

## LECTINAS LEGUMINOSAS NO AUXÍLIO PARA CARACTERIZAÇÃO DE LEISHMANIA\*

*Idalina Thiomi Inumaru Nojimoto\*\*; William Barbosa\*\*\*; Ana Cândida Czerewuta\*\*\*\* & Raquel Lopes de Oliveira\*\*\*\*\*.*

### RESUMO

A superfície polissacarídica das espécies de *Leishmanias* pertencentes aos grupos *mexicano*, *brasiliensis* e estoques isolados no laboratório Gaspar Viana, foram estudadas através do teste de aglutinação direta mediada por lectinas. Foram preparadas dez lectinas de sementes de leguminosas (*Lens culinaris*, *Ricinus communis*, *Artocarpus integrifolia*, *Persea americana*, *Arachis hypogaea*, *Magifera indica*, *Pisum sativum*, *Glycine max*, *Tamarino* e *Tritium vulgare*) e duas foram adquiridas no comércio (*Canavalia ensiformis* e *Phytohemagglutinin P*). No teste de aglutinação direta com essas lectinas, foram observados variados agrupamentos quanto ao número e variedade de sítios receptores na superfície das leishmanias, tendo as cepas do complexo *brasiliensis* apresentado maior número de sítios ligantes para as lectinas do que as do complexo *mexicano* e aquelas isoladas de pacientes no laboratório Gaspar Viana BARBOSA, W. et al, 1976, 1983, 1984). Confirmamos através da reação de imunofluorescência direta que as *Lens culinaris* e *Canavalia ensiformis* marcadas por nós com isotiocianato de fluoresceína (CLARK & SHEPARD), apresentaram resultados similares aos verificados com o teste de aglutinação direta. Paralelamente testamos a capacidade das 12 lectinas aglutinarem *Trypanosoma cruzi*. Constatamos que a superfície do tripanosoma apresenta mais epítomos ligantes para as lectinas do que a superfície de leishmanias. Acreditamos que a interação lectinas com epítomos situados na superfície da membrana plasmática possibilita a caracterização de constituintes da superfície celular, o que tem contribuído para a caracterização de espécie celular.

\* Trabalho realizado com auxílio do CNPq

\*\* Prof<sup>o</sup> Assistente - Departamento de Microbiologia - IPTESP-UFG

\*\*\* Prof. Titular - Departamento Medicina Tropical - IPTESP-UFG

\*\*\*\* Prof<sup>o</sup> Assistente - Departamento Medicina Tropical - IPTESP-UFG

\*\*\*\*\* Técnica de Laboratório - Departamento de Medicina Tropical - IPTESP-UFG

UNITERMOS: Leishmanias; Caracterização de cepas; Lectinas; Reação de aglutinação direta.

## INTRODUÇÃO:

O estudo da sistemática das leishmanias baseado em aspectos biológicos, dos quais se exclui, praticamente a morfologia, pois todos os gêneros e espécies são indistinguíveis, se baseia hoje com segurança em sofisticada metodologia em que se inclui o emprego de anticorpos monoclonais pela tecnologia de hibridomas PATT, D. M. & DAVI, J. R., 1982). Critério genotípico analisado bioquimicamente, quer pela sequência de nucleotídeos do DNA, quer por enzimas de restrição e hibridização de ácidos nucleicos (MOREL e SIMPSON, 1980; WIRTH et al, 1982) demonstra a dificuldade e a complexidade da padronização de técnica para identificação das espécies de leishmanias. Mais recentemente, foi introduzida uma técnica no estudo da sistemática que embora exija um esmerado preparo técnico, prescinde de equipamento, é método exequível em laboratórios relativamente modesto, referindo-se à pesquisa de sítios de ligação oligossacarídica existentes na superfície celular desses protozoários e que parecem guardar uma perfeita conotação com os gêneros e mesmo com as espécies verificadas através de comparações com todos os métodos considerados válidos no estudo da sistemática deste protozoário.

