



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

MÉRCIA SINDEAUX FRUTUOSO

**EFEITO ADJUVANTE DA LECTINA DE *CANAVALIA BRASILIENSIS* NO
TRATAMENTO DA LEISHMANIOSE CUTÂNEA EXPERIMENTAL**

FORTALEZA

2017

MÉRCIA SINDEAUX FRUTUOSO

EFEITO ADJUVANTE DA LECTINA DE *CANAVALIA BRASILIENSIS* NO TRATAMENTO
DA LEISHMANIOSE CUTÂNEA EXPERIMENTAL

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Biotecnologia. Área de concentração: Biotecnologia em Recursos Naturais.

Orientador: Dr. Benildo Sousa Cavada
Co-orientação: Dra. Margarida Maria de Lima Pompeu.

FORTALEZA

2017

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

- F962e Frutuoso, Mércia Sindeaux.
Efeito adjuvante da lectina de *Canavalia brasiliensis* no tratamento da leishmaniose cutânea experimental / Mércia Sindeaux Frutuoso. – 2017.
119 f. : il. color.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia (Rede Nordeste de Biotecnologia), Fortaleza, 2017.
Orientação: Prof. Dr. Benildo Sousa Cavada.
Coorientação: Profa. Dra. Margarida Maria de Lima Pompeu.
1. Leishmaniose. 2. Lectina. 3. Fluconazol. I. Título.

CDD 660.6

MÉRCIA SINDEAUX FRUTUOSO

EFEITO ADJUVANTE DA LECTINA DE *CANAVALIA BRASILIENSIS* NO
TRATAMENTO DA LEISHMANIOSE CUTÂNEA EXPERIMENTAL

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Biotecnologia. Área de concentração: Biotecnologia em Recursos Naturais.

Aprovada em: 19/12/2016.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Benildo Sousa Cavada (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profa. Dra. Margarida Maria de Lima Pompeu (Coorientadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Anastácio de Queiroz Sousa
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Jorge Luis Almeida Correia
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profa. Dra. Kyria Santiago do Nascimento
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profa. Dra. Erika Freitas Mota
Universidade Federal do Ceará (UFC)

*"É melhor tentar e falhar,
que preocupar-se e ver a vida passar;
é melhor tentar, ainda que em vão,
que sentar-se fazendo nada até o final.
Eu prefiro na chuva caminhar,
que em dias tristes em casa me esconder.
Prefiro ser feliz, embora louco,
que em conformidade viver ..."*

Martin Luther King

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me guiado por toda a vida.

Aos meus pais que foram e são as pessoas mais importantes da minha vida, sempre presentes em todos os momentos e tudo que sou hoje veio da educação, carinho e amor deles por mim. Minha mãe, Carmem Lucia Martins Sindeaux Frutuoso, dedicou-se aos filhos sempre com muito amor e carinho, abandonando os próprios sonhos e sua carreira profissional para ver seus filhos com um futuro promissor, nos ensinou a lutar pelos sonhos, a ter caráter e principalmente nos ensinou a importância do respeito ao próximo. Meu Pai, Juarez Frutuoso da Silva, trabalhou muito e longe da família para nos proporcionar a vida que tínhamos, um amigo que sempre com o seu jeito me dava os melhores conselhos e sempre me apoiava em minhas decisões. Essas duas pessoas tão simples e honestas são um espelho pra minha vida e as pessoas que mais amo e que mais tenho que agradecer.

Ao meu orientador, Dr. Benildo Cavada, pelos seus conhecimentos a mim transmitidos, sua paciência e dedicação, sua atenção e boa vontade. Nesses últimos meses, tive a oportunidade de conhecer melhor e observar o quanto é humilde, sincero e com um coração enorme. Suas sábias palavras me ajudaram em momentos críticos. Muito obrigada!

