



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA E MEDICINA LEGAL
MESTRADO EM PATOLOGIA**

JULIANA MONTEZUMA BARBOSA

**AGLUTINAÇÃO DE *LEISHMANIA AMAZONENSIS* INDUZIDA
POR LECTINAS COMO MÉTODO PARA PURIFICAÇÃO DE
PROMASTIGOTAS METACÍCLICAS**

FORTALEZA

2012

JULIANA MONTEZUMA BARBOSA

**AGLUTINAÇÃO DE *LEISHMANIA AMAZONENSIS* INDUZIDA
POR LECTINAS COMO MÉTODO PARA PURIFICAÇÃO DE
PROMASTIGOTAS METACÍCLICAS**

Dissertação submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Patologia da Universidade Federal do Ceará como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Patologia.

Área de concentração: Patologia Tropical

Orientadora: Profa. Dra. Margarida Maria de Lima Pompeu

FORTALEZA

2012

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca de Ciências da Saúde

B195a Barbosa, Juliana Montezuma.

Aglutinação de *Leishmania amazonensis* induzida por lectinas como método para purificação de promastigotas metacíclicas / Juliana Montezuma Barbosa. – 2012.

82 f. : il. color., enc. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Patologia, Fortaleza, 2012.

Área de Concentração: Patologia Tropical.

Orientação: Profa. Dra. Margarida Maria de Lima Pompeu.

1. Lectinas. 2. Aglutinação. 3. *Leishmania* . I. Título.

CDD 617.07

JULIANA MONTEZUMA BARBOSA

AGLUTINAÇÃO DE *LEISHMANIA AMAZONENSIS* INDUZIDA POR LECTINAS COMO
MÉTODO PARA PURIFICAÇÃO DE PROMASTIGOTAS METACÍCLICAS

Dissertação submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em
Patologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a
obtenção do grau de Mestre em Patologia.

Aprovada em ___/___/_____

BANCA EXAMINADORA

Prof^a Dr^a Margarida Maria de Lima Pompeu (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará – UFC

Prof. Dr. Vassiliepe Sousa Arruda
Universidade Federal do Ceará – UFC

Prof^a. Dr^a. Erika Freitas Mota
Universidade Federal do Ceará – UFC

Prof^a. Dr^a. Maria do Livramento Leitão Vilar
Faculdade Christus

Prof^a. Dr^a. Maria Jania Teixeira (Suplente)
Universidade Federal do Ceará – UFC

Ao meu amado avô, Luiz Gonzaga Barbosa,
(*in memoriam*), grande exemplo de fé e superação

AGRADECIMENTOS

A Deus, minha fortaleza e refúgio, por guiar meus passos e ter me concedido saúde e disposição para concretização de mais uma etapa tão importante em minha vida.

Aos meus pais, Alberto e Heloíse Barbosa, meus irmãos, Alberto Filho e Célia Barbosa e familiares que continuamente contribuíram com seu apoio e torcida. Em especial aos meus tios Abelardo e Dina de Sá e Fernando e Célia Rocha pela atenção e recursos disponibilizados durante toda a minha vida escolar e acadêmica.

Ao meu namorado lindo, Jean Monteiro, por sua paciência e estímulo constantes, por sua doce companhia, essencial a mim.

Ao Programa de Pós-Graduação em Patologia, pela rica oportunidade.

À CAPES pelo auxílio financeiro. Ao REUNI pela oportunidade de realização de tantas atividades extra-curriculares. Ao final de tudo posso realmente dizer que valeu a pena.

Aos professores do Mestrado em Patologia, pela dedicação, paciência e, sobretudo, pelo companheirismo entre si que nos proporcionou um ambiente agradável para realizarmos nossas pesquisas.

À coordenação do mestrado, na pessoa da Dra. Margarida Pompeu, por sua dedicação e empenho em melhorar cada vez mais a qualidade do Mestrado e, atualmente, ao Dr. Max Victor Carioca, por dar continuidade a esse projeto. À Paula Palácio, por estar sempre disposta a solucionar as nossas dificuldades e burocracias.

À Dra. Cristina Chaves, chefe do Setor de Parasitologia, por sua preocupação com o ensino, buscando sempre trazer conhecimento atual e inovador. Por seu senso crítico e sua inestimável ajuda que contribuíram para a lapidação desse trabalho.

À Dra. Jânia Teixeira e à Dra. Zirlane Castelo Branco por estarem sempre presentes e dispostas a passarem seus conhecimentos, por colocarem ordem nos alunos e, ao mesmo tempo, nos fazerem rir, por serem referência como profissionais e como pessoas.

Aos demais professores do Setor de Parasitologia, pelos anos de convivência e de produção de conhecimento: Prof^o. Vladimir Michailowsky, Prof^o Ivo Castelo Branco, Prof^a Kelma Bastos, Prof^a Danielle Malta, Prof^o Josias Vale por fazerem parte dessa história de uma maneira igualmente especial.

À minha orientadora querida e preferida, Dra. Margarida Pompeu, pelos sete anos de valiosa convivência e orientação, pela confiança dispensada. Muito do que aprendi não se encontra em livros ou artigos. Pessoa doce, de alma nobre, mui amada e admirada. Estar ao seu lado seguramente foi determinante para que eu encontrasse motivação para galgar cada degrau.

À minha inestimável amiga Mércia Frutuoso, minha “mãe” por adoção, “irmã” por opção. Por ser presente, por me acolher em sua casa aos finais de semana e feriados para me co-orientar nos momentos mais importantes e decisivos.

Às minhas filhotas, Raissa Matos e Claudênia Praciano. Por todas as tardes divertidas e proveitosas que passamos produzindo ciência (e outras coisas mais). Por serem alunas dedicadas e comprometidas, cada uma à sua maneira, contribuíram imensamente em todas as etapas dos meus inúmeros experimentos.

Ao Augusto César Oliveira (Guto), por estar sempre por perto durante toda a caminhada da graduação ao mestrado.

À professora Erika Mota, por tanto me ensinar com seu rigor e disciplina nos primeiros anos da Iniciação Científica, e por sua contínua contribuição em minha caminhada.

Ao Dr. Anastácio Queiroz, por me manter sempre ocupada em outros projetos, por me permitir usufruir de seus conhecimentos.

Ao Dr. Benildo Cavada, por nos ceder, quantas vezes fossem necessárias, as lectinas, instrumento fundamental para realização desse trabalho e por sempre estar acessível para orientação.

Ao professor Rondinelle Ribeiro, por sua valiosa contribuição com a análise estatística.

À Débora, pela amizade e ajuda nos cortes histológicos do meu material.

Aos meus amigos do mestrado, Laiane Melo, Webertty Figueiredo, Allan Rodrigo Maia, Márcia Lima Verde, Vitória Sóllon, Fernando Henrique Azevedo, Carlivânia Costa, Paulo Florentino, Nelson Nóbrega, Ana Lúcia Hanemann, Almira Monteiro, Anaiara Lucena, Daniela Monteiro (amiga querida), Mônica Andrade, Anthunes Ambrósio, Cláudio Castro, Glayriann Belarmino, Sayonara Melo, Dyana Alves, pelos bons momentos de convivência e de troca de experiências.

Aos amigos Laboratório de Parasitologia e de Patologia, em especial à Lucineide e ao seu Mário pelo cuidado com meus “bebês” no biotério. Ao Alísio, por ser sempre solícito nas leituras de lâminas. Aos ICs, mestrandos e doutorandos que, de uma forma ou de outra, contribuíram para a realização desse trabalho.

Enfim, a todos, minha enorme gratidão!

O pessimista se queixa dos ventos,
o otimista espera que ele mude,
o realista ajusta as velas.

(William George Ward)

RESUMO

Nas infecções experimentais, estudos utilizando inóculo purificado de *Leishmania*, com populações metacíclicas mais homogêneas, tem sido importantes por se aproximarem mais da condição de infecção natural e por eliminar uma possível resposta inflamatória induzida por restos parasitários. A superfície dos vários parasitos reveste-se por diversos glicoconjugados. Estes, por sua vez, podem ser reconhecidos especifica e reversivelmente por lectinas, proteínas que possuem afinidade a carboidratos. Por conta disso, tem-se tentado purificar promastigotas metacíclicas de culturas de *Leishmania* através de aglutinação mediada por lectinas. Com esse intuito, buscou-se avaliar se lectinas de diferentes especificidades seriam capazes de aglutinar promastigotas de *L. amazonensis* em diferentes estágios evolutivos. Para isso, foi utilizado um painel de 7 lectinas, e a especificidade de ligação aos carboidratos de superfície foi analisada através de ensaios de aglutinação, sendo a lectina de *Dioclea violacea* (DVL) selecionada para a realização dos ensaios in vivo. A DVL foi capaz de aglutinar *L. amazonensis* num percentual de 78% em cultura de fase logarítmica e 52% em fase estacionária. Em seguida, promastigotas de fase estacionária foram incubadas com DVL para avaliar se a aglutinação era estágio-específica. Posteriormente, realizou-se infecção experimental em hamsters dourados (10^6 promastigotas/animal) para avaliar a infectividade das frações purificadas. Os animais foram divididos em 3 grupos: Fração aglutinada (FA) (n=8); Fração não aglutinada (FNA) (n=9); Controle positivo (CT) (n=8). A evolução da infecção foi acompanhada pelo tamanho da lesão, nas 6 semanas pós-infecção e pela quantificação da carga parasitária no linfonodo regional, por diluição limitante, bem como pela análise anatomopatológica das lesões. Em todos os grupos as lesões iniciaram na 3ª semana. O tamanho da lesão foi muito semelhante em todos os grupos, com exceção da 4ª e 5ª semanas, onde FNA apresentou uma variação transitória ($p<0,01$). Quanto à carga parasitária e às alterações histopatológicas não houve diferença entre os grupos avaliados. Esses dados sugerem que, embora a DVL seja capaz de se ligar especificamente aos glicoconjugados de superfície das promastigotas, induzindo importante poder de aglutinação nas duas fases de crescimento, ela não foi capaz de selecionar formas infectantes de *L. amazonensis*.

Palavras-chave: 1. Lectinas; 2. Aglutinação; 3. *Leishmania*.

ABSTRACT

In experimental leishmaniasis infections, the use of metacyclic enriched inoculum is very important because it can simulate the natural infection and avoids the inflammatory response induced by the high density parasite inoculum. The surface of different evolutionary forms of *Leishmania* is coated by several glycoconjugates that can be recognized specifically and reversibly by lectins, proteins that have affinity with carbohydrates. This being the case, one could use lectins in order to purify metacyclic *Leishmania*. The aim of the current study was to evaluate whether lectins of different specificities would agglutinate *L. amazonensis* promastigotes of different evolutionary forms. A panel of 7 lectins were used. The binding specificity was analyzed by agglutination tests. DVL agglutinated 78% of *L. amazonensis* promastigotes from logarithmic phase culture and 52% from stationary phase, and therefore was selected for *in vivo* tests. Stationary phase promastigotes were incubated with DVL to evaluate if the agglutination was stage-specific and it was purified the agglutinated and non agglutinated fractions. Golden hamsters were infected with 10^6 promastigotes and grouped as: Agglutinated fraction (FA) (n=8); Non agglutinated fraction (FNA) (n=9); Control (CT) (n=8). The lesion size was measured over the course of 6 weeks. The parasite load of regional lymph node was quantified by limiting dilution and histopathological analysis of the lesions were performed on their paws. The lesions began at the third week in all groups. The lesion's size was similar in all of them, except at the fourth and fifth weeks that FNA presented a transitory reduction ($p<0,01$). There were no significant differences concerning the parasite load and histopathologic changes among the groups. These data suggest that DVL did not select effectively infective forms of *L. amazonensis*, although it agglutinates promastigotes from the two culture growth phases.

Key-words: 1. Lectins; 2. Agglutination; 3. *Leishmania*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1.** Estrutura do LPG e polimorfismo entre espécies de *Leishmania* do Velho Mundo. (Fonte: RYAN *et al.*, 1993)..... 25
- Figura 2.** Representação esquemática da mudança na superfície de LPG durante a metaciclologênese em *L. donovani* (a, b) e *L. major* (c, d) (Fonte: SACKS *et al.*, 1995)..... 26
- Gráfico 1.** Perfil de aglutinação de *L. amazonensis* com lectinas específicas para D-galactose em fase logarítmica (preto) e estacionária (hachurado). AIL (*Artocarpus integrifolia*), VML (*Vatairea macrocarpa*), EVL (*Erythrina velutina*), EFL (*Erythrina fusca*). Valores são mostrados como percentagens de promastigotas aglutinadas na melhor concentração de cada lectina na fase logarítmica.....45
- Gráfico 2.** Perfil de aglutinação de *L. amazonensis* com lectinas específicas para D-glicose/D-manose em fase logarítmica (preto) e estacionária (hachurado). DVL (*Dioclea violacea*), CFL (*Cratylia floribunda*), ConBr (*Canavalia brasiliensis*). Valores são mostrados como percentagens de promastigotas aglutinadas na melhor concentração de cada lectina na fase logarítmica.....45
- Gráfico 3.** Perfil de aglutinação de promastigotas de *Leishmania amazonensis* em fase estacionária por lectinas não inibidas e inibidas com açúcar. Valores são mostrados como percentagens de promastigotas aglutinadas na melhor concentração das lectinas.....46
- Gráfico 4.** Desenvolvimento de lesão de hamsters infectados com *Leishmania amazonensis* após inoculação de 10^6 promastigotas em pata posterior esquerda. Valores representam a média do delta (diferença entre pata infectada e sadia) \pm SEM de 8 ou 9 hamsters por grupo. CT= Controle positivo, FA= Fração Aglutinada, FNA= Fração Não Aglutinada por *Dioclea violacea*. * $p < 0,05$ entre CT e FNA, FA e FNA..... 48
- Gráfico 5.** Carga parasitária em linfonodo de drenagem de hamsters 9 semanas após inoculação de 10^6 promastigotas de *Leishmania amazonensis*. Os valores representam mediana de 7 a 8 animais/grupo obtidos de 1 dos 4 experimentos realizados. CT= Controle positivo, FA= Fração Aglutinada, FNA= Fração Não Aglutinada por *Dioclea violacea*.....49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Percentual de aglutinação de promastigotas de *L. amazonensis*, em diferentes fases do crescimento, induzido por lectinas específicas para D-galactose ou D-glicose/D-manose, em várias concentrações. Dados representativos de 3 ensaios realizados..... 43

Tabela 2. Percentual de aglutinação de promastigotas de *L. amazonensis*, em diferentes fases do crescimento, induzido por lectinas específicas para D-galactose ou D-glicose/D-manose, na concentração que induziu maior aglutinação na fase logarítmica..... 44

Tabela 3. Avaliação dos critérios histopatológicos. Cada parâmetro foi avaliado segundo presença ou ausência do evento através de escores: 0 (ausência), 1 (presença de 1-25%), 2 (presença de 26-50%), 3 (>50%) Os valores representam mediana de 7 ou 8 animais/grupo. CT= Controle positivo, FA= Fração Aglutinada, FNA= Fração Não Aglutinada por *Dioclea violacea*. MØ vac= macrófago vacuolizado, MØ não vac= macrófago não vacuolizado..... 50

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
1.1. EPIDEMIOLOGIA DAS LEISHMANIOSES	17
1.2. AGENTE ETIOLÓGICO	18
1.3. HOSPEDEIROS.....	19
1.4. COMPETÊNCIA VETORIAL	20
1.5. CICLO EVOLUTIVO DO PARASITO	21
1.6. A RESPOSTA IMUNOINFLAMATÓRIA NA RESPOSTA POR <i>LEISHMANIA</i>	22
1.7. GLICOCONJUGADOS DE <i>LEISHMANIA</i>	23
1.8. MÉTODOS DE PURIFICAÇÃO DE FORMAS METACICLICAS DE <i>LEISHMANIA</i>	28
1.9. LECTINAS COMO FERRAMENTA PARA PURIFICAÇÃO DE FORMAS INFECTANTES	29
2. JUSTIFICATIVA	33
3. OBJETIVO	36
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	38
4.1. PARASITOS	38
4.2. LECTINAS	38
4.3. AGLUTINAÇÃO MEDIADA POR LECTINAS	38
4.4. ENSAIO DE PURIFICAÇÃO DE METACÍCLICAS	39
4.5. ANIMAIS	39
4.6. INFECÇÃO EXPERIMENTAL	40
4.7. DETERMINAÇÃO DA CARGA PARASITÁRIA.....	40
4.8. ANÁLISE ANATOMOPATOLÓGICA	40
4.9. ASPECTOS ÉTICOS	41
4.10. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	41
5. RESULTADOS	43
5.1. POTENCIAL DE AGLUTINAÇÃO DE LECTINAS DE DIFERENTES ESPECIFICIDADES, EM PROMASTIGOTAS DE <i>LEISHMANIA AMAZONENSIS</i>	43
5.2. AVALIAÇÃO DA ESPECIFICIDADE DA AGLUTINAÇÃO INDUZIDA PELAS	

LECTINAS	46
5.3. AVALIAÇÃO DA VIRULÊNCIA DAS FRAÇÕES PURIFICADAS DE <i>LEISHMANIA</i> <i>AMAZONENSIS</i> MEDIANTE INFECÇÃO EXPERIMENTAL	47
5.4. DETERMINAÇÃO DA CARGA PARASITÁRIA	48
5.5. ANÁLISE ANATOMOPATOLÓGICA	50
6. DISCUSSÃO	52
7. CONCLUSÃO	58
8. REFERÊNCIAS	60
ANEXOS	77
ANEXO – A	77
APÊNDICES	79
APÊNDICE – A	79
APÊNDICE – B	80
APÊNDICE – C	81
APÊNDICE – D	82

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1. Epidemiologia das leishmanioses

Leishmanioses são doenças infecto-parasitárias, zoonóticas, que resultam do parasitismo dos hospedeiros vertebrados por protozoários tripanosomatídeos do gênero *Leishmania*, sendo transmitidos através da picada de insetos vetores fêmeas infectados, que apresentam vasta distribuição geográfica na maioria das áreas tropicais e subtropicais do globo terrestre (WHO, 2010).