Publicações científicas nos mostram que as lectinas parecem ser ef-

cientes para resolver o problema de identificação de protozoários. Elas têm sido usadas para explorar as estruturas das membranas LIS and SHARON, 1977; GOLDSTEIN and HAYES, 1978; GOLDSTEIN et al, 1980) e usadas para separar e identificar protozoários (BRETTEG and SEHOTTELINS; PETAVEZ et al, 1978; GREGNOL et al, 1980; ARAÚJO et al, 1980) incluindo as leishmanias (JOCOBSON et al, 1982; SCHOTTELIUS and GONÇALVES COSTA, 1982; SCHOTTELIUS, 1982).

Nosso objetivo neste trabalho consiste em introduzir novas lectinas obtidas por extração de leguminosas, ocorrentes habitualmente no Brasil no estudo da sistematização das leishmanias, desenvolver sua obtenção e seu emprego no "Screening" usando leishmanias disponíveis, todas elas bem identificadas pelos presentes métodos acima citados.

## MATERIAL E MÉTODOS

### 1 - Cepas de Leishmanias

1.1. *L. m. amazonensis* (Cepa Pará): Instituto Evandro Chagas.

1.2. *L. brasiliensis* (Cepa 49): Instituto de Medicina Tropical de São Paulo.

### 1.3 Cepas IPTESP-UFG.

1. L. L1. Jordelino R. dos Santos, prontuário 211497, 57 anos, Silvânia-GO. 17.04.79.

2. *L. eva* - Eva Gonçalves da Rocha, prontuário 193594, 41 anos, Goiás-GO. 20.11.81.

3. *L. xambioá* - Domingos Pinto Barroso, prontuário, 41 anos, Xambioá-GO. 20.11.81.

4. *L. MT* - Leish. "Gaspar Viana".

5. *L. isac* - Isac Gonçalves, prontuário 4641, 42 anos, Goiás-GO. 11.11.81.

6. *L. heleno* - Heleno M. Silva, prontuário 4522, 35 anos, Mato Grosso, 05.11.81.

7. *L. M.* (misteriosa) - Salvino Lesário Silva, 48 anos, Goiás-GO. 20.02.88.

8. *L. juarez* - Juarez Aguiar Barbosa, prontuário 157480, 42 anos, Araguaçu-GO. 29.11.83.

9. *L. manóel* - Manoel da Cruz de Oliveira, prontuário 25445, 14 anos, Marabá-PA. 20.07.84.

10. *L. pedro* - Pedro Pinheiro Bezerra, prontuário 36241, 30 anos, Rolin de Moura-RO. 14.11.83.

11. *L. joão* - João Generoso de Souza, prontuário 38065, 29 anos, Cavalcante-MA. 06.12.83.

12. *L. gaspar* - Gaspar João Barbosa, prontuário 43734, 26 anos, Guaraf-GO. 10.05.84.

### 2. Meio de cultura

As leishmanias foram cultivadas no meio RQ modificado, idealizado no Laboratório Gaspar Viana, cuja composição química do meio é a seguinte: 500ml de caldo de coágulo de boi filtrado, 100ml de extrato de co-

ração caseiro de boi, 5g de extrato de levedura, 0,4g de KCl, 8g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 4g de NaCl, 2g de glicose, 200ml de água destilada. O pH do meio ajustado para 7,2-7,4 e autoclavado a 121°C por 20 minutos.

Após incubação a temperatura de 26-27°C por 96 horas de cultivo no meio RQ modificado, as promastigotas foram coletadas por centrifugação a 3.000 x g durante 15 minutos e lavadas por duas vezes em tampão fosfato pH 7,2 (PBS). As leishmanias foram ressuspensas no mesmo tampão a 1-9 10 promastigotas ml.

### 3 - Lectina

Foram usadas neste trabalho doze lectinas de leguminosas das quais dez extraídas no nosso laboratório. Estas lectinas estão agrupadas na Tabela I e para cada lectina estudada, os seguintes dados foram coletados.

3.1 - Atividades hemaglutinante - O teste da atividade das lectinas foi realizado com uma suspensão de hemácias humanas formolizadas do Grupo "O" Rh negativo. O teste foi feito realizado em placa de poliestireno com orifícios tendo fundo em V, adicionando 2 gotas de lectina diluída em solução salina, 1 gota de hemácias formolizadas a 5% em solução salina (NaCl 0,15M). A reação foi incubada durante 90 minutos em uma câmara úmida à temperatura ambiente, sendo então realizada a leitura.

