



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA

YASMIM DE ALENCAR GRANGEIRO

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-PROMASTIGOTA DA LECTINA OBTIDA
DAS SEMENTES DE *Luetzelburgia auriculata* (Allemão) Ducke SOBRE *Leishmania
major***

FORTALEZA

2023

YASMIM DE ALENCAR GRANGEIRO

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-PROMASTIGOTA DA LECTINA OBTIDA DAS
SEMENTES DE *Luetzelburgia auriculata* (Allemão) Ducke SOBRE DE *Leishmania major*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Ceará - UFC como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Bioquímica. Área de concentração: Bioquímica Vegetal.

Orientador: Prof. Dr. Claudener Souza
Teixeira.

FORTALEZA

2023

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Sistema de Bibliotecas
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- G785a Grangeiro, Yasmim de Alencar.
Avaliação da atividade anti-promastigota da lectina obtida das sementes de *Luetzelburgia auriculata* (Allemão) Ducke sobre de *Leishmania major* / Yasmim de Alencar Grangeiro. – 2023.
68 f. : il. color.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Fortaleza, 2023.
Orientação: Prof. Dr. Claudener Souza Teixeira.
1. Glicoconjugados. 2. Leishmaniose. 3. Domínio de Reconhecimento a Carboidratos. I. Título.
CDD 572
-

YASMIM DE ALENCAR GRANGEIRO

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-PROMASTIGOTA DA LECTINA OBTIDA DAS
SEMENTES DE *Luetzelburgia auriculata* (Allemão) Ducke SOBRE *Leishmania major*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Ceará - UFC como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Bioquímica. Área de concentração: Bioquímica Vegetal.

Orientador: Prof. Dr. Claudener Souza
Teixeira.

Aprovada em : 13/02/2023

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Claudener Souza Teixeira
Universidade Federal do Cariri (UFCA)

Prof. Dr. Bruno Anderson Matias da Rocha
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Roberto Nicolete
Fundação Oswaldo Cruz Ceará (Fiocruz Ceará)

Aos meus avós Josefa Geneceuda Gomes de Alencar e Marcelino Ferreira de Alencar (*in memoriam*).

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me conceder saúde e sabedoria para seguir sempre em frente. Obrigada por ser a minha força e o meu guia em todos os momentos.

Ao meu Padre Cícero, por todas as graças alcançadas e por fazer parte de todas as conquistas da minha vida.

À Universidade Federal do Ceará, pelo ensino gratuito de qualidade, e a todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, pela indiscutível contribuição para minha formação. Agradeço também a (CAPES) por ter sido, durante o período de desenvolvimento da pesquisa, a instituição que me permitiu dedicação exclusiva às atividades.

Ao meu Orientador, Prof. Dr. Claudener Souza Teixeira, por ter sido além de orientador, um amigo, sempre indicando caminhos e aconselhando para que tudo corresse bem. Muito obrigada pelos ensinamentos compartilhados e por me guiar nos primeiros passos da pós-graduação.

Aos membros da banca examinadora, por aceitarem o convite e pelo tempo e disposição para colaborar com este trabalho.

À responsável técnica do Laboratório de Patologia Experimental da UFCA, Dra. Racquel Oliveira, pelos valiosos ensinamentos em cultivo de *Leishmania*, recomendações e companheirismo durante a realização deste projeto.

Ao Prof. Dr. Cláudio Gleidiston, pelos conselhos acadêmicos e por sempre estar disposto a ensinar coisas novas a seus alunos.

Ao laboratório de Biologia Estrutural e Molecular (LaBEM) e a todos meus companheiros de laboratório que me ajudaram durante essa caminhada, especialmente a Romério Rodrigues pela paciência e por estar sempre disponível para tirar minhas dúvidas.

Ao Laboratório de Patologia Experimental (LAPEX) e a todos os colegas de laboratório pelos momentos de descontração e ensinamentos.

Às amigas da Bioquímica, Tawany Borges, Maria Eduarda, Ana Caroline e Lidiane Pinto, que tornaram as vivências acadêmicas mais divertidas e estiveram sempre dispostas a ajudar. Agradeço especialmente a Tawany, que mesmo com os 537 km de distância entre Juazeiro do Norte e Fortaleza, esteve sempre comigo compartilhando momentos de felicidade e tristeza. Muito obrigada!

Às amigas de laboratório, Flávia Eduarda e Ana Estevam pelas manhãs, tardes e noites de apoio e carinho, dentro e fora do laboratório. Serei eternamente grata por toda ajuda durante a realização deste trabalho, vocês foram fundamentais!

Aos amigos da Biomedicina, Karoline Albuquerque, Myzzaella Brito, Cosme Edson e Thiago Rodrigues pela amizade desde a graduação. Agradeço profundamente pela sinceridade em poder compartilhar todos os acontecimentos importantes da minha vida, pelas conversas engraçadas e pela grande amizade e companheirismo de sempre.

Aos amigos da vida, Gabriel Mota, Bruna Victória, Leonardo Kennedy, Leanderson Gomes, Isabella Xavier, Lucas Pereira e Ingrid Lais, por sempre me motivarem e acreditarem no melhor de mim. Em especial a Gabriel Mota e Bruna Victória que foram essenciais durante o desenvolvimento dessa dissertação. Gratidão!

Ao meu primo amigo, Pedro Walisson Gomes, que lá no início de tudo foi o meu maior incentivador para ingressar na carreira acadêmica. Seus conselhos de vida e de escrita jamais serão esquecidos!

À minha amiga e cunhada, Camilla Santana, que sempre torceu pelo meu sucesso e participou de muitas das noites de bons drinks para esquecer os estresses do laboratório.

À minha família, que torceu por mim desde o início e comemorou comigo cada pequena conquista. Amo vocês e sou grata por tudo!

Aos familiares e amigos que rezaram e torceram por mim, especialmente à minha avó Maria Marilza Grangeiro, à minha tia Maria Nilza Amorim e à minha sogra Marília Matos que sempre me colocaram em suas orações. Muito obrigada!

Ao meu amor, Pedro Henrique por me incentivar a seguir esse caminho, sempre me fazendo acreditar que posso mais do que imagino. Obrigada por ser meu companheiro, meu melhor amigo e meu porto seguro. Você fez meus dias difíceis serem mais leves!

Às minhas irmãs e melhores amigas, Ingrid e Maria Isabela pela amizade e companheirismo durante toda a vida! Amo vocês mais do que vocês imaginam!

Aos meus pais Magda e Júnior, que sempre sonharam comigo e me ajudaram a tornar essa conquista possível. Agradeço também por todo amor, carinho e compreensão. Eu nada seria se não fossem vocês! Muito obrigada!

A todos aqueles que contribuíram, direta ou indiretamente, para a realização desta dissertação, o meu sincero agradecimento.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

RESUMO

Leishmanioses são doenças que interferem na qualidade de vida dos enfermos e podem ser classificadas em Leishmaniose Visceral (LV), quando há o acometimento dos órgãos, e em Leishmaniose Tegumentar (LT), quando há o acometimento do tegumento. A LT é mais frequentemente causada pelas espécies *L. braziliensis*, *L. guyanensis* e *L. amazonensis*, no continente Americano, e por *L. major*, *L. tropica* e *L. aethiopica* nos continentes Europeu, Africano e Asiático. Em sua superfície celular, as leishmanias possuem uma grande quantidade de glicoconjugados que desempenham funções importantes para o parasito ao longo do seu ciclo de vida. Dentre esses glicoconjugados, os Lipofosfoglicanos (LPGs) se encontram em maior quantidade. O LPG da *L. major* trata-se de um polímero que contém majoritariamente galactose. O tratamento das leishmanioses baseia-se na administração de glucantime e anfotericina B, que, apesar de eficazes, apresentam limitações estimulando a busca por alternativas terapêuticas. Nesse contexto, destacam-se as lectinas devido a sua capacidade já conhecida de interagir com glicanos de diversos patógenos. A aglutinina obtida de sementes de *Luetzelburgia auriculata* (LAA) possui afinidade de ligação por galactose e lactose. Baseando-se nestes achados, a pesquisa avaliou o potencial anti-promastigota *in vitro* da LAA em cepa de *L. major*. Promastigotas foram incubadas com diferentes concentrações de LAA (320 – 5 µg/mL) e a viabilidade celular determinada por contagem em câmara de Neubauer. Após a determinação da IC₅₀/24h da LAA, foi avaliada a participação do domínio de reconhecimento a carboidratos (DRC) na atividade da lectina. Ensaios de fluorescência com o diacetato de 2',7'-diclorodihidrofluoresceína (DCFH₂-DA) e Iodeto de Propídio (IP) foram realizados a fim de verificar os possíveis mecanismos de ação da lectina e microscopia eletrônica de varredura foi utilizada para avaliar as possíveis alterações morfológicas induzidas pela LAA em formas promastigotas. Também foi avaliado o efeito da associação entre a LAA e a Anfotericina B e o glucantime sobre formas promastigotas. A LAA inibiu o crescimento de formas promastigotas de *L. major* de forma tempo e concentração dependentes, com valores de IC₅₀/24h = 82 µg/mL; IC₅₀/48h = 25 µg/mL; IC₅₀/72h = 20 µg/mL. Os dados obtidos mostraram que a atividade da lectina está relacionada à sua capacidade de reconhecer e se ligar a glicanos presentes em *L. major* e que o tratamento com esta é capaz de induzir a produção de EROs, danos a integridade da membrana celular e alterações morfológicas nos parasitas. A LAA também demonstrou possuir efeito modulador quando associada a anfotericina B, melhorando a atividade deste fármaco. Nossos resultados apresentam a LAA como uma alternativa promissora no tratamento

da leishmaniose tegumentar causada por *L. major*, sendo necessários estudos *in vivo* que possam elucidar os mecanismos de ação da mesma em um sistema biológico.

Palavras-chave: Glicoconjugados; leishmaniose; domínio de reconhecimento a carboidratos.

ABSTRACT

Leishmaniasis is an infectious disease that interferes in patients quality of life and can be classified into Visceral Leishmaniasis (LV), when there is organ involvement, and Tegumentary Leishmaniasis (LT), when there is integument involvement. TL is most often caused by the species *L. braziliensis*, *L. guyanensis* and *L. amazonensis* on the American continent, and by *L. major*, *L. tropica* and *L. aethiopica* on the European, African and Asian continents. On their cell surface, leishmanias have a large amount of glycoconjugates that perform important functions for the parasite throughout its life cycle. Among these glycoconjugates, Lipophosphoglycans (LPGs) are in greatest quantity. *L. major*'s LPG is a polymer that contains mostly galactose. The treatment of leishmaniasis is based on the administration of glucantime and amphotericin B, which, although effective, have limitations stimulating the search for therapeutic alternatives. In this context, lectins stand out due to their already known ability to interact with glycans of various pathogens. The agglutinin obtained from *Luetezburgia auriculata* (LAA) seeds has binding affinity for galactose and lactose. Based on these findings, the research evaluated the *in vitro* anti-promastigote potential of LAA in *L. major* strain. Promastigotes were incubated with different concentrations of LAA (320 – 5 µg/mL) and cell viability determined by Neubauer chamber counting. After determining the IC₅₀/24h of the LAA, the participation of the carbohydrate recognition domain (CRD) in lectin activity was evaluated. Fluorescence assays with 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFH2-DA) and Propidium Iodide (PI) were performed in order to verify the possible mechanisms of action of lectin. Scanning electron microscopy was used to evaluate the possible morphological changes induced by LAA in promastigote forms. The effect of the association between LAA and Amphotericin B and glucantime on promastigote forms was also evaluated. LAA inhibited the growth of promastigote forms of *L. major* in a time and concentration-dependent manner, with IC₅₀/24h values = 82 µg/mL; IC₅₀/48h = 25 µg/mL; IC₅₀/72h = 20 µg/mL. The data obtained showed that lectin activity is related to its ability to recognize and bind to glycans present in *L. major* and that treatment with LAA is capable of inducing ROS production, damage to cell membrane integrity and morphological changes in parasites. LAA has also been shown to have a modulatory effect when associated with amphotericin B, improving the activity of this drug. Our results present LAA as a promising alternative in the treatment of cutaneous leishmaniasis caused by *L. major*, requiring *in vivo* studies that can elucidate its mechanisms of action in a biological system.

Keywords: Glyconjugates; leishmaniasis; carbohydrate recognition domain.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AmB D	Desoxicolato de Anfotericina B
AmB	Anfotericina B
ANOVA	Análise de Variância
BLL	Lectina de <i>Bothrops leucurus</i>
CCL	Lectina de <i>Chondrilla caribensis</i>
CHIKV	Vírus Chikungunya
IC₅₀	Concentração Inibitória de 50%
CO₂	Dióxido de Carbono
ConA	Lectina de <i>Canavalia ensiformis</i>
Con-A	Concanavalina A
Con-Br	Lectina de <i>Canavalia brasiliensis</i>
DCF	2',7'-Diclorofluoresceína
DCFH2-DA	Diacetato de 2',7'-diclorodihidrofluoresceína
DRC	Domínio de Reconhecimento de Carboidrato
DVL	Lectina de <i>Dioclea violacea</i>
E.P.M.	Erro Padrão da Média
ELISA	Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
FAMED	Faculdade de Medicina
Fig.	Figura
GILPs	Glicoinositolfosfolipídios
GP63	Glicoproteína com Atividade de Metalopeptidase
GPI	Glicofosfatidilinositol
IFN- γ	Interferon- γ
kDa	Quilodalton
KM+	Lectina de <i>Artocarpus integrifolia</i>
LAA	Agglutinina de <i>Luetzelburgia auriculata</i>
LAPEX	Laboratório de Patologia Experimental
LC	Leishmaniose Cutânea
LM	Leishmaniose Mucocutânea
LPGs	Lipofosfoglicanos

LV	Leishmaniose Visceral
MaL	Lectina de <i>Machaerium acutifolium</i>
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
N.N.N.	Nicolle, Novy e McNeal
OMS	Organização Mundial da Saúde
OPAS	Organização Pan-Americana da Saúde
PAGE	Eletroforese em Gel de Poliacrilamida
PAMPs	Padrões Moleculares Associados a Patógenos
PBS	Phosphate-Buffered Saline
pH	Potencial de Hidrogênio
PI	Iodeto de Propídio
PpeL	Lectina de <i>Parkia pendula</i>
PPGs	Proteofosfoglicanos
SbIII	Antimonial Trivalente
SbV	Antimonial Pentavalente
ScLL	Lectina do látex de <i>Synadenium carinatum</i>
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
SFB	Soro Fetal Bovino
TCLL	Lectina semelhante à quitinase do tamarindo
TR	Tripanotona Redutase
UFCA	Universidade Federal do Cariri
VML	Lectina de <i>Vatairea macrocarpa</i>
WSMoL	Lectina de <i>Moringa oleífera</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	14
2.1	Aspectos gerais das leishmanioses	14
2.2	<i>Leishmania</i> e seu ciclo biológico	15
2.3	Glicoconjugados de <i>Leishmania</i>	17
2.4	<i>Leishmania major</i>	19
2.5	Quimioterapia	20
2.5.1	Antimoniais pentavalentes	20
2.5.2	Anfotericina B e sua forma lipossomal	21
2.6	Resistência medicamentosa	22
2.7	Bioprospecção	23
2.8	Lectinas	23
2.9	Aplicações biológicas das lectinas	25
2.10	<i>Luetzelburgia auriculata</i> (Allemão) Ducke	26
2.11	Aglutinina de <i>Luetzelburgia auriculata</i> (LAA)	27
3	OBJETIVOS	29
3.1	Objetivo Geral	29
3.2	Objetivos Específicos	29
4	ARTIGO REFERENTE A DISSERTAÇÃO	30
5	CONCLUSÃO	56
	REFERÊNCIAS	57

1. INTRODUÇÃO

As Leishmanioses são um grupo de doenças infecciosas de caráter endêmico que possuem ampla distribuição mundial e interferem significativamente na qualidade de vida dos enfermos (GALVIS-OVALLOS *et al.*, 2020). De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), a leishmaniose é uma das doenças tropicais negligenciadas mais relevantes do mundo. Estima-se que 700.000 a 1 milhão de novos casos da doença ocorram anualmente, caracterizando assim um problema de saúde pública (OMS, 2022).

As manifestações clínicas da leishmaniose são variadas e, de acordo com os sintomas apresentados, esse grupo de doença pode ser classificado em Leishmaniose Visceral e Leishmaniose Cutânea (AKHOUNDI *et al.*, 2017; LIMA, 2021). A forma cutânea da doença é caracterizada por lesões tegumentares únicas ou múltiplas e pode ser transmitida ao homem por diferentes espécies de protozoários do gênero *Leishmania* (OLIVEIRA *et al.*, 2021). De acordo com Assis e colaboradores (2012a), a LT é mais frequentemente causada por *L. braziliensis*, *L. guyanensis* e *L. amazonensis*, no novo mundo, e por *L. major*, *L. tropica* e *L. aethiopica* no continente Americano, e por *L. major*, *L. tropica* e *L. aethiopica* nos continentes Europeu, Africano e Asiático. Dentre as espécies de leishmania existentes, a *L. major* é a mais estudada (OYAMA, 2018; GÁRCIA, 2019).

Durante seu ciclo de vida, as leishmanias sofrem modificações bioquímicas e morfológicas importantes, como a expressão de glicoconjugados (ASSIS *et al.*, 2012b). Estes, são cruciais para sobrevivência e multiplicação dos parasitos em ambientes hostis e são determinantes na interação com o hospedeiro vertebrado e invertebrados (TURCO; SPATH; BEVERLEY, 2001). Dentre os glicoconjugados de superfície presentes nas leishmanias, os Lipofosfoglicanos (LPGs) se encontram em maior quantidade. O LPG da *L. major* consiste em um polímero que contém os açúcares manose, glicose, arabinose e, principalmente, galactose, apresentando assim uma grande variabilidade em sua composição e disposição estrutural (ASSIS *et al.*, 2012a ; MC CONVILLE *et al.*, 1987).

Dentre os principais tratamentos utilizados para as leishmanioses destacam-se os antimoniais pentavalentes e a Anfotericina B, bem como sua forma lipossomal. Todavia, os fármacos utilizados possuem elevada toxicidade e necessidade de administração parenteral, comprometendo a qualidade de vida dos pacientes e dificultando a manutenção do tratamento (CAETANO *et al.*, 2020; TIPHINE; LETSCHER-BRU; HERBRECHT, 1999). Além disso, o surgimento de cepas de *Leishmania* resistentes a esses fármacos também é observado (RIBEIRO, 2019).

Diante do tratamento limitado da Leishmaniose no Brasil, da alta toxicidade da terapêutica utilizada e do surgimento de cepas de *Leishmania* com resistência medicamentosa, constata-se a necessidade do desenvolvimento opções terapêuticas alternativas (LINDOSO, 2018). Para isto, são necessárias estratégias diversificadas, dentre elas, destaca-se a bioprospecção de produtos de origem natural com atividade antileishmania (SILVA, 2016).

Lectinas são proteínas capazes de reconhecer se ligar reversivelmente a carboidratos específicos (PEUMANS; VAN DAMME, 1995). Essas proteínas são encontradas em todos os organismos vivos e desempenham um papel essencial na interação célula-célula auxiliando a interação entre hospedeiros e patógenos (SINGH; WALIA; KENNEDY, 2019; YAU *et al.*, 2015). Devido as propriedades específicas das lectinas, existem variadas aplicações biológicas atribuídas a essas proteínas como atividade inseticida (REYES-MONTÃO; VEGA-CASTRO, 2018), atividade antifúngica (DIAS *et al.*, 2020), atividade bactericida (CARVALHO *et al.*, 2015b), atividade antitumoral (PALHARINI *et al.*, 2017), atividade pró-inflamatória (ALMEIDA *et al.*, 2016) e atividade leishmanicida (THOMAZELLI *et al.*, 2018; CARNEIRO *et al.*, 2021).

A lectina obtida da farinha das sementes de *Luetzelburgia auriculata* é uma hololectina homotetramérica composta majoritariamente por folhas- β , com massa molecular de 29 kDa por subunidade (OLIVEIRA *et al.*, 2002) e que apresenta afinidade de ligação aos carboidratos galactose e lactose (ALENCAR *et al.*, 2010). Pesquisas realizadas com essa lectina, demonstraram que a LAA exerce atividade inibitória sobre o crescimento fungos fitopatogênicos como *Aspergillus niger*, *Colletrichum lindemuthianum* e *Fusarium solani*. Além disto, estudos *in vivo* demonstraram que a LAA possui atividade anti-inflamatória, sendo capaz de imunomodular a resposta imune (ALENCAR *et al.*, 2010).

