqui como esquema II, o que havia mostrado conferir proteção em camundongos BALB/c contra *L. major*.

A imunização de camundongos BALB/c ou C57BL/6 com as lectinas ConBr ou PAA, com ou sem o antígeno SLA, e no esquema de imunização I, não resultou em proteção. Os camundongos BALB/c apresentaram lesões progressivas crescentes após imunização com as lectinas (ConBr ou SLA) e/ou antígeno SLA, semelhantes àsquelas dos animais controles, imunizados com salina. Os camundongos C57BL/6 imunizados com a lectina ConBr e/ou antígeno SLA apresentaram lesão bem mais evidente que os animais controles imunizados com salina apesar das diferenças de tamanho de lesão não serem estatisticamente significantes. A imunização com a lectina PAA e/ou antígeno SLA resultou em lesão mais reduzida do que os animais imunizados com a lectina ConBr, apesar de também não ter havido proteção dos animais após desafio. A imunização apenas com o antígeno SLA, tanto de camundongos resistentes como de susceptíveis, resultou em lesão ainda mais evidente que nos animais controles imunizados com salina. Este fenômeno, já descrito por Liew (1985) e Barral-Netto e colaboradores (1987), evidencia que, enquanto a imunização endovenosa ou intraperitoneal com promastigotas mortas pelo calor ou irradiadas promove uma proteção duradoura, a imunização intramuscular e subcutânea com estes mesmos antígenos aumentam a susceptibilidade, agravando ainda mais a lesão, o que ocorre em animais geneticamente resistentes (CBA) e susceptíveis (BALB/c). A imunização de camundongos BALB/c, naturalmente susceptíveis,

endovenosamente com antígeno solúvel de promastigotas de *L. amazonensis* resultou em proteção parcial dos animais, que passaram a apresentar um quadro histopatológico com a presença de inflamação granulomatosa, depósito de colágeno e necrose fibrinóide, lesão semelhante àquela observada nos camundongos resistentes (ANDRADE et al., 1984; BARRAL et al., 1987). O mecanismo responsável por este fenômeno ainda não está bem estabelecido, mas sabe-se que linfócitos T específicos para o antígeno de *L. major* estão envolvidos neste mecanismo de inibição de uma resposta protetora. As células com este fenótipo, em experimentos de transferência adotiva, também são capazes de reverter um quadro de imunidade protetora em animais imunizados pela via parenteral (TITUS et al., 1984; LIEW et al., 1985).

Em nosso trabalho, apenas os camundongos BALB/c (geneticamente susceptíveis) imunizados com a lectina KM(+) isoladamente foram capazes de apresentar uma proteção parcial pós-infecção, enquanto que não houve proteção dos camundongos C57BL/6 (geneticamente resistentes). O fato da proteção ter sido observada nos camundongos BALB/c imunizados pelos esquemas I e II de imunização torna improvável a possibilidade da ação direta da lectina no mecanismo de proteção, já que no esquema I o desafio foi feito quinze dias depois da última inoculação da lectina. É importante observar que a proteção parcial encontrada nos camundongos BALB/c imunizados apenas com a lectina KM(+) e desafiados com *L. amazonensis* difere dos resultados encontrados por Panunto-Castelo e colaboradores (2001), onde a imunização com a mesma lectina e SLA resultou em proteção frente a imunização com *L. major*. Estes dados conflitantes sugerem que resultados normalmente encontrados para uma determinada espécie

de *Leishmania* nem sempre podem ser atribuídos às demais espécies, onde diferentes mecanismos de resistência ou susceptibilidade possam estar envolvidos. Não podemos descartar a possibilidade de uma possível resposta imune à própria KM(+) que pode compartilhar algum epítopo com a cepa de *L. amazonensis* utilizada para o preparo do antígeno.

A resposta diferenciada da imunização com KM(+), a qual resulta em proteção parcial, não observada nas outras lectinas (ConBr e PAA), é intrigante, pelo fato de terem sido utilizadas lectinas com especificidade por carboidratos similares, embora sejam estruturalmente diferentes. As lectinas de leguminosas da subtribo Diocleinae, representada pela lectina de *Canavalia brasiliensis* é uma lectina glicose/manose específica formadas por subunidades compostas de uma única cadeia polipeptídica, e seus fragmentos, enquanto que a lectina *Pisum arvense*, representante de leguminosa da tribo *Viciae*, possui suas subunidades formadas por duas cadeias (alfa e beta) (ROUGÉ et al., 1987). Por outro lado, a lectina de *Artocarpus integrifolia* é uma lectina manose específica de espécie da família *Moraceae*. A ligação de lectinas à superfície celular está, muitas vezes, diretamente associada à indução de sinais biológicos (CAVADA et al., 2001) e os efeitos biológicos diferentes resultantes podem ser desencadeados pelo reconhecimento de diferentes glicanos (receptores) de superfície celular ou ainda por reconhecimento diferente do mesmo receptor (RAMOS et al., 1998). Um exemplo já bem definido deste fenômeno, é a relação entre a indução da liberação de histamina induzida pelo reconhecimento por lectinas homólogas de regiões diferentes do mesmo glicano na superfície de macrófagos peritoneais de rato. As lectinas *C.brasiliensis* (ConBr), *C. ensiformis* (ConA), *D. guianensis* e *D. virgata*

reconhecem com maior afinidade carboidratos biantenados complexos ou epítomos homólogos, presentes na superfície celular, do que outras lectinas da subtribo *Diocleinae*. Este reconhecimento está diretamente relacionado com uma maior liberação de histamina por macrófagos (DAM et al., 1998).

No presente estudo, todos os animais imunizados foram submetidos a uma reação de DTH na décima semana pós-infecção. Nos nossos resultados, foi interessante observar que camundongos BALB/c controle (tratados com salina) apresentaram uma reação de DTH negativa enquanto que os camundongos C57BL/6 controle apresentaram reação de DTH positiva. A reação de hipersensibilidade tardia (DTH) caracteriza o estabelecimento de uma resposta celular específica, indicando resposta a uma exposição anterior ao antígeno. Os animais recuperados de uma infecção por *Leishmania* e considerados resistentes à infecção (C57BL/6) apresentam um DTH positivo, sugerindo uma resposta mediada pela resposta imune celular protetora; enquanto que os camundongos susceptíveis (BALB/c) não apresentam este tipo de reação. É possível observar que os animais imunizados com as lectinas ConBr e PAA não apresentaram uma resposta de DTH positiva, apenas as imunizações com KM(+) resultaram em uma reação de DTH positiva em alguns grupos. A imunização de camundongos BALB/c com KM(+) e KM(+)+SLA pelo esquema I levou a uma resposta DTH potente, enquanto a imunização com a KM(+) no esquema II não resultou em aparecimento de resposta de DTH em qualquer um dos grupos. A imunização de camundongos C57BL/6 com KM(+) no esquema I resultou em DTH positivo apenas para o grupo imunizado com SLA, enquanto a imunização pelo esquema II apenas o grupo imunizado com KM(+)+SLA teve um DTH positivo. É interessante

observar que nem todos os grupos que apresentaram uma resposta de DTH positiva foram protegidos após o desafio. É possível que mecanismos supressores estejam modulando o DTH nestes animais. Liew e colaboradores (1985) já haviam demonstrado que células T Lyt-1^+2^- L3T4^+ , que levam a um agravamento da lesão nos animais após desafio, produzidas em animais imunizados por via subcutânea com antígeno de *L. major* são responsáveis pela formação de uma reação de DTH positivo que pode ser transferido sistematicamente para animais não imunizados.