As leishmanioses constituem grande problema de saúde pública, estando presentes em 98 países distribuídos em cinco continentes (Américas do Sul e do Norte, Europa, África e Ásia). Estão entre as nove doenças infecto-parasitárias de maior importância no mundo e são a segunda causada por protozoários. A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que a prevalência mundial dessa zoonose seja de aproximadamente 12 milhões de casos e que 350 milhões de pessoas estejam expostas ao risco de contrair a doença. Há registro aproximado de 2 milhões de novos casos das diferentes formas clínicas ao ano, sendo 1,5 milhão de leishmanioses tegumentar e 0,5 milhão de leishmaniose visceral, destes, acredita-se que apenas 600.000 são notificados (DESJEUX, 2004). Estima-se que mais de 90% dos casos de leishmaniose visceral estão concentrados em Bangladesh, Brasil, Etiópia, Índia, Nepal e Sudão, e que mais de 90% dos casos de leishmaniose cutânea ocorrem no Afeganistão, Argélia, Irã, Arábia Saudita, Síria, Bolívia, Brasil, Colômbia, Nicarágua e Peru (WHO, 2010).

No Brasil tem-se verificado um aumento no número de casos registrados a partir da década de 1980, variando de 3.000 (1980) a 37.710 (2001). A leishmaniose tegumentar americana (LTA) foi assinalada em 19 estados, verificando-se sua expansão geográfica, quando, em 2003, foi confirmada a autoctonia em todos os estados brasileiros (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007).

1.2. Agente etiológico

A leishmaniose é uma parasitose causada por protozoários do gênero *Leishmania*. As leishmanias encontram-se sob duas formas em seu ciclo de vida. As formas amastigotas (3-7 µm de diâmetro) vivem dentro dos fagolisossomas de células do sistema monocítico fagocitário dos hospedeiros vertebrados, como monócitos e macrófagos, e são ingeridas, dentro destas células, pela fêmea do inseto flebotomíneo durante seu repasto em um hospedeiro infectado (LAINSON; RYAN; SHAW, 1987; CHANG *et al.*, 1990; ALEXANDER; SATOSKAR; RUSSELL, 1999; GONTIJO; CARVALHO, 2003). Uma vez dentro do intestino do inseto, o parasito sofre mudanças bioquímicas e morfológicas, transformando-se em promastigota (10-20 µm), forma flagelada extracelular, que pode ser encontrada livre ou aderida à parede ou às microvilosidades do intestino (KILLICK-KENDRICK, 1990a; SACKS *et al.*, 1995; ANDRADE; SARAIVA, 1999).

Morfológicamente, as promastigotas podem ser descritas como proclílicas, formas reprodutivas e não infectantes, e metacíclicas, as não reprodutivas e infectantes (ADLER; TEODOR, 1931; KILLICK-KENDRICK, 1987; KILLICK-KENDRICK, 1990a; PIMENTA *et al.*, 1992; MAHONEY *et al.*, 1999; AWASTHI; MATHUR; SAHA, 2004).

Segundo a classificação proposta pela Sociedade Internacional de Protistologistas (ADL *et al.*, 2005), baseada na ultra-estrutura genética e molecular, os agentes etiológicos das leishmanioses estão inseridos no Supergrupo Excavata e táxons Euglenozoa, Kinetoplastea, Família Trypanosomatidae, Gênero *Leishmania*. Neste gênero existem mais de 20 espécies distribuídas em regiões de clima tropical e subtropical de todo o mundo, com exceção da Oceania.

As classificações mais utilizadas para as leishmanias seguem o modelo taxonômico proposto por Lainson e Shaw (1987), que as dividem nos subgêneros *Leishmania* (SAF'JANOVA, 1982) e *Viannia*. O primeiro, presente no Velho e no Novo Mundo, e o segundo restrito ao Novo Mundo. As espécies do subgênero *Viannia* apresentam desenvolvimento no intestino posterior do flebotomíneo, aderidas à parede, na região do piloro, enquanto aquelas do subgênero *Leishmania* desenvolvem-se nos intestinos médio e anterior dos flebotomíneos (LAINSON; RYAN; SHAW, 1987; MARZOCHI, 1992; VALE; FURTADO, 2005).

No Novo Mundo, são reconhecidas 15 espécies de *Leishmania* responsáveis pela doença no homem, pertencentes aos dois subgêneros: *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) panamensis*, *L. (V.) lainsoni*, *L. (V.) colombiensis*, *L. (V.) naifi*, *L. (V.) peruviana*, *L. (V.) lindenbergi*, *L. (V.) shawi*, *L. (L.) amazonensis*, *L. (L.) mexicana*, *L. (L.) garnhami*, *L. (L.) venezuelensis*, *L. (L.) pifanoi*, responsáveis pelas formas cutâneas das leishmanioses e *L. (L.) infantum/chagasi*, responsável pela forma visceral da doença (WHO, 2010).

1.3. Hospedeiros

Os vetores e hospedeiros invertebrados das leishmanioses são os insetos hematófagos pertencentes à Ordem Diptera, Família Psychodidae, Subfamília Phlebotominae, conhecidos popularmente no Brasil, dependendo da região geográfica, como “mosquito” palha, tatuquira, birigui, entre outros. Os flebotomíneos são os únicos vetores das leishmanioses, com o gênero *Phlebotomus* ocorrendo no Velho Mundo e *Lutzomyia* no Novo Mundo (LAINSON; SHAW, 1987; KILLICK-KENDRICK, 1990b). Outros gêneros de flebotomíneos foram classificados, porém, por uma série de razões, a maioria das espécies não é transmissora da doença. Existem cerca de 800 espécies de flebotomíneos, no entanto, apenas 93 tem sido identificadas como vetores das leishmanioses (WHO, 2010).

Os hospedeiros vertebrados são animais silvestres, tais como roedores, edentados, marsupiais, procionídeos, ungulados primitivos e primatas (LAINSON; SHAW, 1987), e animais domésticos, tais como cães e, possivelmente, gatos (SIMÕES-MATTOS *et al.*, 2004; OTRANTO; DANTAS-TORRES, 2010; VIDES *et al.*, 2011). A maioria das leishmanioses é zoonótica, contudo os homens infectam-se somente quando se expõem acidentalmente ao ciclo de transmissão natural. Entretanto, nas formas antroponóticas, os humanos são os únicos reservatórios hospedeiros. Em nosso país, todas as formas de leishmanioses são zoonóticas. A antroponose ocorre somente no calazar indiano (GRIMALDI *et al.*, 1991).

No Brasil, as principais espécies de flebotomíneos envolvidas na transmissão da LTA são: *Lutzomyia flaviscutellata*, *Lu. whitmani*, *Lu. umbratilis*, *Lu. intermedia*, *Lu. wellcome* e *Lu. migonei*. Na transmissão da leishmaniose visceral o principal vetor é o do complexo *Lu.*

longipalpis (LAINSON; RANGEL, 2005), embora já haja evidência de transmissão pela espécie *Lu . cruzi* nos Estados do Mato Grosso e Mato Grosso do Sul (DE PITA-PEREIRA *et al.*, 2008; MISSAWA *et al.*, 2011).

1.4. Competência vetorial

Dentre as várias espécies de flebotomíneos existentes no Novo e no Velho Mundo, nem todas são transmissoras das leishmanioses. Alguns critérios são considerados para a incriminação como vetor de *Leishmania*, tais como: o vetor deve ser antropofílico e picar reservatórios e hospedeiros vertebrados; deve ser infectado na natureza com a mesma *Leishmania* que ocorre em humanos; e deve suportar o crescimento do parasito e ser capaz de transmiti-lo a outro hospedeiro (WHO, 2010).

Os vetores podem ser divididos em específicos, quando suportam o crescimento de apenas uma espécie, ou permissivos, caso tolerem o crescimento e desenvolvimento de várias espécies de *Leishmania*. Os principais fatores que influenciam a capacidade de uma determinada espécie de flebotomíneo de atuar como vetor são, em primeiro lugar, a resistência do parasito à ação das enzimas digestivas no trato intestinal do inseto; em segundo lugar, a presença de moléculas na superfície do intestino do flebotomíneo que correspondam aos glicoconjugados de superfície das promastigotas, permitindo que estas se liguem à parede intestinal do inseto. E, por fim, a produção de promastigotas metacíclicas, a única forma do parasito capaz de sobreviver no hospedeiro vertebrado (SACKS; KAMHAWI, 2001; VOLF; MYSKOVA, 2007; SVÁROVSKÁ *et al.*, 2010).

1.5. Ciclo evolutivo do parasito

Leishmania é transmitida por flebotomíneos fêmeas que se infectaram durante o repasto sanguíneo a partir de reservatórios infectados pelo parasito, no intuito de obter proteínas necessárias ao desenvolvimento de seus ovos (SACKS; KAMHAWI, 2001).

Ao ingerir sangue infectado, o inseto fêmea adquire também as formas amastigotas que, dentro da membrana peritrófica, transformam-se rapidamente em promastigotas, flageladas, e multiplicam-se ativamente no intestino do inseto vetor. Os primeiros dias após o repasto sanguíneo conferem um ambiente potencialmente letal para o desenvolvimento do parasito, devido à ação das enzimas presentes no trato digestivo do inseto. Para se protegerem da ação das enzimas digestivas, as promastigotas procíclicas produzem glicoconjugados que correspondem aos fosfoglicanos de superfície e, em seguida escapam da matriz peritrófica para não serem eliminadas ao final da digestão do repasto sanguíneo. A expressão de moléculas de superfície durante este estágio é essencial para a sobrevivência e crescimento da *Leishmania* (ILG, 2000).

A membrana peritrófica começa a ser destruída em torno do terceiro dia, esse processo é acelerado pela liberação de quitinases pelo parasito (SCHLEIN; JACOBSON; SHLOMAI, 1991). Ao escaparem da membrana peritrófica, as formas procíclicas aderem-se, por intermédio de seu flagelo, às células epiteliais do intestino do vetor e reproduzem-se intensamente. Imediatamente segue-se a metaciclogênese, etapa em que as promastigotas deixam de reproduzirem-se e transformam-se em promastigotas metacíclicas infectantes. Esse processo é acompanhado por modificações na morfologia do parasito e na expressão gênica e por modificações estruturais do LPG e de outros glicoconjugados expostos na superfície do parasito (SARAIVA *et al.*, 1995). Essas modificações bioquímicas na superfície das metacíclicas implicam na perda de sua capacidade de adesão ao epitélio do intestino médio do flebotomíneo. Como resultado, as promastigotas metacíclicas destacam-se, migrando para a faringe e cavidade bucal. Quando o vetor infectado alimenta-se do sangue de um humano ou de outro mamífero, regurgita as formas infectantes e estas são fagocitadas pelas células do sistema fagocítico mononuclear, como macrófagos, e por neutrófilos e células dendríticas imaturas, do hospedeiro vertebrado, onde se transformam novamente em amastigotas (ALEXANDER; SATOSKAR; RUSSELL, 1999;

LIESEA; CHLEICHERA; BOGDAN, 2008). Dentro dos macrófagos, as amastigotas reproduzem-se por fissão binária e a multiplicação dos parasitos pode progredir até o rompimento da célula, liberando as amastigotas que poderão infectar outras células fagocíticas, dando continuidade ao ciclo (BAÑULS; HIDE; PRUGNOLE, 2007).

1.6. A Resposta Imunoinflamatória na infecção por *Leishmania*

Durante a picada do flebotomíneo fêmea infectado, promastigotas metacíclicas são inoculadas na derme do hospedeiro mamífero, como seres humanos, cães, roedores, marsupiais, dentre outros (RIBEIRO, 1995). A quantidade inoculada de promastigotas varia de acordo com a intensidade da infecção do flebotomíneo. O número de promastigotas inoculadas parece ser importante no desenvolvimento da resposta imunológica (BELKAID *et al.*, 2000).

Na infecção inicial, a *Leishmania* induz a liberação de quimiocinas e a migração de neutrófilos e macrófagos para o foco inflamatório (ANDRADE *et al.*, 1984; TEIXEIRA *et al.*, 2005). Nas primeiras semanas de infecção os linfócitos são sensibilizados. As células T CD4⁺ virgens ao interagirem com *Leishmania* podem diferenciar-se em uma variedade de subpopulações de células efetoras, como em células T auxiliares clássicas Th1 e Th2 ou em linhagens mais recentemente definidas, como Th17, Treg (T regulatórias) e Tfh (T foliculares) (ZHOU; CHONG; LITTMAN, 2009; PECK; MELLINS, 2010; ZHU; YAMANE; PAUL, 2010). A diferenciação para cada subpopulação será determinada pelas citocinas presentes no microambiente e pela interação do receptor da célula T com o receptor do antígeno (BOYTON; ALTMANN, 2002). As células Th1 são caracterizadas pela produção de IFN- γ e estão envolvidas na imunidade celular contra microrganismos intracelulares. As células Th2 produzem IL-4, IL-5 e IL-13 e são responsáveis pela imunidade humoral. As células Treg produzem IL-4, IL-13, IL-10 e TGF- β . Sua diferenciação é induzida por TGF- β , ácido retinóico e IL-2 (VIGNALI; COLLISON; WORKMAN, 2008; SHEVACH, 2009). Por fim, as células Tfh requerem para sua diferenciação IL-21 e atuam regulando a maturação das células B (VOGELZANG *et al.*, 2008; NURIEVA *et al.*, 2008). A resposta Th2 e de células Treg geralmente resultam na progressão da doença (CAMPANELLI, 2006; TRIPATHI; SINGH; NAIK, 2007; RODRIGUES *et al.*, 2009).

Nos animais susceptíveis, a lesão apresenta exsudato constituído essencialmente de macrófagos não ativados, vacuolizados e repletos de amastigotas, com focos de necrose. Nos resistentes, a lesão apresenta exsudato inflamatório misto, o parasitismo é baixo com formação de granuloma e fibrose (ANDRADE *et al.*, 1984).

A resposta imunológica desenvolvida depende também do tamanho do inóculo. Camundongos BALB/c, quando infectados com inóculo com grande quantidade de parasitos, desenvolvem resposta Th2, Treg e Th17, sem controle do crescimento parasitário e progressão da doença. Entretanto, se infectados com baixo número de parasitos, conseguem controlar a infecção, com desenvolvimento de resposta Th1 (DOHERTY; COFFMAN, 1996; MENON; BRETHER, 1996, 1998; ANDERSON *et al.*, 2009).

1.7. Glicoconjugados de *Leishmania*

A superfície celular dos tripanosomatídeos, nos seus diversos estágios evolutivos, é revestida ricamente por moléculas glicosiladas, a maioria ancorada à membrana celular, através de glicolípídeos como o glicosil-fosfatidil-inositol (GPI). Esses glicoconjugados formam uma densa camada superficial protetora, cobrindo por inteiro a superfície da célula, intermediando as interações do parasito com seus hospedeiros (ETGES; BOUVIER; BORDIER, 1986; ILGOUTZ; MCCONVILLE, 2001; MCCONVILLE *et al.*, 2002).

Uma série de glicoconjugados de superfície tem sido descrita em diferentes espécies de *Leishmania*, como o lipofosfoglicano (LPG) e a glicoproteína 63 (gp63), moléculas envolvidas nos processos de ligação aos hospedeiros vertebrados e invertebrados (MOODY, 1993; NADERER ; VINCE; MCCONVILLE, 2004).

O LPG é considerado uma das mais importantes macromoléculas nas espécies de *Leishmania* já estudadas. Handman, Greenblat e Goding (1984) foram os primeiros a descrevê-lo na membrana de promastigotas, por meio de anticorpos monoclonais, e a demonstrar suas propriedades anfipáticas, chamando-o de lipopolissacarídeo. Basicamente sua molécula consiste de quatro domínios, são eles:

A) Âncora GPI: consiste de um fosfolipídio 1-*O*-alquil-2-*lyso*-fosfatidil-inositol, onde a cadeia alifática é um hidrocarboneto não ramificado, saturado, com 24 ou 26 carbonos (ORLANDI; TURCO, 1987).

