

# ESTUDO SOBRE A RELAÇÃO PARASITO-HOSPEDEIRO E LECTINAS COMO INSTRUMENTO DE DIFERENCIAÇÃO ENTRE CEPAS DE LEISHMANIA NO NOVO MUNDO\*

Maria do Desterro Soares Brandão Nascimento

## RESUMO

Trata-se de estudo baseado em investigações científicas publicadas acerca de lectinas usadas para detectar grupos de carboidratos específicos presentes nas superfícies celulares, com fins taxonômicos em *Leishmania*, bem como pesquisa da relação parasito-hospedeiro considerando os estágios evolutivos das cepas e condições de patogenicidade e não patogenicidade.

## INTRODUÇÃO

O gênero *Leishmania*, usualmente dividido em três complexos que infectam o homem, tais como: *complexo mexicana*, *complexo brasiliensis*, *complexo donovani* ou como acrescenta LAINSON & SHAW (1979) os *complexos hertigi*, *tropica*, *major* e outros de posição incerta quanto à taxonomia. As principais espécies que infectam o homem causam leishmaniose cutânea, mucocutânea e visceral.

Todas as formas dessas infecções são transmitidas por mosquitos (*Phlebotomus* no Velho Mundo, *Lutzomyia* e *Psychodopygus* no Novo Mundo).

*Leishmania* é um protozoário parasita que vive em íntimo contato com os tecidos do organismo de diferentes origens filogenéticas. Durante o seu ciclo de vida manifesta duas formas morfológicas e fisiológicas: a amastigota vivendo intracelularmente em células do sistema retículo histiocitário do hospedeiro vertebrado e promastigota no sistema digestivo do vetor invertebrado, bem como em meio de cultura (17).

O número de espécies e subespécies *Leishmania* nos recentes anos tem aumentado em decorrência da utilização de métodos modernos de investigação taxonômica, tais como os citados em seguida como sejam: diferenciação da mensuração da densidade do núcleo e cinetoplas-

\* Trabalho apresentado a disciplina Imunologia Básica, do Curso de Mestrado de Medicina Tropical, IPI/UEG, em 1984

to; lisozima e outras enzimas; crescimento padrão de promastigotas in vitro na presença de anti-soro; desenvolvimento característico de promastigotas no intestino do vetor; vetores, hospedeiros reservatórios e outros fatores epidemiológicos; características clínicas produzidas pela doença e outros (20).

Lectinas têm sido usadas para diferenciação intra e interespecífica de cepas de *Leishmania*. Neste trabalho faz-se um estudo sobre as investigações científicas que têm sido feitas sobre as superfícies celulares de cepas de *Leishmania*, em particular no Novo Mundo, através de lectinas que se ligam a grupos de carboidratos cepas específicos como critério auxiliar bioquímico para resolver a problemática de classificação das diferentes espécies dessa protozoose.

Os problemas das leishmanioses, não somente a tegumentar como a visceral, assumem importância extraordinária no Brasil pois atingem populações produtivas das zonas rurais de múltiplas regiões, aumentando a mortalidade infantil e dos primeiros anos de idade, bem como diminuindo a capacidade de trabalho de adultos em suas atividades produtivas, principalmente agrícola tendo em vista o homem ser acidentalmente acometido ao explorar os ambientes selváticos, para a sobrevivência.

No Brasil o desenvolvimento sócio-econômico vem levando o homem, em suas atividades, a entrar em contato com ecossistemas diferentes onde os parasitos (*Leishmania*) são componentes de uma patobiocenose, em equilíbrio com hospedeiros normais. O homem ao entrar nesse ecossistema modifica seu equilíbrio e então sofre ações parasitárias que altera suas

condições de saúde, prejudicando assim a capacidade de trabalho. (28)

Baseado nas condições de agressões à saúde do homem por essa protozoose, assim como na dificuldade de padronização de técnicas de identificação das espécies e subespécies de *Leishmania*, o que de certo modo vem prejudicar estudos diagnósticos e terapêuticos é que pretende-se neste trabalho obter fundamentos necessários ao aprimoramento de utilização de lectinas que se ligam aos carboidratos presentes nas cepas abrangendo métodos de aglutinação e outros, assim como conjugação com fluoresceína que atualmente estão disponíveis comercialmente. (16)

Lectinas foram melhor definidas por LIS e SHARON (1981) como açúcar de ligação que aglutinava células protéicas ou glicoprotéicas de origem não imune. O açúcar específico de lectinas é usualmente estabelecido por técnica de inibição de hapteno, consistindo portanto testar diferentes carboidratos por sua habilidade também de aglutinação ou precipitação de polissacarídeos (ou glicoproteínas).