A dosagem de IgG anti-*L. amazonensis* também não pode ser relacionada com proteção contra infecção, já que os animais imunizados com PAA e PAA+SLA, que apresentaram um aumento dos títulos de anticorpos específicos, não foram protegidos.

O adjuvante ideal para vacina contra leishmaniose que induza proteção duradoura (seja composto de uma ou várias moléculas) deverá atrair e ativar a resposta de células apresentadoras de antígenos profissionais a direcionar uma diferenciação da resposta celular tipo Th1 (MOINGEON et al., 2001). A produção inicial de $\text{IFN-}\gamma$ é crucial para a definição de uma resposta protetora e a produção desta citocina é desencadeada pela presença, principalmente, de IL-12 no ambiente de diferenciação dos linfócitos T CD4^+ (MOSMANN & COFFMAN, 1989). A administração de IL-12 recombinante nos primeiros cinco dias da infecção por *Leishmania major* resultou não só na proteção dos animais como numa expressão mais elevada de $\text{IFN-}\gamma$ e IL-10 e mais reduzida de IL-4 no linfonodo destes animais (HEINZEL et al., 1993; WANG et al., 1994).

As lectinas ConBr e PAA mostraram, em trabalhos anteriores, serem potentes indutoras da produção de NO *in vitro* e *in vivo* (ANDRADE et al., 1999) ou de IFN- γ (BARRAL-NETTO et al., 1996). Estes dois produtos são importantes no processo de eliminação de parasitas intracelulares e estabelecimento de uma resposta protetora celular. Estes aspectos, contudo, não foram suficientes para o estabelecimento de efeito adjuvante destas lectinas na proteção de animais susceptíveis e resistentes vacinados contra *L. amazonensis*. Não podemos descartar a possibilidade destas lectinas também estarem induzindo a produção de citocinas anti-inflamatórias por leucócitos murinos como IL-4 ou IL-10, da mesma forma que induziram a secreção destas citocinas fortemente em CMSP humanas e IL-4 por células murinas. A combinação da ação destas citocinas, as quais podem estar sendo produzidas nos momentos iniciais da infecção por linfócitos T CD4+, pode resultar em uma condição que desfavoreça o hospedeiro frente a invasão pelo parasita (HEINZEL et al., 1991).

Já foi demonstrado que macrófagos murinos estimulados pela lectina KM(+) secretaram IFN- γ , em consequência da indução da produção de IL-12 p40, o que provavelmente influenciou a proteção parcial obtida em camundongos BALB/c imunizados com a lectina KM(+) e o antígeno SLA de *L. major*. Este efeito protetor foi bloqueado quando os animais foram tratados com anticorpo monoclonal anti-IL-12, evidenciando a importância desta citocina para o estabelecimento de uma resposta Th1 (PANUNTO-CASTELO et al., 2001). No presente trabalho, a mesma lectina KM(+) foi capaz de conferir proteção parcial a camundongos BALB/c imunizados apenas quando utilizada sozinha, enquanto que a associação KM(+) e

antígeno SLA de *Leishmania amazonensis* não resultou em proteção com uma resposta semelhante para os dois esquemas de imunização utilizados.

Vários fatores podem contribuir para a diferença de resultados encontrados com relação a imunização com a lectina KM(+). É possível que diferentes mecanismos estimulatórios possam estar envolvidos com a resposta imune às espécies de *Leishmania* do Novo Mundo. Já foram descritos alguns gens relacionados a resistência inata de algumas linhagens de camundongos relacionados a determinadas espécies de *Leishmania*. A resistência à infecção por *L. donovani*, por exemplo, parece estar relacionada ao controle do gen *Ish* (expresso em macrófagos) enquanto que a resistência adquirida a infecção ao mesmo parasita é influenciada pelo complexo H-2 (BLACKWELL et al., 1980, 1984). Os mecanismos de resposta imune do hospedeiro mamífero relacionado à infecção por *L. mexicana* também parecem ser diferentes aos relacionados a infecção por *L. donovani* ou *L. major* (ALEXANDER & KAYE, 1985).

A infecção por *L. amazonensis* é capaz de produzir um espectro maior de manifestações clínicas no homem (cutânea, VL e LMC) do que a infecção por *L. major* (revisto em BARRAL et al., 1991). A infecção experimental de hamsters com *L. amazonensis* ou *L. chagasi*, com posterior tratamento com estibogluconato, resultou em cura, com total eliminação do parasita apenas nos animais infectados com *L. chagasi*, evidenciando também uma maior dificuldade em controlar a infecção por *L. amazonensis* (FIGUEIREDO et al., 1999).

Neste trabalho podemos concluir que, apesar das lectinas ConBr, PAA e KM(+) terem a capacidade de induzir a produção de moléculas-chaves para o desenvolvimento de uma resposta celular, as mesmas não foram capazes de agir

como adjuvantes na imunização de camundongos BALB/c e C57BL/6 contra a infecção experimental por *L. amazonensis*.

6 CONCLUSÕES

Nossos dados sugerem:

1. As lectinas *Canavalia brasiliensis* (ConBr), *Pisum arvense* (PAA) e *Artocarpus integrifolia* (KM(+)) utilizadas *in vitro* mostraram ser imunoestimulatórias para células mononucleares murinas e humanas:
 - a) As lectinas ConBr e PAA estimularam a produção de IFN- γ e IL-4 por CMSP humanas *in vitro*, enquanto a lectina KM(+) não mostrou ser estimulatória para estas células nas doses testadas;
 - b) As lectinas ConBr, PAA e KM(+) estimularam a produção de IFN- γ , IL-10 e IL-4 por células esplênicas murinas.
2. As lectinas *Canavalia brasiliensis* (ConBr) e *Pisum arvense* (PAA) não exerceram atividade adjuvante na proteção após desafio com *Leishmania amazonensis* BA125 aos camundongos BALB/c e C57BL/6 quando foram imunizados com uma associação de uma destas lectinas ao antígeno solúvel de *Leishmania amazonensis* (SLA);
3. A lectina *Artocarpus integrifolia* (KM(+)) conferiu proteção parcial após desafio com *Leishmania amazonensis* BA125 a camundongos BALB/c imunizados isoladamente, mas não quando associada ao antígeno solúvel de *Leishmania amazonensis* (SLA).

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

AFRIN, F.; ANAM, K.; ALI, N. Induction of partial protection against *Leishmania donovani* by promastigote antigens in negatively charged liposomes. **J. Parasitol.**, **86**:730, 2000.

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

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

ALEXANDER, J.; KAYE, P.M. Immunoregulatory pathways in murine leishmaniasis: different regulatory control during *Leishmania mexicana mexicana* and *Leishmania major* infections. **Clin. Exp. Immunol.**, **61**: 674-682, 1985.

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

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

ANDRADE, Z.A.; REED, S.G.; ROTERS, S.B.; SADIGURSKY, M. Immunopathology of experimental cutaneous leishmaniasis. **Am. J. Pathol.**, **114**: 137-148, 1984.