3.2 - Concentração protéica - As dosagens protéicas das soluções de

NOJIMOTO, I. T.; BARBOSA, W.; CZEREWUTA, A. C. & OLIVEIRA, R. L. de. Lectinas leguminosas no auxílio para caracterização de Leishmania. Rev. Pat. Trop. 18(2):173-181, jul./dez. 1989

TABELA I - Estudos das lectinas

LECTINAS	TÍTULO HEMAGL.	INIBIÇÃO AÇÚCARES	CONC. PRO-TÉICA mg/ml	EXTRAÇÃO 2º REFERÊNCIA
<i>Phytohemaglutina - P</i>	8.000	-	5,0	Difco
<i>Canavalia ensiformis (Con-A)</i>	512	Monose	6,8	Difco
<i>Lens culinaris</i>	1.024	Glicose	25,0	HOWARD et al.
<i>Ricinus communis</i>	8.000	Lactose	35,0	OLSNES et al.
<i>Pisum sativum</i>	512	-	20,0	ENTLIDA et al.
<i>Persea americana</i>	64	-	2,0	MEODE et al.
<i>Mangifera indica</i>	4.000	-	12,5	HOWARD et al.
<i>Arachis hypogala</i>	8.000	Galactose	30,0	LOTAN et al.
<i>Glycine max</i>	512	-	15,0	LIS, H. et al.
<i>Triticum vulgare</i>	64	-	1,0	HOWARD et al.
<i>Artocarpus integrifolia</i>	16.000	-	12,5	ROQUE B. et al.
Tamarindo	2.000	-	32,5	HOWARD et al.

lectinas foram determinadas espectrofotometricamente pela técnica de Lowry et al.

3.3. - Aglutinação - O teste de aglutinação foi realizado na placa de Kahn-Kline, misturando-se 20ul de suspensão de promastigotas (1-9 10 ml) com 20ul de solução de lectina. Após 10 minutos à temperatura ambiente a aglutinação foi lida no microscópio invertido (12,5 x 1,6) estimada de 0 a 4+, (0 = não houve aglutinação fraca; 2+ a 3+ = aglutinação moderada; 4+ = aglutinação intensa) e comparada sempre com o controle negativo.

3.4 - Referência do método de extração das lectinas estudadas - Tabela I.

#### 4 - Inibição de aglutinação

Os carboidratos usados para inibição de aglutinação lectinas - promastigotas foram usadas a uma con-

centração de 0,2M. Este experimento foi feito na placa de Kahn-Kline colocando-se 20ul de solução de carboidrato específico com 20ul de solução de lectina e incubadas por 20 minutos à temperatura ambiente antes da adição de promastigotas. O teste foi lido após 10 minutos.

#### 5 - Conjugação das lectinas ao isotiocianato de fluoresceína (ITCF)

As lectinas preparadas no laboratório como a de LENS CULINARIS e CANAVALLIA ENSIFORMIS foram marcadas com isômero I de Isotiocianato de fluoresceína, de acordo com o método descrito por CLARK & SHEPARD.

Este método consistiu em dissolver as lectinas liofilizadas de modo a se obter uma concentração proteica de 20mg/ml em solução de NaCl 0,15M contendo tampão carbonato-bicarbonato a 0,01M pH 9,5.

NOJIMOTO, I. T.; BARBOSA, W.; CZEREWUTA, A. C. & OLIVEIRA, R. L. de. Lectinas leguminosas no auxílio para caracterização de Leishmania. Rev. Pat. Trop. 18(2):173-181, jul./dez. 1989

As lectinas dissolvidas foram introduzidas em tubos de diálise e deixadas por 24 horas a 4°C mergulhadas em um banho de 5 vezes o seu volume de ITCF, na proporção de 0,3mg por ml da referida solução salina tamponada com carbonato.