B) Núcleo fosfossacarídico: ligado ao inositol da âncora com um glicosil fosfato preso à hidroxila em C-6 do resíduo proximal de manose por ligação fosfodiéster (TURCO *et al.*, 1989; MCCONVILLE *et al.*, 1990; ILG *et al.*, 1992). A presença de galactofuranose (Gal_f) interna é uma característica da *Leishmania*, visto que este isômero não é usualmente encontrado em glicoconjugados de eucariontes (TURCO, 1996).

C) Esqueleto de unidades repetidas de fosfodissacarídeos: todos os LPG já descritos contêm múltiplas unidades de PO₄⁻⁶Galβ1,4Manα1 que se repetem 15 a 30 vezes formando um polímero de fosfoglicanos; esse número de unidades repetidas por molécula de LPG depende diretamente do estágio de crescimento da promastigota (SACKS; BRODIN; TURCO, 1990; MCCONVILLE *et al.*, 1992). Variações interestágios, interespecíficas ou mesmo intraespecíficas na molécula devem-se também às diversas substituições por açúcares nas posições C-3 de galactose (a maioria) ou C-2 de manose (MCCONVILLE; FERGUSON, 1993; TURCO, 1996). Na *L. donovani* o LPG não apresenta substituições na cepa do Sudão (TURCO *et al.*, 1987) ou parcialmente ramificado com cadeias laterais de glicose na cepa indiana (MAHONEY *et al.*, 1999) (Figura 1).

Na *L. major*, as substituições são mais variadas, com oligossacarídeos contendo galactose, glicose e arabinose em 87% de Galβ1,3 (MCCONVILLE *et al.*, 1990). Em *L. tropica* as ramificações são terminadas com glicose e arabinose (MCCONVILLE *et al.*, 1995), porém 35% das manoses apresentam a hidroxila em C-2 substituída por cadeia lateral de manose em ligação α1,2 (MCCONVILLE *et al.*, 1995). Das espécies do Novo Mundo poucas foram caracterizadas, dentre as quais a *L. mexicana*, cujos fosfoglicanos repetitivos são parcialmente ramificados com glicose em posição Galβ1,3 (ILG *et al.*, 1992) e *L. peruviana*, que assim como a *L. donovani* do Sudão, não possui ramificações neste polímero (MCCONVILLE *et al.*, 1995). A caracterização parcial do LPG de *L. amazonensis* mostrou similaridade ao da *L. mexicana*, e o da *L. chagasi*, ao da *L. donovani* do Sudão (SACKS *et al.*, 1994).

desenvolva papel importante na proteção contra a lise pelo complemento (PUENTES *et al.*, 1990). Ele também parece estar envolvido na ligação inicial da promastigota ao macrófago, facilitando sua entrada e inibindo as ações líticas das enzimas ou radicais livres (CHAN *et al.*, 1989; MCNEELY; TURCO, 1990).

Durante o desenvolvimento da *Leishmania*, o LPG sofre modificações no tamanho e na estrutura do carboidrato: as formas procíclicas expressam, geralmente, menos LPG, enquanto as metacíclicas expressam uma cadeia maior e mais ramificada, isto é, esta molécula sofre modificações durante a metaciclogênese, aumentando o número de unidades fosfodissacarídicas (Man-Gal-PO₄) (Figura 2) (SACKS; KAMHAWI, 2001). Entretanto, especula-se que, para as leishmanias do complexo *L. mexicana*, a modificação da estrutura do LPG é inversa, ou seja, a cadeia de LPG diminui em tamanho após a metaciclogênese (ILG *et al.*, 1992).

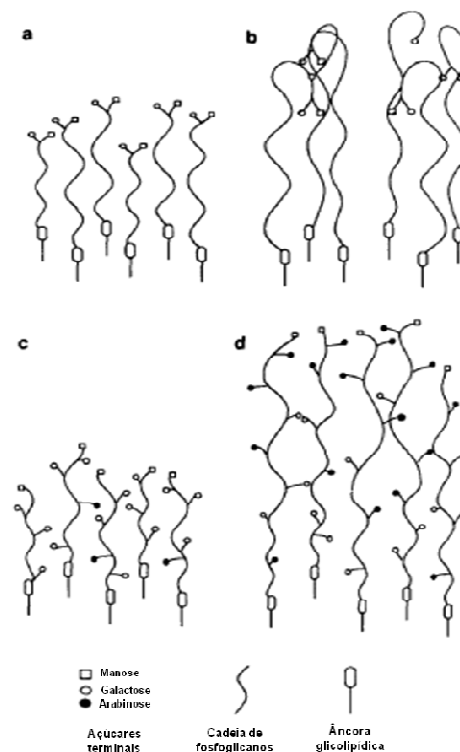


Figura 2. Representação esquemática da mudança na superfície de LPG durante a metaciclogênese em *L. donovani* (a, b) e *L. major* (c, d) (Fonte: SACKS *et al.*, 1995).

Além do LPG, outros glicoconjugados estão presentes na superfície da *Leishmania*, como os glicosil-fosfatidil-inositol livres (GIPL), os proteofosfoglicanos (PPG) e as glicoproteínas contendo âncoras GPI. Os GIPL são moléculas que não estão ligadas a proteínas nem a polissacarídeos e são os glicoconjugados mais abundantemente expressos, tanto em promastigotas como em amastigotas de *Leishmania* (cerca de 10^7 cópias/célula) e podem variar entre as espécies. A síntese de GIPL é comparável nos dois estágios e, provavelmente, eles são os principais componentes expostos na superfície de amastigotas, juntamente com os glicoesfingolipídios (GSL) procedentes do hospedeiro (MCCONVILLE; FERGUSON, 1993; WINTER *et al.*, 1994).

Quanto aos fosfoglicanos ligados a proteínas, os PPGs, cinco diferentes classes de proteínas modificadas por fosfossacarídeos foram descritas: fosfatase ácida secretada (SAP), proteofosfoglicano filamentoso secretado (fPPG), proteofosfoglicano de membrana (mPPG), proteofosfoglicano secretado de amastigota (aPPG) e segundo proteofosfoglicano secretado de promastigota (pPPG2) (ILG; HANDMAN; STIERHOF, 1999; ILG, 2000).

A mais conhecida glicoproteína ligada a GPI é a gp63, uma molécula com 63 kDa, também conhecida como “leishmanolisina” ou “protease de superfície de promastigota”. Presas à membrana através de âncora GPI, as gp63 recobrem toda a superfície de promastigotas, inclusive o flagelo (cerca de 5×10^5 moléculas/célula), onde ficam “escondidas” sob o glicocálice de LPG; em virtude desta localização, são pobremente marcadas por anticorpos e soro imune (ETGES; BOUVIER; BORDIER, 1986; KARP; TURCO; SACKS, 1991). Sua expressão aumenta durante a metaciclogênese, chegando a representar mais de 2% das proteínas de promastigotas metacíclicas (KWEIDER *et al.*, 1989; BRITTINGHAM *et al.*, 1995) e também estão presentes em amastigotas, porém em menor quantidade. Outra glicoproteína de 46 kDa foi identificada em *L. amazonensis*, a gp46 (HAHL; MCMAHON-PRATT, 1987). Nesta espécie, a purificação simultânea de gp63 e gp46 revelou que a concentração desta molécula foi duas a três vezes maior que a de leishmanolisina (BURNS *et al.*, 1991), representando pelo menos 1% das proteínas de membrana.

1.8. Métodos de purificação de formas metacíclicas de *Leishmania*

Baseando-se nas diferenças estruturais do LPG durante o desenvolvimento do parasito e por ser esta uma das moléculas presentes em maior abundância na superfície celular de promastigotas (HANDMAN; GREENBLAT; GODIM, 1984), o LPG tem sido utilizado como base nos métodos de purificação de formas metacíclicas (TURCO, 1987; CHAVES *et al.*, 2003). Esses métodos referem-se à seleção de parasitos baseada na modificação dos grupos laterais de LPG. Entre esses métodos, destaca-se a purificação utilizando anticorpos monoclonais ou lectinas (KELLEHER *et al.*, 1994; COURRET *et al.*, 1999; MAHONEY *et al.*, 1999; LIRA *et al.*, 1998; SACKS; HIENY; SHER, 1985; ALMEIDA *et al.*, 1993; PINTO-DA-SILVA *et al.*, 2002).

Os métodos de purificação de promastigotas por anticorpos monoclonais consistem na utilização dessas glicoproteínas para reconhecimento de epítomos de LPG, de glicoconjugados ou de fosfoglicanos especificamente expressos por culturas de parasitos. Os parasitos são incubados com anticorpo, em torno de 30 minutos à temperatura ambiente e, em seguida, os parasitos aglutinados são removidos e lavados por centrifugação a uma baixa rotação (150 x g) de maneira que as formas metacíclicas, menos densas, ficam remanescentes no sobrenadante (MAHONEY *et al.*, 1999). Alguns anticorpos monoclonais, que reconhecem promastigotas procíclicas e por isso podem selecionar negativamente as formas metacíclicas de *Leishmania*, tem sido descritos na literatura, como 3F12, 3A1-La, MG1 e XCIV-1H2 A8 (T11) que selecionam negativamente cepas de *L. major* (KELLEHER *et al.*, 1994), *L. amazonensis* (COURRET *et al.*, 1999; CHAVES *et al.*, 2003), *L. donovani* (MAHONEY *et al.*, 1999) e *L. tropica* (LIRA *et al.*, 1998), respectivamente.

Os métodos de purificação por lectinas consistem em selecionar, positiva ou negativamente, subpopulações de parasitos pelo reconhecimento de açúcares de superfície. Promastigotas de cultura estacionária são incubadas com soluções definidas de lectinas, em torno de 30 a 60 minutos, à temperatura ambiente, para reações de aglutinação. Em seguida, os parasitos são submetidos a uma centrifugação a baixa rotação (40 x g) para separar formas aglutinadas e não aglutinadas. Cada fração é lavada separadamente a 2769 x g para remoção da lectina (PINTO-DA-SILVA *et al.*, 2002). Ao final do procedimento, uma das frações deverá

apresentar subpopulações enriquecidas de promastigotas metacíclicas. A literatura descreve várias lectinas com potencial para aglutinar seletivamente formas promastigotas de cultura estacionária de *L. major* e *L. braziliensis*, tais como a lectina de amendoim (PNA) (SACKS; HIENY; SHER, 1985), lectina de lentilha (LCL) (ALMEIDA *et al.*, 1993) e lectina de *Bauhinia purpurea* (BPL) (PINTO-DA-SILVA *et al.*, 2002).

Além destes, existe outro método de purificação de metacíclicas, que independe das variações estruturais do LPG. Tal método consiste em separar formas infectantes por centrifugação em gradiente de densidade. A suspensão de parasitos de cultura de fase estacionária é centrifugada a 1300 x g por 10 minutos à temperatura ambiente, com 20% de Ficoll. Em seguida, os parasitos preparados na fração são ressuspensos e submetidos a rotações de 1900 x g nas mesmas condições. Ao final do processo, um pequeno agregado de células, sedimentado no tubo, corresponde a uma fração rica em formas metacíclicas. Esse protocolo tem sido descrito para estudos com cepas de *L. major* deficientes em LPG (SPATH; BEVERLEY, 2001).

Os métodos de purificação são importantes para permitir análise molecular e funcional das formas evolutivas de *Leishmania*.

1.9. Lectinas como ferramenta para purificação de formas infectantes

Lectinas são glicoproteínas de origem não imune, que interagem de maneira reversível e específica com carboidratos através de interações hidrofóbicas e são capazes de induzir o fenômeno de aglutinação celular (LORIS *et al.*, 1998). As lectinas estão presentes em todas as classes e famílias de organismos, sendo encontradas em vegetais superiores, algas, fungos, bactérias, vírus e animais (vertebrados e invertebrados). Em vegetais, elas são detectadas em centenas de espécies de plantas. A maioria das lectinas é obtida das sementes, principalmente em leguminosas, sendo acumuladas no período de maturação e desaparecendo após a germinação. As lectinas constituem cerca de 10% das proteínas totais de sementes, porém a quantidade isolada é pequena: varia entre 0,1-1% deste total (SHARON; LIS, 2004; ALENCAR *et al.*, 2005).

Cerca de uma centena de lectinas já foi encontrada e caracterizada bioquímica e biologicamente (CAVADA *et al.*, 1996a, 1996b). Somente da subtribo Diocleinae mais de 15 lectinas foram isoladas nos últimos 15 anos. Todas as lectinas desta subtribo são proteínas estáveis, tanto estruturalmente quanto funcionalmente, e possuem especificidade por resíduos de glicose, manose e derivados. Embora a classificação de lectinas seja baseada em sua especificidade por monossacarídeos, membros individuais dos grupos podem mostrar diferenças apreciáveis em sua especificidade por oligossacarídeos, sendo que estas diferenças são menos significativas quando as lectinas pertencem ao mesmo gênero (GOLDSTEIN; PORETZ, 1986; PEUMANS; VAN-DAMME, 1994).

Em relação à pesquisa com *Leishmania*, lectinas tem sido utilizadas no estudo de constituintes glicosilados, ou de suas funções, no parasito e em seus vetores. Já foram usadas como sondas para o reconhecimento de açúcares constituintes da membrana de diversas espécies e cepas (DWYER, 1974, 1977; JACOBSON *et al.*, 1982; SCHOTTELIUS, 1982; GUEUGNOT *et al.*, 1984; ROSSELL *et al.*, 1990; ANDRADE; SARAIVA, 1999), para discriminar linhagens de parasitos patogênicos e não patogênicos (DAWIDOWICZ *et al.*, 1975; DORAN; HERMAN, 1981; SACKS; HIENY; SHER, 1985; NAGAKURA *et al.*, 1986; SARAIVA *et al.*, 1986; GROGL *et al.*, 1987; HOWARD *et al.*, 1987), bem como para distinguir os diferentes estágios morfológicos de *Leishmania* (WILSON; PEARSON, 1984; SARAIVA *et al.*, 1986) e para purificação de seus glicoconjugados (GOROCICA *et al.*, 1997), entre outros métodos.

Dentre as várias lectinas estudadas, a ConA, extraída das sementes de *Canavalia ensiformes* (feijão de porco), é atualmente uma das mais bem caracterizadas. Várias lectinas homólogas a ConA foram isoladas e caracterizadas, tais como as das espécies *Dioclea grandiflora* (MOREIRA *et al.*, 1996), *Canavalia brasiliensis* (MOREIRA; CAVADA, 1984), *Dioclea guianensis* (VASCONCELOS *et al.*, 1991), *Cratylia floribunda* (OLIVEIRA *et al.*, 1991), *Dioclea violacea* (MOREIRA *et al.*, 1996), *Dioclea virgata* (CAVADA *et al.*, 1996a) e *Dioclea rostrata* (CAVADA *et al.*, 1996b), todas específicas para glucose/manose e pertencentes ao táxon Diocleinae. Tem sido relatado que as lectinas de Diocleinae, mesmo compartilhando de uma alta semelhança em suas estruturas primárias e tridimensionais (GRANJEIRO *et al.*, 1997; SANZ-APARACIO *et al.*, 1997; CALVETE *et al.*, 2000), e de serem específicas pelos mesmos

monossacarídeos (glucose/manose), apresentam diferenças marcantes em várias atividades biológicas.

Por conta dessa especificidade de ligação aos açúcares de superfície de vários parasitos, as lectinas tem sido amplamente investigadas como ferramenta de purificação. A lectina de amendoim (PNA), utilizada para aglutinar cepa de *L. major*, liga-se à galactose terminal do LPG de promastigotas de fase logarítmica, mas não se liga ao LPG das formas metacíclicas, que, em contrapartida, apresenta arabinose em sua porção terminal (MCCONVILLE *et al.*, 1992). Lectina de *Bauhinia purpurea* (BPL), que reconhece especificamente ligações β -gal (1 \rightarrow 3)-GalNAc, e a lectina de lentilha (LCL), que é específica para D-manose terminal, selecionam negativa e positivamente organismos metacíclicos de *L. braziliensis*, respectivamente (PINTO-DA-SILVA *et al.*, 2002; ALMEIDA *et al.*, 1993).

Em *L. donovani* os resíduos de açúcares terminais na cadeia de LPG, constituídos principalmente por galactose, não são substituídos durante a metaciclogênese, entretanto o aumento do tamanho da cadeia de LPG faz com que essa molécula sofra modificações conformacionais, escondendo o sítio de ligação dos açúcares (Figura 2). Por conta disso as promastigotas procíclicas ligam-se a PNA e ConA, mas as metacíclicas não (SACKS *et al.*, 1995).

Para cepas de *L. amazonensis*, embora alguns trabalhos já tenham testado várias lectinas (SARAIVA, 1986; ANDRADE; SARAIVA, 1999), nenhuma delas mostrou-se capaz de aglutinar seletivamente as promastigotas, purificando as metacíclicas.

Carboidratos tem sido apontados como macromoléculas essenciais em variados processos celulares, como sinalização, suporte estrutural, proteção e tráfego (ROSEMAN, 2001), e as lectinas têm sido frequentemente usadas como instrumento para o estudo das interações celulares, na imunomodulação e na diferenciação de subpopulações de parasitos que envolvem glicoconjugados (SACKS; HIENY; SHER, 1985; BARRAL-NETTO *et al.*, 1996; VOLF; SKARUPOVÁ; MAN, 2002).