A maioria dos efeitos depende da interação de lectinas com a membrana plasmática (15) e há possibilidade neste aspecto que a caracterização da superfície celular por lectinas tenha contribuído mais para o entendimento de células prestando informação, não somente sobre a distribuição topográfica dos receptores da própria superfície celular, assim como a química e a física celular, como também as alterações que possam ocorrer durante o crescimento da célula normal e diferenciação. (13)

DAWIDOWICZ e col. (1975) através de estudos dos estágios infectivos de

*Leishmania brasiliensis*, amastigotas e promastigotas, pôde verificar que após certo número de transferências em cultura a forma extracelular (promastigota) tende a perder a propriedade infectiva. No entanto foi aventada a hipótese de que a presença de receptor em formas patogênicas seria expressão da relação parasito-hospedeiro e a redução poderia refletir em alteração geral ou particular do parasita o qual produz a falta de habilidade para parasitar células hospedeiras.

A ausência de receptores na porção flagelar é característica de alguns tripanosomatídeos, no entanto utilizando-se métodos citoquímicos com Concanavalina A (Con A) peroxidase — diaminobenzidina, como cita DAYER e col. (1981) pode se verificar que a ausência de reação em amastigotas de *Leishmania donovani* ocorre na porção da emergência do flagelo.

Em sendo assim tratar-se-á, a seguir de breves informações epidemiológicas das leishmanioses no Brasil, abordagem geral sobre lectinas, detalhes técnicos de lectinas ligadas a grupos de carboidratos específicos com as respectivas investigações dos receptores nas diferentes cepas de *Leishmania*, tendo em vista que para HERNÁNDEZ e col. (1980) as lectinas parecem ser poderosa prova para desafiar o problema de identificação de *Leishmania* e *Trypanosoma cruzi*.

## 1. ALGUMAS CONSIDERAÇÕES SOBRE TAXONOMIA, EPIDEMIOLOGIA E CLÍNICA DAS LEISHMANIOSES

Leishmaniose é essencialmente uma zoonose podendo envolver o homem, o cão e roedores silvestres. (18)

No quadro 1 estão relacionados os dados referentes à taxonomia das leishmanioses através de infecção experimental de mosquitos com a forma promastigota e após observada a evolução no intestino do referido vetor, estudo da diferenciação da densidade do núcleo e cinetoplasto entre as espécies bem como através de enzimas (malate desidrogenase, glicose 6 fosfatase); vetores, reservatórios e lesões (6, 12, 14, 21).

CONVIT e col. (1977) faz referência ao polimorfismo clínico-patológico da leishmaniose cutânea americana e propõe duas formas polares. O pólo maligno caracterizado por leishmaniose cutânea difusa com invasão maciça da pele, mucosas do nasofaringe, assim como linfonodos. As lesões têm grande número de parasitas e a resposta ao teste de Montenegro é negativa. O outro pólo é a forma localizada da doença, com poucos parasitas, teste de Montenegro positivo e completa involução após tratamento, o contrário portanto do pólo maligno. Na zona intermediária estão aquelas formas cutâneas ou mucosas que recidivam, ou aqueles casos de lesões cutâneas que surgem à distância da lesão primária. As formas clínicas usualmente dão teste de Montenegro positivo e as lesões têm número variável de parasitas. Frequentemente responde vagarosamente ao tratamento (fig. 1).