À Dra. Margarida Maria de Lima Pompeu, que me orienta desde a iniciação científica, com muita dedicação, competência e, principalmente, amor. Uma pessoa sempre dedicada ao trabalho que se tornou o exemplo de como um bom profissional deve ser. Com seu carinho, humildade e respeito, me fez acreditar e confiar que eu seria capaz de ir até onde eu desejasse. Obrigada por ter me dado a oportunidade de aprender tudo que sei, por ter confiado tanto em mim, pelo apoio nos piores momentos da minha vida e por estar presente nos melhores momentos dela.

Ao Dr. Anastácio, que com tanta atenção, sempre me apoiou na elaboração desse projeto e de tantos outros. Ter o privilégio de conviver com um profissional de tanto

renome é perceber que a humildade é tudo, que a compaixão é necessária, que a sabedoria é um dom que deve ser compartilhado. Um ser humano brilhante que é acima de tudo ama o que faz e passa todo seu conhecimento a quem estiver disposto a aprender. Além de toda a disposição para ensinar, ainda se preocupou com minha saúde durante todos esses anos de convivência.

A todos os meus amigos e companheiros dos Laboratórios de Patologia e Parasitologia, Dra. Diana, Webberly, Pedro, Laecio, Claudênia, Naya, Vinicius, Rafael, Dani Monteiro e Juliana, que participaram ativamente na execução dos experimentos e em todas as etapas do projeto, como também, pelas boas risadas na hora do almoço no RU (risos). Em especial à Priscila Valera Guerra que realizou etapas fundamentais do projeto, juntamente com sua orientadora, no Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz. Obrigada por tudo. A participação de vocês foi fundamental.

À Érika Mota, por acreditar em mim, por me ensinar o valor e importância da pesquisa de forma crítica, sempre com muita dedicação e alguns gritinhos (risos). Esteve presente em todos os momentos da minha jornada acadêmica, sempre com maravilhosas contribuições e muita atenção. Uma grande amiga, uma maravilhosa pesquisadora e uma grande mulher que sempre irei admirar com muito carinho, amor e respeito.

À Maria Jânia Teixeira, professora e pesquisadora de altíssima capacidade, sempre dispostas a passar seus conhecimentos para todos os alunos de todos os cursos, sem distinção. Agradeço pelo apoio e ajuda no andamento desta pesquisa, foi de fundamental importância na execução de todas as etapas.

À minha filhota, Juliana Montezuma, que desde 2005 está ao meu lado. Ela que iniciou sua jornada no laboratório como minha “Alcohol applicator” (risos) e hoje é uma grande profissional e maravilhosa pesquisadora. Passamos muitas noites estudando, em alguns momentos para fazermos meus trabalhos e em outros para fazermos o dela, e com esse companheirismo foi possível vencermos as varias etapas que a vida acadêmica nos traz. Além de companheira acadêmica, é minha grande amiga do peito que numa ligação vem correndo ajudar independente do problema. Vivemos maravilhosos momentos no laboratório e fora dele, e é por isso e muito mais que não canso de falar que te amo muito!

Aos meus irmãos, Angélica Sindeaux Frutuoso e Daniel Sindeaux Frutuoso, pelo companheirismo, dedicação, carinho, amor e principalmente, por sempre estarem ao meu lado me apoiando em tudo. Nessa reta final, a presença dos dois foi crucial para a finalização desse trabalho. Amo muito vocês!!!! Obrigada!!

A todos da minha família, que sempre me deram muita força, apoio e sempre acreditando em meu potencial. Em especial à Bruna Sindeaux, Emmanuelle Coelho, Herika Sindeaux, Isadora Frutuoso, Neide Frutuoso, Rebeca Sindeaux e Vera Neiva Sindeaux, pelo companheirismo e amizade, por sempre se preocuparem comigo, e principalmente, por confiarem em mim.