2. JUSTIFICATIVA

2. JUSTIFICATIVA

As infecções experimentais com *Leishmania* tem sido importantes para esclarecer os mecanismos da doença, bem como nos estudos para avaliações de novas abordagens terapêuticas e de vacinas na prevenção da leishmaniose. Nos diversos modelos experimentais para estudo da leishmaniose, tem-se utilizado para infecção culturas na fase estacionária, por conter mais formas metacíclicas, infectantes. Estima-se que os flebotomíneos podem inocular de 0 a 10^3 promastigotas na derme do hospedeiro mamífero (WARBURG; SCHLEIN, 1986), o que, possivelmente, é um fator importante na variação da intensidade da infecção. O grau de infecção e o tipo de resposta imunológica podem determinar um amplo espectro clínico, caracterizado pelas formas clínicas assintomática, subclínica e clássica (BADARO *et al.*, 1986a, 1986b).

Em culturas de fase estacionária de *L. major*, estima-se que a frequência de formas metacíclicas seja em torno de 10% (DA SILVA *et al.*, 1989; PUENTES *et al.*, 1990; LIMA; TITUS, 1996). Considerando que apenas as formas metacíclicas parasitam eficientemente os macrófagos, um inóculo de apenas 10 promastigotas seria suficiente para a infecção (DA SILVA *et al.*, 1989; PUENTES *et al.*, 1990). Por outro lado, sendo a frequência de metacíclicas em *L. braziliensis* de 0,01% (LIMA; TITUS, 1996), uma dose de 10^4 ou mais de parasitos seria necessária para infectar com sucesso os macrófagos do hospedeiro vertebrado. Por conta disso, para garantir o sucesso da infecção, grande parte dos experimentos que utilizam animais de laboratório, são realizados com inóculos bastante superiores àqueles utilizados pelo vetor no ambiente natural, podendo levar a resultados que não condizem com a realidade.

Como se sabe, ao final do desenvolvimento no trato digestivo do flebotomíneo, as leishmanias diferenciam-se em promastigotas metacíclicas e são transmitidas aos hospedeiros vertebrados. Por isso, em estudos experimentais de infectividade de parasitos em animais (in vivo) ou em macrófagos (in vitro) é preferível o uso de formas metacíclicas provenientes de culturas purificadas.

Estudos que utilizam inóculo purificado, com populações metacíclicas mais homogêneas, tem sido importantes, tanto por se aproximarem mais da condição da infecção natural, quanto por inibirem uma possível resposta inflamatória induzida pelos restos parasitários, atraindo por sua

vez, muitos neutrófilos, descaracterizando a fase silenciosa da infecção, causada por inóculo com poucos parasitos, como já descrito (BELKAID *et al.*, 2000).

Diante do exposto, é relevante a identificação de técnicas que permitam separar formas metacíclicas que possam ser reproduzíveis e acessíveis.

3. OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

- Avaliar se lectinas são capazes de purificar formas metacíclicas de *Leishmania amazonensis*

3.2. Objetivos Especificos

- Avaliar se lectinas aglutinam formas promastigotas de *Leishmania amazonensis*;
- Identificar qual lectina possui melhor potencial de aglutinação;
- Comparar a virulência das frações purificadas de *Leishmania amazonensis* na infecção experimental *in vivo*.

4.MATERIAL E MÉTODOS

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Parasitos

Leishmania amazonensis (MHOM/BR/87/BA125), isolada de paciente com leishmaniose cutânea, foi analisada por sorodema e zimodema (BARRAL *et al.*, 1991) e mantida congelada e por passagens periódicas em hamsters. As culturas foram mantidas em meio NNN e em garrafas com Schneider (Himedia, Mumbai, Índia) suplementado com 10% de Soro Bovino Fetal (SBF) (Gibco, Grand Island NY, USA), 2% de urina humana estéril de doadores masculinos, 2mM de L-glutamina (Gibco), 50 µg/mL de gentamicina (Gibco), 100 µg/mL de penicilina (Sigma Aldrich, St. Louis, MO) e 200 µg/mL de estreptomicina (Sigma), e foram utilizadas até a 5ª passagem.

4.2. Lectinas

Lectinas de *Artocarpus integrifolia* (AIL), *Erythrina fusca* (EFL), *Erythrina velutina* (EVL), *Vatairea macrocarpa* (VML), específicas para D-galactose, *Canavalia brasiliensis* (ConBr), *Cratylia floribunda* (CFL) e *Dioclea violacea* (DVL), específicas para D-glicose/D-manose, cedidas gentilmente pelo professor Benildo Cavada do Laboratório de Moléculas Biologicamente Ativas (BioMol-UFC, Brasil) foram diluídas em PBS na concentração de 1mg/mL. As soluções foram aliquotadas e armazenadas a -20°C e usadas uma única vez após o descongelamento.

4.3. Aglutinação mediada por lectinas

Promastigotas vivas de *L. amazonensis* (5×10^7 promastigotas/mL), tanto de fase de crescimento logarítmico como estacionário, foram incubadas em placas de 96 poços, em volumes iguais, com as lectinas em diferentes concentrações (SARAIVA *et al.*, 1986 adaptado). As suspensões foram incubadas por 1 hora à temperatura ambiente nas seguintes concentrações:

0,05; 0,5; 5; 50 e 100 µg/mL. Em seguida, as promastigotas não aglutinadas foram contadas em câmara de Neubauer. Com o objetivo de fazer uma seleção negativa das promastigotas metacíclicas, foram selecionadas as lectinas que induziram aglutinação acima de 50% nas promastigotas de culturas de fase logarítmica.

Para cada lectina as reações controle foram realizadas pela inibição da aglutinação com açúcar específico numa concentração de 0,1 M ou pela omissão da lectina (Apêndice A). O percentual de aglutinação foi determinado pela fórmula: $[1 - (\text{número de promastigotas livres da amostra com lectina} / \text{número de promastigotas livres do controle})] \times 100$ (SACKS; HIENY; SHER, 1985).

4.4. Ensaio de purificação de metacíclicas

Promastigotas vivas de *L. amazonensis* em fase estacionária foram tratadas com a lectina DVL (adaptado de SACKS; HIENY; SHER, 1985; PINTO-DA-SILVA *et al.*, 2002). Foram incubados, em placas de 24 poços, volumes iguais de parasitos (5×10^7 promastigotas/mL) e de lectina (50 µg/mL, concentração final de 25 µg/mL) ou PBS por 30 minutos, à temperatura ambiente. Em seguida, a suspensão foi centrifugada a 20 x g por 5 minutos, 5 °C para separação das frações aglutinada e não aglutinada. As duas frações foram lavadas separadamente a 2760 x g, 15 minutos, 5 °C por 3 ciclos (Apêndice B).

4.5. Animais

Foram utilizados hamsters dourados machos (n=25) cedidos pelo Biotério do Departamento de Patologia e Medicina Legal-UFC entre 6 e 8 semanas de vida. Os animais foram distribuídos aleatoriamente em três grupos:

- Grupo Controle (n=8), no qual foi inoculado parasito sem tratamento com lectina, como se faz a infecção em ambiente laboratorial atualmente;
- Grupo Fração Aglutinada (n=8), no qual foram inoculadas as leishmanias que se ligaram especificamente à lectina DVL na concentração de 25 µg/mL;

- Grupo Fração Não Aglutinada (n=9), no qual foram inoculadas leishmanias que ficaram livres no sobrenadante, não se aderindo à DVL na concentração de 25 µg/mL.

4.6. Infecção experimental

A infecção experimental foi realizada no coxim plantar posterior esquerdo, por via subcutânea. O inóculo de 10^6 promastigotas por animal foi administrado num volume de 20 µL em PBS. Os animais receberam cuidados de profissionais capacitados e alimentaram-se com base em uma dieta de ração, frutas, sementes e água filtrada *ad libitum*. A evolução da lesão foi acompanhada por medição semanal de patas, durante um período de 6 semanas. Em seguida, os animais foram anestesiados e eutanasiados com halotano. Posteriormente, foram retirados linfonodos de drenagem e patas para determinação de carga parasitária e estudos histopatológicos, respectivamente.

4.7. Determinação da carga parasitária

Os linfonodos poplíteos foram retirados assepticamente e macerados em meio Schneider não suplementado. Em seguida, foram feitas diluições seriadas em Schneider suplementado em placas de 24 poços até 10^{64} . Dezesesseis dessas diluições foram selecionadas (10^4 , 10^8 , 10^{12} , 10^{16} , 10^{20} , 10^{24} , 10^{28} , 10^{32} , 10^{36} , 10^{40} , 10^{44} , 10^{48} , 10^{52} , 10^{56} , 10^{60} , 10^{64}) e distribuídas em sextuplicatas em placas de 96 poços em meio NNN. O número de parasitos viáveis foi determinado pela mais alta diluição que permitiu o crescimento das promastigotas durante 4 semanas de incubação em B.O.D a 23 °C (TITUS *et al.*, 1985). A determinação do número de parasitos foi definida pelo software ELIDA (TASWELL, 1984).

4.8. Análise anatomopatológica

As patas foram fixadas em formol a 10% e, em seguida, descalcificadas em EDTA a 4%. Posteriormente, o material foi seguido para cortes histológicos e confecção de lâminas coradas em hematoxilina-eosina. Foram avaliados parâmetros como: exsudato celular, edema, necrose,

congestão, presença de eosinófilos, neutrófilos, linfócitos, plasmócitos, macrófagos, células gigantes, granulomas, fibrose e parasitismo.

Cada parâmetro foi avaliado semi-quantitativamente segundo presença ou ausência do evento através de escores: 0 (ausência), 1 (1-25%), 2 (26-50%), 3 (>50%), conforme descrito por Lima (2008).

4.9. Aspectos éticos

Esse trabalho esteve de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal da Universidade Federal do Ceará (CEPA-UFC), sob número de protocolo 19/2011 (Anexo A).

4.10. Análise estatística

Para análise da comparação da lesão de patas foi utilizado o teste Two-way ANOVA, seguido do teste de Bonferroni. Para a avaliação da carga parasitária e para a análise histopatológica foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis, seguido de Dunns. Os valores de $p < 0,05$ foram considerados significantes. O programa utilizado para essas análises foi o Software GraphPad Prism versão 5.00 para Windows.

5.RESULTADOS

5. RESULTADOS

5.1. Potencial de aglutinação de lectinas de diferentes especificidades, em promastigotas de *Leishmania amazonensis*.

Inicialmente, foi feita uma triagem com diversas lectinas de especificidades para D-galactose e D-glicose/D-manose. O potencial dessas lectinas de aglutinarem promastigotas vivas de *L. amazonensis* foi avaliado, tanto na fase logarítmica como na estacionária, utilizando diferentes concentrações.

A capacidade de aglutinação variou muito entre as lectinas. Na fase logarítmica, AIL e EFL, específicas para D-galactose, aglutinaram promastigotas de *L. amazonensis*, num percentual de 54,9 e de 50,9%, nas concentrações de 50 e 0,05 µg/mL, respectivamente (Tabela 1). Na fase estacionária, esse percentual diminuiu para 11,3 e 19,5%, respectivamente (Tabela 2; Gráfico 1).

Tabela 1. Percentual de aglutinação de promastigotas de *L. amazonensis*, em diferentes fases do crescimento, induzido por lectinas específicas para D-galactose ou D-glicose/D-manose, em várias concentrações. Dados representativos de 3 ensaios realizados.

Lectinas	Fase Logarítmica					Fase Estacionária				
	Concentrações das lectinas (µg/mL)					Concentrações das lectinas (µg/mL)				
	0,05	0,5	5	50	100	0,05	0,5	5	50	100
Especificidade para D-galactose:										
<i>Artocarpus integrifolia</i> – AIL	17,3	19,2	30,6	54,9	33,1	23,2	20,2	25,2	11,3	31,8
<i>Vatairea macrocarpa</i> – VML	12,9	15,8	33,1	26,5	23,1	32,8	22,5	22,8	21,9	21,1
<i>Erythrina velutina</i> – EVL	17,5	12,3	2,2	21,0	39,2	32,5	42,0	5,6	13,7	11,1
<i>Erythrina fusca</i> – EFL	50,9	43,1	19,6	21,4	39,2	19,5	21,0	24,9	18,6	29,7
Especificidade para D-glicose/D-manose:										
<i>Dioclea violacea</i> – DVL	13,3	12,9	35,2	66,3	78,1	24,1	11,5	28,1	31,0	52,7
<i>Cratylia floribunda</i> – CFL	23,8	23,5	13,1	23,2	61,9	27,5	12,0	9,3	17,8	29,4
<i>Canavalia brasiliensis</i> – ConBr	27,6	21,1	13,7	43,5	8,6	9,2	19,9	11,4	11,6	3,2

As lectinas DVL e CFL, específicas para D-glicose/D-manose, apresentaram, na concentração de 100 µg/mL, um maior potencial aglutinante para cepa de *L. amazonensis* na fase logarítmica, atingindo percentuais de 78,1 e 61,9%, respectivamente (Tabela 1). Na mesma concentração, durante a fase estacionária, foi possível observar uma redução desse percentual para 52,7 e 29,4%, respectivamente (Tabela 2; gráfico 2).

Tabela 2. Percentual de aglutinação de promastigotas de *L. amazonensis*, em diferentes fases do crescimento, induzido por lectinas específicas para D-galactose ou D-glicose/D-manose, na concentração que induziu maior aglutinação na fase logarítmica.

Especificidade para D-galactose:	Conc. (µg/mL)	Fase Logarítmica	Fase Estacionária	Delta Aglutinação
<i>Artocarpus integrifolia</i> – AIL	50	54,9	11,3	43,6
<i>Vatairea macrocarpa</i> – VML	5	33,1	22,8	10,3
<i>Erythrina velutina</i> – EVL	100	39,2	11,1	28,1
<i>Erythrina fusca</i> – EFL	0,05	50,9	19,5	31,4
Especificidade para D-glicose/D-manose:				
<i>Dioclea violacea</i> – DVL	100	78,1	52,7	25,4
<i>Cratylia floribunda</i> – CFL	100	61,9	29,4	32,5
<i>Canavalia brasiliensis</i> – ConBr	50	43,5	11,6	31,9

Delta aglutinação: diferença de aglutinação entre as fases logarítmica e estacionária.

Algumas lectinas, como EFL e VML, na fase logarítmica, e VML e EVL, na fase estacionária, foram capazes de aglutinar promastigotas em concentrações muito baixas (0,05 a 5 µg/mL). Em concentrações mais elevadas, observou-se uma redução da aglutinação (Tabela 1).

Ao se comparar as aglutinações nas duas fases de crescimento, observou-se que, com exceção da EVL, as lectinas apresentaram um melhor poder para aglutinar as promastigotas de fase logarítmica (Tabela 1). A lectina que melhor discriminou as duas fases de crescimento foi AIL, com valor de delta igual a 43,6% (Tabela 2; gráficos 1 e 2).

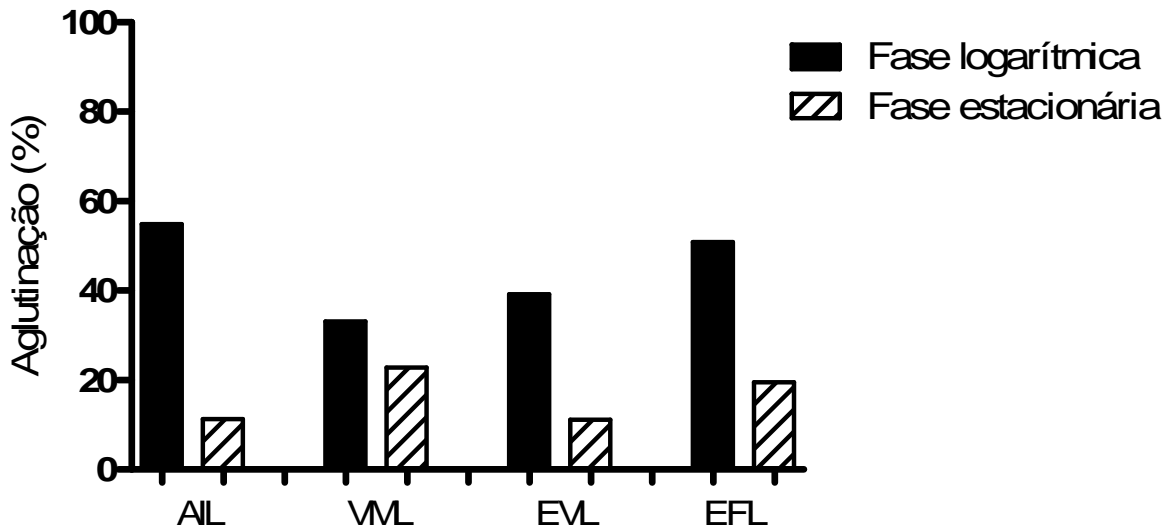


Gráfico 1. Perfil de aglutinação de *L. amazonensis* com lectinas específicas para D-galactose em fase logarítmica (preto) e estacionária (hachurado). AIL (*Artocarpus integrifolia*), VML (*Vatairea macrocarpa*), EVL (*Erythrina velutina*), EFL (*Erythrina fusca*). Os resultados são expressos como porcentagem de promastigotas aglutinadas por AIL, VML, EVL e EFL nas concentrações: 50, 5 e 100 e 0,05 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente.