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

ASSREUY, A.M.S.; MARTINS, G.J.; MOREIRA, M.E.F.; BRITO, G.A.C.; CAVADA, B.S.; RIBEIRO, R.A.; FLORES, C.A. Prevention of cyclophosphamide-induced

hemorrhagic cystitis by glucose-mannose binding plant lectins. **J. Urol.**, **161**: 1988-1993, 1999.

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

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

BADARO, R.; LOBO, I.; NAKATAMI, M.; MUINOS, A.; NETTO, E.M.; COLER, R.N.; REED, S.G. Successful use of a defined antigen/GM-CSF adjuvant vaccine to treat mucosal Leishmaniasis refractory to antimony: a case report. **Braz. J. Infect. Dis**, **5**: 223-32, 2001.

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

BAJTAY, Z.; JÓZSI, M.; BÁNKI, Z.; THIEL, S.; THIELENS, N.; ERDEL, A. Mannan-binding lectin and C1q bind to distinct structures and exert differential effects on macrophages. **Eur. J. Immunol**, **30**: 1706-1713, 2000.

BANCHONGLIKITKUL, C.; SMART, J.D.; GIBBS, R.V.; CAVADA, B.S.; SAMPAIO, A.; COOK, D.J.; ROGERS, D.J. Lectin in drug delivery-the binding of some *Diocleinae* lectins to the mucosal surfaces of the eye and mouth. **J. Pharm. Pharmacol**, **50**: 104, 1998.

BARBOSA, T.; ARRUDA, S.; CAVADA, B.; GRANGEIRO, T. B.; FREITAS, L.A.R.; BARRAL-NETTO, M. *In vivo* lymphocyte activation and apoptosis by lectins of the *Diocleinae* subtribe. **Mem.Inst.Oswaldo Cruz**, **96**: 673-678, 2001.

BARRAL, A.; PETERSEN, E.A.; SACKS, D.L.; NEVA, F.A. Late metastatic leishmaniasis in the mouse. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, **32**: 277-285, 1983.

BARRAL, A.; PEDRAL-SAMPAIO, D.; GRIMALDI, G.; MONEN, H.; McMAHON-PRATT, D.; JESUS, A.R.J.; ALMEIDA, R.; BADARO, R.; BARRAL-NETTO, M.; CARVALHO, E.M.; JOHNSON, W.D. Leishmaniasis in Bahia, Brazil: evidence that *Leishmania aazonensis* produces a wide spectrum of clinical disease. **Am.J. Trop. Med. Hyg.**, **44**: 536-546, 1991.

BARRAL-NETTO, M.; VON SOHSTEN, R.L.; TEIXEIRA, M.; DOS SANTOS, W.L.C.; POMPEU, M.L.; MOREIRA, R. A.; OLIVEIRA, J.T.A.; CAVADA, B.S.; FALCOFF, E.; BARRAL, A. *In vivo* protective effect of the lectin from *Canavalia*

brasiliensis on BALB/c mice infected by *Leishmania amazonensis*. **Acta Tropica**, **60**: 237-250, 1996.

BARRAL-NETTO, M.; BARRAL, A.; BRODSKYN, C.; CARVALHO, E.M.; REED, S.G. Cytotoxicity in human mucosal and cutaneous leishmaniasis. **Parasite Immunology**, **16**: 1-8, 1994.

BARRAL-NETTO, M.; BARRAL, A.; BROWNELL, C.E.; SKEIKY, Y.A.W.; ELLINGSWORTH, L.R.; TWARDZIK, D.R.; REED, S. Transforming growth factor- β in leishmanial infection: a parasite escape mechanism. **Science**, **257**: 545-548, 1992.

BARRAL-NETTO, M.; BRODSKYN, C.; CARVALHO, E.M.; BARRAL, A. [Human leishmaniasis@cytokines.bahia.br](mailto:Human_leishmaniasis@cytokines.bahia.br) **Brazilian J. of Medical and Biological Research**, **31**: 149-55, 1998.

BARRAL-NETTO, M.; DIEZ, R.; BADARÓ, R.; SAMPAIO, D.; BARRAL, A.; CARVALHO, E.M.; FALCOFF, E. Serum interferon activity of patients with leishmaniasis. **Brazilian J. Med. Biol. Res**, **22**: 1485-1487, 1989.

BARRAL-NETTO, M.; FREITAS, L.A.R.; ANDRADE, Z.A. Histopathologic changes induced by vaccination in experimental cutaneous leishmaniasis of BALB/c mice. **Am. J. Pathol.**, **127**: 271-278, 1987.

BARRAL-NETTO, M.; MACHADO, P.; BARRAL, A. Human cutaneous leishmaniasis: recent advances in physiopathology and treatment. **Eur. J. dermatol**, **5**: 104-113, 1995.

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

BARRAL-NETTO, M.; REED, S.G.; SADIGURSKY, M.; SONNENFELD, G. Specific immunization of mice against *Leishmania mexicana amazonensis* using solubilized promastigotes. **Clin. Exp. Immunol.**, **67**: 11-19, 1987.

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

BELOSEVIC, M.; FINBLOOM, D.S.; VAN DER MEIDE, P.; SLAYTER, M.V.; NACY, C.A. Administration of monoclonal anti-IFN- γ antibodies *in vivo* abrogates natural resistance of C3H/HeN mice to infection with *Leishmania major*. **J. Immunol.**, **143**: 266-274, 1989.

- BELKAID, Y.; MENDEZ, S.; LIRA, R.; KADAMBI, N.; MILON, G.; SACKS, D. A natural model of *Leishmania major* infection reveals a prolonged "silent" phase of parasite amplification in the skin before the onset of lesion formation and immunity. **J. Immunol.**, **165**: 969-977, 2000.
- BELKAID, Y.; HOFFMANN, K.F.; MENDEZ, S.; KAMHAWI, S.; UDEY, M.C.; WYNN, T.A.; SACKS, D.L. The role of interleukin (IL)-10 in the persistence of *Leishmania major* in skin after healing and the therapeutic potential of anti-IL-10 receptor antibody for sterile cure. **J.Exp.Med**, **194**: 1497-506, 2001.
- BENTO, C.A.; CAVADA, B.S.; OLIVEIRA, J.T.; MOREIRA, R.A.; BARJA-FIDALGO, C. Rat paw edema and leukocyte immigration by plant lectins. **Agents Actions**, **38**: 48-54, 1993.
- BERMAN, J.D. Human leishmaniasis: clinical, diagnostic, and chemotherapeutic developments in the last 10 years. **Clin. Infect. Dis.**, **24**: 684-703, 1997.
- BLACK, C.D.V.; KROCZEK, R.A.; BARBET, J.; WEINSTEIN, J.N.; SHEVACH, E.M. Induction of IL-2 receptor expression *in vivo*: response to Concanavalin A. **Cellular Immunol.**, **111**: 420-432, 1988.
- BLACKWELL, J.M.; FREEMAN, J.; BRADLEY, D.J. Influence of H-2 complex on acquired resistance to *Leishmania donovani* infection in mice. **Nature**, **283**: 72, 1980.
- BLACKWELL, J.M.; HOWARD, J.G.; LIEW, F.Y.; HALE, C. Mapping of the gene controlling susceptibility to cutaneous leishmaniasis. **Mouse Newsletter**, **70**: 86, 1984.
- BLACKWELL, J.M. Genetic susceptibility to leishmanial infections: studies in mice and man. **Parasitology**, **112**: S67-S74, 1996.
- BOURREAU, E.; PRÉVOT, G.; PRADINAUD, R.; LAUNOIS, P. Interleukin (IL)-13 is the predominant Th2 cytokine in localized cutaneous leishmaniasis lesions and renders specific CD4+ T cells unresponsive to IL-12. **J. Infect. Dis.**, **183**: 953-9, 2001.
- BOURREAU, E.; PRÉVOT, G.; PRADINAUD, R.; LAUNOIS, P. Unresponsiveness of specific T cells to IL-12 is associated with active cutaneous leishmaniasis owing to *Leishmania guyanensis*. **Scand. J. Immunol.**, **54**: 335-9, 2001.
- BOURREAU, E.; PRÉVOT, G.; PRADINAUD, R.; LAUNOIS, P. High intralesional interleukin-10 messenger RNA expression in localized cutaneous leishmaniasis is associated with unresponsiveness to treatment. **J. Infect. Dis.**, **184**: 1628-30, 2001.