Aos meus amigos, que são muitos, que me hospedaram com tanto carinho e amor. Nesse último semestre, tive a oportunidade de me aproximar de pessoas que Deus me presenteou para que eu pudesse superar obstáculos que a vida traz para nosso crescimento. Todos vocês me proporcionaram, de alguma forma, emoções intensas e incríveis. Me perdoem pelos choros e pelo incomodo, mas sei que vivemos mais momentos de muito riso e trabalho que momentos difíceis. Obrigada mesmo Ana Claudia, Carol, Darlene, Delano, Jeane, Renata, Tiago e Vitor.

À CAPES, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, pelo apoio financeiro concedido por meio da bolsa de auxílio.

Ao Centro Universitário Christus, que subsidiou a compra de reagentes que possibilitaram a execução do presente trabalho.

RESUMO

As leishmanioses constituem grande problema de saúde pública, compreendendo um amplo espectro de síndromes clínicas que pode ter manifestações diversas. Proteção e cura do hospedeiro se correlacionam com o desenvolvimento de resposta imune tipo Th1, e IFN- γ é considerada uma molécula chave nesta resposta protetora. A droga de primeira escolha para o tratamento das leishmanioses é o antimonial pentavalente, que possui vários efeitos colaterais, especialmente seu efeito cardiotoxico. Na busca de novas alternativas de tratamento, o fluconazol vem apresentando dados promissores, porém necessita de um maior tempo de tratamento ou de doses mais elevadas para apresentar uma melhor resposta. A lectina de *Canavalia brasilienses* (ConBr) tem sido descrita como potente imunomodulador, pois induz proliferação linfocitária com produção de IFN- γ . Com base nesses dados, buscou-se avaliar se ConBr potencializaria o efeito do Fluconazol no tratamento da leishmaniose cutânea experimental por *Leishmania (Viannia) braziliensis*. Para isso, camundongos BALB/c (n=40) foram infectados com *L. braziliensis* e divididos aleatoriamente, após 10 dias de infecção, em cinco grupos, com os seguintes tratamentos: 1.Fluconazol (30mg/Kg/dia/10dias, por via oral); 2.Glucantime® (60mg/Kg/dia/10dias, por via intramuscular); 3.ConBr (10 μ g/50 μ l/dia/5dias, por via intramuscular); 4.Fluconazol (30mg/Kg/dia/10dias, por via oral) associado com ConBr (10 μ g/50 μ l/dia/5dias, intramuscular); 5.solução salina por via oral. Os animais que foram tratados com a associação Fluconazol-ConBr, quando comparados com o grupo tratado com salina, apresentaram uma redução significativa da carga parasitária do linfonodo de drenagem (p=0,006), redução no tamanho da lesão (p=0,03) e maior síntese de IFN- γ no sobrenadante das culturas de células do linfonodo regional (p=0,03). Dados semelhantes foram observados no grupo tratado com Glucantime®, o que em conjunto, demonstra que a associação Fluconazol-ConBr foi capaz de induzir uma resposta terapêutica semelhante ao tratamento com Glucantime®, considerado padrão ouro.

Palavras-chaves: *Leishmania braziliensis*. *Canavalia brasilienses*. Fluconazol. Leishmaniose cutânea.