Apesar da realização de variados estudos com a LAA, não há na literatura nenhum relato sobre a ação dessa lectina sobre protozoários do gênero *Leishmania*. Nesse contexto, em razão da escassez de estudos sobre o tema e devido a capacidade da LAA de reconhecer e interagir com o mesmo tipo de carboidrato presente na superfície celular de *L. major*, faz-se necessário a avaliação da atividade leishmanicida desta lectina frente a esta espécie de leishmania.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1. Aspectos gerais das leishmanioses

De acordo com a Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS), no continente americano, entre 2001-2017, foram relatados 940.396 novos casos de leishmaniose tegumentar (LT), sendo o Brasil responsável por 72,6% dos casos (OPAS, 2019). No mesmo período, foram reportados 59.769 novos casos de leishmaniose visceral (LV) nas Américas. Assim como na LT, o Brasil é o país do continente americano com o maior percentual de casos de LV (aproximadamente 96% de registros) (GALVIS-OVALLOS *et al.*, 2020).

O Brasil é considerado o terceiro país do mundo com o maior número de casos de leishmaniose (ALENCAR; FIGUEIREDO, 2018). Destes, a grande maioria ocorre nas regiões Norte, Nordeste e Centro-Oeste do país (ARAÚJO; NUNES, 2017). Dados coletados demonstram que a região Nordeste engloba 43,1% dos casos de LV, sendo relevante seu estudo aprofundado no estado do Ceará (IZZO, 2018). Este, possui o maior número de casos da doença sendo considerado uma região endêmica de transmissão intensa. No Ceará, destacam-se devido à alta prevalência da enfermidade os municípios de Fortaleza, Barbalha, Crato e Juazeiro do Norte (BRASIL, 2020a).

A região Norte concentra o maior número de casos de LT, cerca de 37,3% do total e cerca de 73,3 casos/100.000 habitantes, seguida das regiões Centro-Oeste, que possui 35,4 casos/100.000 habitantes, e Nordeste, com 18,8 casos/100.000 habitantes (BRASIL, 2019). No Nordeste, o Ceará é o estado onde a doença ocorre com maior frequência. Em 2020, os municípios com a maior quantidade de casos novos de LT foram, respectivamente, Itapajé, Crato e Viçosa do Ceará (BRASIL, 2020b).

A leishmaniose visceral, popularmente conhecida como “Calazar” e “Febre Dum-Dum”, é causada pelas espécies *L. donovani* e *L. infantum*, sendo a *L. infantum* responsável pelas formas clínicas da doença nas Américas (CLEMENTINO, 2018). A LV apresenta-se clinicamente como uma doença generalizada crônica que, se não tratada adequadamente, pode evoluir para a letalidade em 90% dos casos (ALMEIDA *et al.*, 2020). As infecções oportunistas e as hemorragias severas são os principais fatores de risco para o óbito na LV (AGUIAR; RODRIGUES, 2017).

A leishmaniose tegumentar é caracterizada pelo aparecimento de lesões cutâneas ou mucocutâneas. Na Leishmaniose Cutânea (LC), o parasito promove uma reação inflamatória no local do repasto sanguíneo do vetor e recruta células do sistema imunológico como

plasmócitos e macrófagos (OLIVEIRA *et al.*, 2021). Clinicamente, essa reação é observada através do aparecimento de uma pápula eritematosa que evolui para uma úlcera indolor de formato arredondado. Já na leishmaniose mucocutânea (LM) surgem lesões secundárias destrutivas nas mucosas das vias aéreas superiores (BRASIL, 2020a).

2.2. Leishmania e seu Ciclo Biológico

Considerada uma zoonose, a leishmaniose é causada por protozoários flagelados intracelulares do gênero *Leishmania* (VEASEY, 2020). Nesse gênero existem 30 espécies diferentes de protozoários e, dentre elas, 20 espécies são conhecidas por serem patogênicas ao homem (AZEVEDO; MARCILI, 2020; CHAGAS *et al.*, 2021).

As espécies de leishmania patogênicas ao homem são agrupadas e classificadas em dois subgêneros: *Leishmania* e *Viannia* (ÁVILA, 2018). Essa classificação foi determinada com base no comportamento das promastigotas no tubo digestivo do vetor, sendo classificadas em *Viannia* as que apresentam desenvolvimento na região posterior do intestino e em *Leishmania* para as espécies que se desenvolvem na região anterior do intestino (LAINSON; SHAW, 1987).

Os protozoários do gênero *Leishmania*, durante seu ciclo de vida, alternam entre as formas morfológicas amastigotas e promastigotas (ANVERSA *et al.*, 2018). As amastigotas são parasitas intracelulares obrigatórios e correspondem a forma não móvel do parasito. Elas são encontradas nos macrófagos do hospedeiro vertebrado, possuem formato arredondado ou oval, medem cerca de 3 a 5 μm e não possuem flagelo livre (MACIEL, 2021).

As promastigotas são encontradas no trato digestivo do inseto vetor, possuem forma alongada, fusiforme e delgada e medem cerca de 10 a 15 μm (ALEMAYEHU; ALEMAYEHU, 2017). Além disso, as promastigotas são consideradas a forma móvel do parasito, visto que possuem um flagelo livre e extenso na sua porção anterior, que propicia sua locomoção (VITÓRIO, 2018).

A transmissão do protozoário ao hospedeiro se dá através do repasto sanguíneo de insetos fêmeas pertencentes à ordem Díptera, família *Psychodidae*, subfamília *Phlebotominae* e gêneros *Phlebotomus* (Europa, África e Ásia) e *Lutzomyia* (América) (BRITO, 2020; YOUNG, DUNCAN, 1994). Esses insetos possuem ampla distribuição geográfica, sendo encontrados em ambientes silvestres, rurais e urbanos. Além disso, os flebotomíneos estão presentes em quatro continentes, com aproximadamente 990 espécies já relatadas (BUTENKO *et al.*, 2019).

Popularmente conhecidos como “birigui” e “mosquito-palha”, os flebotomíneos são insetos holometábolos, isto é, possuem 4 fases de desenvolvimento: ovos, larvas, pupas e adultos, com média de 36 dias de ciclo de vida (CAPUCCI, 2021; SANTOS *et al.*, 2014). Possuem em média de 1 a 3 mm de tamanho, apresentam coloração que varia de castanho claro a escuro e estrutura corporal delicada, com pernas longas e asas com formato lanceolado (AKHOUNDI *et al.*, 2016).

Na fase adulta, os insetos flebotomos apresentam dimorfismo sexual, que é expresso tanto nas diferenças morfológicas dos insetos, como na divergência entre os comportamentos alimentares (SANTOS, 2018). A principal fonte de alimentação dos adultos consiste em carboidratos, entretanto, apenas as fêmeas são capazes de realizar hematofagia. A alimentação sanguínea, exclusiva das fêmeas, garante proteínas e aminoácidos que são essenciais para o desenvolvimento e amadurecimento dos ovos (PIMENTA; FREITAS; SECUNDINO, 2012).

Antes de atingir a fase adulta, os flebotomíneos vivem em locais terrestres quentes e úmidos, ricos em material orgânico em decomposição, que garante abrigo, alimentação e umidade às larvas e pupas (COSTA, SOUZA, 2018). Já os adultos possuem hábitos crepusculares e noturnos, e são encontrados em troncos e raízes de árvores, tocas de animais, cavernas ou fendas em rochas (CARVALHO *et al.*, 2014). Habitualmente, os flebotomíneos vivem em áreas florestais, não sendo assim encontrados nos centros das cidades. Todavia, devido a mudanças ambientais provocadas pelo homem, os flebotomíneos se adaptaram à situação e migraram para áreas urbanas (ALVES *et al.*, 2019).

Os flebotomíneos possuem a capacidade de se alimentar em diferentes espécies hospedeiras, como canídeos, aves, roedores e humanos, reforçando assim, seu papel como principais vetores da Leishmaniose no Brasil (TANURE *et al.*, 2015). Como o ciclo de vida da leishmania ocorre em dois hospedeiros diferentes, um hospedeiro mamífero e um inseto vetor, ele é considerado digenético (GENTIL, 2018).

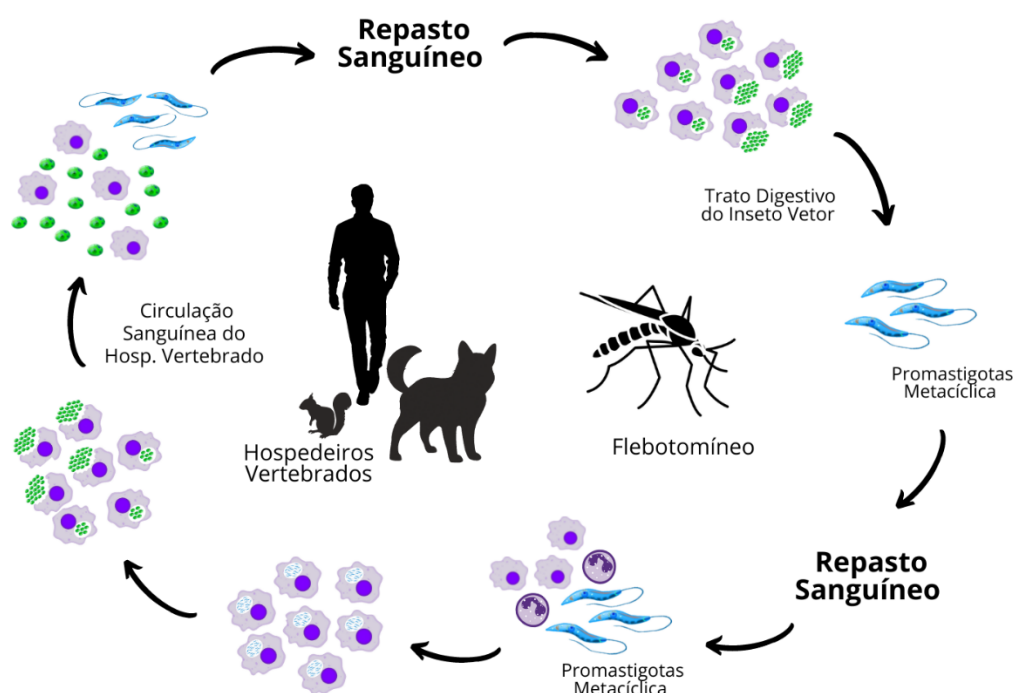
O cão doméstico é considerado o reservatório urbano mais relevante do parasita, visto que, esses animais são altamente suscetíveis à infecção, apresentam parasitismo exorbitante na pele e convivem muito próximo aos seres humanos (BENEDETTI; PEZENTE, 2020). Normalmente, nesses animais, a doença possui caráter crônico e pode levar o animal ao óbito, mesmo quando tratada (SILVA *et al.*, 2021).

Ao realizar o repasto sanguíneo em um indivíduo contaminado, o inseto vetor ingere macrófagos infectados com as formas amastigotas. Estas, se reproduzem por divisão binária no trato digestivo do inseto e, ao atingir a porção posterior do intestino, se transformam em promastigotas metacíclicas (GENTIL, 2018). O inseto vetor contaminado, ao realizar um novo

repasto sanguíneo, libera promastigotas metacíclicas na pele do hospedeiro, resultando na rápida infiltração de células de defesa e recrutamento de macrófagos no local da infecção (HOLANDA *et al.*, 2018) (Figura 1).

As primeiras células a chegarem ao local da infecção são os neutrófilos, seguidos dos macrófagos. Ambas as células realizam a fagocitose das promastigotas metacíclicas, que logo se diferenciam em amastigotas e começam a se reproduzir (CORDEIRO, 2017). Após sucessivas divisões binárias, a quantidade de parasitas intracelulares excede a capacidade de suporte das células fagocíticas, resultando na lise celular. As amastigotas são liberadas na corrente sanguínea, iniciando uma reação inflamatória e proporcionando atração e infecção de outros macrófagos, continuando assim o ciclo (AGUIAR; RODRIGUES, 2017) (Figura 1).

Figura 1 - Ciclo biológico da infecção por *Leishmania*.



Fonte: Elaborada pelo autor e adaptada de ASSIS *et al.*, 2012a.

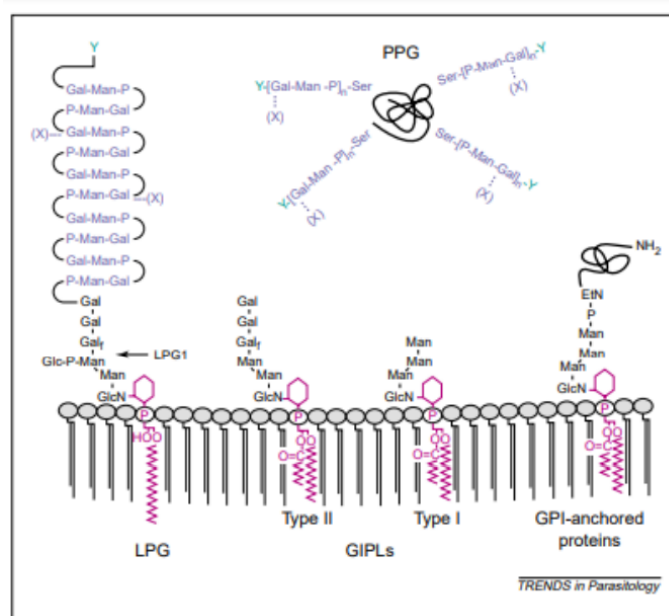
2.3. Glicoconjugados de leishmania

Para sobrevivência e multiplicação das leishmanias em ambientes hostis, como o trato digestório do vetor e os tecidos do hospedeiro vertebrado, os parasitas sofrem modificações bioquímicas e morfológicas importantes, dentre elas destaca-se a expressão de glicoconjugados (ASSIS *et al.*, 2012b). Glicoconjugados são definidos como moléculas que possuem

carboidratos ligados covalentemente a outra classe de moléculas como proteínas e lipídios (GUIMARÃES, 2017).

Em sua superfície celular, as leishmanias possuem uma grande quantidade de glicoconjugados que atuam como Padrões Moleculares Associados a Patógenos (PAMPs) e desempenham funções importantes para o parasito ao longo do seu ciclo de vida (TURCO; SPATH; BEVERLEY, 2001). Dentre os glicoconjugados presentes na superfície celular das leishmanias, os Lipofosfoglicanos (LPGs) se encontram em maior quantidade. (Figura 2).

Figura 2 – Glicoconjugados na superfície celular das leishmanias.



Fonte: TURCO, SPÄTH, BEVERLEY, 2001.

Os LPGs recobrem toda a superfície das promastigotas, incluindo o flagelo, formando um glicocálice e são pouco expressos nas amastigotas (TURCO, 2003). Estruturalmente, são compostos por quatro domínios: uma porção inicial lipídica representada por 1-O-alkil-2-lisofosfatidilinositol (PI), uma porção central formada por um heptassacarídeo representado por Gal(α 1-6)Gal(α 1-3)Gal(α 1-3)[Glc(α 1-PO₄)Man(α 1-3)Man(α 1-4)-GlcN(α 1-), uma porção de repetições de dissacarídeos fosforilados Gal(α 1-4)Man(α 1-PO₄) e uma porção cap composta por um oligossacarídeo terminal (ASSIS *et al.*, 2012a).

Esse glicoconjugado é considerado um importante fator de virulência parasitária e sua função varia no hospedeiro vertebrado e no invertebrado (BARBOSA, 2012). No trato digestivo do vetor, o LPG garante a fixação nas paredes intestinais, através da ligação a lectinas específicas, e a proteção do parasito das enzimas digestivas. Já na circulação sanguínea do

hospedeiro vertebrado, o LPG auxilia na proteção do parasito contra a lise do complemento, facilita a entrada dos parasitas nas células fagocíticas e previne a destruição das promastigotas nos macrófagos (CABEZAS, 2015).

Outros glicoconjugados, além do LPG, estão presentes na superfície das leishmanias, como glicosil-fosfatidil-inositol livres (GILPs), proteofosfoglicanos (PPG) e a glicoproteína GP63 (BARBOSA, 2012).

Os GILPs estão presentes em todas as formas evolutivas da leishmania e são encontrados com abundância nas amastigotas (CABEZAS, 2015). Embora, a quantidade de GILPs seja maior que a quantidade de LPG na leishmania, a função desse glicoconjugado ainda não é bem esclarecida na literatura (ASSIS *et al.*, 2012b). A estrutura básica dos GILPs consiste em um Man α 1-4GlcN ligado à uma porção lipídica, geralmente composta por alquil-acil-glicerol ou lisoglicerol-liso-alquil-glicerol (ASSIS *et al.*, 2012a).

O PPG é o segundo glicano mais abundante nas leishmanias, ele é semelhante ao LPG pois contém unidades repetitivas de fosfoglicano. Esse glicoconjugado está diretamente envolvido com a interação e sobrevivência da leishmania com a célula hospedeira (SANTOS, 2019; VALENTE *et al.*, 2019). Já a GP63 é considerada um importante fator de virulência das leishmanias. Ela consiste em uma metalopeptidase ancorada via GPI que está envolvida diretamente na interação das promastigotas com os receptores dos macrófagos (FREITAS; PINHEIRO, 2010; LONDONO, 2015).

2.4. *Leishmania major*

Inicialmente descrita em 1914 por Yakimoff e Schokhor (1914), a *Leishmania major* é um parasito zoonótico que pode ser transmitido ao hospedeiro através do repasto sanguíneo dos insetos vetores *Phlebotomus papatasi* e *Phlebotomus dubosqi*. Ademais, essa espécie possui como reservatório contínuo um conjunto de roedores silvestres, especialmente o Gerbil (*Rhombomys opimus*), sendo o homem apenas um hospedeiro acidental do parasita (CARVALHO, 2021; PERDOMO, 2010; SILVEIRA, 2021).

Assim como nas demais espécies de leishmania, o LPG da *L. major* apresenta uma grande variabilidade em sua composição e arranjo de carboidratos (ASSIS *et al.*, 2012a). O estudo realizado por Mc Conville e colaboradores (1987) demonstrou que o LPG de *L. major* trata-se de um polímero que contém os açúcares manose, glicose, arabinose e, principalmente, galactose. Devido a sua diversidade estrutural, o LPG das leishmanias exerce um papel fundamental na infecção do hospedeiro vertebrado (ASSIS *et al.*, 2012a).

As manifestações clínicas presentes na LT variam de acordo com a espécie envolvida na infecção (AKHOUNDI, 2017). Diferentemente da LT causada por *L. braziliensis* no Novo Mundo, o espectro clínico-patológico da infecção por *L. major* é limitado e possui como sintoma principal uma úlcera de pele de remissão espontânea (GRIMALDI, 1982).

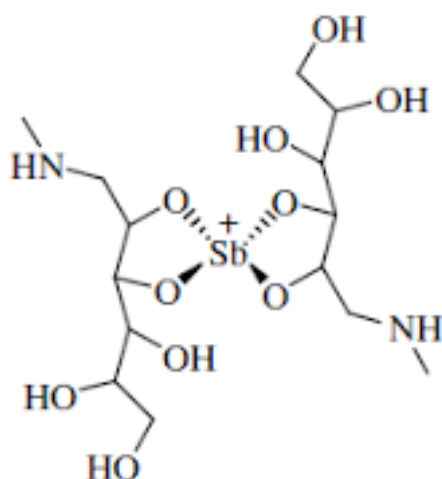
2.5. Quimioterapia

O tratamento da LT objetiva acelerar a cura, evitar cicatrizes e prevenir possíveis recaídas da doença (DNDi, 2019). A terapêutica atual baseia-se na administração de antimoniais pentavalentes, como o Glucantime, e da anfotericina B e sua forma lipossomal (TIWARI *et al.*, 2018).