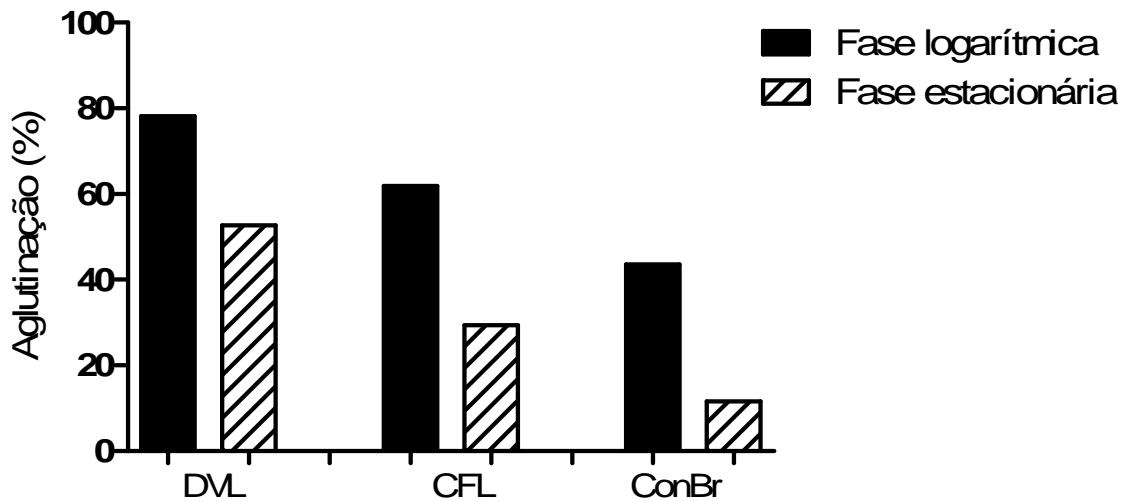


Gráfico 2. Perfil de aglutinação de *L. amazonensis* com lectinas específicas para D-glicose/D-manose em fase logarítmica (preto) e estacionária (hachurado). DVL (*Dioclea violacea*), CFL (*Cratylia floribunda*), ConBr (*Canavalia brasiliensis*). Os resultados são expressos como porcentagem de promastigotas aglutinadas por DVL, DFL e ConBr nas concentrações: 100, 100 e 50 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente.

5.2. Avaliação da especificidade da aglutinação induzida pelas lectinas

Para comprovar se a ação aglutinante era mediada por lectinas, foi realizado um novo ensaio utilizando o bloqueio por seu açúcar específico. Nesta etapa foram selecionadas apenas as lectinas que apresentaram um potencial aglutinante igual ou superior a 50% na fase logarítmica de crescimento.

Quando bloqueada por D-glicose/D-manose a lectina DVL, teve uma brusca redução de aglutinação, na concentração de 100 μ g/mL, de 74% (percentual sem bloqueio) para 17%. A lectina EFL, apesar de ter aglutinado apenas 20% das promastigotas durante a fase estacionária, reduziu para 1% quando bloqueada com D-galactose. As lectinas AIL e CFL, que aglutinaram 20,6 e 39,6%, respectivamente, não demonstraram diferença entre a aglutinação com a lectina isolada ou associada ao bloqueio (13,7 e 36,2%, respectivamente) (Gráfico 3).

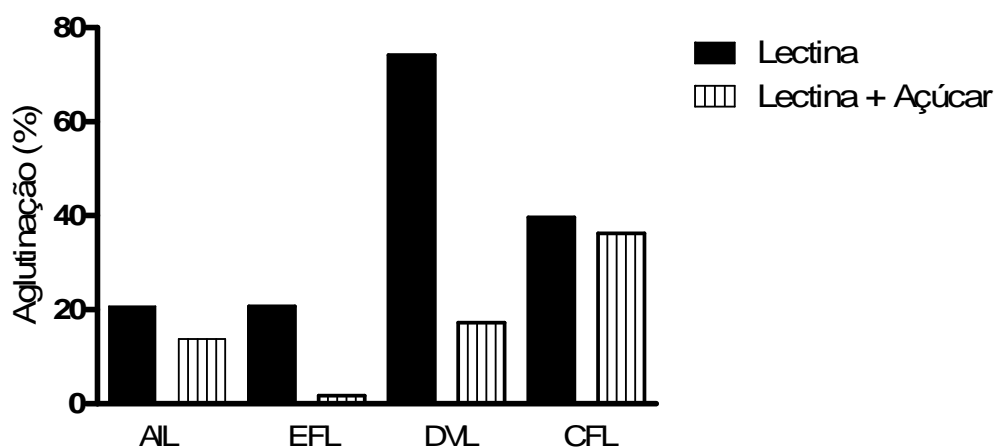


Gráfico 3. Perfil de aglutinação de promastigotas de *Leishmania amazonensis* em fase estacionária por lectinas na presença ou ausência de seu açúcar específico. Os resultados são expressos como porcentagem de promastigotas aglutinadas por AIL, EFL, DVL e CFL nas concentrações: 50, 0,05, 100 e 100 μ g/mL, respectivamente

5.3. Avaliação da virulência das frações purificadas de *Leishmania amazonensis* mediante infecção experimental.

Após os testes *in vitro*, constatou-se que, dentre as lectinas avaliadas, DVL, na concentração de 100 µg/mL, apresentou maior capacidade para aglutinar promastigotas de *L. amazonensis* em fase estacionária. Por essa razão, o estudo *in vivo* foi delineado utilizando apenas essa lectina. Entretanto, após realização de uma série de ensaios de aglutinação notou-se efeito tóxico ocasionado, provavelmente, pelas elevadas concentrações a lectina. Por conta disto, novos experimentos *in vitro* foram realizados e chegou-se à conclusão de que a concentração final mais adequada a ser utilizada para os ensaios *in vivo* seria de 25 µg/mL.

Ensaio de purificação de *L. amazonensis* com a lectina selecionada foram conduzidos e os inóculos purificados foram administrados em hamsters, como previamente descrito.

Os animais foram acompanhados durante 6 semanas após a infecção experimental com cepa purificada de *L. amazonensis*, para avaliação da evolução do tamanho das lesões. Em todos os grupos as lesões surgiram na 3ª semana, com as seguintes médias: CT=0,38, FA=0,35 e FNA=0,19 mm. Durante todo o período as lesões foram similares entre os grupos CT e FA. Já entre CT e FNA observou-se que as dimensões das lesões de FNA foram inferiores às do CT na 4ª e na 5ª semanas pós-infecção ($p<0,01$), bem como entre FA e FNA ($p<0,01$) nos mesmos períodos (Gráfico 4).

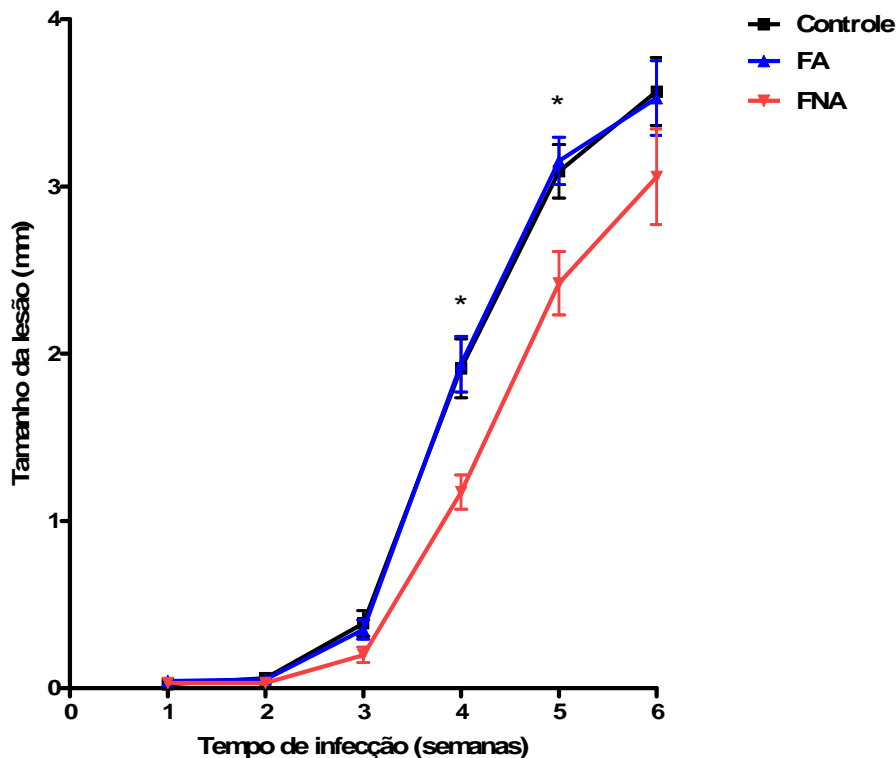


Gráfico 4. Desenvolvimento de lesão de hamsters infectados com *Leishmania amazonensis* purificadas por *Dioclea violacea* após inoculação de 10^6 promastigotas em pata posterior esquerda. Valores representam a média do delta (diferença entre pata infectada e sadia) \pm SEM de 8 ou 9 hamsters por grupo. CT= Controle positivo, FA= Fração Aglutinada, FNA= Fração Não Aglutinada por *Dioclea violacea*. * $p < 0,05$ entre CT e FNA, FA e FNA.

5.4. Determinação da carga parasitária

Foi realizada a determinação da carga parasitária no linfonodo poplíteo de drenagem da lesão. As placas foram analisadas quanto a presença de parasitos nos poços, durante um período de 4 semanas. Constatou-se que o grupo CT apresentou mediana de $9,1 \times 10^{40}$ leishmanias/linfonodo, enquanto os grupos FA e FNA apresentaram $1,1 \times 10^{40}$ e $1,3 \times 10^{32}$ leishmanias/linfonodo, respectivamente (Gráfico 5). Não houve diferença estatisticamente significante entre os grupos.

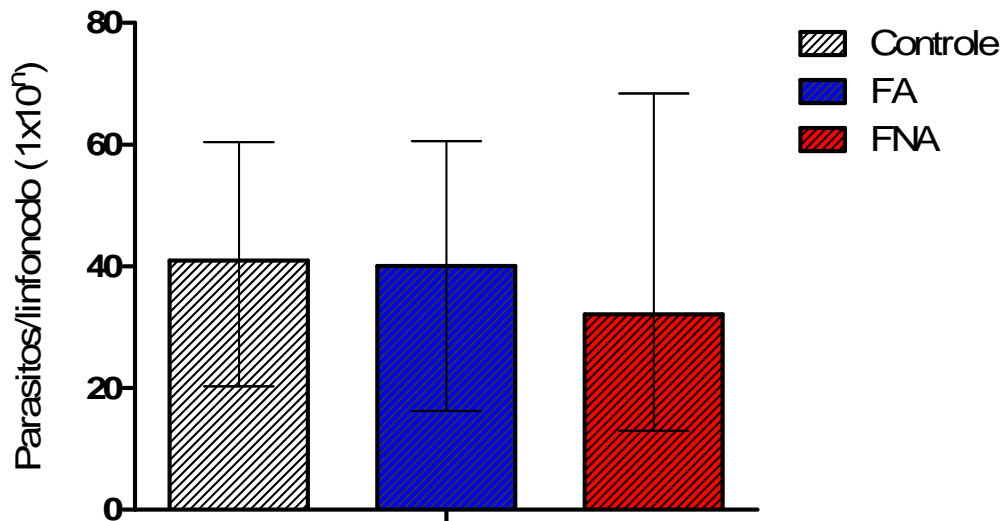


Gráfico 5. Carga parasitária em linfonodo de drenagem de hamsters 6 semanas após inoculação de 10^6 promastigotas de *Leishmania amazonensis* purificadas por *Dioclea violacea*. Os valores representam mediana de 7 a 8 animais/grupo obtidos de 1 dos 3 experimentos realizados. CT= Controle positivo, FA= Fração Aglutinada, FNA= Fração Não Aglutinada por *Dioclea violacea*.

5.5. Análise anatomopatológica

Na análise histopatológica, foram avaliados a intensidade e o tipo de exsudato, bem como o parasitismo. Todos os grupos apresentaram a mesma característica, com intenso exsudato inflamatório, histioplasmolinfocitário, com franco predomínio de macrófagos vacuolizados e parasitados, permeados por plasmócitos e escassos linfócitos. Raros animais apresentaram granulomas não organizados. Outro achado frequente foi a presença de necrose com infiltrado neutrofílico (Tabela 3). Em nenhum parâmetro houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

Tabela 3. Avaliação dos critérios histopatológicos. Cada parâmetro foi avaliado segundo presença ou ausência do evento através de escores: 0 (ausência), 1 (presença de 1-25%), 2 (presença de 26-50%), 3 (>50%) Os valores representam mediana de 8 ou 9 animais/grupo. CT= Controle positivo, FA= Fração Aglutinada, FNA= Fração Não Aglutinada por *Dioclea violacea*. MØ vacuolizado=macrófago vacuolizado, MØ não vacuolizado= macrófago não vacuolizado.

Parâmetro avaliado	CT (n=8) Mediana (min-máx)	FA (n=8) Mediana (min-máx)	FNA (n=9) Mediana (min-máx)
Exsudato	3 (3-3)	3 (2-3)	3 (2-3)
Necrose	1,5 (0-3)	2 (1-3)	2 (1-3)
Congestão	0,5 (0-1)	1 (0-2)	1 (0-1)
Neutrófilos	1 (0-2)	2 (1-2)	2 (1-2)
Linfócitos	1 (1-2)	1 (1-2)	1 (1-2)
Plasmócitos	1 (1-2)	1,5 (1-3)	1 (1-2)
MØ vacuolizado	2,5 (1-3)	2 (1-3)	2 (1-3)
MØ não vacuolizado	0,5 (0-2)	1 (0-2)	1 (0-2)
Granuloma organizado	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)
Granuloma não organizado	0,5 (0-1)	0,5 (0-1)	0 (0-1)
Edema	1,5(0-2)	1 (0-1)	2 (1-2)
Parasitismo	2(1-3)	2 (1-3)	2 (1-3)
Ulceração	1(0-1)	0 (0-1)	0 (0-1)
Σ escores	16	17	17

6. DISCUSSÃO

6. DISCUSSÃO

A aglutinação das promastigotas de *L. amazonensis* foi mais intensa durante a fase logarítmica de crescimento. As lectinas com especificidade para D-glicose/D-manose apresentaram maior poder aglutinante para a referida cepa do que as lectinas específicas para D-galactose. Esses dados corroboram com os achados de Ilg e cols. (1992) que descrevem que as leishmanias do complexo mexicana apresentam unidades repetidas de ligações de glicose em posição $\beta(1,3)$ nas cadeias laterais de LPG e de outros fosfoglicanos.

Procíclicas de *L. major* apresentam, no seu esqueleto de LPG, unidades repetidas de PO_4^- 6Gal β 1,4Man α 1 e ramificações de galactose em posição $\beta(1,3)$. Por esse motivo, as promastigotas de fase logarítmica se ligam à lectina de PNA, específica para D-galactose. Em contrapartida, durante a fase estacionária, as formas metacíclicas apresentam, nas cadeias laterais, porções terminais de arabinose $\beta(1,2)$, perdendo a capacidade de ligar-se à PNA (HANDMAN; GODING, 1985; SACKS; HIENY; SHER, 1985; MCCONVILLE *et al.*, 1992). No presente trabalho, as promastigotas de cultura de fase estacionária de *L. amazonensis*, apresentaram uma redução na ligação com as lectinas avaliadas específicas para D-galactose, bem como para D-glicose/D-manose. Isso pode indicar uma possível ocorrência de redução e/ou uma mudança conformacional dos açúcares de superfícies presentes nas formas metacíclicas da cepa em questão.

O LPG é um glicoconjugado hiperglicosado expresso em altos níveis (aproximadamente 6×10^6 moléculas/célula) em promastigota, sofrendo modificações durante as transformações do parasito no vetor. Geralmente, nas formas amastigotas sua expressão é diminuída, resultando em menos de 100 moléculas/célula (MCCONVILLE; BLACKWELL, 1991; BAHR *et al.*, 1993).

Na fase logarítmica em *L. braziliensis*, foi observado que a proporção de manose, glicose e galactose era de 3:1:3. Entretanto, durante a fase estacionária, a proporção de glicose aumenta em uma relação de 1:2:1. A estrutura do LPG de metacíclicas praticamente dobra de tamanho, devido ao alongamento da cadeia de fosfodissacarídeos e ao aparecimento de açúcares ramificados. O aumento de glicose em metacíclicas de *L. braziliensis* é consistente para explicar

a perda do reconhecimento por ligação das lectinas galactose-específicas e, por sua vez, a incapacidade de formas metacíclicas se aglutinarem (SOARES *et al.*, 2005).