Na Tabela 1 constam os dados estatísticos referentes a calazar humano diagnosticados através da clínica e viscerotomia no Brasil no período de 1913 a 1978, como também na Tabela 2 estão correlacionados os dados referentes à leishmaniose tegumentar americana diagnosticados nos Estados e territórios brasileiros durante o período de 1976 a 1980, sen-

QUADRO 1 - Taxonomia - Epidemiologia e clínica das leishmanioses

COMPLEXO	ESPÉCIE	SUBESPÉCIE	MORFOLOGIA	DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA	VETOR	RESERV.	HOMEM	LESÃO/EVOLUÇÃO
HIPOPIILÁRIA	<i>L. tarentae</i> , <i>L. adleri</i> <i>L. chamaelonis</i> DNAN 1720		promastig.	Mediterrâneo, URSS		respteis	não	sangue-baço
(mexicana)	<i>L. enrietti</i> DNAN 1718		grande + + + + (4 a 6 u) DNAK 1701 MDH V	Curitiba - Paraná	Desconhecido	cobaio de laboratório	não	pele
	<i>L. gerbilli</i>					<i>Cavia porcellus</i>		
SUPRAPILÁRIA	<i>L. hertigi</i> DNAN 1714	<i>hertigi</i>	grande + + + + alongada MDH IX	Panamá	Desconhecido	porco espinho (88%)	não	derme/sem lesão
(brasiliensis)		<i>deanei</i>	cinetopl. puntiforme	BR/Piauí/Pará				
		<i>herreri</i>		Costa Rica		preguiça (60%)	não	pele-sangue-vísceras
PERIPILÁRIA	<i>L. brasil. brasiliensis</i> DNAN 1716 1717	<i>brasiliensis</i> não protege Lbg	Tam. + MDH VI G6PD	Perú, Equador, Venezuela, Colômbia, Bolívia-Paraguai. BR/Serra dos Carajás/Mata, Terra Firme, abaixo Rio Amazonas (1 caso KM rodovia)	<i>Psychodopylla</i> , <i>gus wellecti</i> (antropofílico) <i>Ps. amazonensis</i> . <i>Ps. paranaensis</i> <i>L. umbratimazonas</i> /Mata, Terra Firme	jumentos, eqüídeos (50%), roedores	espúndia	cutâneo-mucosa, geralmente única e grande mucosa a dist. (meses/anos/após)
		<i>guyanensis</i> protege Lbb	Tam. +	Guianas, BR/Manaus, Pará, Roraima, Norte do Amazonas/Mata, Terra Firme	<i>Ps. amazonensis</i> . <i>Ps. paranaensis</i> <i>L. umbratimazonas</i> /Mata, Terra Firme			
		<i>panamensis</i> protege Lmm	cresc. + MDH 0	Panamá (só Pacífico)	<i>L. trapidoi</i> <i>Ps. paranaensis</i>	preguiça e roedores	não	lesão única/pele sem metastases
	<i>L. peruviana</i>		cresc. +	Peru (Oeste) montanha 3000 m	<i>Lu. verrucarum</i>	cão doméstico	uta	pele, poucas lesões/cicat. espontânea
SUPRAPILÁRIA	<i>L. mexicana mexicana</i> DNAN 1718	<i>mexicana</i> / não protege <i>brasiliensis</i>	Tam. + DNAK 1700 MDH I	Sul do México, Belize Guatemala	<i>Lu. olmeca olmeca</i> <i>Lu. intermedia</i>	roedores silvestres (cauda)	úlceras cleros	auricular 40% única, rara metast.
		<i>amazonensis</i>	MDH III	Trinidad, BR/Mata, Vár	<i>Lu. flavis</i>	roedores,	rara	cutânea difusa/