2.5.1. Antimoniais pentavalentes

A utilização dos antimoniais no tratamento da leishmaniose foi inicialmente descrita em 1912, com a utilização do antimonial trivalente (SbIII) que possuía como característica principal sua alta toxicidade (VIANNA, 1912). Após quase uma década de seu uso, em 1920, o antimonial trivalente foi substituído pelo antimonial pentavalente (SbV), que apresentava 10 vezes menos toxicidade do que seu antecessor (Figura 3) (FERNANDES, 2019).

Figura 3 – Estrutura molecular do Antimoniato de Meglumina (Glucantime).



Considerado um pró-fármaco, o SbV em pH ácido nos macrófagos do hospedeiro, é convertido na forma ativa trivalente (SbIII). O SbIII promove a apoptose dos parasitos através da inibição da enzima tripanotiona redutase (TR), que é essencial e exclusiva dos parasitos da família *Trypanosomatidae* (BEIG, *et al.*, 2015).

A administração dos antimoniais pentavalentes, como o Glucantime, é feita pelas vias intramuscular ou endovenosa em dose única diária, por no mínimo 20 e no máximo 40 dias (CONTI; JÚNIOR, 2015). A terapêutica, usualmente, é acompanhada por efeitos adversos graves que incluem cardiotoxicidade, pancreatite e hepatotoxicidade. Estes podem comprometer a qualidade de vida do paciente, aumentar o tempo de internação e os custos envolvidos no tratamento (CAETANO *et al.*, 2020).

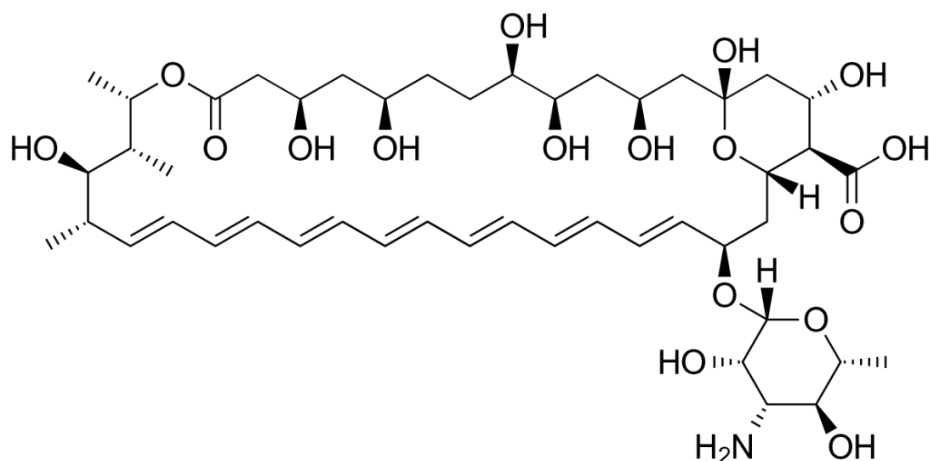
Além disso, os antimoniais pentavalentes são capazes de atravessar a barreira transplacentária, acarretando síndromes severas de retardo mental, e por isso são contraindicados para gestantes (CAETANO *et al.*, 2019). Em situações como essa, o fármaco utilizado é a Anfotericina B lipossomal, que é um antibiótico com ação leishmanicida que apresenta menos efeitos adversos que o antimônio (WYREPKOWSKI *et al.*, 2020).

2.5.2. Anfotericina B e sua forma lipossomal

A anfotericina B (AmB) é um antibiótico da classe dos poliênicos macrolídeos, que se liga aos esteróis da membrana celular e forma poros que modificam a permeabilidade da membrana, ocasionando a morte do patógeno (SILVA, 2018). Além de função antibiótica, a AmB apresenta também uma importante atividade antifúngica e contra alguns protozoários, incluindo os do gênero *Leishmania* (LEMKE; KIDERLEN; KAYSER, 2005). O fármaco possui duas formas de apresentação comercial, o desoxicolato de AmB (AmB-D) e a AmB lipossomal (BRASIL, 2017) (Figura 4).

O AmB-D é utilizado como segunda linha para o tratamento das leishmanioses desde a década de 1960. Entretanto, devido à sua alta toxicidade, alto custo e difícil administração, o AmB-D foi reestruturado com lipídios a fim de substituir o desoxicolato por outros lipídios (SUBERVIOLA, 2021; SHIRZADI, 2019). A formulação da AmB Lipossomal impede que o fármaco seja metabolizado fora do seu tecido alvo e aumenta a velocidade de absorção na região reticuloendotelial (CHAKRAVARTY; SUNDAR, 2019). Dessa forma, há uma grande entrega da droga nos tecidos alvo em um curto período, diminuindo significativamente a toxicidade do tratamento (SUNDAR; AGARWAL, 2017).

Figura 4 – Estrutura molecular da Anfotericina B.



Fonte: HOLANDA *et al.*, 2019.

Apesar da segurança e eficácia demonstrada, a ocorrência de efeitos tóxicos e reações adversas com o uso da AmB lipossomal também são comuns. Nos mamíferos, a AmB lipossomal se liga ao colesterol presente na membrana celular e esse mecanismo pode explicar alguns dos efeitos colaterais comuns ao tratamento (TIPHINE; LETSCHER-BRU; HERBRECHT, 1999). As manifestações apresentadas podem ser controladas com terapia de suporte e incluem náuseas, vômitos, febre, calafrios, entre outros (TOURINHO, 2015).

2.6. Resistência medicamentosa

Além dos efeitos adversos associados ao tratamento da leishmaniose, o surgimento de cepas de *Leishmania* com resistência medicamentosa também é observado (RIBEIRO, 2019). Estudos indicam que o surgimento das cepas resistentes é influenciado pela espécie de *Leishmania* envolvida, por variações farmacocinéticas e por variações da interação do fármaco utilizado com o sistema imune do hospedeiro. Entretanto, a maior causa para a seleção natural de parasitos resistentes é o uso indiscriminado de medicamentos (CORDEIRO, 2017). Parasitos que possuem resistência medicamentosa, podem apresentar um aumento na virulência, tornando cada vez mais difícil o tratamento da leishmaniose com os medicamentos já existentes (FRADE, 2016).

2.7. Bioprospecção

As propriedades curativas das plantas são reconhecidas desde a antiguidade e sua utilização pela indústria farmacêutica para a formulação de medicamentos é uma prática extremamente comum (ZAGO, 2018). No Brasil, a utilização de plantas medicinais para o tratamento de doenças consiste em uma prática herdada das populações indígena, africana e europeia que se perpetua até os dias atuais (BADKE *et al.*, 2016).

A biodiversidade brasileira é considerada uma das mais ricas do mundo, visto que possui inúmeras espécies de plantas com propriedades medicinais (CORDEIRO; BRAGA, 2020). Foram descritas, até o presente momento, cerca de 55 mil espécies de plantas no Brasil (MARQUES *et al.*, 2022). Dentre estas, pelo menos 3.150 espécies ocorrem no domínio fitogeográfico da Caatinga (FERNANDES; QUEIROZ, 2018).

A Caatinga é o único bioma exclusivo do território brasileiro, logo, a maioria das espécies de plantas e animais presentes na região não são encontradas em nenhum outro lugar do mundo (MARTINS, 2015). Além disso, dado a suas condições de solo e clima peculiares, a Caatinga é considerada um dos principais ecossistemas existentes, pois possui em seu domínio, um número significativo de plantas com potencial medicinal (SOUZA *et al.*, 2022).

Devido à escassez de quimioterápicos eficazes no controle da leishmaniose, produtos naturais são rotineiramente utilizados pela população como terapia complementar (VIZA JÚNIOR, *et al.*, 2019). Nesse contexto, estudos de plantas com atividade leishmanicida demonstraram que espécimes vegetais podem servir de base para elaboração de fármacos importantes para o tratamento da leishmaniose (OLIVEIRA *et al.*, 2009).

De acordo com Rocha (2009), identificar o composto que exerce o efeito terapêutico e seus alvos farmacológicos é um dos maiores desafios para o desenvolvimento de medicamentos a partir de produtos vegetais. A vista disso, utilizar isoladamente os constituintes da planta pode representar uma vantagem nesse processo (LIMA, 2021).

2.8. Lectinas

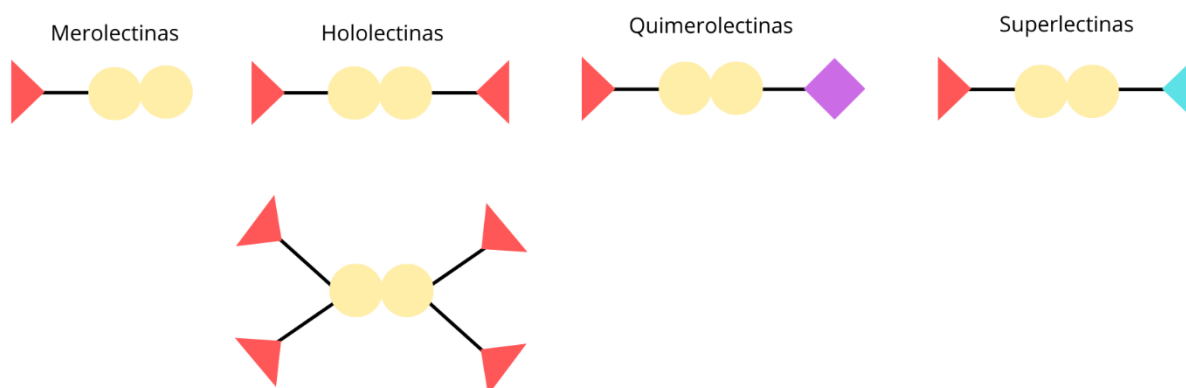
Lectinas são proteínas que possuem pelo menos um domínio não catalítico capaz de se ligar reversivelmente a carboidratos específicos (PEUMANS; VAN DAMME, 1995). Devido as suas propriedades específicas, as lectinas desempenham um papel significativo na interação célula-célula e atuam como mediadores durante a interação entre hospedeiros e patógenos (SINGH; WALIA; KENNEDY, 2019).

As lectinas possuem uma ampla distribuição na natureza e podem ser encontradas em todas as classes de organismos vivos, incluindo microrganismos, animais e plantas (YAU *et al.*, 2015). Dentre as classes existentes, as lectinas de plantas são as mais estudadas devido a sua abundância na natureza e sua capacidade de agir contra patógenos importantes (SOUZA *et al.*, 2021).

As lectinas vegetais são classificadas, com base em seus aspectos moleculares, em: Merolectinas, Hololectinas, Quimerolectinas e Superlectinas (VAN DAMME *et al.*, 1998). As Merolectinas possuem apenas um sítio de ligação a carboidratos e são incapazes de promover a aglutinação de células. Já as Hololectinas possuem pelo menos dois sítios de ligação a carboidratos idênticos e, por consequência, conseguem promover a aglutinação celular e a precipitação de glicoconjugados (Figura 3) (CAVADA *et al.*, 2001; VAN PARIJS *et al.*, 1991).

As Quimerolectinas possuem, além do sítio ligante a carboidrato, um sítio de ligação distinto, que não interage com carboidratos e pode desempenhar atividade catalítica ou outra atividade biológica bem definida (POVINELI; FINARDI FILHO, 2002). As Superlectinas, assim como as Hololectinas, possuem pelo menos dois sítios de ligação a carboidratos. Entretanto, nas Superlectinas as regiões de ligação reconhecem carboidratos estruturalmente distintos (Figura 5) (SANTOS, 2018).

Figura 5 - Classificação das lectinas de acordo com domínios de ligação.



Fonte: Elaborada pelo autor e adaptada de PEUMANS; VAN DAMME, 1995.

2.9. Aplicações biológicas das lectinas

A grande diversidade de lectinas com diferentes funções fisiológicas, garante uma série de possíveis aplicações para essas moléculas (ALMEIDA, 2018). Dentre as propriedades apresentadas pelas lectinas vegetais, destacam-se as atividades anti-noceptivas, antitumorais, antibacterianas, antifúngicas, antivirais, antiparasitárias, anti e pró inflamatórias, dentre outras (CAVADA *et al.*, 2020).

A atividade antibacteriana das lectinas resulta da interação com os componentes da parede celular e com os glicoconjugados presentes em sua superfície (LAGARDA-DIAZ *et al.*, 2017). A lectina obtida das sementes de *Moringa oleífera* (WSMoL) apresentou importante atividade bactericida e bacteriostática contra cepas de *Enterococcus faecalis*, *Klebsiella pneumoniae* e *Serratia sp.* (CORIOLANO *et al.*, 2020).

A atividade antifúngica das lectinas varia de acordo com a afinidade da lectina com os glicanos estruturais da membrana fúngica. Essa interação entre fungos e lectinas, geralmente acontece com lectinas ligantes de N-Acetilglicosamina e quitina, que são os principais componentes da parede celular fúngica (KATOCH; TRIPATHI, 2021). O estudo realizado por Dias e colaboradores (2020), evidenciou que o tratamento de células de *Candida parapsilosis* com a lectina de *Machaerium acutifolium* (MaL) é capaz de elevar a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e de promover alterações na permeabilidade da membrana celular resultando na inibição dos fungos.

A atividade antimicrobiana das lectinas não se limita apenas a fungos e bactérias. Uma lectina de banana modificada expressou atividade antiviral em cepas de influenza em estágio inicial de desenvolvimento (DATSON *et al.*, 2020). Como também a lectina semelhante à quitinase do tamarindo (TCLL) que, por possuir especificidade de ligação a N-acetilglicosamina, pode ligar-se a superfície celular do alfavírus CHIKV, que apresenta em sua composição N-glicano, inibindo assim a entrada do vírus nas células hospedeiras (KAUR *et al.*, 2019).

Além dessas propriedades biológicas, o potencial imunoestimulador das lectinas foi descrito em estudos realizados com as lectinas *Canavalia ensiformis* (ConA) (THOMAZZELI *et al.*, 2018) e *Canavalia brasiliensis* (ConBr) (BARBOSA *et al.*, 2001), onde ambas as lectinas foram capazes de ativar leucócitos, induzindo a produção de interferon- γ (IFN- γ). Ademais, em um experimento *in vivo* utilizando camundongos BALB/c e *Leishmania major*, Panunto-Castelo e colaboradores (2001), demonstraram que a lectina de *Artocarpus integrifolia* (KM+)

é capaz de induzir a inversão da produção de IL-4 para IL-12, alterando assim, a resposta imune de Th2 para Th1.

As lectinas também demonstraram importante atividade contra parasitos do gênero *Leishmania*. O estudo realizado por *Carneiro et al.* (2021) utilizando a lectina das sementes de *Parkia pendula* (PpeL), demonstrou a inibição no crescimento de promastigotas de *L. infantum* via domínio de reconhecimento a carboidratos (DRC), sugerindo uma interação entre a lectina e os glicoconjugados de *L. infantum*. Resultados semelhantes foram evidenciados no estudo realizado por *Souza et al.* (2021), onde a lectina da esponja marinha *Chondrilla caribensis* (CcL), inibiu o desenvolvimento das promastigotas de *L. infantum*, induzindo a produção de EROs e alterando a integridade da membrana.

As lectinas de ConA e de *Bothrops leucurus* (BLL) também demonstraram atividade leishmanicida contra cepas de *L. amazonensis* e *L. braziliensis*. Os resultados evidenciaram que a ConA foi capaz de estimular a produção de EROs e de aumentar a capacidade fagocitária dos macrófagos em promastigotas de *L. amazonensis*, resultando na eliminação do parasita (THOMAZZELI *et al.*, 2018). Já a BLL diminuiu a viabilidade de promastigotas de *L. amazonensis* e *L. braziliensis* em um mecanismo dependente de galactose e cálcio.

A capacidade de interagir com formas amastigotas de *Leishmania* também foi descrita em lectinas de origem vegetal. A lectina obtida do látex de *Synadenium carinatum* (ScLL), em diferentes concentrações, reduziu o número de macrófagos infectados por *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis* (AFONSO-CARDOSO *et al.*, 2011). Além disto, a lectina Concanavalina A (Con-A) foi capaz de interagir com células fagocíticas do sangue periférico de humanos levando a produção de citocinas e de EROs, ocasionando a eliminação dos parasitas do interior destas células (THOMAZZELI *et al.*, 2018).

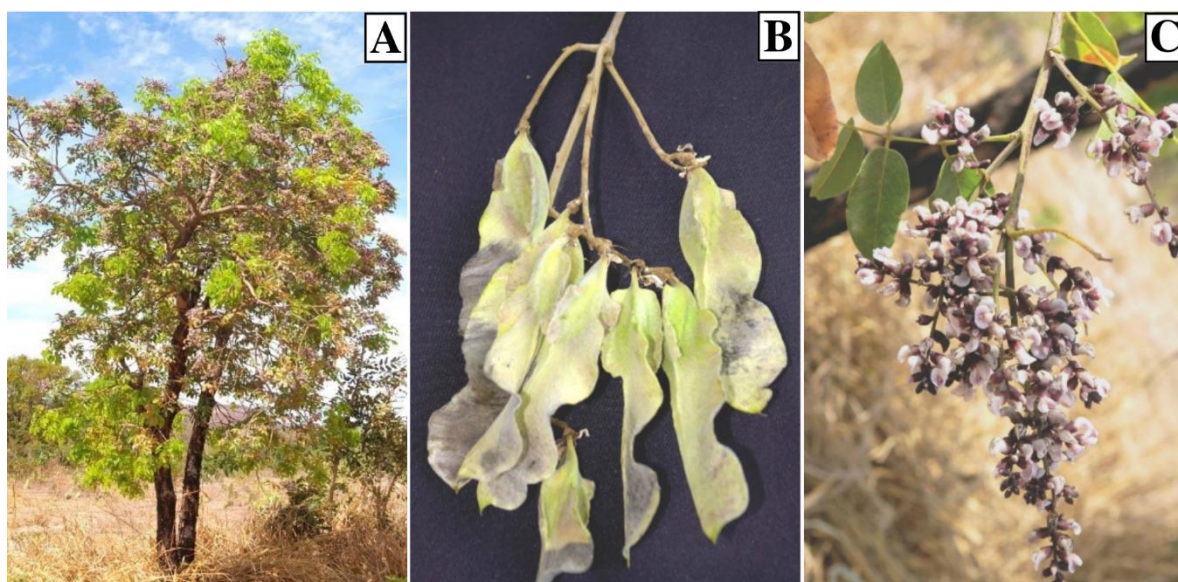
2.10. *Luetzelburgia auriculata* (Allemão) Ducke

A *Luetzelburgia auriculata* (Allemão) Ducke, popularmente conhecida como “pau-mocó” e “pau de chapada”, é uma planta da família *Fabaceae*, nativa do Brasil e predominante na região Nordeste (BARROSO *et al.*, 2016; SOARES *et al.*, 2007). Uma planta de porte arbóreo, a *L. auriculata* é capaz de crescer em solos pedregosos, chapadas e encostas e, em ambientes favoráveis ao seu desenvolvimento, pode atingir até 22 metros de altura (MAIA, 2004; OLIVEIRA *et al.*, 2002). (Figura 4).

A planta apresenta tronco de madeira clara revestida por uma casca marrom acinzentada de aspecto liso a rugoso e suas folhas são predominantemente ovais de coloração verde intensa

(SOARES *et al.*, 2007 ; VASCONCELOS, 2012). Com aspecto achatado, o fruto da *L. auriculata* mede cerca de 6 cm de comprimento, possui coloração amarronzada com aspecto aveludado e apresenta apenas 1 semente (MARTINS, 2015). As sementes podem atingir até 21,7 mm de comprimento e seu peso pode variar entre 0,23 g e 0,68 g (Figura 6) (LOPES, 2018).

Figura 6 –*Luetzelburgia auriculata* (Allemão) Ducke.



Fonte: Árvore do Bioma do Cerrado. Disponível em: <https://www.arvoresdobiomacerrado.com.br/site/2017/07/28/luetzelburgia-auriculata-allemao-ducke/> Espécie vegetal (A), sementes (B) e flores (C) de *Luetzelburgia auriculata*.

Mesmo possuindo uma grande quantidade de proteínas e lipídios em sua composição, os frutos da *L. auriculata* não são consumidos por animais e humanos devido à alta toxicidade das suas sementes (SILVA *et al.*, 2020). No entanto, a planta possui um alto potencial de uso no paisagismo e tem sido utilizada, majoritariamente, na recomposição de vegetação de áreas degradadas e na arborização de ruas (NOGUEIRA *et al.*, 2012). Além disso, por possuir uma madeira clara, ela é amplamente utilizada na fabricação de móveis (VASCONCELOS, 2012).