ABSTRACT

The leishmaniasis are important public health problems, comprising a very wide spectrum of clinical presentations. The host protection and cure, depend on his or her capacity to mount an immune response type Th1, and IFN- γ is a key molecule on this protective response. The drugs of first choice for the treatment are the pentavalent antimonials, which cause several side effects and the most concerning side effect is the cardiotoxic ones. On the search for alternative treatment, fluconazole has shown promising results, however it has to be given for a longer time and in higher doses to achieve a better response. The *Canavalia brasiliensis* lectin (ConBr) has been described as a potent immune modulator, as it induces lymphocytic proliferation, with the production of IFN- γ . Based on these data we studied, if ConBr would potentiate the effect of fluconazole on the treatment of experimental cutaneous leishmaniasis, caused by *L. braziliensis*. To evaluate this, BALB/c mice (n=40) were infected with *L. braziliensis* and were divided randomly 10 days post-infection, in 5 groups, with the following treatments: 1- fluconazole (30mg/Kg/day/10days, per os); 2- Glucantime® (60mg/Kg/day/10days, intramuscular); 3- ConBr (10 μ g/50 μ l/day/5days, intramuscular); 4- Fluconazole (30mg/Kg/day/10days, per os) plus ConBr (10 μ g/50 μ l/day/5days, intramuscular); 5- Saline solution per os. Animals that were treated with the association of fluconazole and ConBr, when compared with those treated with saline solution, presented a significant reduction on the parasite load on the draining lymph nodes (p=0,006), reduction in lesion size (p=0,03) and higher production of IFN- γ on the supernatant of cell culture of regional lymph nodes (p=0,03). Similar data were observed on the group treated with Glucantime®, and all together, demonstrate that the association of fluconazole and ConBr was capable of inducing a therapeutic response similar to the one seen in the group treated with Glucantime®, which is considered the gold standard in the treatment for leishmaniasis.

Key words: *Leishmania braziliensis*. *Canavalia brasiliensis*. Fluconazole. Cutaneous leishmaniasis.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 -	Status epidemiológico de leishmaniose cutânea no mundo - World Health Organization 2013	19
FIGURA 2 -	Novos casos de Leishmaniose Tegumentar Americana no Brasil – 1990 a 2014 ...	20
FIGURA 3 -	Desenho experimental do estudo elaborado pela autora.....	49
FIGURA 4 -	Avaliação da evolução do tamanho das lesões de camundongos BALB/c infectados experimentalmente com <i>L. braziliensis</i> e tratados com Fluconazol associado à ConBr	51
FIGURA 5 -	Avaliação da lesão no final do experimento, no 18º dia pós-infecção.	52
FIGURA 6 -	Avaliação da carga parasitária do linfonodo de drenagem	53
FIGURA 7 -	Produção de IFN- γ por células mononucleadas de linfonodo de camundongos BALB/c infectados com <i>L. braziliensis</i> tratados com a associação de Fluconazol e Lectina de <i>Canavalia brasiliensis</i>	55
FIGURA 8 -	Produção de TGF- β (A) e IL-10 (B) por células mononucleadas de linfonodo de camundongos BALB/c infectados com <i>L. braziliensis</i> tratados com a associação de Fluconazol e Lectina de <i>Canavalia brasiliensis</i>	56
FIGURA 9 -	Avaliação da intensidade do infiltrado inflamatório nas lesões das patas de camundongos BALB/c infectados experimentalmente com <i>L. braziliensis</i> e tratados com Fluconazol associado à ConBr	58
FIGURA 10 -	Avaliação da intensidade de amastigotas de <i>L. braziliensis</i> (A e B) e de granulomas (C e D) nas lesões das patas de camundongos BALB/c infectados experimentalmente com <i>L. braziliensis</i> e tratados com Fluconazol associado à ConBr	60
FIGURA 11 -	Avaliação do peso relativo do fígado (A) e baço (B)	61

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 -	Achados histopatológicos das lesões das patas de camundongos BALB/c infectados experimentalmente com <i>L. braziliensis</i> e tratados com Fluconazol associado à ConBr	59
------------	---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANB-L - Anfotericina B liposomal

APC - Célula apresentadora de antígeno

C3b - Fragmento b da proteína C3 do sistema complemento

CD – Grupo de diferenciação (*Cluster Of Differentiation*)