Neste trabalho, a triagem delineada para a seleção de uma lectina eficaz em purificar formas metacíclicas de *L. amazonensis* decorreu em 3 etapas. Primeiro, a avaliação da aglutinação deveria atingir um percentual acima de 50 na fase logarítmica. Segundo, as lectinas selecionadas deveriam apresentar especificidade de ligação ao açúcar na superfície da *Leishmania*. Estima-se que, na fase estacionária, a quantidade de formas infectantes seja de até 10% (LIMA; TITUS, 1996). Portanto, para que ocorresse uma seleção negativa seria necessário uma aglutinação relevante das procíclicas presentes na fase estacionária, de forma que o sobrenadante pudesse apresentar uma população enriquecida de formas metacíclicas. Essa condição estaria relacionada a um baixo valor de delta entre as duas fases de crescimento.

Dessa forma, levando-se em conta o poder de aglutinação, as lectinas AIL, EFL, DVL e CFL apresentaram relevante potencial de aglutinação. No entanto, AIL e CFL foram excluídas do estudo, pelo fato de estarem ligando-se à *Leishmania* de forma inespecífica. Dessa maneira, dentre todas as lectinas estudadas através dos ensaios de bloqueio com açúcar, somente DVL e EFL mostraram-se as mais promissoras para selecionar formas metacíclicas de cultura.

A EFL apresentou elevada especificidade, além de apresentar atividade em uma concentração muito baixa (0,05 µg/mL), que diminuiria o risco de toxicidade e reduziria os custos do ensaio. Por outro lado, além da DVL apresentar melhor poder aglutinante, e menor valor de delta, seus valores de aglutinação também foram semelhantes aos descritos na literatura para BPL, que aglutinou 84% de *L. braziliensis* em fase logarítmica e 50% em fase estacionária (PINTO-DA-SILVA *et al.*, 2002). Por esses motivos, a DVL foi selecionada para comparação da virulência das frações purificadas na infecção *in vivo*.

Na infecção experimental com as frações de *L. amazonensis*, oriundas dos ensaios de purificação com DVL, esperava-se que uma das frações apresentasse maiores lesões ou que essas lesões surgissem mais precocemente do que no grupo controle, indicando uma infecção constituída por inóculo rico em metacíclicas. Em contrapartida, na outra fração, que deveria ser pobre em formas infectantes, era esperado que as lesões surgissem mais tardiamente e em proporções bem menores. No entanto, verificou-se que não houve diferença entre as duas frações

purificadas. O tempo de surgimento da lesão também foi igual para os três grupos, evidenciando que a DVL não se mostrou adequada para ser utilizada como ferramenta para enriquecimento de formas metacíclicas de *L. amazonensis*. Em estudo com *L. braziliensis*, realizado por Pinto-da-Silva e cols. (2002), foi mostrado que as lesões, induzidas em hamsters por promastigotas não aglutinadas por BPL, surgiram mais precocemente e apresentaram maiores tamanhos em relação ao controle, entretanto sem significância estatística.

Neste trabalho, os ensaios *in vitro* demonstraram que a melhor concentração de DVL para aglutinar as promastigotas de *L. amazonensis* foi 100 µg/mL. Entretanto, durante os ensaios posteriores, na purificação das frações para a infecção *in vivo*, avaliando-se com 30 e 60 minutos, percebeu-se um efeito tóxico causado pela DVL nas promastigotas, como presença de vacuolização, tumefação e lise dos parasitos após 1h de incubação nas concentrações de 100 e de 50 µg/mL. Por essa razão, o estudo *in vivo* foi delineado utilizando a concentração de 25 µg/mL. Além disso, em virtude de ter sido observada uma quantidade relevante de auto-aglutinação no controle, o tempo de incubação foi reduzido para 30 minutos, para controlar este viés. É possível que estas variáveis possam contribuir para a presença de dados conflitantes na literatura.

Estudos de Andrade e Saraiva (1999), analisando a lectina AIL, demonstraram um potencial aglutinante em diferentes graus de eficácia para três linhagens de *L. amazonensis*, com concentrações mínimas requeridas de 8, 16 e 125 µg/mL, na fase estacionária. No presente estudo, porém, avaliando a capacidade e a especificidade da aglutinação da AIL, verificou-se que, embora ela apresentasse um bom potencial de aglutinação, a ligação não parecia ser mediada pelo sítio de ligação do açúcar, também chamado de domínio de reconhecimento a carboidrato (CRD), podendo, todavia, ser decorrente de outros tipos de ligação, como por exemplo, por afinidade de carga elétrica, como observado em ensaios imunoenzimáticos (SAHA *et al.*, 2005). Este mesmo fato foi observado com a CFL (Gráfico 3).

Muitas divergências são apontadas entre os trabalhos que avaliam aglutinação com lectinas. Nagakura e cols. (1986) confirmaram aglutinação para *L. braziliensis* com ConA, *Ricinus comunis I*, *Dolichos biflorus* e *Triticum vulgaris* (WGA) e, em contrapartida, Grogl e cols. (1987) e Andrade e Saraiva (1999), não obtiveram aglutinação de *L. braziliensis* com WGA. Muskus e cols. (1997) relataram aglutinação por PNA, ConA e *Glycine max* (SBA) para *L.*

braziliensis, porém esses dados não foram reproduzidos por Pinto-da-Silva e cols. (2002). Dwyer (1977) descreveu que promastigotas de *L. donovani* foram aglutinadas por uma série de lectinas: ConA, *Lotus tetragonolobus*, SBA, WGA e *Phaseolus vulgaris* (PHA). Entretanto, estudos posteriores que utilizaram a mesma espécie de *Leishmania* e as mesmas lectinas corroboraram apenas com a aglutinação pela primeira lectina (ANDRADE; SARAIVA, 1999). Em outro momento, a ligação de *Ulex europaeus I* e WGA por *L. donovani*, relatada por Bandyopadhyay e cols. (1991), não foi observada por Sacks e cols. (1995) ou por Howard e cols. (1987) ou por Andrade e Saraiva (1999). Esses relatos demonstram uma dificuldade na reprodutibilidade dos achados. Isto poderia ser explicado por vários motivos, como a concentração, o grau de pureza ou a toxicidade das lectinas testadas. Pode dever-se também às diferenças entre as cepas de leishmanias avaliadas, à perda da virulência das cepas com o decorrer das passagens em meios de cultura, ou o tempo de cultivo dos parasitos, se no quarto ou quinto dia de cultivo. Deve-se levar em conta também a concentração inicial do inóculo na cultura, que pode acarretar em depleção precoce dos nutrientes, comprometendo a qualidade e a viabilidade do parasito. Outro fator que pode interferir, seria o tempo de incubação no ensaio de aglutinação. Neste trabalho, pode ser observado que o tempo de incubação acarretou a formação de grumos nas promastigotas sem lectinas, indicando a possível ocorrência de auto-aglutinação (dados não mostrados).

A carga parasitária não mostrou diferença significativa entre os grupos. Além disso, a similaridade entre as duas frações, bem como com o controle, indica que DVL aparentemente não discriminou formas procíclicas de metacíclicas, possivelmente por ligar-se a um glicoconjugado comum aos dois estágios evolutivos da *L. amazonensis*.

Vale ressaltar a grandeza da carga parasitária provocada por essa cepa de *L. amazonensis*. Em trabalho realizado, recentemente, por Peloi e cols. (2011), com a mesma espécie de *Leishmania* e com o mesmo modelo experimental, a carga parasitária no grupo controle foi de 10^4 leishmanias/linfonodo e o tamanho da lesão atingiu 1,5 mm, o que contrasta enormemente com os achados desta pesquisa, onde se obteve, no controle, carga parasitária na ordem de 10^{40} leishmanias/linfonodo e lesões de pata 2 vezes maiores. Quanto a isso, alguns aspectos merecem ser ponderados. Primeiro, existem variações entre as cepas da mesma espécie (ANDRADE; SARAIVA, 1999). Nos dois trabalhos foram utilizadas cepas diferentes. Segundo, o número de

passagens da cultura pode ser determinante na manutenção ou perda da virulência da cepa. No presente estudo, a cepa utilizada era continuamente reisolada de animais infectados, e usada somente até a 5ª passagem. Terceiro, o modelo utilizado (hamsters dourados), por não ser isogênico, pode apresentar variação quanto a resistência à *Leishmania*. Além disso, no presente trabalho, os achados da infecção experimental foram realizados três vezes, apresentando boa reprodutibilidade.

Os dados da histopatologia corroboram com os achados do tamanho das lesões de pata e da carga parasitária dos grupos, demonstrando que não há diferença na virulência das frações purificadas.

A utilização de lectinas como ferramenta de purificação de formas metacíclicas está sujeita a muitas variáveis, inerentes tanto ao parasito como à lectina. No entanto, geralmente os ensaios diagnósticos, bem como as infecções experimentais também estão sujeitos à estas variáveis, que podem ser contornadas com os ajustes do protocolo, para evitar os vieses metodológicos. Embora a DVL não se ligue a moléculas específicas de formas procíclicas de *L. amazonensis* e, conseqüentemente não sirva como uma ferramenta de enriquecimento de metacíclicas, isto não invalida a busca de outras lectinas que possam ser identificadas para tal fim.

7.CONCLUSÃO

7. CONCLUSÃO

- As lectinas de *Artocarpus integrifolia* (AIL) e de *Erythrina fusca* (EFL), específicas para D-galactose, e de *Dioclea violacea* (DVL) e de *Cratylia floribunda* (CFL), específicas para D-glicose/D-manose, apresentaram importante indução de aglutinação de promastigotas de *L. amazonensis*.
- As lectinas de *Erythrina fusca* (EFL), específica para D-galactose, e de *Dioclea violacea* (DVL), específica para D-glicose/D-manose, se ligaram especificamente ao açúcar da *Leishmania*, enquanto que *Artocarpus integrifolia* (AIL) e *Cratylia floribunda* (CFL) se ligaram de maneira inespecífica.
- A separação das frações por *Dioclea violacea* não foi eficaz para aglutinar seletivamente formas infectantes de *L. amazonensis*.

8. REFERÊNCIAS

8. REFERÊNCIAS

Adl SM, Simpson AG, Farmer MA, Andersen RA, Anderson OR, Barta JR, Bowser SS, Brugerolle G, Fensome RA, Fredericq S, James TY, Karpov S, Kugrens P, Krug J, Lane CE, Lewis LA, Lodge J, Lynn DH, Mann DG, Mccourt RM, Mendoza L, Moestrup O, Mozley-Standridge SE, Nerad TA, Shearer CA, Smirnov AV, Spiegel FW, Taylor MF. The new higher level classification of eukaryotes with emphasis on the taxonomy of protists. **The Journal of Eukaryotic Microbiology**. 52(5):399-451; 2005.

Adler S, Theodor O. Investigations on Mediterranean Kala-azar I-V. **Proceedings of Royal Society**. Series B;108: 447-502; 1931.

Alencar VBM, Alencar NMN, Assreuy AMS, Mota LM, Brito GAC, Aragão KS, Bittencourt FS, Pinto VPT, Debray M, Ribeiro RA, Cavada BS. Pro-inflammatory effect of *Arum maculatum* lectin and role of resident cells. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology** 37, p. 1805-1814. 2005.

Alexander J, Satoskar AR, Russell DG. *Leishmania* species: models of intracellular parasitism. **Journal of Cell Science**. 18: 2993-3002; 1999.

Almeida MC, Cuba CA, De Sa CM, Pharoah MM, Howard KM, Miles MA. Metacyclogenesis of *Leishmania (Viannia) braziliensis* in vitro: evidence that lentil lectin is a marker of complement resistance and enhanced infectivity. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**. 87, 325–329, 1993.

Anderson CF, Stumhofer JS, Hunter CA, Sacks D. IL-27 regulates IL-10 and IL-17 from CD4+ cells in nonhealing *Leishmania major* infection. **Journal of Immunology**. 183(7):4619-27, 2009.

Andrade AFB, Saraiva EMB. Lectin-binding properties of different *Leishmania* species. **Parasitology Research**. 85, 576-81; 1999.

Andrade ZA, Reed SG, Roters SB, Sadigursky M. Immunopathology of experimental cutaneous leishmaniasis. **The American Journal of Pathology**. 114(1):137-48, 1984.

Awasthi A, Mathur RK, Saha B. Immune response to *Leishmania* infection. **The Indian Journal of Medical Research.** 119(6):238-58; 2004.

Badaro R, Jones TC, Carvalho EM, Sampaio D, Reed SG, Barral A, Teixeira R, Johnson WD Jr. New perspectives on a subclinical form of visceral leishmaniasis. **The Journal of Infection Diseases.** 154(6):1003-11, 1986a.

Badaro R, Jones TC, Lorenço R, Cerf BJ, Sampaio D, Carvalho EM, Rocha H, Teixeira R, Johnson WD Jr. A prospective study of visceral leishmaniasis in an endemic area of Brazil. **The Journal of Infection Diseases.** 154(4):639-49, 1986b.

Bahr V, Stierhof YD, Ilg T, Demar M, Quinten M, Overath P. Expression of lipophosphoglycan, high-molecular weight phosphoglycan and glycoprotein 63 in promastigotes and amastigotes of *Leishmania mexicana*. **Molecular and Biochemical Parasitology.** 58(1):107-21; 1993.

Bandyopadhyay P, Ghosh DK, De A, Ghosh KN, Chaudhuri PP, Das P, Bhattacharya A. Metacyclogenesis of *Leishmania* spp: species-specific in vitro transformation, complement resistance, and cell surface carbohydrate and protein profiles. **The Journal of Parasitology.** 77(3):411-6, 1991.

Bañuls AL, Hide M, Prugnot F. *Leishmania* and the Leishmaniases: A Parasite Genetic Update and Advances in Taxonomy, Epidemiology and Pathogenicity in Humans. **Advances in Parasitology.** 64, 2007.

Barral A, Pedral-Sampaio D, Grimaldi Júnior G, Momen H, McMahon-Pratt D, Ribeiro de Jesus A, Almeida R, Badaro R, Barral-Netto M, Carvalho EM, Johnson WD. Leishmaniasis in Bahia, Brazil: evidence that *Leishmania amazonensis* produces a wide spectrum of clinical disease. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene.** 44: 536-546, 1991.

Barral-Netto M, Von Sohsten RL, Teixeira M, dos Santos WL, Pompeu ML, Moreira RA, Oliveira JT, Cavada BS, Falcoff E, Barral A. In vivo protective effect of the lectin from *Canavalia brasiliensis* on BALB/c mice infected by *Leishmania amazonensis*. **Acta Tropica.** 60(4):237-50, 1996

Belkaid Y, Mendez S, Lira R, Kadambi N, Milon G, Sacks D. A natural model of *Leishmania major* infection reveals a prolonged "silent" phase of parasite amplification in the skin before the onset of lesion formation and immunity. **The Journal of Immunology**. 15;165(2):969-77, 2000.

Boyton RJ, Altmann, DM.. Is selection for TCR affinity a factor in cytokine polarization? **Trends in Immunology**. 23, 526–529, 2002.

Brittingham A, Morrison CJ, McMaster WR, Mcgwire BS, Chang KP, Mosser DM. Role of the *Leishmania* surface protease gp63 in complement fixation, cell adhesion, and resistance to complement-mediated lysis. **Journal of Immunology**. 15;155(6):3102-11; 1995.

Burns JM Jr, Scott JM, Carvalho EM, Russo DM, March CJ, Van Ness KP, Reed SG. Characterization of a membrane antigen of *Leishmania amazonensis* that stimulates human immune responses. **Journal of Immunology**. 15;146(2):742-8, 1991.

Calvete JJ, Costa FH, Saker-Sampaio S, Murciano MP, Nagano CS, Cavada BS, Grangeiro TB, Ramos MV, Bloch C Jr, Silveira SB, Freitas BT, Sampaio AH. The amino acid sequence of the agglutinin isolated from the red marine alga *Bryothamnion triquetrum* defines a novel lectin structure. **Cellular Molecular Life Science**. 57, 343-350. 2000.

Campanelli AP, Roselino AM, Cavassani KA, Pereira MS, Mortara RA, Brodskyn CI, Goncalves HS, Belkaid Y, Barral-Netto M, Barral A, Silva JS. CD4+CD25+ T cells in skin lesions of patients with cutaneous leishmaniasis exhibit phenotypic and functional characteristics of natural regulatory T cells. **The Journal of Infectious Diseases**. 1;193(9):1313-22; 2006.

Cavada BS, Granjeiro TB, Ramos MV, Cordeiro EF, Oliveira JTA, Moreira RA. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**. v. 8(1), p. 31-36. 1996a.

Cavada BS, Ramos MV, Cordeiro EF, Granjeiro TB, Oliveira JTA, Carvalho AFFU, Moreira RA. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**. v. 8(1), p. 37-42. 1996b.

Chan J, Fujiwara T, Brennan P, Mcneil M, Turco SJ, Sihille JC. Microbial glycolipids: possible virulence factors that scavenge oxygen radicals. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**. 86(7):2453-7; 1989.

Chang KP, Chaudhuri G, Fong D. Molecular determinants of *Leishmania* virulence. **Annual Review of Microbiology**. 44: 499-529, 1990.

Chaves CS, Soares DC, Da Silva RP, Saraiva EM. Characterization of the species- and stage-specificity of two monoclonal antibodies against *Leishmania amazonensis*. **Experimental Parasitology**. 103(3-4):152-9, 2003.