2.11. Aglutinina de *Luetzelburgia auriculata* (LAA)

De acordo com Oliveira e colaboradores (2002), a lectina presente nas sementes de *L. auriculata* apresenta-se como um homotetrâmero, em pH 7,6, possui massa molecular de 29 kDa por subunidade, é composta majoritariamente por folhas- β e apresenta afinidade de ligação

por glicanos contendo resíduos de galactose e lactose (ALENCAR *et al.*, 2010). Classificada como uma hololectina, a LAA possui atividade hemaglutinante que independe da presença de íons metálicos e é inativada em temperaturas superiores a 80°C (SIMÕES, 2011).

O estudo realizado por Melo e colaboradores (2005), demonstrou que a LAA exerce importante atividade inibitória sobre o crescimento fungos fitopatogênicos como *Aspergillus niger*, *Colletrichum lindemuthianum* e *Fusarium solani*. Além disto, estudos *in vivo* demonstraram que a LAA possui propriedades anti-inflamatórias, sendo capaz de imunomodular as diferentes fases da resposta imune (ALENCAR *et al.*, 2010).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Avaliar a atividade anti-promastigota *in vitro* da lectina das sementes de *Luetzelburgia auriculata* sobre cepa de *Leishmania major*.

3.2. Objetivos Específicos

- Purificar a LAA a partir das sementes de *Luetzelburgia auriculata*;
- Avaliar o efeito da LAA sobre o crescimento de formas promastigota de *L. major*;
- Verificar a participação do domínio de reconhecimento a carboidratos (DRC) na atividade da lectina;
- Investigar a formação de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) em promastigotas tratados com LAA;
- Verificar alteração de integridade da membrana dos promastigotas submetidos ao tratamento com LAA;
- Estudar o efeito da associação da LAA e anfotericina B e, LAA e Glucantime sobre promastigotas de *L. major*;
- Analisar as alterações morfológicas da *L. major*, frente a ação da LAA, através de microscopia eletrônica de varredura (MEV).

4. ARTIGO REFERENTE A DISSERTAÇÃO

Artigo a ser submetido na revista *International Journal of Biological Macromolecules* – Fator de Impacto: 8.025.

Title

***Luetzelburgia auriculata* lectin display anti-promastigote activity via ROS generation and structural damage and enhances the effect of amphotericin B in *Leishmania major* strain**

Yasmim de A. Grangeiro^a, Ana L.E. Santos^b, Flávia E.V. Barbosa^c, Romério R.S. Silva^a, Adrielle R. Costa^b, Bruno A. M. Rocha^a, Racquel O.S. Souza^c, Cláudio G.L. Silva^{c*} Claudener S. Teixeira^{a,b*}

^a Department of Biochemistry and Molecular Biology, Federal University of Ceará, Fortaleza, CE, Brazil.

^b Center for Agricultural Sciences and Biodiversity, Federal University of Cariri, Crato, CE, Brazil.

^c Faculty of Medicine, Federal University of Cariri, CE, Brazil.

*Correspondence to: Claudener S. Teixeira, Federal University of Cariri - e-mail: **claudener@gmail.com** or Cláudio G.L. Silva, Federal University of Cariri, e-mail: **claudio.gleidiston@ufca.edu.br**

ABSTRACT

Leishmaniasis is an infectious disease that interferes in patients quality of life and the treatment is based on the administration of glucantime and amphotericin B. Although effective, these drugs have limitations which stimulate the search for alternative therapeutics. In this context, lectins stand out due to their already known ability to interact with cell glycans of various pathogens. *Luetzelburgia auriculata* agglutinin (LAA) has binding affinity for galactose and lactose carbohydrates, which are targets in *Leishmania* cells. Based on these, this research evaluated the *in vitro* anti-promastigote potential activity of LAA in *L. major* strains. Promastigotes were incubated with different concentrations of LAA (320 – 5 µg/mL) and cell viability was determined by Neubauer chamber counting. After determining the IC₅₀/24h of the LAA, the participation of the carbohydrate recognition domain (CRD) in lectin activity was evaluated. Fluorescence assays with 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFH2-DA) and propidium iodide (PI) were performed in order to verify the mechanisms of action of lectin. Scanning electron microscopy was used to evaluate the morphological changes induced by LAA in promastigotes. The effect of the association between LAA and Amphotericin B and glucantime on promastigote forms was also evaluated. LAA inhibited the growth of promastigote forms of *L. major* in a time and concentration-dependent manner, with values IC₅₀/24h = 82µg/ml; IC₅₀/48h = 25µg/ml; IC₅₀/72h = 20µg/ml, an effect possibly associated with its ability to interact with the glycans from *L. major*. LAA is able to induce the production of reactive oxygen species and causes damage to the parasite membrane. The association of lectin with amphotericin B is able to modulate the effect of the drug, improving its activity. Our results present LAA as a promising alternative in the treatment of cutaneous leishmaniasis caused by *L. major*, requiring *in vivo* studies that can elucidate its mechanisms of action in a biological system.

Keywords: Glyconconjugates. Leishmaniasis. Carbohydrate recognition domain.

Highlights

LAA induces ROS production causing oxidative stress in *Leishmania major*

The toxic effect of LAA results in damage to membranes related to its CRD

1. INTRODUCTION

Leishmaniasis is a group of endemic infectious diseases that have wide dissemination worldwide and interfere significantly with the quality of life of patients [1]. According to the World Health Organization (WHO), leishmaniasis is one of the most relevant neglected tropical diseases in the world. It is estimated that 700,000 to 1 million new cases of the disease occur annually, thus characterizing a public health problem [2].

Leishmania spp. infections have distinct clinical forms that are established according to the location of the parasite in the infected tissues. Due to the manifestations presented, leishmaniasis is classified as dermatropic, when skin and mucous membranes are affected, and viscerotropic, when organs are affected [3].

Tegumentary leishmaniasis (TL) is characterized by the appearance of cutaneous or mucocutaneous lesions. In cutaneous leishmaniasis (CL), there is the appearance of an erythematous papule that evolves into a painless, round-shaped ulcer located at the site of the vector bite, and in mucocutaneous leishmaniasis (ML) there are secondary destructive lesions on the mucous membranes of the upper airways [4].

TL is most often caused by the species *L. braziliensis*, *L. guyanensis* and *L. amazonensis* on the American continent, and by *L. major*, *L. tropica* and *L. aethiopica* on the European, African and Asian continents. [5]. Among the leishmania species *L. major* is the most studied [6].

For survival and multiplication of leishmania, parasites undergo important biochemical and morphological changes throughout their life cycle, such as the expression of glycoconjugates [7]. On the cell surface of leishmania, these glycoconjugates act as Pathogen-Associated Molecular Patterns (PAMPs) and perform important functions for the parasite [8].

Among the glycoconjugates present in leishmanias, Lipophosphoglycans (LPGs) and glycosylinositol phospholipids (GIPLs) are the predominant glycans on the cell surface of these parasites. The LPG and GIPL of *L. major* consist of polymers containing the carbohydrates mannose, glucose, arabinose, and especially galactose, thus presenting great variability in its composition and structural arrangement [5, 9, 10].

The treatment of TL is based on the administration of pentavalent antimonials, amphotericin B, and its liposomal form [11]. However, the therapy is usually accompanied by serious adverse effects that include cardiotoxicity, pancreatitis, and hepatotoxicity. These can compromise the quality of life of the patient, increase the duration of hospitalization, and increase the costs involved in the treatment [12]. In addition to the adverse effects associated

with the treatment of leishmaniasis, the emergence of *Leishmania* strains with drug resistance is also observed [13]. Parasites, that have drug resistance, can show an increase in virulence, which difficulty the treatment of leishmaniasis with existing drugs [14].

Given the limitations and toxicity of available treatments of Leishmaniasis and the emergence of *Leishmania* strains with drug resistance, the development of alternative therapeutic options is necessary [15]. For this purpose, diversified strategies are necessary, among them, the bioprospecting of products of natural origin with leishmanicidal activity [16].

Lectins are proteins found in all living organisms and which have at least one non-catalytic domain capable of reversibly binding to specific carbohydrates [17, 18]. Due to its specific properties, lectins play a significant role in cell-cell interaction and act as mediators during host-pathogen interaction [19].

Lectins are considered excellent biotechnological tools with the possibility of several biological applications such as antiparasitic [20], anti-inflammatory [21], antioxidant [22], relaxing vessel [23], angiogenic [24] and leishmanicidal [25]. All these applications are related to the ability of these lectins to interact with glycans present in cell membranes.

Luetzelburgia auriculata agglutinin (LAA) is a homotetrameric hololectin composed mostly of β -sheets and with a molecular mass of 29 kDa per subunit. This lectin has an affinity for free galactose or lactose and for complex glycans whose antennae end at galactose residues. LAA-carbohydrate interactions are preferentially maintained at pH 7.0 and temperatures below 80°C [26, 27]. LAA also has a hemagglutinating activity independent of the presence of metal ions [17, 27].

Previous studies demonstrated that LAA exerts important inhibitory activity on the growth of phytopathogenic fungi such as *Aspergillus niger*, *Colletotrichum lindemuthianum*, and *Fusarium solani* [28]. Moreover, *in vivo* studies have shown that LAA has anti-inflammatory properties, being able to immunomodulate the different phases of the immune response [26].

Due to the scarcity of studies on the subject and knowing the ability of LAA to recognize and interact with the same type of carbohydrate present on the cell surface of *L. major*, it is necessary to evaluate the leishmanicidal activity of this lectin. Therefore, this study aims to investigate the *in vitro* leishmanicidal effect of LAA against *L. major*.

2. MATERIAL AND METHODS

2.1 Lectin purification

L. auriculata seeds were collected from plants located at Araripe, Ceará, Brazil. The plant was identified in the Herbarium Dárdano de Andrade-Lima/Regional University of Cariri, number 15.748, and registered in SISGEN (Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado, ID: A6D883E).

The purification of the agglutinin from *Luetzelburgia auriculata* (LAA) was carried out as described by Oliveira et al. [27]. Mature seeds from *L. auriculata* were ground into a fine powder using a coffee mill. The resulting flour was diluted 1:10 (w/v) in NaCl 0.15 M and incubated at room temperature under continuous stirring for 4 h before the centrifugation at 4000 $\times g$ for 20 min at 4 °C. The supernatant (crude extract) was precipitated by adding ammonium sulfate 60% saturation in the solution (fraction 40–60%), and the precipitate was centrifuged (4000 $\times g$, 20 min). The pellet was solubilized in a minimal volume of extraction buffer.

The fraction 40-60% was loaded on a column (1.0 x 3.5 cm) of Guar Gum matrix (Sigma Aldrich) equilibrated with NaCl 0.15 M. The unbound proteins were eluted with the equilibrium solution in a flow of 1.0 ml.min⁻¹, and lectin was desorbed using lactose 0.1 M. The eluted material was collected manually in 1.5 ml fractions and monitored at 280 nm. The active fraction was dialyzed against distilled water and freeze-dried. The purified *L. auriculata* agglutinin (LAA) was subjected to 12.5% sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) under denaturing conditions [29].

2.2 Biological assays

2.2.1 Parasites

The *Leishmania major* strain (MHOM/IL/80/Friendlin) used in the present study was identified by DNA sequencing using the Genetic Analyzer ABI 3500® (Applied Biosystems). Promastigote forms were maintained in Fetal Bovine Serum (SFB) and 5% DMSO and Schneider's medium supplemented with 20% SFB and antibiotics (100 U/ml penicillin and 100 µg/ml streptomycin). For the experiments, promastigotes up to the 8th culture passage were used.

2.2.2 Evaluation of the anti-promastigote activity of LAA in *L. major* strain

Promastigotes (10^6 cells/ml) were incubated in 96-well plates (200 μ l/well) in a B.O. D oven at 26°C for 24, 48, and 72h in Schneider medium (Vitrocell-Embriolife, São Paulo, Brazil) supplemented with 20% fetal bovine serum (FBS) and antibiotics (100 U/ml penicillin; 100 μ g/ml streptomycin) (Vitrocell-Embriolife, São Paulo, Brazil), cultured in the absence or presence of LAA (320 - 5 μ g/ml), Amphotericin B (0.5 - 0.03 μ g / ml), Glucantime (75 - 2.3 mg / ml) or PBS (0.1 M). After each time interval, cell viability was assessed by counting in a Neubauer chamber. The results were expressed as percent cell viability and the concentration that inhibited growth by 50% (IC_{50}) was determined by non-linear regression. The assays were performed in triplicate in three independent experiments

2.2.3 Evaluation of the association between LAA and conventional drugs in promastigotes

For the evaluation of the association between LAA and conventional drugs (Glucantime and Amphotericin B), promastigotes were separated into three different treatment groups, these being: LAA (41 μ g) and amphotericin B (0.5 - 0.03 μ g/ml); LAA (41 μ g) and glucantime (75-2.3 mg/ml) and the control group treated with PBS (0.1M) only. LAA concentrations were obtained from the viability results, where the 24h IC_{50} was used at a subinhibitory concentration ($IC_{50}/8 = 10.25$ μ g/ml) and associated with increasing drug concentrations. The experiments were performed under the same conditions as mentioned above.

2.2.4 Evaluation of the carbohydrate recognition domain (CRD) in anti-promastigote activity

To perform this assay, LAA ($IC_{50} - 82$ μ g/ml) was incubated with β -Lactose (0.1 M), for 60 min at 37 °C. After this period, promastigotes (10^6 cells/ml) were incubated in 96-well plates at 26 °C in Schneider medium (Vitrocell-Embriolife, São Paulo, Brazil) supplemented with 20% fetal bovine serum (FBS) and antibiotics (100 U/ml penicillin; 100 μ g/ml streptomycin) (Vitrocell-Embriolife, São Paulo, Brazil) with the following treatments: 1) LAA (IC_{50}); 2) β -Lactose (0.1 M); 3) LAA ($IC_{50} - 82$ μ g/ml) and β -Lactose (0.1 M); and 4) PBS (0.1 M). After the treatment period, cell viability was determined by counting in a Neubauer

chamber. The data were expressed as percent cell viability and the assays were performed in triplicate in three independent experiments.

2.2.5 Analysis of Reactive Oxygen Species (ROS) production

For the evaluation of ROS production, 2',7'-dichlorofluorescein (DCFH₂-DA) was used. After the promastigote forms were treated for 24 h with LAA (IC₅₀), the cells were incubated with 10 µM of DCFH₂-DA at 37 °C for 30 min in the dark. In this assay, antimycin A (3.2 µM) was used as a positive control while PBS (0.1 M) was used as a negative control. Promastigotes were visualized under a fluorescence microscope (Carl Zeiss Axiostar Plus Fluorescence; excitation wavelength, 488 nm; emission wavelength, 525 nm).

2.2.6 Cell membrane integrity analysis

Promastigotes were incubated with LAA (IC₅₀) and treated as described in section 2.2.4, after treatment, cells were then incubated with 0.5 mM propidium iodide at 37 °C for 30 min in the dark [30]. Amphotericin B (0.03 µg/ml) and PBS (0.1 M) were used as the positive and negative control, respectively. At the end of treatment, promastigotes were observed in fluorescence microscope (Carl Zeiss Axiostar Plus, excitation wavelength, 490 nm; emission wavelength, 620 nm).

2.2.7 Scanning electron microscopy analysis

Promastigotes were treated with LAA at IC₅₀ concentration for 24 h. After the treatment period, the cells were washed with PBS (0.1M) and fixed for 2 h with glutaraldehyde (2.5%) at room temperature. The parasites were then washed again with PBS (0.1M) and subjected to increasing concentrations of ethanol. Finally, the samples were dried in a CO₂ oven, coated with gold, and analyzed in a Tescan scanning electron microscope model Vega 3 (Tescan, Brno, Czech Republic) using an accelerating beam voltage of 10,000 kV). The analyses were performed at the Materials Engineering Laboratory of the Federal University of Cariri, Brazil.

2.3 Statistical analyses

Data were expressed as mean \pm Standard Error of Mean (SEM) and significant differences were evaluated by analysis of variance (ANOVA) followed by specific comparative tests using GraphPad Prism version 5.0 software. Values that scored $p < 0.05$ were considered significant.

3. RESULTS

3.1 LAA purification

LAA was purified by affinity chromatography and final purity was confirmed by gel electrophoresis (SDS-PAGE). The Chromatogram shows two peaks (PI) and (PII), corresponding, respectively, to the unbound protein fraction and the retained protein fraction (Figure 1A). In SDS-PAGE, LAA showed three bands (Figure 1B), the first band corresponding to the α chain ($\cong 29$ kDa), the second to the β chain ($\cong 16$ kDa) and the third to the γ chain ($\cong 15$ kDa).

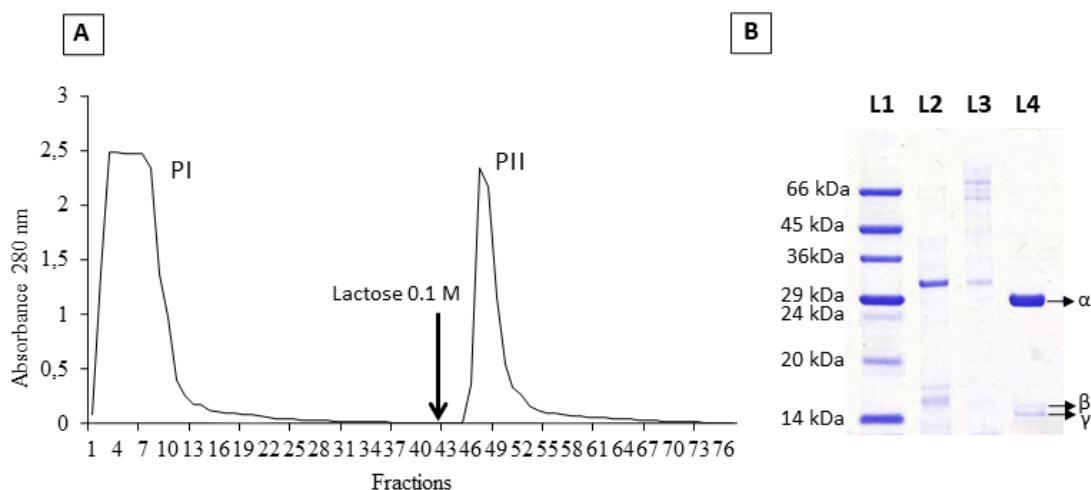
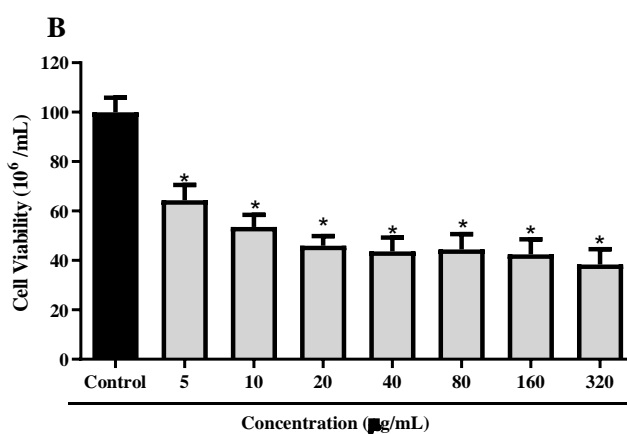
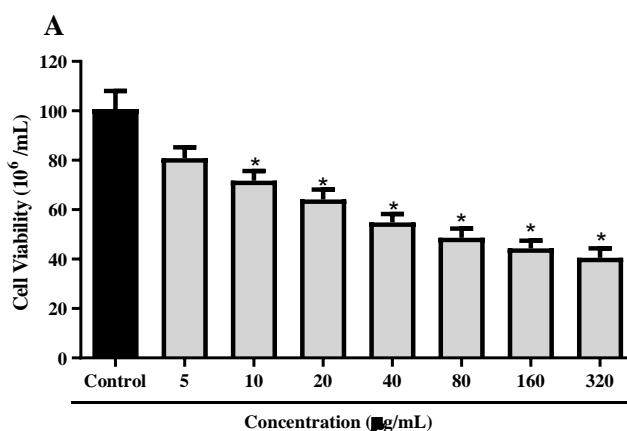


Fig. 1. LAA purification by affinity chromatography. (A) Chromatogram profile of *L. auriculata* fraction (40-60%) in Guar Gum column. (B) SDS-PAGE showing LAA after purification. L1: Molecular weight standards (MW); L2: crude extract; L3: fraction (40-60%); L4: PII (purified LAA). Molecular weight marker: bovine serum albumin 66 kDa; ovalbumin, 45 kDa; glyceraldehyde- 3-phosphate dehydrogenase, 36 kDa; carbonic anhydrase, 29 kDa; trypsinogen, 24 kDa; trypsin inhibitor, 20 kDa; α -lactalbumin, 14 kDa; (LAA) α -chain, β -chain, and γ -chain of lectin.