- CAMPOS-NETTO, A.; PORROZZI, R.; GREESON, K.; COLER, R.N.; WEBB, J.R.; SEIKY, Y.A.; REED, S.G.; GRIMALDI, G. Jr. Protection against cutaneous leishmaniasis induced by recombinant antigen in murine and nonhuman primate models of the human disease. **Infect. Immun.**, **69**: 4103-8, 2001.
- CARVALHO, E.M.; BADARÓ, R.; REED, S.G.; JONES, T.C.; JOHNSON, W.D. Absence of gamma interferon and interleukin 2 production during active visceral leishmaniasis. **J.Clin. Invest**, **76**: 2066-2069, 1985.
- CAVADA, B.S.; BARBOSA, T.; GRANGEIRO, T.B.; BARRAL-NETTO, M. Revisiting *proteus*: Do minor changes in lectin structure matter in biological activity? Lessons from and potential biotechnological uses of the Diocleinae subtribe lectins. **Current Protein and Peptide Sci.**, **2**: 123-135, 2001.
- CAVADA, B.S.; MOREIRA, R.A.; OLIVEIRA, J.T.A.; GRANGEIRO, T.B. Primary structures and functions of plant lectins. **R. Bras. Fisiol. Veg.**, **5**: 193-201, 1993.
- CERF, B.J., JONES, T.C.; SAMPAIO, D.; TEIXEIRA, R.; JOHNSON, J.R.; W.D. Malnutrition as a risk factor for severe visceral leishmaniasis. **J. Infect. Dis.**, **156**: 1030-1033, 1987.
- CHACE, J. H.; HOOKER, N.A.; MILDENSTEIN, K.L.; KRIEG, A.M.; J. S. COWDERY, J.S. Bacterial DNA-induced NK cell IFN-gamma production is dependent on macrophage secretion of IL-12. **Clin Immunol Immunopathol.**, **84**:185, 1997.
- CHANG, J.; TSUYOSHI, F.; BRENNAN, P.; McNEIL, M.; TURCO, S.J.; SIBILLE, J.-C.; SNAPPER, M.; AISEN, P.; BLOOM, B.R. Microbial glycolipids: possible virulence factors that scavenge oxygen radicals. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, **86**: 2453-2457, 1989.
- CHRISPEELS, M.J.; RAIKHEL, N.V. Lectins, lectin genes and their role in plant defense. **The Plant Cell**, **3**: 1-9, 1991.
- COOPER, H. S. Lectins as probes in histochemistry and immunohistochemistry: the peanut (*Arachis hypogaea*) lectin. **Hum. Pathol.**, **15**: 904, 1984.
- COURRET, N.; FREHEL, C.; PRINA, E.; LANG, T.; ANTOINE, J.-C. Kinetics of the intracellular differentiation of *Leishmania amazoensis* and internalization of host MHC molecules by the intermediate parasite stages. **Parasitology**, **122**: 263-279, 2001.
- COX, J.; COULTER, A.R. Adjuvants – a classification and review of their modes of action. **Vaccine**, **15**: 248-56, 1997.
- DAM, T.K.; CAVADA, B.S.; GRANGEIRO, T.B.; SANTOS, C.; SOUSA, F.; OSCARSON, S.; BREWER, C.F. Diocleinae lectins are a group of proteins with

- conserved binding sites to the core trimannoside of asparagine-linked oligosaccharides and differential specificities for complex carbohydrates. **J. Biol. Chem.**, **273**: 12082-12088, 1998.
- DA SILVA, R. P.; HALL, B.F.; JOINER, K.A.; SACKS, D.L. CR1, the C3b receptor, mediates binding of infective *Leishmania major* metacyclic promastigotes to human macrophages. **J. Immunol.**, **143**: 617, 1989.
- DEL GIUDICE, G.; RAPPUOLI, R. Genetically derived toxoids for use as vaccines and adjuvants. **Vaccine**, **17**: 44-52, 1999.
- DE LUCA, P.M.; MAYRINK, W.; PINTO, J.A.; COUTINHO, S.G.; SANTIAGO, M.A.; TOLEDO, V.P.; COSTA, C.A.; GENARO, O.; REIS, A.B.; MENDONÇA, S.C. A randomized double-blind placebo-controlled trial to evaluate the immunogenicity of a candidate vaccine against American tegumentary leishmaniasis. **Acta Trop.**, **21**: 251-60, 2001.
- DHALIWAL, J. S., LIEW, F.Y.; COX, F.E. Specific suppressor T cells for delayed-type hypersensitivity in susceptible mice immunized against cutaneous leishmaniasis. **Infect. Immun.**, **49**:417, 1985.
- DOHERTY, T.M.; COFFMAN, R. *Leishmania* antigens presented by GM-CSF-derived macrophages protect susceptible mice against challenge with *Leishmania major*. **J. Immunol**, **150**: 5476-83, 1993.
- DUMONTEIL, E.; ANDRADE-NARVAREZ, F.; ESCOBEDO-ORTEGON, J.; RAMIREZ-SIERRA, M.J.; VALENCI-PACHECO, G.; FLORES-SERRANO, A.; CANTO-LARA, S.; ARJONA-TORRES, A. Comparative study of DNA vaccines encoding various antigens against *Leishmania mexicana*. **Dev. Biol**, **104**: 135-41, 2000.
- ELHAY, M.; KELLEHER, M.; BACIC, A.; MCCONVILLE, M.J.; TOLSON, D.L.; PEARSON, T.W.; HANDMAN, E. Lipophosphoglycan expression and virulence in ricin-resistant variants of *Leishmania major*. **Mol. Biochem. Parasitol.**, **40**: 255, 1990.
- FENG, Z.Y.; LOUIS, J.; KINDLER, V.; PEDRAZZINI, T.; ELIASON, J.F.; BEHIN, R.; VASSALLI, P. Aggravation of experimental cutaneous leishmaniasis in mice by administration of interleukin 3. **Eur. J. Immunol**, **18**: 1245-1251, 1988.
- FERNANDES, A.P.; CARVALHO, F.A.; TAVARES, C.A.; SANTIAGO, H.C.; CASTRO, G.A.; TAFURI, W.L.; FERREIRA, L.A.; GAZZINLELLI, R.T. Combined interleukin-12 and topical chemotherapy for established *Leishmania* drastically reduces tissue parasitism and relapses in susceptible mice. **J. Infect. Dis.**, **183**: 1646-52, 2001.