Courret N, Prina E, Mougneau E, Saraiva EM, Sacks DL, Glaichenhaus N, Antoine JC. Presentation of the *Leishmania* antigen LACK by infected macrophages is dependent upon the virulence of the phagocytosed parasites. **European Journal of Immunology**. 29, 762–773, 1999.

Da Silva RP, Hall BF, Joiner KA, Sacks DL. CR1, the C3b receptor, mediates binding of infective *Leishmania major* metacyclic promastigotas to human macrophages. **Journal of Immunology**. 143:617–622, 1989.

Davies CR, Cooper AM, Peacock C, Lane RP, Blackwell JM. Expression of LPG and GP63 by different developmental stages of *Leishmania major* in the sandfly *Phlebotomus papatasi*. **Parasitology**. 101 Pt 3:337-43, 1990.

Dawidowicz K, Hernandez AG, Infante RB, Convit J. The surface membrane of *Leishmania*. I. The effects of lectins on different stages of *L. braziliensis*. **The Journal of parasitology**. 61: 950-953, 1975.

De Pita-Pereira D, Cardoso MA, Alves CR, Brazil RP, Britto C. Detection of natural infection in *Lutzomyia cruzi* and *Lutzomyia forattinii* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) by *Leishmania infantum chagasi* in an endemic area of visceral leishmaniasis in Brazil using a PCR multiplex assay. **Acta Tropica**. 107(1):66-9, 2008.

Desjeux, P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**. 27:305–318, 2004.

Doherty TM, Coffman RL. *Leishmania tropica*: Effect of infectious dose on T cell subset development in BALB/c mice **Experimental Parasitology**. 84:97-103, 1996.

Doran TI, Herman R. Characterization of populations of promastigotes of *L. donovani*. **The Journal of protozoology**. 1981; 28: 345±350; 1981.

Dwyer DM. *L. donovani*: surface membrane carbohydrates of promastigotes. **Experimental Parasitology**. 41: 341±358; 1977.

Dwyer DM. Lectin binding saccharides on a parasitic protozoan. **Science**. 184: 471±473; 1974.

Etges R, Bouvier J, Bordier C. The major surface protein of *Leishmania promastigotes* is anchored in the membrane by a myristic acidlabeled phospholipid. **The EMBO Journal**. 5:597–601, 1986.

Goldstein IJ, Poretz RD. In The Lectins. Properties, functions, and Applications In Biology And Medicine, ed. I .E. Liener, N. Sharon and J. Goldstein. **Academic Press**, Orlando, p.33, 1986.

Gontijo B, De Carvalho MDE. L. Leishmaniose tegumentar Americana. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. 36(1):71-80; 2003.

Gorocica P, Monroy A, Rivas B, Estrada-Parra S, Leroy Y, Chávez R, Zenteno E. Purification of the lipophosphoglycan from two *Leishmania mexicana* strains by lectin affinity chromatography. **Preparative Biochemistry and Biotechnology**. 27(1):1-17; 1997.

Granjeiro TB, Gatehouse JA, Pereira MN, Cavada BS. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**. v. 9(1), p. 9-13. 1997.

Grimaldi GJR, McMahan-Pratt D. Leishmaniasis and its etiologic agents in the New World: an overview. **Progress in Clinical Parasitology**. 2, p.73-118, 1991.

Grimaldi GJR, Momem H, Naiff RD, McMahan-Pratt D, Marrett TV. Characterization and classification of leishmanial parasites from humans, wild mammals, and sand flies in the Amazon region of Brazil. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. 44, n.6, p.645-61, 1991.

Grogl M, Franke ED, McGreevy PB, Kuhn RE. *L. braziliensis* protein, carbohydrate and antigen differences between log phase and stationary phase promastigotes in vitro. **Experimental Parasitology**. 83: 352±359; 1987.

Gueugnot J, Guillot J, Damez M, Coulet M. Identification and taxonomy of human and animal leishmaniasis by lectin mediated agglutination. **Acta Tropica (Basel)**. 41: 135±143; 1984.

Kahl LP, McMahon-Pratt D. Structural and antigenic characterization of a species- and promastigote-specific *Leishmania mexicana amazonensis* membrane protein. **Journal of Immunology**. 1;138(5):1587-95, 1987.

Handman E, Goding JW. The *Leishmania* receptor for macrophages is a lipid-containing glycoconjugate. **The EMBO Journal**. 4:329; 1985.

Handman E, Greenblatt CL, Goding JW. An amphipathic sulphated glycoconjugate of *Leishmania*: characterization with monoclonal antibodies. **The EMBO Journal**. 3(10):2301-6; 1984.

Howard, MK, Sayers G, Miles MA. *L. donovani* metacyclic promastigotes: transformation in vitro, lectin agglutination, complement resistance and infectivity. **Experimental Parasitology**. 64: 147±179; 1987.

Ilg T, Etges R, Overath P, McConville MJ, Thomas-Oates J, Thomas J, Homans SW, Ferguson MA. Structure of *Leishmania mexicana* lipophosphoglycan. **The Journal of Biological Chemistry**. 5;267(10):6834-40, 1992.

Ilg T. Proteophosphoglycans of *Leishmania*. **Parasitology Today**. 16: 489–497, 2000.

Ilg T, Handman E, Stierhof YD. Proteophosphoglycans from *Leishmania* promastigotes and amastigotes. **Biochemical Society Transactions**. 27(4):518-25, 1999.

Ilgoutz SC, Mcconville MJ. Function and assembly of the *Leishmania* surface coat. **International Journal for Parasitology**. 31(9):899-908; 2001.

Jacobson RL, Seutzey GM, Greenblatt CL, Schnur LF. Surface reaction of *Leishmania*. I. Lectin mediated agglutination. **Annls of Tropical Medicine and Parasitology**. 76: 45±52; 1982.

Karp CL, Turco SJ, Sacks DL. Lipophosphoglycan masks recognition of the *Leishmania donovani* promastigote surface by human kala-azar serum. **Journal of Immunology**. 15;147(2):680-4, 1991.

Kelleher M, Curtis JM, Sacks DL, Handman E, Bacic A. Epitope mapping of monoclonal antibodies directed against lipophosphoglycan of *Leishmania major* promastigotes. **Molecular and Biochemical Parasitology**. 187-200, 1994.

Killick-Kendric R. The life-cycle of *Leishmania* in the sandfly with special reference to the form infective to the vertebrate host. **Annales de Parasitologie Humaine et Comparée**. 65: 37-42; 1990a.

Killick-Kendric R. Phlebotomine vectors of the leishmaniasis: a review. **Medical Veterinary Entomology**. 4(1):1-24; 1990b.

Killick-Kendric R. Biology of *Leishmania* in phlebotomine sandflies. In Killick-Kendric R, Peters W (eds), *The Leishmaniasis in Biology and Medicine*, Academic Press, London, p. 392-460; 1987.

Kweider M, Lemesre JL, Santoro F, Kusnierz JP, Sadigursky M, Capron A. Development of metacyclic *Leishmania* promastigotes is associated with the increasing expression of GP65, the major surface antigen. **Parasite Immunology**. 11(3):197-209; 1989.

Lainson R, Rangel EF. *Lutzomyia longipalpis* and the eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil - A Review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. 100(8):811-27, 2005.

Lainson R, Ryan L, Shaw JJ. Infective stages of *Leishmania* in the sand fly vector and some observations on the mechanism of transmission. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. 82:421-4, 1987.

Lainson R, Shaw JJ. Evolution, classification and geographical distribution. Em: W. Peters and R. Killick-Kendrick, eds.; “The Leishmaniasis in Biology and Medicine”, London, **Academic Press**; 1, p.1-119, 1987.

Liese J, Schleicher UB, Bogdan C. The innate immune response against *Leishmania* parasites. **Immunobiology**. 213, 377–387, 2008.

Lima HC, Titus RG. Effects of Sand Fly Vector Saliva on Development of Cutaneous Lesions and the Immune Response to *Leishmania braziliensis* in BALB/c Mice. **Infection and Immunity**. 64, 5442–5445, 1996.

Lima LFA. **A influência do gênero e da infecção materna na resposta à *Leishmania braziliensis* em filhotes de hamster**. 52f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Ceará, Mestrado em Patologia, Fortaleza-Ce, 2008.

Lira R, Mendez S, Carrera L, Jaffe C, Neva F, Sacks D. *Leishmania tropica*: the identification and purification of metacyclic promastigotes and use in establishing mouse and hamster models of cutaneous and visceral disease. **Experimental Parasitology**. 89, 331– 342, 1998.

Loris R, Hamelryck T, Bouckaert J & Wyns L. Legume lectin structure. **Biochimica et Biophysica Acta**. 383, 9 -36, 1998.

Mahoney AB, Sacks DL, Saraiva EMB, Modi GB, Turco SJ. Intra-species and stage-specific polymorphisms in lipophosphoglycan structure control *Leishmania donovani*-sand fly interactions. **Biochemistry**. 38, 9813–9823, 1999.

Marzochi MC. A Leishmanioses no Brasil: as leishmanioses tegumentares. **Jornal Brasileiro de Medicina**. 63: 82-104, 1992.

Mcconville MJ, Mullin KA, Ilgoutz SC, Teasdale RD. Secretory pathway of trypanosomatid parasites. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**. 6(1):122-54; 2002.

McConville MJ, Schnur LF, Jaffe C, Schneider P. Structure of *Leishmania* lipophosphoglycan: inter- and intra-specific polymorphism in Old World species. **The Biochemical Journal**. 15;310 (Pt 3):807-18, 1995.

McConville MJ, Ferguson MA. The structure, biosynthesis and function of glycosylated phosphatidylinositols in the parasitic protozoa and higher eukaryotes. **The Biochemical Journal**. 1;294 (Pt 2):305-24, 1993.

McConville MJ, Turco SJ, Ferguson MA, Sacks DL. Developmental modification of lipophosphoglycan during the differentiation of *Leishmania major* promastigotes to an infectious stage. **The EMBO Journal**. Vol. 11, 3593–3600, 1992.

McConville MJ, Blackwell JM. Developmental changes in the glycosylated phosphatidylinositols of *Leishmania donovani*. Characterization of the promastigote and amastigote glycolipids. **The Journal of Biological Chemistry**. 15;266(23):15170-9; 1991.

McConville MJ, Thomas-Oates JE, Ferguson MA, Homans SW. Structure of the lipophosphoglycan from *Leishmania major*. **The Journal of Biological Chemistry**. 15;265(32):19611-23, 1990.

Mcneely TB, Turco SJ. Requirement of lipophosphoglycan for intracellular survival of *Leishmania donovani* within human monocytes. **Journal of Immunology**. 144(7):2745-50; 1990.

Menon JN, Bretscher PA. Characterization of the immunological memory state generated in mice susceptible to *Leishmania major* following exposure to low doses of *L. major* and resulting in resistance to a normally pathogenic challenge. **European Journal of Immunology**. 26(1):243-9, 1996.

Menon JN, Bretscher PA. Parasite dose determines the Th1/Th2 nature of the response to *Leishmania major* independently of infection route and strain of host or parasite. **European Journal of Immunology**. 28:4020-8, 1998.

Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. – **Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana** - 2. ed. Brasília. Editora: MINISTÉRIO DA SAÚDE, p.182, 2007.

Missawa NA, Veloso MA, Maciel GB, Michalsky EM, Dias ES. Evidence of transmission of visceral leishmaniasis by *Lutzomyia cruzi* in the municipality of Jaciara, State of Mato Grosso, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. 44(1):76-8, 2011.

Moody SF. Molecular variation in *Leishmania*. **Acta Tropica (Basel)**. 53: 185±204; 1993.

Moreira RA, Cavada BS. **Biologia Plantarum**. v. 26 (2), p.113-120. 1984.

Moreira RA, Cordeiro EF, Ramos MV, Granjeiro TB, Martins JL, Oliveira JTA, Cavada BS. **Revista Brasileira Fisiologia Vegetal**. v. 8(1), p. 23-30. 1996.

Muskus C, Segura I, Oddone R, Turco SJ, Leiby DA, Toro L, Robledo S, Saravia NG. Carbohydrate and LPG expression in *Leishmania viannia* subgenus. **The Journal of Parasitology**. 83(4):671-8, 1997.

Naderer T, Vince JE, McConville MJ. Surface determinants of *Leishmania* parasites and their role in infectivity in the mammalian host. **Currente Molecular Medicine**. 4(6):649-65, 2004.

Nagakura K, Tachibana H, Kaneda Y, Nakae T. *Leishmania braziliensis*: localization of glycoproteins in promastigotes. **Experimental Parasitology**. 61: 335±342; 1986.

Nurieva RI, Chung Y, Hwang D, Yang XO, Kang HS, Ma L, Wang YH, Watowich SS, Jetten AM, Tian Q, Dong C. Generation of T follicular helper cells is mediated by interleukin-21 but independent of T helper 1, 2, or 17 cell lineages. **Immunity**. 29, 138–149, 2008.

Oliveira JTA, Cavada BS, Moreira RA. **Revista Brasileira de Botânica**, v.14, p. 61-66. 1991.

Orlandi PA Jr, Turco SJ. Structure of the lipid moiety of the *Leishmania donovani* lipophosphoglycan. **The Journal Biological Chemistry**. 25;262(21):10384-91, 1987.

Otranto D, Dantas-Torres F. Canine and feline vector-borne diseases in Italy: current situation and perspectives. **Parasites and Vectors**. 11;3:2, 2010.

Peck A, Mellins ED. Plasticity of T-cell phenotype and function: the T helper type 17 example. **Immunology**. 129(2):147-53, 2010.

Peloi LS, Biondo CE, Kimura E, Politi MJ, Lonardon MV, Aristides SM, Dorea RC, Hioka N, Silveira TG. Photodynamic therapy for American cutaneous leishmaniasis: the efficacy of methylene blue in hamsters experimentally infected with *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. **Experimental Parasitology**. 128(4):353-6, 2011

Peumans WJ, Van Damme, EJM. In Lectins, Biology-Biochemistry. **Clinical Biochemistry**, Vol. 10, ed E. Van Driesche, J.Fischer, S. Beeckman and T. C. Bog – Hansen. TEXTOP, Hellerup, Denmark, 1994.

Pimenta PF, Turco SJ, Mcconville MJ, Lawyer PG, Perkins PV, Sacks DL. Stage-specific adhesion of *Leishmania* promastigotes to the sandfly midgut. **Science**. 256:1812-1815; 1992.

Pinto-da-Silva LH, Camurate M, Costa KA, Oliveira SM, Da Cunha-e-Silva NL, Saraiva EM. *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, 1371–1377, 2002.

Puentes SM, Da Silva RP, Sacks DL, Hammer CH, Joiner K. Serum resistance of metacyclic stage *Leishmania major* promastigotes is due to release of C5b-9. **Journal of Immunology**. 145:4311–4316, 1990.

Ribeiro JM. Blood-feeding arthropods: live syringes or invertebrate pharmacologists? **Infectious Agents and Diseases**. 4(3):143-52, 1995.

Rodrigues OR, Marques C, Soares-Clemente M, Ferronha MH, Santos-Gomes GM. Identification of regulatory T cells during experimental *Leishmania infantum* infection. **Immunobiology**. 214(2):101-11; 2009.

- Roseman S. Reflections on glycobiology. **The Journal of Biological Chemistry**. 9;276(45):41527-42; 2001.
- Rossell RJ, Stevens AF, Miles MA, Allen AK. A comparison of the lectin binding properties of glycoconjugates from a range of *Leishmania* species. **Parasitology Research**. 76: 294±300; 1990.
- Ryan KA, Garraway LA, Descoteaux A, Turco SJ, Beverley SM. Isolation of virulence genes directing surface glycosyl-phosphatidylinositol synthesis by functional complementation of *Leishmania*. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**. 15;90(18):8609-13, 1993.
- Sacks DL, Hieny S, Sher A. Identification of cell surface carbohydrate and antigenic changes between noninfective and infective stages of *L. major* promastigotes. **Journal of Immunology**. 135: 564± 569, 1985.
- Sacks DL, Kamhawi S. Molecular aspects of parasite-vector and vector-host interactions in Leishmaniasis. **Annual Review of Microbiology**. 55, 453–483, 2001.
- Sacks DL, Pimenta PF, McConville MJ, Schneider P, Turco SJ. Stage-specific binding of *Leishmania donovani* to the sand fly vector midgut is regulated by conformational changes in the abundant surface lipophosphoglycan. **Journal of Experimental Medicine**. 181, 685–697, 1995.
- Sacks DL, Saraiva EM, Rowton E, Turco SJ, Pimenta PF. The role of the lipophosphoglycan of *Leishmania* in vector competence. **Parasitology**. 108 Suppl:S55-62, 1994.
- Sacks DL, Brodin TN, Turco SJ. Developmental modification of the lipophosphoglycan from *Leishmania major* promastigotes during metacyclogenesis. **Molecular and Biochemical Parasitology**. 42(2):225-33, 1990.
- Saf’janova VM. Classificação do gênero *Leishmania* Ross, capítulo 11, págs 95-101. Em “**As Leishmânias. Protozoologia – parte 7**”. Academia de Ciências, União Russa das Sociedades de Protozoologistas, Leningrado, URSS. 1982. APUD Laison R, Shaw JJ. 1987.