3.2 LAA inhibits the growth of promastigotes via CRD

LAA exhibited an inhibitory effect on promastigotes of *L. major*. Our data reveals that this effect is time-dependent and potentially dose dependent (Fig. 2 A - C). In the 24h treatment period, it was possible to observe a significant reduction of cells, with the exception of the lowest concentration (5 $\mu\text{g/ml}$).

However, this pattern was not observed at 48 and 72h, where all concentrations used were able to reduce the viability of promastigotes. The inhibitory concentrations obtained in this assay were: $\text{IC}_{50}/24\text{h} = 82 \mu\text{g/ml}$; $\text{IC}_{50}/48\text{h} = 25 \mu\text{g/ml}$ and $\text{IC}_{50}/72\text{h} = 20 \mu\text{g/ml}$. From the results obtained, the use of the concentration of LAA capable of inhibiting 50% of promastigote growth within 24 hours ($\text{IC}_{50}/24 \text{H} = 82 \mu\text{g} /\text{mL}$) was standardized for the other experiments.



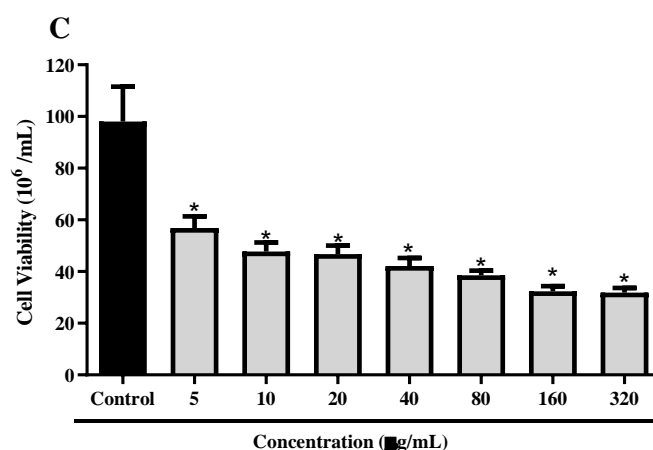


Fig. 2. LAA inhibited the proliferation of promastigotes forms in *L. major* after 24 (A), 48 (B), 72 (C) hours of treatment. The data represent the mean \pm S. D. of three independent experiments performed in triplicate and analyzed statistically by One-way ANOVA and Bonferroni post-test (* $p < 0.05$ vs. PBS).

To verify whether the action of LAA on promastigote forms of *L. major* would be related to the Carbohydrate Recognition Domain (CRD), parasites were treated with LAA ($IC_{50}/24h - 82 \mu g/ml$) and β - Lactose (0.1 M). Incubation of LAA with β - Lactose was able to reverse the inhibitory effect of LAA on promastigote forms within 24h (LAA: $49\% \pm 1.7$ vs. LAA + β - Lactose: $96\% \pm 3.8$) (Fig. 3). This data points out that the anti-promastigote activity of LAA is dependent on the interaction of its CRD with carbohydrates present in glycans on the surface of *L. major*.

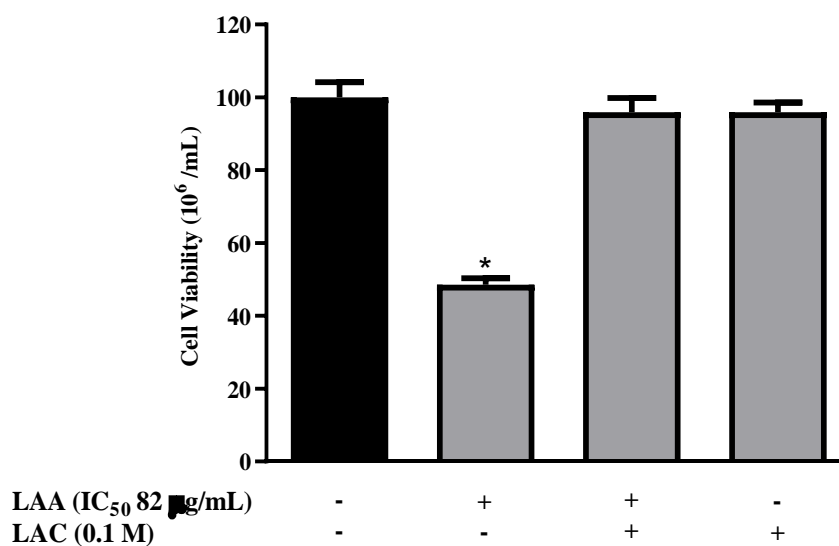


Fig. 3. Effect of β -Lactose (LAC) (0,1 M) on LAA activity ($IC_{50} = 82 \mu\text{g}/\text{ml}$). The data represent the mean \pm S. D. of three independent experiments performed in triplicate and analyzed statistically by One-way ANOVA and Bonferroni post-test (* $p < 0.05$ LAA vs. LAA + LAC).

3.3 LAA modulates the leishmanicidal action of glucantime and amphotericin B

The association between the 24 h minimum sub-inhibitory concentration of LAA and amphotericin B (29 % \pm 7.1) is more effective than treatment with the drug alone at the concentrations of 0.03 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (72 % \pm 5.8); 0.06 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (59 % \pm 8.2); 0.125 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (51 % \pm 3.4) and 0.25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (34 % \pm 2.7) (Fig. 5 A - B).

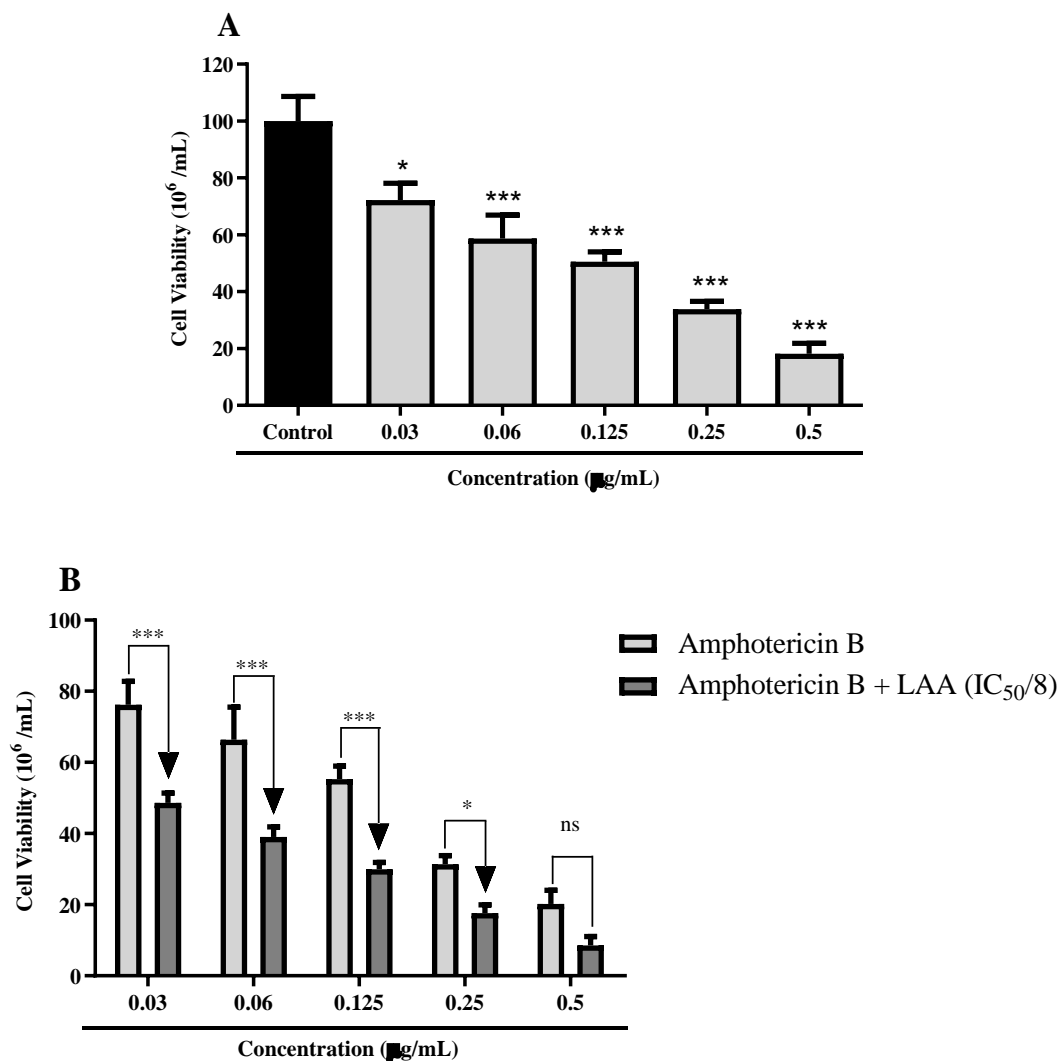


Fig. 4. Effect of glucantime after 24h of treatment (*) indicates $p < 0.05$ compared to PBS (A). Effect of the association between LAA ($IC_{50}/8 = 10.25 \mu\text{g}/\text{ml}$) and glucantime after 24 hours of treatment (B). The data represent the mean \pm S. D. of three independent experiments performed in triplicate and

analyzed statistically by One-way ANOVA and Bonferroni post-test (** indicates $p < 0.01$, (***) indicates $p < 0.001$ in comparison Glucantime vs. Glucantime + LAA.

Nevertheless, the results showed that the association between the sub-inhibitory concentration of LAA and glucantime ($95\% \pm 0.9$), can decrease the efficacy of the drug. The effect was significant in all concentrations when the drug was administered by itself, inhibiting up to 76%. However, in association with lectin, glucantime had its action reduced in all concentrations tested 2.3 mg/ml ($94\% \pm 1.7$); 4.6 mg/ml ($93\% \pm 1.7$); 9.3 mg/ml ($93\% \pm 1.7$); 18.5 mg/ml ($94\% \pm 1.5$); 37.5 mg/ml ($97\% \pm 1.9$) and 75 mg/ml ($99\% \pm 1.7$) (Fig. 4 A - B).

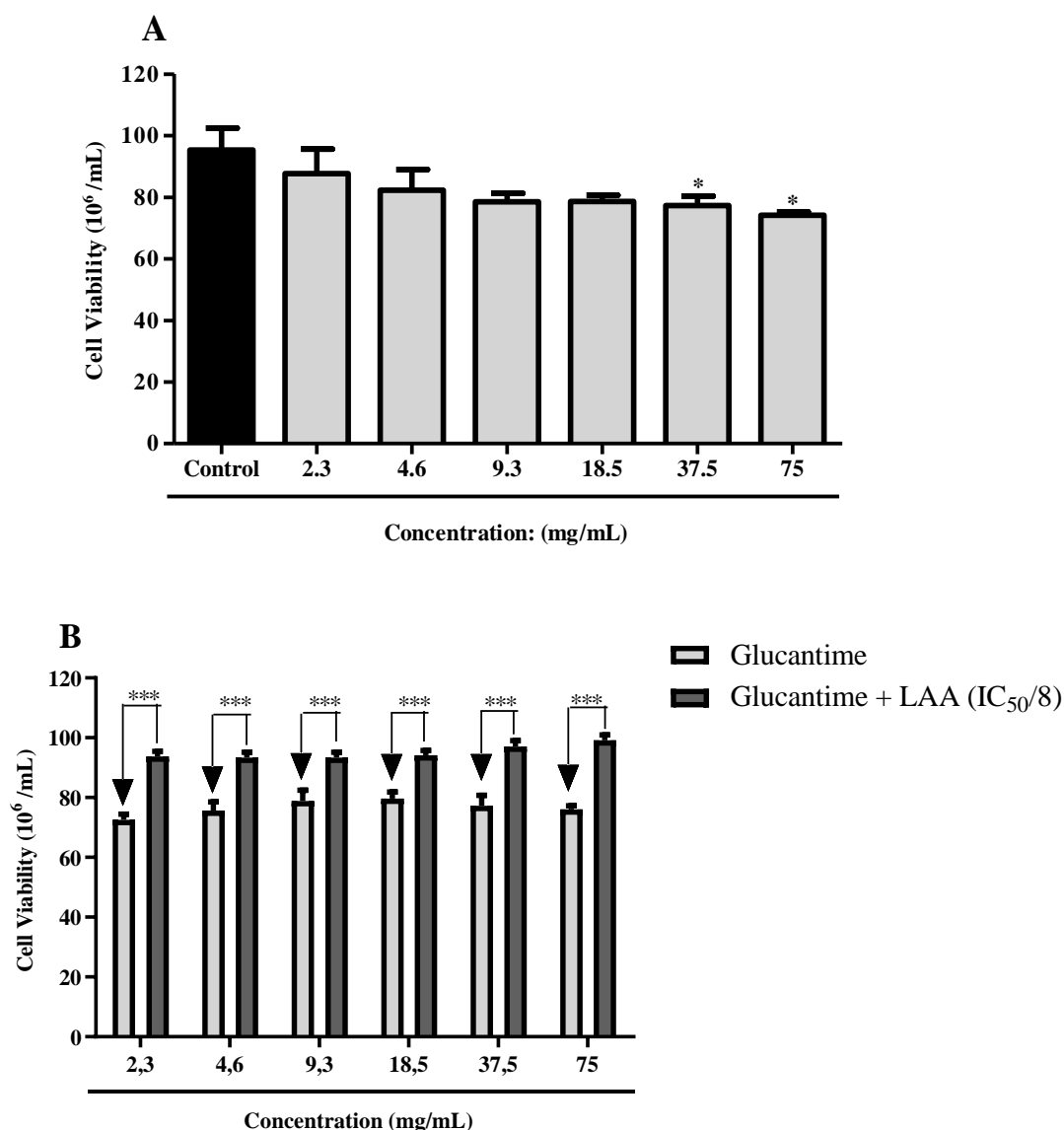


Fig. 5. Effect of amphotericin B after 24h of treatment (*) indicates $p < 0.05$ compared to PBS (A). Effect of the association between LAA ($IC_{50/8} = 10.25 \mu\text{g/ml}$) and amphotericin B after 24 hours of

treatment (B). The data represent the mean \pm S. D. of three independent experiments performed in triplicate and analyzed statistically by One-way ANOVA and Bonferroni post-test (***) indicates $p < 0.01$, (***) indicates $p < 0.001$ in comparison amphotericin B vs. Amphotericin B + LAA.

3.4 LAA induced structural damage in *L. major* promastigotes

Morphological analysis of *Leishmania major* promastigotes by scanning electron microscopy (SEM) permitted to observe that the control group maintained the typical features of the parasite, such as preserved membrane and flagellum (Fig. 6 A - B). However, treatment with LAA (IC_{50} - 82 $\mu\text{g/ml}$) for 24 h was able to cause changes in the morphology of these parasites, such as alteration of the plasma membrane as of the formation of protrusions on the membrane surface, shortening of the flagellum and formation of aggregates, which is indicative of the binding action of LAA (Fig. 6 C-D).

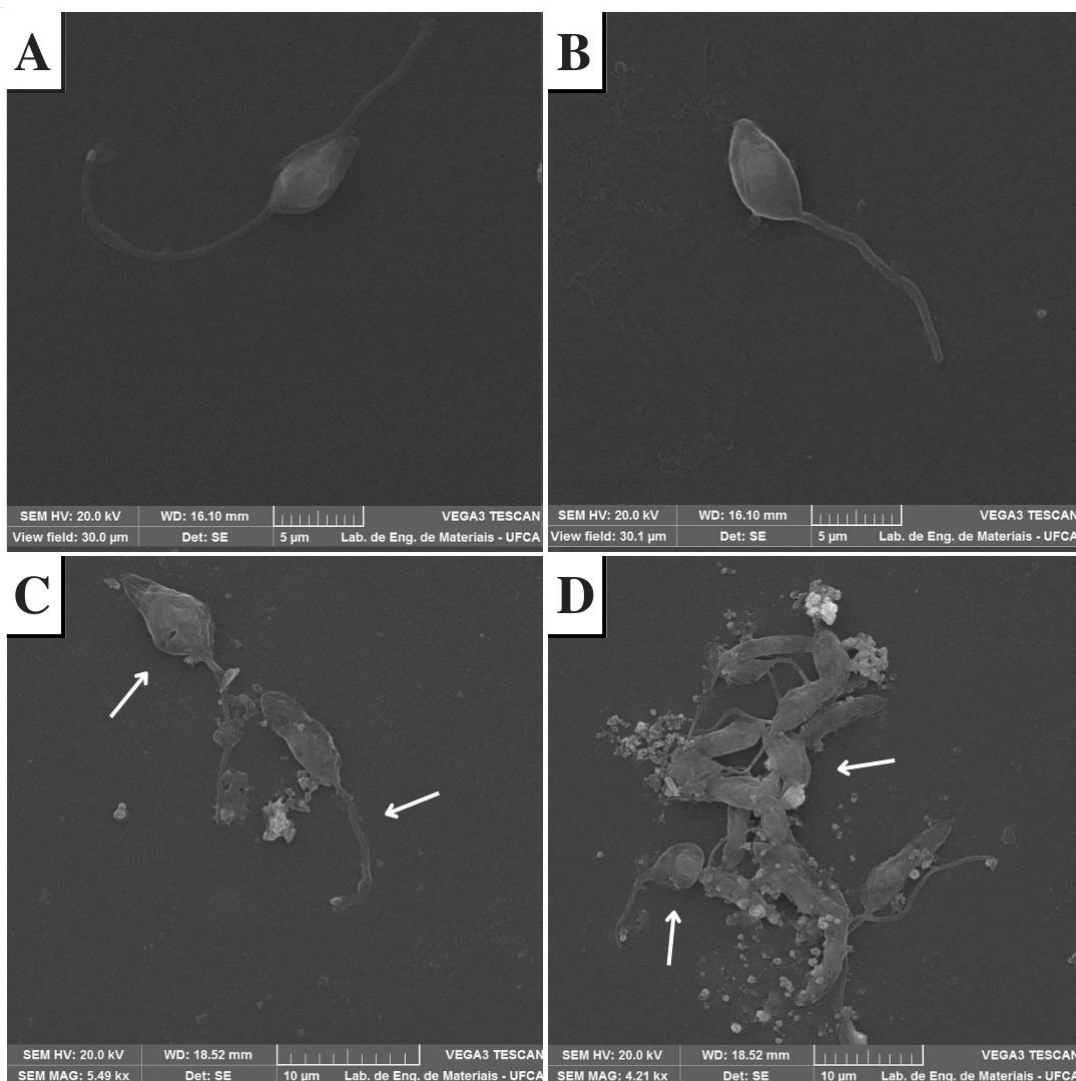


Fig. 6. Scanning electron microscopy of promastigotes *Leishmania major* of treated and untreated with LAA. The images show control (A – B) and promastigotes treated with 82 µg/ ml of LAA (C – D). Scale bar = 5 µm and 10 µm. The arrow points to morphological changes in the promastigote forms such as: formation of pores and protusions in the parasite membrane, shortening of the flagellum and formation of aggregates.

3.5 LAA acts on the production of ROS and produces damage to the parasites membrane

Subsequently, we sought to evaluate the probable mechanisms of action of LAA in promastigotes of *L. major*. Treatment of promastigotes with LAA (IC₅₀ - 82 µg/ml) for a period of 24 h showed significant fluorescence, evidencing that this lectin induces the production of reactive oxygen species (ROS) in *L. major* (Fig. 7). It was also possible to verify that LAA (IC₅₀ - 82 µg/ml) caused changes in the parasites' membranes since internalization of PI was registered through fluorescence emission (Fig. 8). Neither of the two effects was observed in LAA treated cells were seen in PBS (0.1 M) treated cells (Fig. 7; Fig. 8).