- FERREIRA, R.R.; CAVADA, B.S.; MOREIRA, R.A.; OLIVEIRA, J.T.A.; GOMES, J.C. Characteristics of the histamine release from hamster cheek pouch mast cells stimulated by lectins from Brazilian beans and concanavalin A. **Inflamm. Res.**, **45**: 442-447, 1996.
- FIGUEIREDO, E.M.; COSTA E SILVA, J. Experimental treatment with sodium stibogluconate of hamsters infected with *Leishmania* (*Leishmania*) *chagasi* and *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis*. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, **32**: 191-3, 1999.
- FIorentino, D.F.; ZLOTNIK, A.; MOSMANN, T.R.; HOWARD, M.; O'GARRA, A. IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages. **J. Immunol.**, **147**: 3815-3822, 1991.
- FISCHER, C.; VOSS, A.; ENGEL, J. Development status of miltefosine as first oral drug in visceral and cutaneous leishmaniasis. **Med. Microbiol. Immunol.** **190**: 85-7, 2001.
- FOLLADOR, I.; ARAUJO, C.; ORGE, G.; CHENG, L.H.; CARVALHO, L.P.; BACELLAR, O.; ALMEIDA, R.P.; CARVALHO, E.M. Immune responses to a inactive vaccine against american cutaneous leishmaniasis together with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. **Vaccine**, **20**: 1365-1368, 2002.
- FRUTH, U.; SOLIOZ, N.; LOUIS, J.A. *Leishmania major* interferes with antigen presentation by infected macrophages. **J. Immunol.**, **150**: 1857-64, 1993.
- GABIUS, H.-J. Animal lectins. **Eur. J. Biochem.**, **243**: 543-576, 1997.
- GASSER, R. A.; MAGILL, A.J.Jr.; OSTER, C.N.; FRANKE, E.D.; GROGL, M.; BERMAN, J.D. Pancreatitis induced by pentavalent antimonial agents during treatment of leishmaniasis. **Clin. Infect. Dis.**, **18**: 83, 1994.
- GESSNER, A.; VIETH, M.; WILL, A.; SCHRÖPPEL, K.; RÖLLINGHOFF, M. Interleukin-7 enhances antimicrobial activity against *Leishmania major* in murine macrophages. **Infection and Immunity.**, **61**: 4008-4012, 1993.
- GHALIB, H. W.; WHITTLE, J.A.; KUBIN, M.; HASHIM, F.A.; A. M. EL-HASSAN, A.M.; GRABSTEIN, K.H.; TRINCHIERI, G.; REED, S.G. IL-12 enhances Th1-type responses in human *Leishmania donovani* infections. **J. Immunol.**, **154**: 4623, 1995.
- GHOSH, A.; ZHANG, W.W.; MATLASHEWSKI, G. Immunization with A2 protein results in a mixed Th1/Th2 and humoral response which protects mice against *Leishmania donovani* infections. **Vaccine**, **20**: 59-66, 2001.

- GIANNASCA, P.J.; BODEN, J.A.; MONATH, T.P. Targeted delivery of antigen to hamster nasal lymphoid tissue with M-cell directed lectins. **Infection and Immunity**, **65**: 4288-4298, 1997.
- GOLDSTEIN, I.J. What should be called a lectin? **Nature**, **285**: 66, 1980.
- GOMES, J.C.; ROSSI, R.R.; CAVADA, B.S.; MOREIRA, L.I.M.; OLIVEIRA, J.T.A. Histamine release induced by glucose (mannose)-specific lectins isolated from brazilian beans. Comparison with Concanavalin A. **Agents Actions.**, **41**: 132-135, 1994.
- GOMES, N.A., DOS REIS, G.A. The dual role of CTLA-4 in *Leishmania* infection. **Trends Parasitol**, **10**: 487-91, 2001.
- GONZALO, R.M.; RODRIGUEZ, J.R.; RODRIGUEZ, D.; GONZALEZ-ASEGUINOLAZA, G.; LARRAGA, V.; ESTE, M. Protective immune response against cutaneous leishmaniasis by prime/booster immunization regimens with vaccinia virus recombinants expressing *Leishmania infantum* p36/LACK and IL-12 in combination with purified p36. **Microbes Infect.**, **3**: 701-11, 2001.
- GREEN, S. J.; MELTZER, M.S.; HIBBS, J.B.; NACY, C.A. Activated macrophages destroy intracellular *Leishmania major* amastigotes by an L-arginine-dependent killing mechanism. **J. Immunol.**, **144**: 278, 1990.
- GREIL, J.; BODENDORFER, B.; RÖLLINGHOFF, M.; SOLBACH, W. Application of recombinant granulocyte-macrophage colony-stimulating factor has a detrimental effect in experimental murine leishmaniasis. **Eur. J. Immunol.**, **18**: 1527-1533, 1988.
- GURUNATHAN, S.; WU, C.Y.; FREIDAG, B.L.; SEDER, R.A. DNA vaccines: a key for inducing long-term cellular immunity. **Curr. Opin. Immunol.**, **12**: 442-7, 2000.
- HAAR, J. L.; RAYNOR, R.H.; RUSSELL, E.C.; BHATNAGAR, A.S.; MOHANAKUMAR, T. Ultrastructural analysis of acute lymphoblastic cells: peanut lectin binding correlates with degree of differentiation of the leukemic cells. **Exp.Hematol.**, **13**: 169, 1985.
- HANSEN, G.; YEUNG, V.P.; BERRY, G.; UMETSU, D.T.; DeKRUYFF, R. Vaccination with heat-killed *Listeria* as adjuvant reverses established allergen-induced airway hyperreactivity and inflammation: role of CD8+T cells and IL-18. **J. Immunol.**, **164**: 223-230, 2000.
- HARMS, G.; CHÉHADÉ, A.K.; RACZ, P.; DOUBA, M.; NAIFF, R.D.; FELDMEIER, H.; ZWINGENBERGER, K.; TALHARI, S.; MOUAKEH, A.; NÄKEL, L.; KREMSNER, P.G.; BIENZLE, U. Effects of intradermal gamma-interferon in cutaneous leishmaniasis. **The Lancet**, **10**: 1287-1292, 1989.