A solução de banho foi preparada, dissolvendo-se a quantidade indicada de ITCF em tampão carbonato-bicarbonato a 0,01M, pH 9,5, de volume igual ao da solução no tubo de diálise e adicionando-se 4 volumes de solução de NaCl 0,15M gelada. A seguir, procederam-se diálises contínuas em solução salina tamponada a 0,01M, pH 7,2 até a remoção máxima de ITCF livre no tubo de diálise.

Os conjugados de lectinas foram conservados a -20°C com igual volume de glicerina destilada e tamponada com solução salina tamponada a 0,5M, pH 7,2.

## RESULTADOS

Os resultados dos testes de aglutinação foram sintetizados na Tabela I, Tabela II e Tabela III e IV. Todos os experimentos foram repetidos pelo menos 4 vezes.

O teste de aglutinação mediada pela lectina foi estimada e comparada com controle negativo para evitar a ocorrência da auto-aglutinação.

## DISCUSSÃO

Os resultados dos testes de aglutinação lectinas-leishmanias, demonstram que a *L. brasiliensis* (Cepa 49) é bem distinta das *L. mexicana* (Cepa Pará - Evandro chagas) e dos estoques IPTESP-UFG, através da aglutinação com as lectinas de *Ricinus communis* e de *Glycine max*. Conseqüentemente, *L. brasiliensis* (Cepa 49) apresenta diferentes receptores topográficos na

TABELA II - Resultados do teste de aglutinação da interação leishmanias com lectinas

LECTINAS	LEISHMANIAS ISOLADAS NO LABORATÓRIO GASPAR VIANA - IPTSP-UFG													
	L.b.*	L.m.**	MT	ISAC	LI	EVA	XAM <sup>1</sup>	M	JU <sup>2</sup>	MA <sup>3</sup>	PE <sup>4</sup>	JO <sup>5</sup>	GAS <sup>6</sup>	HE <sup>7</sup>
<i>Phytohemaglutina-P</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Canavalia ensiformis(Con-A)</i>	3+	3+	3+	4+	4+	3+	3+	3+	3+	3+	4+	3+	3+	3+
<i>Lens culinaris</i>	4+	3+	4+	4+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	4+	3+	3+	3+
<i>Ricinus communis</i>	4+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pisum sativum</i>	-	2-	4+	1+	4+	3+	4+	-	2+	1+	-	1+	2+	1+
<i>Persea americana</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Mangifera indica</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Arachis hypogala</i>	4+	3+	3+	2+	2+	4+	2+	3+	2+	3+	2+	3+	2+	2+
<i>Glycine max</i>	4+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Triticum vulgare</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Artocarpus integrifolia</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tamarindo	3+	3+	3+	3+	3+	3+	2+	2+	2+	3+	2+	3+	3+	3+

\* = *L. brasiliensis* - Cepa 49 IMT-SP; \*\* = *L. mexicana* - Cepa Pará E. Chagas; 1 = Xambioá; 2 = Juarez; 3 = Manoel; 4 = Pedro; 5 = João; 6 = Gaspar; 7 = Helene

TABELA III - Resultados do teste de aglutinação direta da interação *Tripanossoma* com lectinas leguminosas.

LECTINAS	Y	JOS	ISO	CL	JOA	ODI
<i>Phytogenaglutininina - P</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Canavalia ensiformis (Con A)</i>	3+	3+	2+	2+	2+	2+
<i>Lens culinaris</i>	4+	4+	4+	4+	4+	4+
<i>Ricinus communis</i>	2+	4+	2+	2+	3+	2+
<i>Pisum sativum</i>	2+	4+	4+	4+	3+	3+
<i>Persea americana</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Mangifera indica</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Arachis hypogaea</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Glycine max</i>	3+	3+	2+	1+	1+	2+
<i>Triticum vulgare</i>	-	2+	-	-	-	2+
<i>Artocarpus integrifolia</i>	-	-	4+	2+	-	-
Tamarindo	4+	3+	2+	4+	4+	4+

TABELA IV - Teste de Imunofluorescência direta das Leishmanias com Con A - ITCF e *Lens culinaris* ITCF.