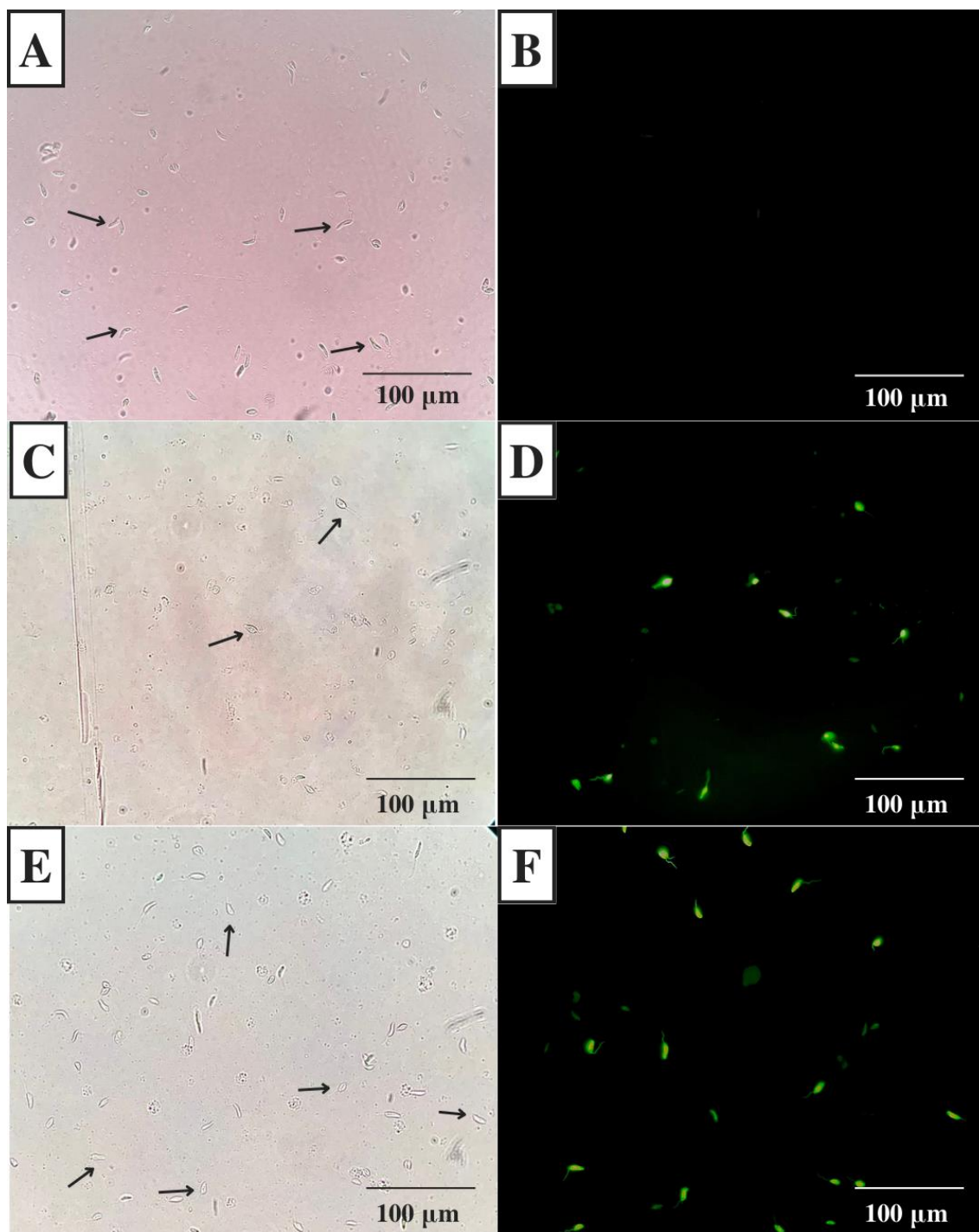


Fig. 7. Images of *L. major* promastigotes showed ROS overproductions and internalization after LAA treatment. (A – B) treatment with PBS 0.1 M (negative control). (C – D) treatment with Antimycin A (3.2 μM- positive control). (E – F) treatment with 82 μg/ ml of LAA. The arrows point to the promastigote forms at 400x magnification under the light of an optical microscope.

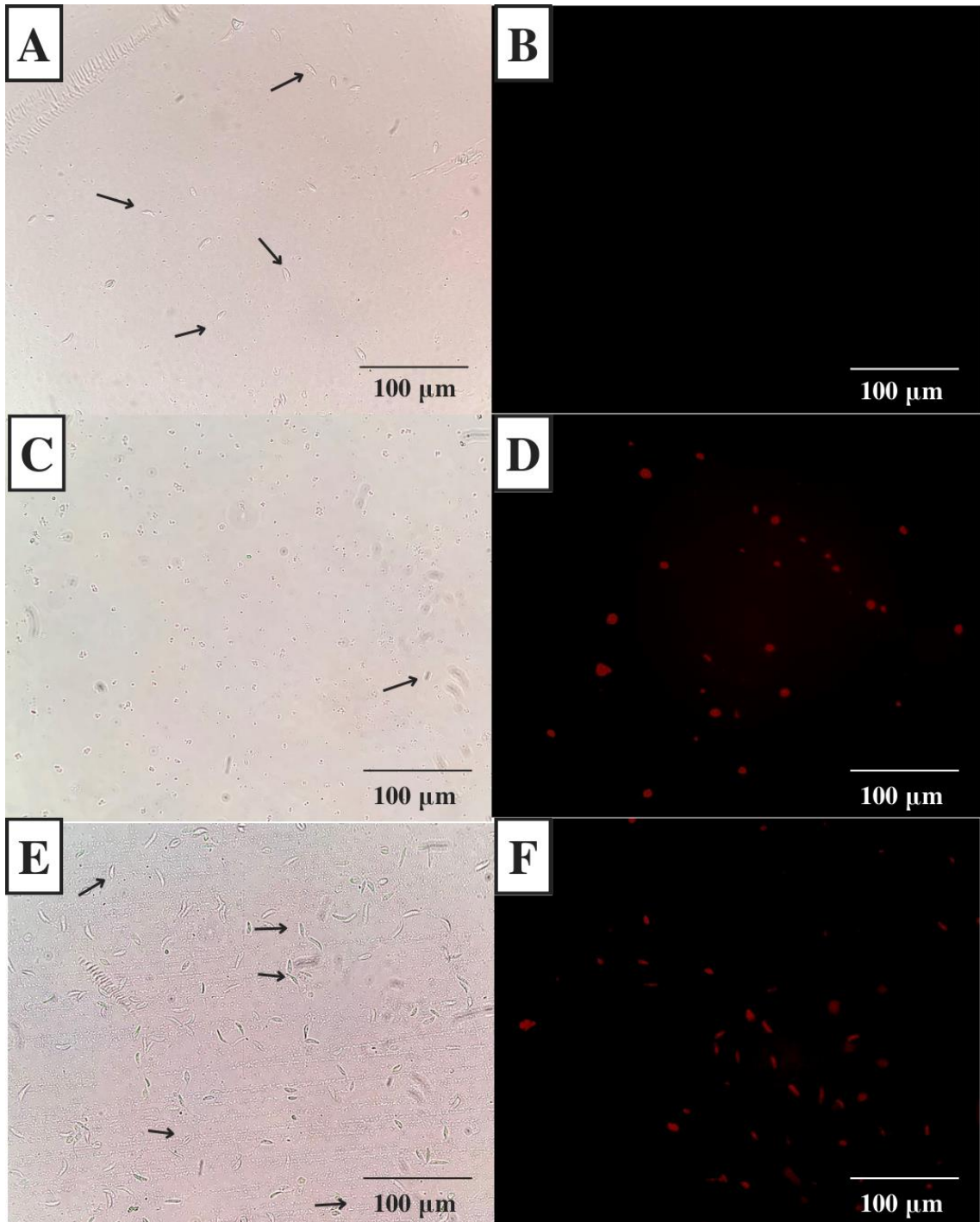


Fig. 8. Images of *L. major* promastigotes showed PI internalization after LAA treatment. (A – B) treatment with PBS 0.1 M (negative control). (C – D) treatment with amphotericin B (0.03 μg/ml - positive control). (E – F) treatment with 82 μg/ml of LAA. The arrows point to the promastigote forms at 400x magnification under the light of an optical microscope.

4. DISCUSSION

LAA presents inhibitory activity on the growth of promastigote forms of *L. major*, confirming the ability of lectins to interact with protozoa of the genus *Leishmania* previously described in the literature. The study by Carneiro and collaborators [25] using lectin from *Parkia pendula* seeds (PpeL), revealed inhibition in the growth of *L. infantum* promastigotes via the carbohydrate recognition domain (CRD), suggesting an interaction between the lectin and *L. infantum* glycoconjugates.

Similar results were evidenced in the study performed with the lectin from the marine sponge *Chondrilla caribensis* (CcL), which inhibited the development of *L. infantum* promastigotes by inducing the production of ROS and altering membrane integrity [31]. Besides these, the lectin obtained from the venom of *Bothrops leucurus* (BLL) presented a relevant inhibitory activity on the growth of promastigotes of *L. braziliensis* [32].

LAA activity is reversed by β -Lactose indicating that CRD is directly involved with the activity probably through the interaction between LAA and the glycoconjugates present on the cell surface of this leishmania species. Previous research has demonstrated the ability of lectins to interact with different *Leishmania* species. In the study by Silva and collaborators [33] using several galactose and glucose-binding lectins, their agglutinating activity was observed in the promastigotes of *L. amazonensis*. Considering that *L. major* has several glycans on the cell surface such as lipophosphoglycans (LPG) and glycosylinositol phospholipids (GIPL) that have galactose residues in the terminal antennae of their structures [5], it is believed that the interaction between LAA and *L. major* occurs due to the lectin's ability to recognize and bind to this carbohydrate and consequently, preventing its development.

The induction of oxidative stress mediated for LAA was caused by the overproduction of reactive oxygen species (ROS) and promoted changes in membrane permeability of promastigotes. According to the existing literature, lectins can induce the production of ROS in different cell types [36]. Studies performed with *Polygonatum cyrtonema* lectin (PCL) and lectin isolated from *Artocarpus heterophyllus*, demonstrated that both lectins are able to increase the production of ROS in human cancer cells [37, 38]. As well as in the study by Dias and collaborators [30], where there was an overproduction of ROS in *Candida parapsilosis* cells after treatment with the lectin of *Machaerium acutifolium* (MaL).

The activity of lectins on biological membranes has been previously described in different cells. Studies performed with the lectin obtained from the marine sponge *Cinachyrella apion* (CaL) and with the lectin from *Morus alba* (MLL), demonstrated the ability of these

lectins to promote membrane alterations in human adenocarcinoma cells and human breast and colon cancer cells, respectively [39, 40]. Therefore, our results demonstrated that LAA interferes with the membrane permeability of *L. major* promastigotes, causing the internalization of PI by the cells. Similar results were observed in *L. infantum* promastigotes treated with CcL, where the lectin caused changes in the integrity in the cell membrane of the parasites resulting in fluorescence emission after incubation with PI [31].

Despite the great progress in the understanding of cell biology and immunology in infections by protozoa of the genus *Leishmania*, the usual therapeutics are still limited [15]. Moreover, serious adverse effects and the emergence of *Leishmania* strains with drug resistance are also observed [13]. Thus, the association between already-known drugs and new substances capable of reducing the viability of these parasites is a strategy that can be used [41].

In this study it was observed that LAA increased the effect of amphotericin B, suggesting that this lectin has potential as an adjuvant molecule in the action of this drug. Other studies have also shown that lectins from *Canavalia ensiformis* (ConA), *Dioclea violacea* (DVL), *Vatairea macrocarpa* (VML), *Canavalia rosea* (ConM), and *Parkia platycephala* (PPL) have adjuvant action in the effect of antibiotics on multidrug-resistant bacterial strains [42, 21, 43] and of fungicides against fungi of the genus *Candida* [44]. This adjuvant effect may be related to the ability of lectin to interact with carbohydrates of microorganisms and facilitate the action of some drugs [44].

On the other hand, LAA was observed to have an antagonistic effect on the action of glucantime, reducing its efficiency. The reduced activity of glucantime and the increased activity of amphotericin B in the presence of LAA may be related to the different mechanisms of action of the two drugs, in which glucantime needs to be internalized to act in inhibit the synthesis of pathways that produce ATP such as, glycolysis and β -oxidation of fatty acids [45] and amphotericin acts on the leishmania membrane via binding to ergosterol [46]. Thus, it is hypothesized that LAA could enhance the action of membrane-interacting drugs such as amphotericin B, but hinders the entry of glucantime into the cell interior, decreasing its bioavailability in the intracellular region.

5. CONCLUSIONS AND PERSPECTIVES

LAA is able to inhibit the growth of *L. major* promastigotes and this activity is related to its CRD, and there may be interactions between the lectin and glycoconjugates present in the parasites' membrane. The anti-promastigote action of the lectin is related to the induction of

oxidative stress, as well as alterations and loss of permeability in the membrane of the parasites. Furthermore, LAA was able to modulate the action of amphotericin B in promastigotes, where the combination was more efficient than using the drug alone. Taken together, our results suggest that LAA is a promising lectin for the treatment of *L. major*.

Acknowledgements

We thank Prof. Fernando A.A. Carvalho and Valeria c. Sousa from the Laboratório de atividade antileishmania, Universidade Federal do Piauí, for providing the *Leishmania* strains. We also thank Daniel Bernardes Silva for his support in obtaining the SEM images.

This study was partly funded by the Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNCAP), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Finance Code 001 and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), referring to the Research Productivity Grants of Bruno A.M. Rocha and Claudener S. Teixeira.

REFERENCES

- [1] F. Galvis-Ovallos, R. A. Silva, V. G. D. Silva, P. B. Sabio, & E. A. B. Galati, Leishmanioses no Brasil: aspectos epidemiológicos, desafios e perspectivas. *Atualidades em Medicina Tropical no Brasil: Protozoários. Rio Branco, AC: Strictu Sensu*, 227-52, 2020. DOI: 10.35170/ss.ed.9786586283136
- [2] B. O. OMS. Mapa de Evidências: Leishmaniose Visceral. Mapa de Evidencias: Leishmaniasis Visceral. Evidence Map: Visceral Leishmaniasis, 2022.
- [3] M. Akhoundi, T. Downing, J. Votýpka, K. Kuhls, J. Lukeš, A. Cannet, ... & D. Sereno. *Leishmania* infections: Molecular targets and diagnosis. *Molecular aspects of medicine*, 57, 1-29., 2017. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2016.11.012>
- [4] Brasil. **Guia de Vigilância em Saúde**. Brasília: Ministério Da Saúde, 3ª edição, 2019.

- [5] R. R. Assis, I. C. Ibraim, P. M. Nogueira, R. P. Soares, & S. J. Turco. Glycoconjugates in New World species of *Leishmania*: polymorphisms in lipophosphoglycan and glycoinositolphospholipids and interaction with hosts. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1820(9), 1354-1365, 2012a. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2011.11.001>
- [6] J. Oyama, F. B. P. Ferreira, C. C. Conter, D. S. S. L. Lera-Nonose, Á. C. F. H. Ramos-Milaré, E. A. S. Venazzi,... & M. V. C. Lonardoni, American tegumentary leishmaniasis: diagnostic and treatment challenges in a clinical case. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 60, 2018. <https://doi.org/10.1590/S1678-9946201860003>
- [7] R. R. Assis, I. C. Ibraim, F. S. Noronha, S. J. Turco, & R. P. Soares. Glycoinositolphospholipids from *Leishmania braziliensis* and *L. infantum*: modulation of innate immune system and variations in carbohydrate structure. *PLoS neglected tropical diseases*, 6(2), e1543., 2012b. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001543>
- [8] S. J. Turco, G. F. Späth, & S. M. Beverley. Is lipophosphoglycan a virulence factor? A surprising diversity between *Leishmania* species. *Trends in parasitology*, 17(5), 223-226, 2001. [https://doi.org/10.1016/S1471-4922\(01\)01895-5](https://doi.org/10.1016/S1471-4922(01)01895-5)
- [9] McConville, M. J., Bacic, A., Mitchell, G. F., & Handman, E. Lipophosphoglycan of *Leishmania major* that vaccinates against cutaneous leishmaniasis contains an alkylglycerophosphoinositol lipid anchor. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 84(24), 8941-8945, 1987. <https://doi.org/10.1073/pnas.84.24.8941>
- [10] M. J. McConville & M. A. Ferguson. The structure, biosynthesis and function of glycosylated phosphatidylinositols in the parasitic protozoa and higher eukaryotes. *The Biochemical journal*, 294, 305–324, 1993. <https://doi.org/10.1042/bj2940305>
- [11] N. Tiwari, M. R. Gedda, V. K. Tiwari, S. P. Singh & R. K. Singh. Limitations of current therapeutic options, possible drug targets and scope of natural products in control of leishmaniasis. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*, 18(1), 26-41, 2018. <https://doi.org/10.2174/1389557517666170425105129>

- [12] D. C. D. S. Caetano, C. O. Costa, S. N. Diniz, M. R. M. dos Santos, A. de Souza Marquez & R. M. S. Pereira. Leishmaniose Tegumentar no Estado do Mato Grosso: Características Sociodemográficas e de Saúde Associados com Reações Adversas Laboratoriais e Eletrocardiográficas. *Ensaio e Ciência C Biológicas Agrárias e da Saúde*, 24(3), 234-241, 2020. <https://doi.org/10.17921/1415-6938.2020v24n3p234-241>
- [13] J. B. P. Ribeiro, A. L. Miranda-Vilela, A. A. S. Amorim, R. D. Garcia, J. R. Moreira, C. M. Gomes, G. H. S. Takano, G. M. F. de Oliveira, A. V. Lima, I. C. R. da Silva & , R. N. R. Sampaio. Study of the efficacy of N-methyl glucamine antimoniate (Sb^V) associated with photodynamic therapy using liposomal chloroaluminium phthalocyanine in the treatment of cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania (L.) amazonensis* in C57BL6 mice. *Photodiagnosis and photodynamic therapy*, 26, 261–269, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2019.04.004>
- [14] G. Kaur & B. Rajput. Comparative analysis of the omics technologies used to study antimonial, amphotericin B, and pentamidine resistance in leishmania. *Journal of parasitology research*, 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/726328>
- [15] J. A. L. Lindoso. Diversidade clínica e tratamento da leishmaniose visceral. *Revista do Instituto Adolfo Lutz*, 77, 1-8, 2018. <https://doi.org/10.53393/rial.2018.v77.34199>
- [16] A. G. Tempone, C. M. de Oliveira & R. G. Berlinck. Current approaches to discover marine antileishmanial natural products. *Planta medica*, 77(06), 572-585, 2011. <https://doi.org/10.1055/s-0030-1250663>
- [17] W. J. Peumans, & E. J. Van Damme. Lectins as plant defense proteins. *Plant physiology*, 109(2), 347, 1995. <https://doi.org/10.1104/pp.109.2.347>
- [18] T. Yau, X. Dan, C. C. W. Ng & T. B. Ng. Lectins with potential for anti-cancer therapy. *Molecules*, 20(3), 3791-3810, 2015. <https://doi.org/10.3390/molecules20033791>
- [19] R. S. Singh, A. K. Walia & J. F. Kennedy. Structural aspects and biomedical applications of microfungus lectins. *International journal of biological macromolecules*, 134, 1097-1107, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.05.093>