- HOWARD, J. G.; LIEW, F.Y.; HALE, C.; NICKLIN, S. Prophylactic immunization against experimental leishmaniasis. II. Further characterization of the protective immunity against fatal *Leishmania tropica* infection induced by irradiated promastigotes. **J.Immunol.**, **132**: 450, 1984.
- HEINY, B.M.; ALBRECHT, V.; BEUTH, J. Correlations of immune cell activities and beta-endorphin release in breast carcinoma patients treated with galactose-specific lectin standardized mistletoe extract. **Anticancer Res.**, **18**: 583-586, 1998.
- HEINZEL, F.P.; RERKO, R.M.; HATAM, F.; LOCKSLEY, R.M. IL-2 is necessary for the progression of leishmaniasis in susceptible murine hosts. **J. Immunol.**, **150**: 3924-3931, 1993.
- HEINZEL, F.P.; SADICK, M.D.; HOLADAY, B.J.; COFFMAN, R.L.; LOCKSLEY, R.M. Reciprocal expression of interferon- γ or interleukin 4 during the resolution or progression of murine leishmaniasis. Evidence for the expansion of distinct helper T cell subsets. **J. Exp. Med.**, **169**: 59-72, 1989.
- HEINZEL, F.P.; SADICK, M.D.; SANDESH, S.M.; LOCKSLEY, R.M. Production of interferon γ , interleukin 2, interleukin 4, and interleukin 10 by CD4⁺ lymphocytes *in vivo* during healing and progressive murine leishmaniasis. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, **88**: 7011-7015, 1991.
- HEINZEL, F.P.; SCHOENHAUT, D.S.; RERKO, R.M.; ROSSER, L.E.; GATELY, M.K. Recombinant interleukin 12 cures mice infected with *Leishmania major*. **J. Exp.Med.**, **177**: 1505-1509, 1993.
- HIRSH, A.M. Role of lectins (and rhizobial exopolysaccharides) in legume nodulation. **Curr. Opin. Plant Biol.**, **2**: 320-326, 1999.
- HOLADAY, B.J.; SADICK, M.D.; WANG, Z.; REINER, S.L.; HEINZEL, F.P.; PARSLow, T.G.; LOCKSLEY, R.M. Reconstitution of *Leishmania* immunity in severe combined immunodeficient mice using Th1- and Th2-like cell lines. **J. Immunol.**, **147**: 1653-1658, 1991.
- JENG, K.C.G.; FRIGERI, L.G.; LIU, F-T. Non-endogenous lectin, galectin-3 (ϵ BP/Mac-2), potentiates IL-1 production by human monocytes. **Immunology Letters**, **42**: 113-116, 1994.
- KANE, M.M.; MOSSER, D.M. The role of IL-10 in promoting disease progression in leishmaniasis. **J. Immunol.**, **166**: 1141-1147, 2001.
- KAYESHTA, R.; BERRY, A.; HAJELA, K. Studies on a glucose-binding lectin from peripheral blood lymphocytes. **Immunol. Lett.**, **38**: 201-5, 1993.

KELLEHER, M.; BACIC, A.; HANDMAN, E. Identification of macrophage-binding determinant of lipophosphoglycan from *Leishmania major* promastigotes. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, **89**: 6-10, 1992.

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

KOUFMAN, K.; EGOZ, N.; GREENBLATT, C.L.; HANDMAN, E.; MONTILIO, B. Observations on immunization against cutaneous leishmaniasis. **Israel J. Med. Sci.**, **14**: 218-22, 1978.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the bacteriophage T4. **Nature**, **227**: 680-685, 1970.

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

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

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

LEAL, L.M.C.C.; MOSS, D.W.; KUHN, R.; MÜLLER, W.; LIEW, F.Y. Interleukin-4 transgenic mice of resistant background are susceptible to *Leishmania major* infection. **Eur. J. Immunol.**, **23**: 566-569, 1993.

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

LICASTRO, F.; DAVIS, L.J.; MORINI, M.C. Lectins and superantigens: membrane interactions of these compounds with T lymphocytes affect immune response. **Int. J. Biochem.**, **25**: 845-52, 1993.

LIEW, F.Y.; HALE, C.; HOWARD, J.G. Prophylactic immunization against experimental leishmaniasis. IV. Subcutaneous immunization against experimental leishmaniasis. **J. Immunol.**, **135**: 2095-2101, 1985.

LIEW, F.Y.; MILLOTT, S.; LI, Y.; LELCHUK, R.; CHAN, L.W.; ZILTENER, H. Macrophage activation by interferon- γ from host-protective T cells is inhibited by

interleukin (IL)3 and IL4 produced by disease-promoting T cells in leishmaniasis. **Eur. J. Immunol.**, **19**: 1227-1232, 1989.

LIEW, F.Y.; HALE, C.; HOWARD, J. Prophylactic immunization against experimental leishmaniasis. IV. Subcutaneous immunization prevents the induction of protective immunity against fatal *Leishmania* infection. **J. Immunol.**, **135**: 2095-2107, 1985.

LIEW, F.Y.; SINGLETON, A.; CILLARI, E.; HOWARD, J.G. Prophylactic immunization against experimental leishmaniasis. V. Mechanism of the anti-protective blocking effect induced by subcutaneous immunization against *Leishmania major* infection. **J. Immunol.**, **135**: 2102-2107, 1985.

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

LIPFORD, G. B.; SPARWASSER, T.; BAUER, M.; S. ZIMMERMANN, S.; KOCH, E.S.; HEEG, K.; WAGNER, H. Immunostimulatory DNA: sequence-dependent production of potentially harmful or useful cytokines. **Eur.J.Immunol.**, **27**: 3420, 1997.

MAILLARD, I.; LAUNOIS, P.; HIMMERILCH, H.; ACHA-ORBEA, H.; DIGGELMANN, H.; LOCKSLEY, R.M.; LO, J.A. Functional plasticity of the LACK-reactive Vbeta4-Valpha8 CD4(+)T cell normally producing the early IL-4 instructing Th2 cell development and susceptibility to *Leishmania major* in BALB/c mice. **Eur. J. Immunol.**, **31**: 1288-96, 2001.

MARZINOWSKI, E.I.; SCHURENKOWA, A. Oriental sore and immunity against it. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, **18**: 67, 1924..

MARZOCHI, K.B.; MARZOCHI, M.A.; SILVA, A.F.; GRATIVOL, N.; DUARTE, R.; CONFORT, E.M.; MODABBER, F. Phase I study of na inactivated vaccine against american tegumentary leishmaniasis in normal volunteers in Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, **93**: 205-12, 1998.

MAYRINK, W.; ANTUNES, C.M.; DA COSTA, C.A.; MELO, M.N.; DIAS, M.; MICHALICK, M.S.; MAGALHÃES, P.A.; LIMA, A.O.; WILLIAMS, P. Further trials of a vaccine against new world cutaneous leishmaniasis. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, **80**: 1001-6, 1986.

MELBY, P.C.; YANG, J.; ZHAO, W.; PEREZ, L.E.; CHENG, J. *Leishmania donovani* p36(LACK) DNA vaccine is highly immunogenic but not protective against experimental visceral leishmaniasis. **Infect. Immun.**, **69**: 4719-25, 2001.

MILANO, S.; ARCOLEO, F.; DIELI, M.; D'AGOSTINO, R.; DE NUCCI, G.; D'AGOSTINO, P.; CILLARI, E. *Ex vivo* evidence for PGE₂ and LTB₄ involvement

in cutaneous leishmaniasis: relation with infection status and cytokine production. **Parasitology**, **112**: 13-19, 1996.

MOHAN, A.; SETH, S. Oral miltefosine in the treatment of kala-azar. **Natl. Med. J. India.**, **13**: 202-3, 2000.

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

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

MOORE, K.J.; MATLASHEWSKI, G. Intracellular infection by *Leishmania donovani* inhibits macrophage apoptosis. **J. Immunol.**, **152**: 2930-2937, 1994.

MOREIRA, R.A.; AINOUS, I.L.; OLIVEIRA, J.T.A.; CAVADA, B.S. Plant lectins, chemical and biological aspects. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, **86**: 211-18, 1991.

MOSMANN, T.R.; COFFMAN, R.L. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. **Ann. Ver. Immunol.**, **7**: 145-73, 1989.

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

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

MURRAY, H.W.; RUBIN, B.Y.; ROTHERMEL, C.D. Killing of intracellular *Leishmania donovani* by lymphokine-stimulated human mononuclear phagocytes. **J. Clin. Invest.**, **72**: 1506-1510, 1983.