LEISHMANIAS	CON A-ITCF	LENS-ITCF
Cepa 49	+	+
Cepa M	+	+
Cepa LI	+	+
Cepa EVA	+	+

CON A-ITCF (*Canavalia ensiformis* - isotiocianato de fluoresceína).

superfície de sua membrana comparados com as do COMPLEXO MEXICANO e das cepas estoques IPTESP-UFG.

Os resultados de aglutinação com as doze lectinas frente às cepas de leishmanias mostram que os esto-

ques IPTESP-UFG. se assemelham ao complexo *Leishmania mexicana*.

Os resultados dos testes de imunofluorescência direta das leishmanias verificados com as lectinas *Canavalia ensiformis* ITCF (isotiocianato de fluoresceína), *Lens culinaris* - ITCF

confirmaram os receptores existentes verificados com os testes de aglutinação. Além das lectinas marcadas revelarem afinidades com a superfície das leishmanias, constatamos que a *Canavalia ensiformis* - ITCF se liga, uniformemente, na superfície do corpo das leishmanias enquanto as *Lens culinaris* - ITCF apresenta pontos específicos de ligação, principalmente, nos flagelos.

As doze lectinas estudadas na interação com as diversas cepas de *T. cruzi* do laboratório não serviram para diferenciá-las. Acreditamos que como a superfície deste protozoário é riquíssima em receptores, precisamos de testar mais variedades de lectinas leguminosas para separá-las.

Concluindo, verificamos que as lectinas leguminosas são ferramentas de fácil manuseio e de baixo custo que precisam ser intensivamente pesquisadas, pois seu potencial é grande para o auxílio na identificação das diferentes espécies de leishmanias e de tripanosomas.

## SUMMARY

### Characterization of Leishmania by lectins plants

The polysaccharide surface of *Leishmania* species belonging to *mexican* and *brasiliensis* groups and

isolated stocks at Gaspar Viana's laboratory were studied by the direct agglutination test, mediated by lectins. Ten lectins' samples were prepared derived from leguminous seeds from the following species: *Lens culinaris*, *Ricinus communis*, *Artocarpus integrifolia*, *Persea americana*, *Arachis hypogaea*, *Mangifera indica*, *Pisum sativum*, *Glycine max*, *Tamarindo*, *Triticum vulgare*, *Canavalia ensiformis* and *Phytohemagglutinin P.*; having been the last two lectins acquired in the market. Different groups could be observed related to the number and variety of the lectin's saccharide bond sites on the *Leishmania* surface, having the strains of *brasiliensis complex* shown a larger number of connected sites for the lectins comparing with the *mexican complex* and others isolated from patients at Gaspar Viana's laboratory.

(BARBOSA, W. et. al. 1976, 1983, 1984). We confirmed through the reaction of direct immunofluorescence that the *Lens culinaris* and *Canavalia ensiformis* marked by us with fluorescent isothiocyanate (CLARK & SHEPARD) showed similar results to the test of direct agglutination. Parallely we tested the capacity of twelve lectins to agglutinate *Tripanosoma cruzi*. We found bonds that the surface of *Trypanosoma cruzi* showed more connected bonds for the

NOJIMOTO, I. T.; BARBOSA, W.; CZEREWUTA, A. C. & OLIVEIRA, R. L. de. Lectinas leguminosas no auxílio para caracterização de *Leishmania*. Rev. Pat. Trop. 18(2):173-181, jul./dez. 1989

lectins, relating to the *Leishmania* surface.

We believe that the new lectins plants tested are very promising in the taxonomic study of *Leishmania*.