CMSP - Células Mononucleares do Sangue Periférico

ConBr - Lectina de *Canavalia brasiliensis*

CR1 - Receptor de complemento tipo 1

GM-CSF - Fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos

IDRM - intradermoreação de Montenegro

IFN- γ - Interferon- γ

Ig - Imunoglobulina

IL - Interleucina

IMC - Imunidade Mediada por Células

L. amazonensis – *Leishmania (Leishmania) amazonensis*

L. braziliensis – *Leishmania (Viannia) braziliensis*

LCD - Leishmaniose Cutânea Difusa

LCL - Leishmaniose Cutânea Localizada

LD - Leishmaniose Disseminada

LM - Leishmaniose Mucosa

LPG - lipofosfoglicano

LT - Leishmaniose Tegumentar

LTA - Leishmaniose Tegumentar Americana

LV - Leishmaniose Visceral

Mac - Complexo de ataque á membrana

MHC - Complexo de histocompatibilidade principal

NK – Células exterminadoras naturais (*Natural killer cell*)

NO – óxido nítrico

PCR- Reação em cadeia de polimerase (*polymerase chain reaction*)

RIFI - imunofluorescência indireta

TGF- β - Fator de crescimento e transformação β

Th – T *helper*

VCAM – *Vascular cell adhesion protein*

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	15
2.	REFERENCIAL TEORICO	19
2.1	Leishmaniose	19
2.2	Resposta imunológica	24
2.2.1	<i>Resposta imunológica inata</i>	24
2.2.2	<i>Resposta imunológica adquirida</i>	26
2.2.3	<i>A resposta imunológica à Leishmania</i>	28
2.2.4	<i>Interferência na fagocitose</i>	31
2.2.5	<i>Interferência nas funções dos macrófagos</i>	31
2.3	Tratamento da leishmaniose	33
2.4	Lectinas	37
2.4.1	<i>Canavalia brasiliensis</i>	39
3.	JUSTIFICATIVA	41
4.	HIPÓTESE	43
5.	OBJETIVOS	44
5.1	Geral	44
5.2	Específicos	44
6.	MATERIAIS E MÉTODOS	45
6.1	Local de execução da pesquisa	45
6.2	Animais de experimentação	45
6.3	Lectina	45
6.4	Parasito	46
6.5	Infecção experimental e Tratamento	46
6.6	Determinação da carga parasitária	47
6.7	Análise histopatológica	48
6.8	Cultura de células do linfonodo de drenagem e quantificação de citocinas	48
6.9	Desenho experimental do estudo	49
6.10	Análise estatística	49
7.	RESULTADOS	50

7.1	Avaliação do tratamento do Fluconazol associado à lectina ConBr no tamanho das lesões e alterações histopatológicas da infecção experimental com <i>L. braziliensis</i>	50
7.2	Avaliação da carga parasitária no linfonodo de drenagem da lesão em BALB/c infectados com <i>L. braziliensis</i> e tratados com a associação de Fluconazol e lectina de <i>Canavalia brasiliensis</i>	53
7.3	Determinação da concentração de citocinas em BALB/c infectados com <i>L. braziliensis</i> e tratados com a associação de Fluconazol e lectina de <i>Canavalia brasiliensis</i>	54
7.4	Análise histopatológica das patas de BALB/c infectados com <i>L. braziliensis</i> e tratados com a associação de Fluconazol e lectina de <i>Canavalia brasiliensis</i>....	57
7.5	Avaliação do fígado e baço de BALB/c, após o tratamento da infecção experimental com a associação de Fluconazol e lectina de <i>Canavalia brasiliensis</i>	61
8.	DISCUSSÃO	62
9.	CONCLUSÃO	70
	REFERÊNCIAS	71
	ANEXO A - Infection in Blood Donors, Northeastern Brazil. Emerging Infectious Diseases	97
	ANEXO B - In Response	99
	ANEXO C - A Lectin from Interacts with Midgut Surface of, Unlike Its Homologues, Lectin and Lectin.....	100
	ANEXO D - A Rapid, Simple, and Cheap Method for the Diagnosis of Cutaneous Leishmaniasis Caused by <i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i>	107
	ANEXO E - Adjuvant activity of peanut, cottonseed and rice oils on cellular and humoral response	110
	ANEXO F - Reply to Drs. Torres and Suarez	116