NOWELL, P.C. Phytohemagglutinin: an initiator of mitosis in cultures of normal human leukocytes. **Cancer Res.**, **20**: 462-66, 1960.

OMS: Organização Mundial de Saúde. Disponível em:
<<http://www.who.int/ctd/html/leish.html>> Acesso em 28 de janeiro de 2002.

OKUYAMA, T.; MAEHARA, Y.; KAJEDI, Y.; TSUIJITANI, S.; KORENAGA, D.; SUGIMACHI, K. Interrelation between tumor-associated cell surface glycoprotein

and host immune response in gastric carcinoma patients. **Cancer**, **82**: 1468-75, 1998.

PADIGEL, U.M.; PERRIN, P.J.; FARRELL, J.P. The development of a Th1-type response and resistance to *Leishmania major* infection in the absence of CD40-CD40L costimulation. **J. Immunol.**, **167**: 5874-9, 2001.

PALATNIK-DE-SOUSA, C.B.; PARAGUAI-DE-SOUSA, E.; GOMES, E.M.; BOROJEVIC, R. Experimental murine *Leishmania donovani* infection: immunoprotection by the fucose-mannose ligand (FML). **Brazilian J. Med. Biol. Res.**, **27**: 547-551, 1994.

PANUNTO-CASTELO, A.; SOUZA, M.A.; ROQUE-BARREIRA, M.C.; SILVA, J.S. KM (+), a lectin from *Artocarpus integrifolia*, induces IL-12 p40 production by macrophages and switches from type 2 to type 1 cell-mediated immunity against *Leishmania major* antigens, resulting in BALB/c mice resistance to infection. **Glycobiology**, **11**: 1035-42, 2001.

PARK, W.B.; LYU, S.Y.; KIM, J.H.; CHOI, S.H.; CHUNG, H.K.; AHN, S.H.; HONG, S.Y.; YOON, T.J.; CHOI, M.J. Inhibition of tumour growth and metastasis by Korean mistletoe lectin is associated with apoptosis and antiangiogenesis. **Cancer Biother. Radiopharm.**, **16**: 439-47, 2001.

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

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

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

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

PEUMANS, W.J.; VAN DAMME, E.J.M. The role of lectins in plant defense. **Histochem.J.**, **27**: 253-271, 1995.

PINTADO, V.; LOPEZ-VELEZ, R. HIV-associated visceral leishmaniasis. **Clin. Microbiol. Infect.**, **6**: 291-300, 2001, 2001.

PRATAP, J.V.; JEYAPRAKASH, A.A.; RANI, P.G.; SEKAR, K.; SUROLIA, A.; VYAYAN, M. Crystal structures of artocarpin, a Moraceae lectin with mannose

specificity, and its complex with methyl- α -D-mannose: implications to the generation of carbohydrate specificity. **J. Mol. Biol.**, **317**: 237-47, 2002.

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

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

RAFATI, S.; SALMANIAN, A.H.; TAHERI, T.; VAFA, M.; FASEL, N. A protective cocktail vaccine against murine cutaneous leishmaniasis with DNA encoding cysteine proteinases of *Leishmania major*. **Vaccine**, **19**: 3360-75, 2001.

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

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

RAMOS, M.V.; MOREIRA, R.A.; OLIVEIRA, J.T.A.; CAVADA, B.S.; ROUGÉ, P. 1996. Structural similarities among *Diocleae* lectins. **Lectins, Biology, Biochemistry, Clinical Biochemistry** - T.C. BOG-HANSEN Eds., Cap. 11, p.44-49, 1999.

REINER, N.E.; WINNIE, N., MA, T.; McMASTER, R. Kinetics of γ interferon binding and induction of major histocompatibility complex class II mRNA in *Leishmania*-infected macrophages. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, **85**: 4330-4334, 1988.

REINER, S.L.; ZHENG, S.; WANG, Z.-E.; STOWRING, L.; LOCKSLEY, R.M. *Leishmania* promastigotes evade interleukin 12 (IL-12) induction by macrophages and stimulate a broad range of cytokine from CD4+ T cells during initiation of infection. **J. Exp. Med.**, **179**: 447-456, 1994.

ROCHA, P.N.; ALMEIDA, R.P.; BACELLAR, O.; JESUS, A.R.; FILHO, D.C.; FILHO, A.C.; BARRAL, A.; COFFMAN, R.L.; CARVALHO, E.M. Down-regulation of Th1 type of response in early human american cutaneous leishmaniasis. **J. Infect. Diseases**, **180**: 1731-4, 1999.

RODRIGUEZ, D.; CAVADA, B.S.; OLIVEIRA, J.T.; MOREIRA, R.A.; RUSSO, M. Differences in macrophage stimulation and leukocyte accumulation in response to

intraperitoneal administration of glucose/mannose-binding plant lectins. **Braz.J.Med.Biol.Res.**, **25**: 823-6, 1992.

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

ROQUE-BARREIRA, M.C.; CAMPOS-NETO, A. Jacalin: na IgA-binding lectin. **J. Immunol.**, **134**: 1740-3, 1985.

ROQUE-BARREIRA, M.C.; PRAZ, F.; HALBWACHS-MECARELLI, L.; GREENE, L.J.; CAMPOS-NETO, A. IgA-affinity purification and characterization of the lectin jacalin. **Brazilian J. Med. Biol. Res.**, **19**: 149-157, 1986.

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

ROSENBERG, M.; CHITAYAT, D.; TZEHOVAL, E.; WAXDAL, M.J.; SHARON, N. Detection and enumeration of monocytes in human blood with peanut agglutinin. **J. Immunol. Methods**, **81**: 7, 1985.

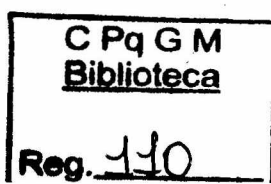
ROUGÉ, P.; RICHARDSON, M.; RANFAING, P.; YARWOOD, A.; CAVADA, B.S. Single- and two- chain legume lectins as phylogenetic markers of speciation. **Biochem. Systematics and Ecology**, **15**: 341-8, 1987.

SALAZAR, J.H. Aspectos imunológicos de la leishmaniasis americana. Ensayos profilácticos mediante vacunaciones con formas leptomonas vivas de cultivo de *Leishmania brasiliensis* Vianna. **Arquivos Venezolanos de Med. Trop. y Parasitol. Med.**, **5**: 365-84, 1965.

SANTOS-DE-OLIVEIRA, R.; DIAS-BARUFFI, M.; THOMAZ, S.M.; BELTRAMINI, L.M.; ROQUE-BARREIRA, M.C. A neutrophil migration-inducing lectin from *Artocarpus integrifolia*. **J. Immunol.** **153**: 1798-1807.

SCHARTON, T.M.; SCOTT, P. Natural killer cells are a source of interferon- γ that drives differentiation of CD4+ T cell subsets and induces early resistance to *Leishmania major* in mice. **J. Exp. Med.**, **178**: 567-577, 1993.

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



SCOTT, P. IFN- γ modulates the early development of Th1 and Th2 responses in a murine model of cutaneous leishmaniasis. **J. Immunol.**, **147**:3149-3155, 1991.

SEDER, R.A.; HILL, A.V. Vaccines against intracellular infections requiring cellular immunity. **Nature**, **406**: 793-7, 2000.

SHARON, N. Lectin-carbohydrate complexes of plants and animals: na atomic view. **Trends in Biochemmical Science**, **18**: 221-6, 1993.