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

01. ARAÚJO, F. G.; HANDMAN, E. & HEMINGTON, J. S. Binding of lectins to the cell surface of *Trypanosoma cruzi*. J. Protozool., 27:397-400, 1980.
02. BARBOSA, W.; SOUZA, M. C. M.; SOUZA, J. M.; RASSI, D. M.; GERAIS, B. B. & OLIVEIRA, R. L. Note on the classification of the "Leishmania sp" responsible for cutaneous leishmaniasis in the East Central Region of Brazil. Annals of Tropical Medicine and Parasitology, 70:389-399, 1976.
03. BARBOSA, W.; OLIVEIRA, R. L. & CZEREWUTA, A. C. Novo meio de cultura monofásico, autoclavável, sem sangue, para cultura de leishmanias da região centro-oeste. Brasil. In: Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, Rio de Janeiro, 1983. Anais. p. 56.
04. BARBOSA, W. et al Leishmaniasis (misteriosa): provável nova espécie ocorrente em Goiás, isolada do sangue periférico de chagásico crônico. Rev. Pat. Trop. 13(2):183-193, 1984.
05. BARBOSA, W.; CZEREWUTA, A. C.; OLIVEIRA, O. S. & MACHADO, F. M. T. *hastatus* - *Trypanosoma* de morcegos *Phyllostomus hastatus hastatus*. Estudo da sua forma. Rev. Pat. Trop. 13(3):409-439, 1984.
06. GOLSTEIN, I. J. & HAYES, C. E. The lectins: carbohydrate - binding proteins of plants and animals. Advanc. Carbohydr. Chem. Biochem., 35:127-339, 1978.
07. GOALDSTEIN I. J.; HAYES, R. C.; MONSIGNY, M.; OSAWA, T. & SHARON, N. - What should be called a lectin? Nature (Lond), 285: 66, 1980.
08. HOWARD, J. K.; SAGE, H. J.; STEIN, M. D.; YOUND, N. M.; LEON, M. A. & DYCKES, D. F. Studies on a phytohemagglutinin from the lentil. II Multiple forms of *Lens culinaris* hemagglutinin from the lentil. J. Biol. Chem., 246:1590-1595, 1971.
09. JACOBSON, R. L. & SCHNUR Surface reaction of leishmania. I: Lectin mediates agglutination. Ann. Trop. Med. Parasit., 76:45-52, 1982.
10. LIS, H. & SHARON, N. Lectins: their chemistry and application to immunology. In: The antigens, Sela, M., ed. New York, Academic Press, 1977. v. 4, p. 429-529.
11. LOTAN, R.; SKUTERLSKY, E.; DANON, D. & SHARON, N. The purification composition and specificity of the anti-T lectin from peanut' (*Arachis hypogaea*) J. Biol. Chem., 250:8518-8523, 1975.
12. MOREL, C. & SIMPSON, L. Characterization of Pathogenic Trypanosomatidae by restriction endonuclease fingerprinting of Kinetoplast DNA minicircles. Am. J. Trop. Med. Hyg., 29:1070-1074, 1980.

NOJIMOTO, I. T.; BARBOSA, W.; CZEREWUTA, A. C. & OLIVEIRA, R. L. de. Lectinas leguminosas no auxílio para caracterização de *Leishmania*. Rev. Pat. Trop. 18(2):173-181, jul./dez. 1989

13. OLSNES, S. & PIHIL, A. Different biological properties of the two constituent peptide chains of ricin, a toxic protein inhibiting protein synthesis. Biochem, 12:3121-3125, 1973.
14. PRAT, D. M.; BENNET, E. & DAVID, J. R. Monoclonal antibodies that distinguish subspecies of *Leishmani braziliensis*. J. Immunol., 129:926-927, 1982.
15. PÉTAVY, A. F.; GUEUGNOT, J.; GUILLOT, J.; DAMEZ, M. & COULET, M. Fixation des lectines sur *Leishmania tropica* et *Crithidia luuciliae*. Protistologica, 14: 103-108, 1978.
16. SCHOTTELIUS, J. & GONÇALVES DA COSTA, S. C. Studies on the relationship between lectin binding carbohydrates and different strains of leishmania from the New World. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 77:19-27, 1982.
17. WIRTH, D. F.; PRATT, D. M.; ARAÚJO FILHO, N.; DOURADO, H. & DAVID, J. R. Rapid identification of leishmania species by specific hybridization of kinoplast DNA in cutaneous lesions. In: REUNIÃO ANUAL SOBRE PESQUISA BÁSICA EM DOENÇA DE CHAGAS, 9, Caxambú-MG, 1982. Anais, Belo Horizonte, CNPq/FINEP, 1982. (Programa e resumo de comunicações).