- [20] K. L. Batista, C. R. Silva, V. F. Santos, R. C. Silva, R. R. Roma, A. L. Santos & C. S. Teixeira. Structural analysis and anthelmintic activity of *Canavalia brasiliensis* lectin reveal molecular correlation between the carbohydrate recognition domain and glycans of *Haemonchus contortus*. *Molecular and biochemical parasitology*, 225, 67-72, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2018.09.002>
- [21] V. F. Santos, A. C. Araujo, A. L. Silva, D. V. Almeida, P. R. Freitas, A. L. Santos & C.S. Teixeira. Dioclea violacea lectin modulates the gentamicin activity against multi-resistant strains and induces nephroprotection during antibiotic exposure. *International journal of biological macromolecules*, 146, 841-852., 2020. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.09.207>
- [22] B. A. Rocha, C. S. Teixeira, J. C. Silva-Filho, R. B. Nóbrega, D. B. Alencar, K. S. Nascimento, V. N. Freire, C. J. Gottfried, C. S. Nagano, A. H. Sampaio, S. Saker-Sampaio, B. S. Cavada & P. Delatorre. Structural basis of ConM binding with resveratrol, an anti-inflammatory and antioxidant polyphenol. *International journal of biological macromolecules*, 72, 1136–1142, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2014.08.03>
- [23] I. L. Barroso-Neto, P. Delatorre, C. S. Teixeira, J. L. Correia, J. B. Cajazeiras, R. I. Pereira & B. S. Cavada. Structural analysis of a *Dioclea sclerocarpa* lectin: Study on the vasorelaxant properties of *Dioclea* lectins. *International journal of biological macromolecules*, 82, 464-470, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.10.052>
- [24] J. H. Véras, C. G. Cardoso, S. C. Puga, A. V. de Melo Bisneto, R. R. Roma, R. R. S. Silva & L. Chen-Chen. Lactose-binding lectin from *Vatairea macrocarpa* seeds induces *in vivo* angiogenesis via VEGF and TNF- α expression and modulates *in vitro* doxorubicin-induced genotoxicity. *Biochimie*, 194, 55-66, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2021.12.011>
- [25] R. F. Carneiro, E. S. Aguiar, V. F. Santos, A. L. Santos, M. H. Santos, R. R. Roma & C. S. Teixeira. Elucidation of the primary structure and molecular modeling of *Parkia pendula* lectin and *in vitro* evaluation of the leishmanicidal activity. *Process Biochemistry*, 101, 1-10, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2020.11.004>

- [26] N. M. N. Alencar, R. S. B. Oliveira, J. G. Figueiredo, I. J. M. Cavalcante, M. P. V. Matos, F. Q. Cunha & M. V. Ramos. An anti-inflammatory lectin from *Luetzelburgia auriculata* seeds inhibits adhesion and rolling of leukocytes and modulates histamine and PGE2 action in acute inflammation models. *Inflammation research*, 59(4), 245-254, 2010. <https://doi.org/10.1007/s00011-009-0092-9>
- [27] J. T. Oliveira, V. M. Melo, M. F. Câmara, I. M. Vasconcelos, L. M. Beltramini, O. L. Machado & A. C. Monteiro-Moreira. Purification and physicochemical characterization of a cotyledonary lectin from *Luetzelburgia auriculata*. *Phytochemistry*, 61(3), 301-310, 2002. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(02\)00239-X](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(02)00239-X)
- [28] V. M. Melo, I. M. Vasconcelos, V. M. Gomes, M. Da Cunha, A. A. Soares & J. T. Oliveira. A cotyledonary agglutinin from *Luetzelburgia auriculata* inhibits the fungal growth of *Colletotrichum lindemuthianum*, *Fusarium solani* and *Aspergillus niger* and impairs glucose-stimulated acidification of the incubation medium by *Saccharomyces cerevisiae* cells. *Plant science*, 169(3), 629-639, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2005.05.010>
- [29] U. K. Laemmli. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970 Aug 15;227(5259):680-5. doi: 10.1038/227680a0. PMID: 5432063.
- [30] L. P. Dias, A. L. Santos, N. M. Araújo, R. R. Silva, M. H. Santos, R. R. Roma & C. S. Teixeira. *Machaerium acutifolium* lectin alters membrane structure and induces ROS production in *Candida parapsilosis*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 163, 19-25, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.06.236>
- [31] A. R. O. Sousa, F. R. N. Andrade, R. P. Chaves, B. L. de Sousa, D. B. de Lima, R. O. da Silva Souza & R. F. Carneiro. Structural characterization of a galectin isolated from the marine sponge *Chondrilla caribensis* with leishmanicidal potential. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1865(12), 129992, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2021.129992>
- [32] M. Â. Aranda-Souza, V. M. B. de Lorena, M. T. dos Santos Correia & R. C. B. Q. de Figueiredo. *In vitro* effect of *Bothrops leucurus* lectin (BLL) against *Leishmania amazonensis*

and *Leishmania braziliensis* infection. *International journal of biological macromolecules*, 120, 431-439, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.08.064>

[33] L. H. Pinto-da-Silva, M. Camurate, K. A. Costa, S. M. Oliveira, da N. L. Cunha-e-Silva & E. M. Saraiva. *Leishmania* (Viannia) *braziliensis* metacyclic promastigotes purified using *Bauhinia purpurea* lectin are complement resistant and highly infective for macrophages *in vitro* and hamsters *in vivo*. *International journal for parasitology*, 32(11), 1371–1377, 2002. [https://doi.org/10.1016/s0020-7519\(02\)00137-6](https://doi.org/10.1016/s0020-7519(02)00137-6)

[34] M. J. Reiniers, R. F. van Golen, S. Bonnet, M. Broekgaarden, T. M. van Gulik, M. R. Egmond & M. Heger. Preparation and practical applications of 2', 7'-dichlorodihydrofluorescein in redox assays. *Analytical chemistry*, 89(7), 3853-3857, 2017. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.7b00043>

[35] M. Hezel, F. Ebrahimi, M. Koch & F. Dehghani. Propidium iodide staining: a new application in fluorescence microscopy for analysis of cytoarchitecture in adult and developing rodent brain. *Micron*, 43(10), 1031-1038, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.micron.2012.04.006>

[36] A. M. de Oliveira Dos Santos, A. E. Duarte, A. R. Costa, A. A. da Silva, C. Rohde, D. G. Silva, É. M. de Amorim, M. H. da Cruz Santos, M. G. Pereira, M. Deprá, S. L. de Santana, V. L. da Silva Valente & C. S. Teixeira. *Canavalia ensiformis* lectin induced oxidative stress mediate both toxicity and genotoxicity in *Drosophila melanogaster*. *International journal of biological macromolecules*, 222(Pt B), 2823–2832, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.10.061>

[37] B. Liu, Y. Cheng, H. J. Bian & J. K. Bao. Molecular mechanisms of *Polygonatum cyrtoneuma* lectin-induced apoptosis and autophagy in cancer cells. *Autophagy*, 5(2), 253-255, 2009. <https://doi.org/10.4161/auto.5.2.7561>

[38] F. C. Carvalho, S. G. Soares, M. B. Tamarozzi, E. M. Rego & M. C. Roque-Barreira. The recognition of N-glycans by the lectin ArtinM mediates cell death of a human myeloid leukemia cell line. *PLoS One*, 6(11), e27892, 2011. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0027892>

- [39] M. Deepa, T. Sureshkumar, P. K. Satheeshkumar & S. Priya. Purified mulberry leaf lectin (MLL) induces apoptosis and cell cycle arrest in human breast cancer and colon cancer cells. *Chemico-biological interactions*, 200(1), 38-44, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2012.08.025>
- [40] L. Rabelo, N. Monteiro, R. Serquiz, P. Santos, R. Oliveira, A. Oliveira & E. Santos. A lactose-binding lectin from the marine sponge *Cinachyrella apion* (Cal) induces cell death in human cervical adenocarcinoma cells. *Marine drugs*, 10(4), 727-743., 2012. <https://doi.org/10.3390/md10040727>
- [41] L. C. B. Alencar, T. P. Chaves, J. S. Santos, F. P. Nóbrega, R. M. Araújo, V. L. Santos & A. C. D. de Medeiros. Efeito modulador do extrato de plantas medicinais do gênero *Spondias* sobre a resistência de cepas de *Staphylococcus aureus* à Eritromicina. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*, 36(1), 2015.
- [42] V. F. Santos, A. C. Araújo, P. R. Silva, A. L. Santos, B. A. M. da Rocha & C. S. Teixeira. Enhanced antibacterial activity of the gentamicin against multidrug-resistant strains when complexed with *Canavalia ensiformis* lectin. *Microbial Pathogenesis*, 152, 104639, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2020.104639>
- [43] R. R. Silva, C. R. Silva, V. F. Santos, C. R. Barbosa, D. F. Muniz, A. L. Santos & C. S. Teixeira, C. S. *Parkia platycephala* lectin enhances the antibiotic activity against multi-resistant bacterial strains and inhibits the development of *Haemonchus contortus*. *Microbial pathogenesis*, 135, 103629, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.103629>
- [44] V.J.A. Fonseca, A.L. Braga, R.S. de Almeida *et al.* Lectins ConA and ConM extracted from *Canavalia ensiformis* (L.) DC and *Canavalia rosea* (Sw.) DC inhibit planktonic *Candida albicans* and *Candida tropicalis*. *Arch Microbiol* **204**, 346 (2022). <https://doi.org/10.1007/s00203-022-02959-x>
- [45] J. Berman. Recent Developments in Leishmaniasis: Epidemiology, Diagnosis, and Treatment. *Current infectious disease reports*, 7(1), 33–38, 2005. <https://doi.org/10.1007/s11908-005-0021-1>

[46] T. S. Tiunan, A. O. Santos, T. Ueda-Nakamura, B. P. Dias Filho & C. V. Nakamura. Recent advances in leishmaniasis treatment. *International Journal of Infectious Diseases*, 15(8), e525-e532, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2011.03.021>

5. CONCLUSÃO

O presente estudo demonstrou o efeito anti-promastigota *in vitro* da lectina extraída das sementes de *Luetzelburgia auriculata*. A LAA inibiu o crescimento de formas promastigotas de *Leishmania major*, atividade que está relacionada ao seu DRC podendo haver interações entre a lectina e glicoconjugados presentes na membrana dos parasitas. A ação anti-promastigota da lectina pode estar relacionada a indução de estresse oxidativo, bem como alterações e perda da permeabilidade na membrana dos parasitas.

A LAA também foi capaz de modular a ação da anfotericina B em formas promastigotas onde a combinação foi mais eficiente do que a utilização da droga de forma isolada. Os resultados observados indicam, portanto, que a LAA é uma lectina promissora para o tratamento da *L. major*. Contudo, mais estudos são necessários para elucidar os prováveis mecanismos de ação tanto em células infectadas como em ensaios *in vivo* que possam elucidar os mecanismos envolvidos em um sistema biológico.

REFERÊNCIAS

- AFONSO-CARDOSO, S. R. *et al.* Effect of the *Synadenium carinatum* latex lectin (ScLL) on *Leishmania (Leishmania) amazonensis* infection in murine macrophages. **Experimental Parasitology**, [s. l.]. v. 128, p. 61-67, 2011.
- AGUIAR, P.F. ; RODRIGUES, R. K.. Leishmaniose visceral no Brasil: artigo de revisão. **Revista Unimontes Científica**, Montes Claros. v. 19, n. 1, p. 192-204, 2017.
- AKHOUNDI, M. *et al.* A historical overview of the classification, evolution, and dispersion of *Leishmania* parasites and sandflies. **PLoS neglected tropical diseases**, [s. l.]. v. 10, n. 3, p. 4349, 2016.
- AKHOUNDI, M. *et al.* *Leishmania* infections: Molecular targets and diagnosis. **Molecular aspects of medicine**, [s. l.]. v. 57, p. 1-29, 2017.
- ALEMAYEHU, B. ; ALEMAYEHU, M. Leishmaniasis: a review on parasite, vector and reservoir host. **Health Science Journal**, [s. l.]. v. 11, n. 4, p. 1, 2017.
- ALENCAR, B. F. P. ; FIGUEIREDO, I. A. Perfil epidemiológico dos casos de Leishmaniose Tegumentar Americana no estado do Maranhão no período de 2015 a 2017. **Revista de Investigação Biomédica**, São Luiz. v. 10, n. 3, p. 243-250, 2018.
- ALENCAR, N. M. N. *et al.* An anti-inflammatory lectin from *Luetzelburgia auriculata* seeds inhibits adhesion and rolling of leukocytes and modulates histamine and PGE2 action in acute inflammation models. **Inflammation research**, [s. l.]. v. 59, n. 4, p. 245-254, 2010.
- ALMEIDA, A. C. *et al.* Structural analysis of *Centrolobium tomentosum* seed lectin with inflammatory activity. **Archives of biochemistry and biophysics**, [s. l.]. v. 596, p. 73-83, 2016.
- ALMEIDA, B. H. **Potencial anti-helmíntico *in vitro* de preparação lectínica (Jacalina/ArtinM) isolada das sementes de *Artocarpus heterophyllus* LAM. sobre larvas de *Haemonchus contortus***. Monografia (Graduação em Biotecnologia) - Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA). Mossoró, 2018.
- ALMEIDA, C. P. *et al.* Leishmaniose visceral: distribuição temporal e espacial em Fortaleza, Ceará, 2007-2017. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, Brasília. v. 29, 2020.
- ALVES, Y. R. *et al.* Leishmanioses e sua importância em saúde pública. In: CONGRESSO NACIONAL DE PESQUISA MULTIDISCIPLINAR. **Anais Colóquio Estadual de Pesquisa Multidisciplinar**, Mineiros, 2019.
- ANVERSA, L. *et al.* Human leishmaniasis in Brazil: a general review. **Revista da Associação Médica Brasileira**, [s. l.]. v. 64, p. 281-289, 2018.
- ARAÚJO, T. T. ; NUNES, D. C. O. A fourteen-year retrospective of clinic-epidemiological aspects of cutaneous and visceral leishmaniasis in Uberlândia, Minas Gerais, Brazil. **Biosci. j.(Online)**, Uberlândia, p. 1054-1064, 2017.

ASSIS, R. R. *et al.* Glycoconjugates in New World species of *Leishmania*: polymorphisms in lipophosphoglycan and glycoinositolphospholipids and interaction with hosts. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects**, [s. l.]. v. 1820, n. 9, p. 1354-1365, 2012a.

ASSIS, R. R. *et al.* Glycoinositolphospholipids from *Leishmania braziliensis* and *L. infantum*: modulation of innate immune system and variations in carbohydrate structure. **PLoS neglected tropical diseases**, [s. l.]. v. 6, n. 2, p. e1543, 2012b.

ÁVILA, M. M. de. **Aspectos da fauna flebotomínea (Diptera: Psychodidae) e da infecção por *Leishmania spp.* em cães domésticos em uma área de alta incidência de Leishmaniose Tegumentar em Rio Branco, Acre.** Tese (Doutorado em Biologia Celular e Molecular) – Instituto Oswaldo Cruz. Rio Branco, 2018.

AZEVEDO, R. C. F., MARCILI, A. Alterações cutâneas secundárias à infecção por *Leishmania sp.*: revisão de literatura. **Brazilian Journal of Development**, Curitiba, v. 6, n. 4, p. 19328-19346, 2020.

BADKE, M. R. *et al.* Saber popular: uso de plantas medicinais como forma terapêutica no cuidado à saúde. **Rev. enferm. UFSM**, Santa Maria, p. 225-234, 2016.

BARBOSA, J. M. **Agglutinação de *Leishmania amazonensis* induzida por lectinas como método para purificação de promastigotas metacíclicas.** Dissertação (Mestrado Patologia) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará. Fortaleza, 2012.

BARBOSA, T. *et al.* *In vivo* lymphocyte activation and apoptosis by lectins of the *Diocleinae* subtribe. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 96, p. 673-678, 2001.

BARROSO, R. F. *et al.* Biométrie de frutos e sementes de *Luetzelburgia auriculata*, Allemão, Ducke. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, Pombal, v. 11, n. 5, p. 155-160, 2016.

BEIG, M. *et al.* Trypanothione reductase: a target protein for a combined *in vitro* and *in silico* screening approach. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, [s. l.]. v. 9, n. 6, p. e0003773, 2015.

BENEDETTI, M. S. G. ; PEZENTE, L. G. Aspectos epidemiológicos da leishmaniose visceral no extremo Norte do Brasil. **Brazilian Journal of Health Review**, Curitiba, v. 3, n. 5, p. 14203-14226, 2020.

BRASIL. **Boletim Epidemiológico Leishmaniose Tegumentar Americana.** Ceará: Ministério da Saúde, Secretaria Executiva de Vigilância e Regulação em Saúde. Fortaleza, 2020a.

BRASIL. **Boletim Epidemiológico Leishmaniose Visceral.** Ceará: Ministério da Saúde, Secretaria Executiva de Vigilância e Regulação em Saúde. Fortaleza, 2020b.

BRASIL. **Guia de Vigilância em Saúde.** Brasília: Ministério Da Saúde, 3ª edição, 2019.

BRASIL. **Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar**. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. Brasília, 2017.

BRITO, G. S. **Influência da luz da lua sobre a agregação de machos de *Nyssomya whitmani*, vetor da leishmaniose cutânea americana no Brasil**. Dissertação (Mestrado em Biodiversidade e Conservação) – Universidade Federal do Maranhão. São Luiz, 2020.

BUTENKO, A. *et al.* Comparative genomics of *Leishmania* (Mundinia). **BMC genomics**, [s. l.]. v. 20, n. 1, p. 1-12, 2019.

CABEZAS, Y. *et al.* *Leishmania* cell wall as a potent target for antiparasitic drugs. A focus on the glycoconjugates. **Organic & biomolecular chemistry**, [s. l.]. v. 13, n. 31, p. 8393-8404, 2015.

CAETANO, D. C. *et al.* Parâmetros clínicos, diagnóstico e tratamento da leishmaniose tegumentar e visceral. **ENCICLOPÉDIA BIOSFERA**, Goiânia, v. 16, n. 29, 2019.

CAETANO, D. C. D. S. *et al.* Leishmaniose Tegumentar no Estado do Mato Grosso: Características Sociodemográficas e de Saúde Associados com Reações Adversas Laboratoriais e Eletrocardiográficas. **Ensaio e Ciência C Biológicas Agrárias e da Saúde**, [s. l.]. v. 24, n. 3, p. 234-241, 2020.

CAPUCCI, D. C. *et al.* **Investigação da comunidade de flebotomíneos (Diptera, Psychodidae) em diferentes ambientes ecológicos visando o monitoramento e controle das leishmanioses**. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Fundação Oswaldo Cruz, Instituto René Rachou. Belo Horizonte, 2021.

CARNEIRO, R. F. *et al.* Elucidation of the primary structure and molecular modeling of Parkia pendula lectin and *in vitro* evaluation of the leishmanicidal activity. **Process Biochemistry**, [s. l.]. v. 101, p. 1-10, 2021.

CARVALHO, A. S. *et al.* Um novo processo para a obtenção do antimoniato de meglumina, visando a produção do medicamento genérico. **Revista Virtual de Química**, [s. l.]. v. 7, n. 2, p. 684-696, 2015a.

CARVALHO, A. S. *et al.* Purification, characterization and antibacterial potential of a lectin isolated from *Apuleia leiocarpa* seeds. **International journal of biological macromolecules**, [s. l.]. v. 75, p. 402-408, 2015b.

CARVALHO, G. M. L. *et al.* Study of phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) collected in a *Leishmania*-endemic area of the metropolitan region of Belo Horizonte, Brazil. **Journal of medical entomology**, [s. l.]. v. 47, n. 6, p. 972-976, 2014.

CARVALHO, L. P. *et al.* **Aspectos da heterogeneidade genética de *Leishmania* (*Leishmania*) major-like isoladas no Brasil**. Dissertação (Mestrado em Parasitologia) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, 2021.

CAVADA, B. S. *et al.* Comprehensive review on Caelsalpinioideae lectins: From purification to biological activities. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.]. v. 162, p. 333-348, 2020.

CAVADA, B. S. *et al.* 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 Science**, [s. l.]. v. 2, n. 2, p. 123-135, 2001.

CHAGAS, A. F. S. *et al.* *In vitro* and *in vivo* activity of a hypotoxic copper (I) complex against dermatropic *Leishmania* species. **Acta Amazonica**, [s. l.]. v. 51, p. 260-269, 2021.

CHAKRAVARTY, J.; SUNDAR, S.. Current and emerging medications for the treatment of leishmaniasis. **Expert opinion on pharmacotherapy**, [s. l.]. v. 20, n. 10, p. 1251-1265, 2019.

CLEMENTINO J. O. **Epidemiologia molecular das leishmanioses no sul de Mato Grosso do Sul**. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Grande Dourados. Dourados, 2018.

CONTI, R. V.; JÚNIOR, V. L. P. Abordagem terapêutica da leishmaniose visceral no Brasil: revisão para clínicos. Brasília, 2015.