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

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

SHIRODKAR, S.; HUTCHINSON, R.L.; PERRY, D.L.; WHITE, J.L.; HEM, S.L. Aluminium compounds used as adjuvantsin vaccines. **Pharm. Res.**, **7**: 1282-8, 1990.

SILVA, L.I.M.M.; RAMOS, M.V.; CAJAZEIRAS, J.B.; FERREIRA, P.R.; CARVALHO, C.A.V.; GRANGEIRO, T.B.; NUNES, E.P.; SAMPAIO, A.H.; FREITAS, B.T.; SILVEIRA, J.A.G.; CAVADA, B.S. Lectin from *Pisum arvense* seeds behave differently from storage proteins during germination in the darkness. **Rev. Bras. de Fisiologia Vegetal**, **12**: 255-262, 2000.

SPARWASSER, T.; KOCH, E.S.; VABULAS, R.M.; HEEG, K.; LIPFORD, G.B.; ELLWART, J.W.; WAGNER, H. Bacterial DNA and immunostimulatory CpG oligonucleotides trigger maturation and activation of murine dendritic cells. **Eur. J. Immunol.**, **28**: 2045, 1998.

SOTO, J.T.; GUTIERREZ, P.; NICHOLLS, R.S.; PADILHA, J.; ENGEL, J.; FISCHER, C.; VOSS, A. Treatment of american cutaneous leishmaniasis with mitelfosine, na oral agent. **J. Clin. Infect. Dis.**, **33**: E57-61, 2001.

SRIRUPA, M.; BHATTACHARYYA, S.; MAJHI, R.; DE, T.; NASKAR, K.; MAJUMDAR, S.; ROY, S. Use of na attenuated leishmanial parasite as an immunoprophylatic and immunotherapeutic agent against murine visceral leishmaniasis. **Clinical and Diagnostic Lab. Immuno.**, **7**: 233-40, 2000.

STACEY, K.J.; BLACKWELL, J.M. Immunostimulatory DNA as adjuvant in vaccination against *Leishmania major*. **Infection and Immunity**, **67**: 3719-26, 1999.

STENGER, S.; THÜRING, H.; RÖLLINGHOFF, M.; BOGDAN, C. Tissue expression of inducible nitric oxide synthase is closely associated with resistance to *Leishmania major*. **J. Exp. Med.**, **180**: 783-793, 1994.

- SUNDAR, S. Treatment of visceral leishmaniasis. **Med. Microbiol. Immunol.**, **190**: 89-92, 2001.
- SUNDAR, S.; PAI, K.; KUMAR, R.; PATHAK-TRIPATHI, K.; GAM, A.A.; RAY, M.; KENNEY, R.T. Resistance to treatment in Kala-azar: speciation of isolates from northern India. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, **65**: 193-6, 2001.
- SYPEK, J.P.; CHUNG, C.L.; MAYOR, E.H.; SUBRAMANYAM, J.M.; GOLDMAN, S.J.; SIEBURTH, D.S.; WOLF, S.F.; SCHAUB, R.G. Resolution of cutaneous leishmaniasis: interleukin 12 initiates a protective T helper type 1 immune response. **J. Exp. Med.**, **177**: 1797-1802, 1993.
- TITUS, R.; DeKREY, G.K.; MORRIS, R.V.; SOARES, M.B. Interleukin-6 deficiency influences cytokine expression in susceptible BALB/c mice infected with *Leishmania major* but does not alter the outcome of disease. **Infect. Immun.**, **69**: 5189-92, 2001.
- TITUS, R.G.; LIMA, G.C.; ENGERS, H.D.; LOUIS, J.A. Exacerbation of murine cutaneous leishmaniasis by adoptive transfer of parasite specific helper T cell populations capable of mediating *Leishmania major*-specific delayed-type hypersensitivity. **J. Immunol.**, **133**: 1594-1600, 1994.
- TORRENTERA, F.A.; GLAICHENHAUS, N.; LAMAN, J.D.; CARLIER, Y. T-cell responses to immunodominant LACK antigen do not play a critical role in determining susceptibility of BALB/c mice to *Leishmania mexicana*. **Infect. Immun.**, **69**: 617-21, 2001.
- UZONNA, J.E.; BRETSCHER, P.A. Anti-IL-4 antibody therapy causes regression of chronic lesions caused by medium-dose *Leishmania major* infection in BALB/c mice. **Eur. J. Immunol.**, **31**: 3175-84, 2001.
- VELEZ, I.D.; DEL PILAR, A.S.; ARBEALAEZ, M.P.; GILCHRIST, K.; ROBLEDO, S.M.; PUERTA, J.A.; BERMAN, J.; MODABBER, F. Safety and immunogenicity of a killed *Leishmania (L.) amazonensis* vaccinated against cutaneous leishmaniasis in Colombia: a randomized controlled trial. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, **94**: 698-703, 2000.
- VERAS, P.S.T.; BRODSKYN, C.I.; BALESTIERI, F.M.P.; FREITAS, L.A.R.; RAMOS, A.P.S.; QUEIROZ, A.R.P.; BARRAL, A.; BEVERLEY, S.M.; BARRAL-NETTO, M. A *dhfr-ts*⁻ *Leishmania major* knockout mutant cross-protects against *Leishmania amazonensis*. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, **94**: 491-496, 1999.
- VIEIRA, L.Q.; HONDOWICZ, B.D.; AFONSO, L.C.C.; WYSOCKA, M.; TRINCHIERI, G.; SCOTT, P. Infection with *Leishmania major* induces interleukin-12 production in vivo. **Immunology Letters**, **40**: 157-161, 1994.

- WANG, Z.-E.; ZHENG, S.; CORRY, D.B.; DALTON, D.K.; SEDER, R.A.; REINER, S.L.; LOCKSLEY, R.M. Interferon γ -independent effects of interleukin 12 administered during acute or established infection due to *Leishmania major*. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, **91**: 12932-12936, 1994.
- WILSON, M. E.; YOUNG, B.M.; ANDERSEN, K.P.; WEINSTOCK, J.V.; METWALI, A.; ALI, M.; DONELSON, J.E. A recombinant *Leishmania chagasi* antigen that stimulates cellular immune responses in infected mice. **Infect. Immun.**, **63**: 2062, 1995.
- WOLDAY, D.; BERHE, N.; AKUFFO, H.; DESJEUX, H.; BRITTON, S. Emerging *Leishmania* /HIV co-infection in Africa. **Med. Microbiol. Immunol.**, **190**: 65-7, 2001.
- YIM, M.; ONO, T.; IRIMURA, T. Mutated plant lectin library useful to identify different cells. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, **98**: 2222-2225, 2001.
- YOON, T.J.; KANG, T.B.; HER, E.; KIM, S.H.; AZUMA, I.; KIM, J.B. Cellular and humoral adjuvant activity of lectins isolated from Lorean mistletoe (*Viscum album colaratum*). **Int. Immunopharmacol.**, **5**: 881-9, 2001.
- ZIMMERMANN, S.; EGETER, O.; HAUSMANN, S.; LIPFORD, G.B.; ROCKEN, M.; WAGNER, H.; HEEG, K. CpG oligodeoxynucleotides trigger protective and curative Th1 responses in lethal murine leishmaniasis. **J. Immunol.**, **160**: 3627, 1998.