Saha S, Mazumdar T, Anam K, Ravindran R, Bairagi B, Saha B, Goswami R, Pramanik N, Guha SK, Kar S, Banerjee D, Ali N. *Leishmania* promastigote membrane antigen-based enzyme-linked immunosorbent assay and immunoblotting for differential diagnosis of Indian post-kala-azar dermal leishmaniasis. **Journal of Clinical Microbiology**. 43(3):1269-77, 2005.

Sanz-Aparacio J, Hermoso J, Granjeiro TB, Calvete JJ, Cavada BS. The crystal structure of *Canavalia brasiliensis* lectin suggests a correlation between its quaternary conformation and its distinct biological properties from Concanavalin A. **FEBS Letters**. 405: 114-118, 1997.

Saraiva EM, Pimenta PF, Brodin TN, Rowton E, Modi GB, Sacks DL. Changes in lipophosphoglycan and gene expression associated with the development of *Leishmania major* in *Phlebotomus papatasi*. **Parasitology**. 111 (Pt 3):275-87, 1995.

Saraiva EMB, Andrade AFB, Pereira MEA. Cell surface carbohydrates of *L. mexicana amazonensis*: differences between infective and noninfective forms. **European Journal of Cell Biology**. 40: 219±225; 1986.

Schlein Y, Jacobson RL, Shlomai J. Chitinase secreted by *Leishmania* functions in the sandfly vector. **Proceedings. Biological Science/The Royal Society**. 245:121–26, 1991.

Schottelius, J. Lectin binding strain specific carbohydrates of the cell surfaces of *Leishmania* strains from the Old World. **Zeitschrift für Parasitenkunde**. 66: 237±247; 1982.

Sharon N, Lis H. **Lectins**, 2 ed. Heidelberg: Springer. 470p, 2004.

Shevach EM. Mechanisms of Foxp3+ T regulatory cell-mediated suppression. **Immunity**. 30, 636–645, 2009.

Simões-Mattos L, Bevilaqua CML, Mattos MRF, Pompeu MML. Feline *Leishmaniasis*: uncommon or unknown? **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**. 99, n.550,79-87, 2004.

Soares RP, Cardoso TL, Barron T, Araújo MS, Pimenta PF, Turco SJ. *Leishmania braziliensis*: a novel mechanism in the lipophosphoglycan regulation during metacyclogenesis. **International Journal for Parasitology**. 35(3):245-53, 2005.

Späth GF, Beverley SM. A lipophosphoglycan-independent method for isolation of infective *Leishmania* metacyclic promastigotes by density gradient centrifugation. **Experimental Parasitology**. 99(2):97-103, 2001.

Svárovská A, Ant TH, Seblová V, Jecná L, Beverley SM, Volf P. *Leishmania major* glycosylation mutants require phosphoglycans (lpg2-) but not lipophosphoglycan (lpg1-) for survival in permissive sand fly vectors. **PLoS Neglected Tropical Diseases**.12;4(1):e580, 2010.

Taswell, C. Limiting dilution assays for the determination of immunocompetent cell frequencies III. Validity tests for the single-hit Poisson model. **Journal of Immunological Methods**. 72, 29-40, 1984.

Teixeira MJ, Fernandes JD, Teixeira CR, Andrade BB, Pompeu ML, Santana da Silva J, Brodskyn CI, Barral-Netto M, Barral A. Distinct *Leishmania braziliensis* isolates induce different paces of chemokine expression patterns. **Infection and Immunity**. 73(2):1191-5, 2005.

Titus RG, Ceredig R, Cerottini JC, Louis JA. Therapeutic effect of anti-L3T4 monoclonal antibody GK1.5 on cutaneous leishmaniasis in genetically-susceptible BALB/c mice. **Journal of Immunology**. 135(3):2108-14, 1985.

Tripathi P, Singh V, Naik S. Immune response to *Leishmania*: paradox rather than paradigm. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**. 51(2):229-42, 2007.

Turco SJ, Orlandi PA Jr, Homans SW, Ferguson MA, Dwek RA, Rademacher TW. Structure of the phosphosaccharide-inositol core of the *Leishmania donovani* lipophosphoglycan. **The Journal of Biological Chemistry**. 25;264(12):6711-5, 1989.

Turco SJ, Hull SR, Orlandi PA Jr, Shepherd SD, Homans SW, Dwek RA, Rademacher TW. Structure of the major carbohydrate fragment of the *Leishmania donovani* lipophosphoglycan. **Biochemistry**. 22;26(19):6233-8, 1987.

Turco SJ. Glycoconjugates of *Leishmania*. 1996. Em: J. Montreuil, JFG Vliegthart, H Schachter, eds., "Glycoproteins and disease", 113-124. **Amsterdam-Netherlands, Elsevier Science B.V.**

Vale ECS, Furtado T. Leishmaniose tegumentar no Brasil: revisão histórica da origem, expansão e etiologia. **Anais Brasileiros de Dermatologia**. 80(4):421-8, 2005.

Vasconcelos IM, Cavada BS, Moreira RA, Oliveira JTA. **Food Biochemistry**. 15, p. 137-154. 1991.

Vides JP, Schwardt TF, Sobrinho LS, Marinho M, Laurenti MD, Biondo AW, Leutenegger C, Marcondes M. *Leishmania chagasi* infection in cats with dermatologic lesions from an endemic area of visceral leishmaniasis in Brazil. **Veterinary Parasitology**. 31;178(1-2):22-8, 2011.

Vignali DA, Collison LW, Workman CJ. How regulatory T cells work. **Nature Review. Immunology**. 8, 523–532, 2008.

Vogelzang A, McGuire HM, Yu D, Sprent J, Mackay CR, King C. A fundamental role for interleukin-21 in the generation of T follicular helper cells. **Immunity**. 29, 127–137, 2008.

Volf P, Myskova J. Sand flies and *Leishmania*: specific versus permissive vectors. **Trends Parasitology**. 23: 91–92, 2007.

Volf P, Skarupová S, Man P. Characterization of the lectin from females of *Phlebotomus duboscqi* sand flies. **European Journal of Biochemistry**. 269(24):6294-301, 2002.

Warburg A, Schlein Y. The effect of post-bloodmeal nutrition of *Phlebotomus papatasi* on the transmission of *Leishmania major*. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. 35(5): 926-30, 1986.

Wilson ME, Pearson RD. Stage-specific variations in lectin binding to *L. donovani*. **Infection and Immunity**. 46: 128±134; 1984.

Winter G, Fuchs M, McConville MJ, Stierhof YD, Overath P. Surface antigens of *Leishmania mexicana* amastigotes: characterization of glycoinositol phospholipids and a macrophage-derived glycosphingolipid. **Journal of Cell Science**. 107:2471-82, 1994.

World Health Organization. **Report of a meeting of the Control of Leishmaniasis**. Geneva, 22-26 March, 2010.

Zhou L, Chong, MMW, Littman, DR. Plasticity of CD4+ T Cell Lineage Differentiation. **Immunity Review**. 30:646-655, 2009;

Zhu J, Yamane H, Paul WE. Differentiation of effector CD4 T cell populations (*). *Annual Review of Immunology*. 28:445-89, 2010.

ANEXO – A



Universidade Federal do Ceará
Comissão de Ética em Pesquisa Animal – CEPA
Rua: Coronel Nunes de Melo, 1127 Rodolfo Teófilo
Cep: 60430-970 Fortaleza-CE
Tel: (85) 3366.8331 Fax: (85) 3366.8333

DECLARAÇÃO

Declaramos que o protocolo para uso de animais em experimentação n° 19/2011, sobre o projeto intitulado: **“AVALIAÇÃO DA AGLUTINAÇÃO DE *Leishmania amazonensis* INDUZIDA POR LECTINA DE *Dioclea violacea* (DVL) COMO MÉTODO PARA PURIFICAÇÃO DE PROMASTIGOTAS METACÍCLICAS”**, de responsabilidade de Juliana Montezuma Barbosa, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

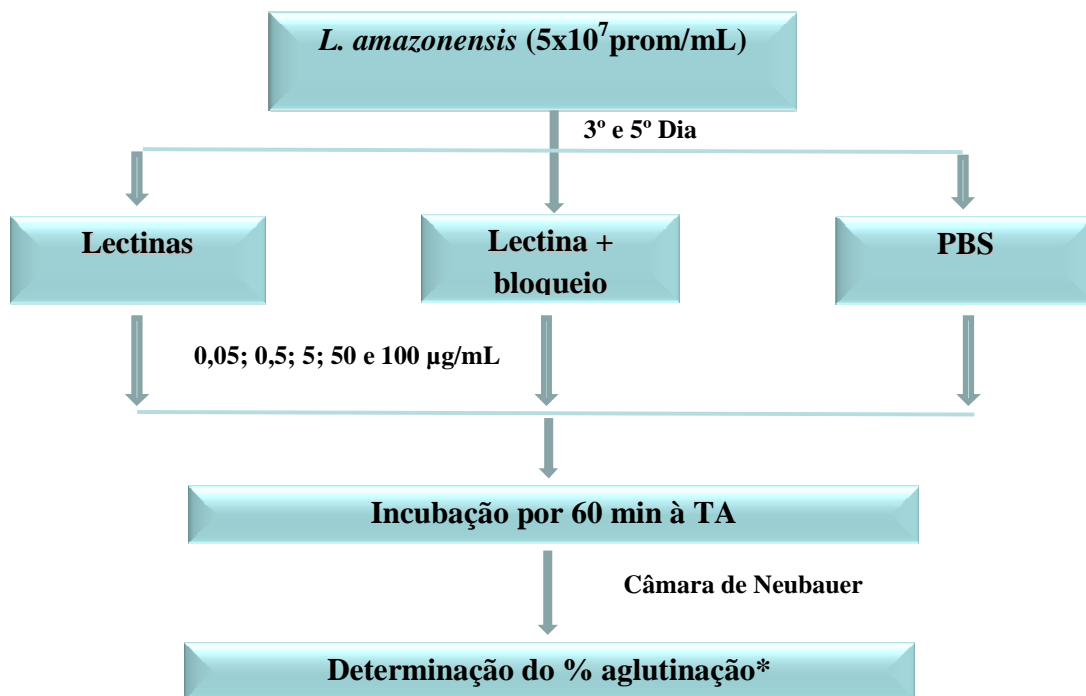
Declaramos ainda que o referido projeto foi aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa Animal – CEPA – em reunião realizada em 29 de agosto de 2011.

Fortaleza, 30 de agosto de 2011.

Profa. Dra. Nylane Maria Nunes de Alencar
Coordenadora da Comissão de Ética em Pesquisa Animal – CEPA

APÊNDICE – A

Desenho esquemático do ensaio de aglutinação de *Leishmania amazonensis* mediada por lectinas específicas para D-galactose e D-glicose/D-manose em várias concentrações



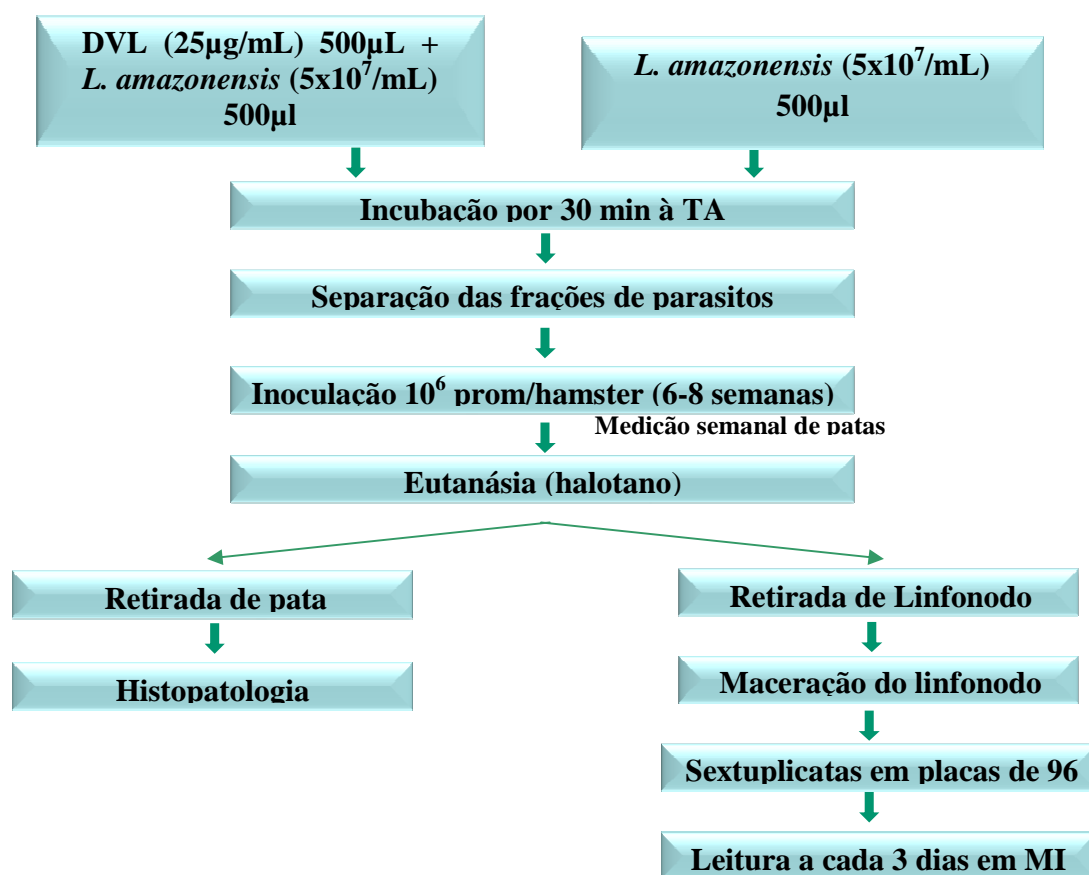
* O percentual de aglutinação foi determinado pela fórmula: $[1 - (\text{número de promastigotas livres da amostra com lectina} / \text{número de promastigotas livres do controle})] \times 100$

TA= Temperatura ambiente

Adaptado de SACKS; HIENY; SHER, 1985; PINTO-DA-SILVA *et al.*, 2002

APÊNDICE – B

Desenho esquemático do ensaio de purificação de metacíclicas de *Leishmania amazonensis* por lectina de *Dioclea violacea* (DVL) e separação das frações



TA= Temperatura ambiente

MI- Microscópio invertido

Adaptado de SACKS; HIENY; SHER, 1985; PINTO-DA-SILVA *et al.*, 2002

APÊNDICE – C

Tamanho das lesões de patas de hamsters infectados com 10^6 promastigotas de *L. amazonensis*. CT= Controle positivo, FA= Fração aglutinada, FNA= Fração não aglutinada por *Dioclea violacea*.

CT (n=8)	1ª sem	2ª sem	3ª sem	4ª sem	5ª sem	6ª sem
Mediana (mm)	0,0250	0,0450	0,3750	2,005	3,150	3,615
(Máx – min)	(0,01 – 0,04)	(0,01 – 0,13)	(0,10 – 0,80)	(0,99 – 2,44)	(2,37 – 3,82)	(2,49 – 4,28)

FA (n=8)	1ª sem	2ª sem	3ª sem	4ª sem	5ª sem	6ª sem
Mediana (mm)	0,0500	0,0400	0,3400	2,045	3,225	3,730
(Máx – min)	(0,01 – 0,06)	(0,02 – 0,17)	(0,12 – 0,57)	(1,20 – 2,43)	(2,33 – 3,65)	(2,22 – 4,20)

FNA (n=9)	1ª sem	2ª sem	3ª sem	4ª sem	5ª sem	6ª sem
Mediana (mm)	0,0300	0,0200	0,1600	1,120	2,250	3,070
(Máx – min)	(0,00 – 0,06)	(0,02 – 0,06)	(0,05 – 0,44)	(0,77 – 1,58)	(1,62 – 3,25)	(1,95 – 4,27)

APÊNDICE – D

Carga parasitária em linfonodo poplíteo de hamsters infectados com 10^6 promastigotas de *L. amazonensis*, após 9 semanas de infecção. CT= Controle positivo, FA= Fração aglutinada, FNA= Fração não aglutinada por *Dioclea violacea*. Valores são dados em quantidade de leishmanias/linfonodo.

Controle	FA	FNA
$1,949 \times 10^{20}$	$1,723 \times 10^{16}$	$9,522 \times 10^{12}$
$1,061 \times 10^{28}$	$2,450 \times 10^{24}$	$1,052 \times 10^{20}$
$1,296 \times 10^{40}$	$1,459 \times 10^{32}$	$1,983 \times 10^{24}$
$9,070 \times 10^{40}$	$1,020 \times 10^{40}$	$2,144 \times 10^{24}$
$2,969 \times 10^{44}$	$1,215 \times 10^{40}$	$1,264 \times 10^{32}$
$1,215 \times 10^{56}$	$2,253 \times 10^{40}$	$1,866 \times 10^{32}$
$2,390 \times 10^{60}$	$2,847 \times 10^{48}$	$8,764 \times 10^{36}$
-	$3,520 \times 10^{60}$	$8,310 \times 10^{44}$
-	-	$2,288 \times 10^{68}$