CORDEIRO, J. C. ; DE SOUZA BRAGA, S. A importância econômica e cultural do cajueiro (*Anacardium occidentale*): símbolo de identidade nordestina. **Gastronomia e vinhos: contributos para o desenvolvimento sustentável do turismo Estudos de Caso–Brasil e Portugal**, p. 103, 2020.

CORDEIRO, L. V. **Correlação entre os parâmetros de virulência e resistência ao antimonial trivalente (SbIII) em isolados clínicos de *Leishmania (Viannia) braziliensis***. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) – Centro de Ciências Exatas e da Natureza, Universidade Federal da Paraíba. João Pessoa, 2017.

CORRIOLANO, M. C. *et al.* Antibacterial lectin from *Moringa oleifera* seeds (WSMoL) has differential action on growth, membrane permeability and protease secretory ability of Gram-positive and Gram-negative pathogens. **South African Journal of Botany**, [s. l.]., v. 129, p. 198-205, 2020.

COSTA, W. A. ; SOUZA, N. A. Sand flies: medical importance. In: **Brazilian Sand Flies**. Springer, [s. l.]. p. 1-8, 2018.

DATSON, E. M. C. *et al.* A molecularly engineered antiviral banana lectin inhibits fusion and is efficacious against influenza virus infection *in vivo*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [s. l.]. v. 117, n. 4, p. 2122-2132, 2020.

DIAS, L. P. *et al.* *Machaerium acutifolium* lectin alters membrane structure and induces ROS production in *Candida parapsilosis*. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.]. v. 163, p. 19-25, 2020.

DNDi. Boletim Informativo da Rede LEISH. Rio de Janeiro: Ministério da Saúde, Fundação Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro, 2019.

FERNANDES, H. J. **Análise da toxicidade relacionada ao uso intralesional de antimoniato de meglumina para tratamento da leishmaniose cutânea localizada.** Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) - Instituto René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz, Belo Horizonte, 2019.

FERNANDES, M. F. ; QUEIROZ, L. P. de. Vegetação e flora da Caatinga. **Ciência e cultura**, [s. l.]. v. 70, n. 4, p. 51-56, 2018.

FRADE, D. K. G. **O impacto da resistência ao antimonial trivalente na biologia e resistência à lise pelo complemento em *Leishmania (Leishmania) amazonensis*.** Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) – Centro de Ciências Exatas e da Natureza, Universidade Federal da Paraíba. João Pessoa, 2016.

FREITAS, J. C. C. de; PINHEIRO, D. C. S. N. Aspectos celulares e moleculares da resposta imunitária a *Leishmania* spp Cellular and molecular aspects of immune response to *Leishmania* spp. **Revista Portuguesa de Ciências veterinárias**, [s. l.]. v. 109, n. 55, p. 11-20, 2010.

GALVIS-OVALLOS, F. *et al.* Leishmanioses no Brasil: aspectos epidemiológicos, desafios e perspectivas. **Atualidades em Medicina Tropical no Brasil: Protozoários.** Rio Branco, Acre, 2020.

GARCIA, U. O. *et al.* **Avaliação da resposta imune e curso clínico na coinfeção experimental por *Plasmodium berghei* ANKA e *Leishmania major*.** Dissertação (Mestrado de Biologia Celular e Molecular) – Instituto Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro, 2019.

GENTIL, W. **Estudos *in vitro* da inibição da atividade da telomerase de *Leishmania major*.** Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu. Botucatu, 2018.

GRIMALDI, G. Leishmanioses tegumentares: aspectos clínicos e imunopatológicos. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz.** Rio de Janeiro, v. 77, p. 195-215, 1982.

GUIMARÃES, A. C. **Polimorfismos de lipofosfoglicanos (LPGs) de *Leishmania (Leishmania) major-like* isoladas no Brasil e seu papel na interação com *Lutzomyia longipalpis* e *Phlebotomus papatasi*.** Dissertação (Mestrado em Parasitologia) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, 2017.

HOLANDA, V. N. *et al.* Desafios e perspectivas no tratamento da leishmaniose tegumentar: revisão de literatura. **Revista Interfaces: Saúde, Humanas e Tecnologia**, [s. l.], v. 6, n. 17, p. 140-157, 2018.

IZZO R. G. **Estudo epidemiológico da leishmaniose visceral no bairro Bom Jardim, Fortaleza–Ceará: resultado das ações de bloqueio de casos humanos.** Monografia (Graduação em Medicina Veterinária) – Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal Rural do Semi-Árido. Mossoró, 2018.

KATOCH, R.; TRIPATHI, A. Research advances and prospects of legume lectins. **Journal of Biosciences**, [s. l.]. v. 46, n. 4, p. 1-30, 2021.

KAUR, G.; RAJPUT, B. Comparative analysis of the omics technologies used to study antimonial, amphotericin B, and pentamidine resistance in leishmania. **Journal of parasitology research**, [s. l.]. v. 2014, 2014.

LAGARDA-DIAZ, I. ; GUZMAN-PARTIDA, A. M. ; VAZQUEZ-MORENO, L. Legume lectins: proteins with diverse applications. **International journal of molecular sciences**, [s. l.]. v. 18, n. 6, p. 1242, 2017.

LAINSON R. ; SHAW J. J. Evolution, classification and geographical distribution. In: The Leishmaniasis in Biology and Medicine. **Biology and Epidemiology. Academic Press**. Londres, v. 1, p. 1-120, 1987.

LEMKE, A.; KIDERLEN, A. F.; KAYSER, Oliver. Amphotericin b. **Applied microbiology and biotechnology**, [s. l.]. v. 68, n. 2, p. 151-162, 2005.

LIMA, D. B. **Avaliação da atividade leishmanicida *in vitro* da lectina de *Vatairea macrocarpa* (Benth.) Ducke**. Dissertação (Mestrado Bioquímica e Biologia Molecular) - Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Cariri. Barbalha, 2021.

LINDOSO, J. A. L. Diversidade clínica e tratamento da leishmaniose visceral. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**. São Paulo, v. 77, p. 1-8, 2018.

LONDONO, P. A. C. **Investigação de genes potencialmente implicados no controle de virulência em *Leishmania major***. Dissertação (Mestrado em Ciências: Biologia Celular e Molecular) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto, 2015.

LOPES, M. F. Q. **Fatores abióticos na fisiologia de sementes e madras de *Luetzelburgia auriculata* (Allemão) Ducke**. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal da Paraíba. Areia, 2018.

MACIEL, L. O. **Avaliação das mudanças morfológicas e perfis fosfolipídicos de formas de *Leishmania (Leishmania) amazonensis* induzidas por variações de pH e temperatura nas condições de cultivo**. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo. São Paulo, 2021.

MAIA, G. N. **Caatinga: árvores e arbustos e suas utilidades**. 1.ed. São Paulo: Editora Leitura & Arte, 2004.

MARQUES, L. G. A. *et al.* O impacto da bioprospecção para o descobrimento de novas moléculas terapêuticas. **Revista Fitos**. Rio de Janeiro, v. 2, p. 293-314, 2022.

MARTINS, T. F. **Purificação e caracterização bioquímica de um inibidor tipo Bowman-Birk de sementes *Luetzelburgia auriculata* (Allemão) Ducke**. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Centro de Ciências, Universidade Federal do Ceará. Fortaleza, 2015.

MCCONVILLE, M. J. *et al.* Lipophosphoglycan of *Leishmania major* that vaccinates against cutaneous leishmaniasis contains an alkylglycerophosphoinositol lipid anchor. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. [s. l.]. v. 84, n. 24, p. 8941-8945, 1987.

MELO, V. *et al.* A cotyledonary agglutinin from *Luetzelburgia auriculata* inhibits the fungal growth of *Colletotrichum lindemuthianum*, *Fusarium solani* and *Aspergillus niger* and impairs glucose-stimulated acidification of the incubation medium by *Saccharomyces cerevisiae* cells. **Plant Science**. [s. l.]. v. 169, n. 3, p. 629-639, 2005.

NOGUEIRA, F. C. B. *et al.* Efeito da temperatura e luz na germinação de sementes de *Luetzelburgia auriculata* (Alemão) Ducke-Fabaceae. **Acta Botanica Brasilica**. [s. l.]. v. 26, n. 4, p. 772-778, 2012.

OLIVEIRA, A. B. *et al.* Plant-derived antimalarial agents: new leads and efficient phythomedicines. Part I. Alkaloids. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**. [s. l.]. v. 81, n. 4, p. 715-740, 2009.

OLIVEIRA, D. K. F. *et al.* Aspectos imunológicos das leishmanioses dermatrópicas e viscerotrópicas. **Revista Unimontes Científica**. Montes Claros, v. 23, n. 2, p. 1-14, 2021.

OLIVEIRA, J. T. *et al.* Purification and physicochemical characterization of a cotyledonary lectin from *Luetzelburgia auriculata*. **Phytochemistry**. [s. l.]. v. 61, n. 3, p. 301-310, 2002.

OMS. Mapa de Evidências: Leishmaniose Visceral. Mapa de Evidencias: Leishmaniasis Visceral. Evidence Map: Visceral Leishmaniasis, [s. l.]. 2022.

OPAS. Organización Panamericana de la Salud. Leishmaniasis: informe epidemiológico de las Américas. Informe de Leishmaniasis, [s. l.]. 2019.

OYAMA, J. *et al.* American tegumentary leishmaniasis: diagnostic and treatment challenges in a clinical case. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**. São Paulo, v. 60, 2018.

PALHARINI, J. G. *et al.* Eutirucallin: a lectin with antitumor and antimicrobial properties. **Frontiers in cellular and infection microbiology**. [s. l.]. v. 7, p. 136, 2017.

PANUNTO-CASTELO, A. *et al.* 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**. [s. l.]. v. 11, n. 12, p. 1035-1042, 2001.

PERDOMO, S. P. K. **Caracterização funcional da proteína LRR17 em *Leishmania (Leishmania) major***. (Mestrado em Ciências) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de São Paulo. São Paulo, 2010.

PEUMANS, W. J.; VAN DAMME, E. J. Lectins as plant defense proteins. **Plant physiology**. [s. l.]. v. 109, n. 2, p. 347, 1995.

PIMENTA, P. F. P. ; FREITAS, V. C.; SECUNDINO, N. F. G. A Interação do Protozoário *Leishmania* com seus Insetos Vetores. **Tópicos avançados em Entomol. Mol. Cap. [s. I.]**. v. 12, p. 1-45, 2012.

POVINELI, K. L. ; FINARDI FILHO, F. As múltiplas funções das lectinas vegetais. **Nutrire Rev. Soc. Bras. Aliment. Nutr.** São Paulo, p. 135-156, 2002.

REYES-MONTAÑO, E. A. ; VEGA-CASTRO, N. A. Plant lectins with insecticidal and insectistatic activities. **Insecticides-Agriculture and Toxicology; IntechOpen: London, UK**. Londres, p. 17-42, 2018.

RIBEIRO, J. B. P. *et al.* Study of the efficacy of N-methyl glucamine antimoniate (SbV) associated with photodynamic therapy using liposomal chloroaluminium phthalocyanine in the treatment of cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania (L.) amazonensis* in C57BL6 mice. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy. [s. I.]**. v. 26, p. 261-269, 2019.

ROCHA, M. N. **Desenvolvimento de espécies de *Leishmania* fluorescentes e caracterização da susceptibilidade de *L. amazonensis* GFP como modelo para testes quimioterápicos**. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Instituto René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz. Belo Horizonte, 2009.

SANTOS, D. D. M. **Avaliação do efeito inseticida de *Momordica charantia* L.(Cucurbitaceae) sobre *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae), vetor da leishmaniose visceral no Brasil**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri. Diamantina, 2018.

SANTOS, F. H. **Obtenção e caracterização de *Leishmania infantum* deficiente para o gene LPG2**. Dissertação (Mestrado em Patologia Humana) - Faculdade de Medicina, Universidade Federal da Bahia. Salvador, 2019.

SANTOS, J. A. S. **Revisão bibliográfica da ação inseticidas de lectinas**. Monografia (Graduação em Química) -Instituto de Química e Biotecnologia, Universidade Federal de Alagoas. Maceió, 2018.

SANTOS, R. P. *et al.* **Estudo da fauna febotomínica (diptera, psychodidae, phlebotominae) em ambientes, silvestre e de grande ação antrópica da orla marítima dos estados de São Paulo e Rio de Janeiro, Brasil**. Monografia (Especialização em Etnomologia Médica) – Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ. Rio de Janeiro, 2014.

SHIRZADI, M. R. Liposomal amphotericin B: a review of its properties, function, and use for treatment of cutaneous leishmaniasis. **Research and reports in tropical medicine. [s. I.]**. v. 10, p. 11, 2019.

SILVA, D. D. *et al.* Características morfológicas de frutos, sementes e plântulas de *Luetzelburgia auriculata* (Allemão) Ducke–Fabaceae. **Research, Society and Development. [s. I.]**. v. 9, n. 8, p. e545986133-e545986133, 2020.

SILVA, J. R. **Avaliação do controle da infecção por *Leishmania braziliensis* in vitro e in vivo pelos Carreadores Lipídicos Nanoestruturados com Anfotericina B (CLN-ANB)**.

Dissertação (Mestrado em Patologia) – Universidade Federal da Bahia. Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Gonçalo Moniz, Salvador, 2018.

SILVA, L. A. C. **Bioprospecção de *Anacardium occidentale* como produto anti-leishmania e cicatrizante.** Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Rede Nordeste de Biotecnologia (RENORBIO). São Luiz, 2016.

SILVA, R. R. da, *et al.* Leishmaniose visceral em cães no Brasil: revisão de literatura. **Science And Animal Health.** [s. l.]. v. 9, n. 1, p. 54-75, 2021.

SILVEIRA, K. R. C. **Efeito da hibridização na expressão de lipofosfoglicanos em *Leishmania major*.** Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz. Belo Horizonte, 2021.

SIMÕES, R. C. **Caracterização de lectinas de leguminosas por espectrometria de massa.** Tese (Mestrado em Bioquímica) – Universidade Federal do Ceará, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular. Fortaleza, 2011.

SINGH, R. S. ; WALIA, A. K. ; KENNEDY, J. F. Structural aspects and biomedical applications of microfungus lectins. **International journal of biological macromolecules.** [s. l.]. v. 134, p. 1097-1107, 2019.

SOARES, E. L. *et al.* Characterization and insecticidal properties of globulins and albumins from *Luetzelburgia auriculata* (Allemao) Ducke seeds towards *Callosobruchus maculatus* (F.) (Coleoptera: Bruchidae). **Journal of Stored Products Research.** [s. l.]. v. 43, n. 4, p. 459-467, 2007.

SOUZA, A. R. O. *et al.* Structural characterization of a galectin isolated from the marine sponge *Chondrilla caribensis* with leishmanicidal potential. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects.** [s. l.]. v. 1865, n. 12, p. 129992, 2021.

SOUZA, A. V. V. de *et al.* Bioprospecção de plantas da Caatinga com potencial para produção de fitomedicamentos. **Revista Fitos.** Rio de Janeiro, v. 2, p. 212-226, 2022.

SOUZA, C. S. A. **Análise temporal, espacial e fatores associados à mortalidade por leishmaniose tegumentar no Brasil.** Dissertação (Mestrado em Saúde Coletiva) – Fundação Oswaldo Cruz, Instituto René Rachou. Belo Horizonte, 2018.

SUBERVIOLA, B. Seguridad clínica de la anfotericina B liposomal. **Revista Iberoamericana de Micología.** [s. l.]. v. 38, n. 2, p. 56-60, 2021.

SUNDAR, S. ; AGARWAL, D. Visceral leishmaniasis–Optimum treatment options in children. **The Pediatric infectious disease journal.** [s. l.]. v. 37, n. 5, p. 492, 2018.

TANURE, A. *et al.* Identification of sandflies (*Diptera: Psychodidae: Phlebotominae*) blood meals in an endemic leishmaniasis area in Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo.** São Paulo, v. 57, p. 321-324, 2015.

THOMAZELLI, A. P. F. S. *et al.* *Concanavalin-A* displays leishmanicidal activity by inducing ROS production in human peripheral blood mononuclear cells. **Immunopharmacology and Immunotoxicology**. [s. l.]. v. 40, n. 5, p. 387-392, 2018.

TIPHINE, M.; LETSCHER-BRU, V.; HERBRECHT, R. Amphotericin B and its new formulations: pharmacologic characteristics, clinical efficacy, and tolerability. **Transplant Infectious Disease**. [s. l.]. v. 1, n. 4, p. 273-283, 1999.

TIWARI, N. *et al.* Limitations of current therapeutic options, possible drug targets and scope of natural products in control of leishmaniasis. **Mini Reviews in Medicinal Chemistry**. [s. l.]. v. 18, n. 1, p. 26-41, 2018.

TOURINHO, B. D. **Tratamento da leishmaniose visceral com anfotericina B lipossomal, Minas Gerais, 2008-2012**. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2015.

TURCO, S. J. Trypanosomatid surface and secreted carbohydrates. In: **Molecular Medical Parasitology**. [s. l.]. Academic Press, p. 225-240, 2003.

TURCO, S. J.; SPÄTH, G. F.; BEVERLEY, S. M. Is lipophosphoglycan a virulence factor? A surprising diversity between *Leishmania* species. **Trends in parasitology**. [s. l.]. v. 17, n. 5, p. 223-226, 2001.

VALENTE, M. *et al.* Overview of the role of kinetoplastid surface carbohydrates in infection and host cell invasion: Prospects for therapeutic intervention. **Parasitology**. [s. l.]. v. 146, n. 14, p. 1743-1754, 2019.

VAN DAMME, E. J. M. *et al.* Plant lectins: a composite of several distinct families of structurally and evolutionary related proteins with diverse biological roles. **Critical Reviews in Plant Sciences**. [s. l.]. v. 17, n. 6, p. 575-692, 1998.

VAN PARIJS, J. *et al.* Hevein: an antifungal protein from rubber-tree (*Hevea brasiliensis*) latex. **Planta**. [s. l.]. v. 183, n. 2, p. 258-264, 1991.

VASCONCELOS, A. L. **Perfil anatômico fitoquímico, antimicrobiano e citotóxico de *Luetzelburgia auriculata* (allemao) Ducke**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Pernambuco. Recife, 2012.

VEASEY, J. V. *et al.* Identification of *Leishmania* species by high-resolution DNA dissociation in cases of American cutaneous leishmaniasis. **Anais Brasileiros de Dermatologia**. [s. l.]. v. 95, p. 459-468, 2020.

VIANNA, G. Tratamento da leishmaniose tegumentar por injeções intravenosas de tártaro emético. **Arq Bras Med**, [s. l.]. v. 4, p. 426-8, 1912.

VITÓRIO, J. G. *et al.* Untargeted metabolomic approach to study tunicamycin resistance in *Leishmania braziliensis*. In: Gene time conference, 2018, Belo Horizonte. Gene time conference, 2018.

VIZA JUNIOR, G. A. Plantas medicinais e leishmaniose cutânea: Uma revisão. **Revista Cereus**. [s. l.]. v. 11, n. 4, p. 84-98, 2019.

WYREPKOWSKI, C. D. C. *et al.* Aspectos farmacológicos da terapia medicamentosa utilizada para a leishmaniose cutânea: uma revisão de literatura. **Revista Eletrônica Acervo Saúde**. [s. l.]. v. 12, n. 8, p. e3352-e3352, 2020.

YAKIMOFF, W. L.; SCHOKHOR N. I. Recherches sur les maladies tropicales humaines et animals au Turkestan – II. La leishmaniose cutanée spontanée du chien au Turkestan. **Bull. Soc. Pathol. Exot.** [s. l.]. V. 7, p. 186–187, 1914.

YAU, T. *et al.* Lectins with potential for anti-cancer therapy. **Molecules**. [s. l.]. v. 20, n. 3, p. 3791-3810, 2015.

YOUNG, D. G.; DUNCAN, M. A. **Guide to the identification and geographic distribution of *Lutzomyia* sand flies in Mexico, the West Indies, Central and South America (Diptera: Psychodidae)**. Walter reed army inst of research washington DC, [s. l.], 1994.

ZAGO, M. E. P. ; MOURA, M. E. P. Vinte e dois anos de pesquisa sobre plantas medicinais: uma análise cienciométrica. **Tecnia**. [s. l.]. v. 3, n. 1, p. 157-173, 2018.