QUADRO I – Taxonomia – Epidemiologia e Clínica das Leishmanioses

		<i>sis</i> não prote- ge Lbb	zea, Amazonas, MT, Ba- rá	<i>cutelata</i> (tronco de arvore	marsuniais, raposa, ra- to espinho- so	cutânea da cin- tura p/ baixo		
		<i>pifanoi</i>	Venezuela, BR/Bacia A- mazônica, MT	Não conhe- cidos	roedores silvestres			
<i>tropica</i>	<i>L. tropica</i> DNAN 1719	<i>major</i> proteção p/ <i>minor</i>	grande + + + + P/ após <i>hertigi</i> DNAk 1703 MDH I	África, Turquia, URSS Síria, Israel, Iran, Nigéria, Egito	<i>P. papatasi</i> (antropofi- lico) e ou- tros	gerbil, ra- to de areia, den- roedores tal silvestres (zoonose)	na cadeia cutânea aguda, cicatriza- tal rapidamente.	
		<i>minor</i> não prot. p/ <i>major</i>	<i>menoro/maj- or</i> DNAk 1707 MDH IV	Tropica (comunidades velhas) Mediterrâneo, Irã, Iraque, Líbia, Turquia, Síria, Índia	<i>P. perfliviewi</i> <i>P. papatasi</i> <i>P. sergenti</i>	cão, homem outros?	antro- pono- se ur- bana	Nódulo único no rosto. Evol. len- ta
		<i>aethiopi- ca</i>	DNAk 1706 MDH V	Etiopia, Kenia	<i>P. longipes</i>	roedores cavernas (pirafos)	cutânea	
<i>donovani</i>	<i>L. donovani</i> DNAN 1719	<i>infantum</i>	peq. (-) DNAk 1704 MDH V	Mediterrâneo, URSS, Á- sia (até China) difun- dida (Paleática)	<i>P. ariasi</i> <i>P. major</i>	chacal-lo- bo, raposa, cão/homem.	infan- til 95% a dultos solda- dos	Vísceras
		<i>donovani</i>	DNAk 1707	Índia, Birmania, Ban- gladesh, Paquistão, E- tiópia, Gambia, Kenia, Uganda, (Oriental)	<i>P. argentines</i> e outros	Homem	todas as i- difusa/pós-cala- dades zar	Vísceras cutâneas
		<i>archibal- di</i>	similar <i>donovani</i>	África equatorial (Keniano-sudanês)	<i>P. langeroni</i> <i>P. martini</i>	roedores, gatos ru- rais	Vísceras	
		<i>chagasi</i>	MDH VII	Argentina, Bolívia, Venezuela, México, Co- lômbia, Guatemala, BR/ Bahia, Ceará, rara na Amazônia (neotropical)	<i>Lu. longipal- pis</i> <i>Lu. evansi</i> <i>Lu. gomezi</i>	raposa, cão, gato	crian- ças 80%, Homem 0,1% Cão 1% Raposa 13%	Infecção assinto- mática, visceral (pele)



FIG. 1 – Classificação clínica e imunopatológica da Leishmaniose cutânea americana.

**TABELA 1 – Calazar humano – casos clínicos e casos diagnosticados por  
Viscerotomia (V) no Brasil – 1913-1978**

ESTADO	(V)	CASOS CLINICOS - ANOS							TOTAL GERAL
		1913 1952	1953 1957	1958 1962	1963 1967	1968 1972	1973 1978	TOTAL	
Pará	18	08	-	03	01	-	-	12	30
Maranhão	01	-	-	24	30	-	-	54	55
Piauí	13	-	101	143	16*	37f	07f	304	317
Ceará	154	07	1.493	808	358f	808f	437f	3911	4065
Rio Grande do Norte	10	-	11	10	02	23	18	64	74
Paraíba	02	01	01	-	-	-	106f	108	110
Pernambuco	09	05	01	06	02	02	05	21	30
Sergipe	26	01	01	-	07	05f	154f	168	194
Alagoas	13	-	-	01	-	28f	77"	106	119
Bahia	80	19	51	80	215f	04f	-	369	449
Minas Gerais	02	01	66	164f	318f	75f	08f	632	634
Espírito Santo	-	-	-	-	-	05	-	05	05
Mato Grosso	03	04*	-	-	02	-	-	05	08
Goiás	01	-	01	05	20	-	-	26	27
Paraná	-	-	-	-	-	-	01	01	01
<b>TOTAL</b>	<b>332</b>	<b>45</b>	<b>1726</b>	<b>1244</b>	<b>971</b>	<b>987</b>	<b>813</b>	<b>5786</b>	<b>6118</b>

\* Importado = 1

f Informações da SUCAM/MS

" Informações do Prof. Hêlvio Auto

**TABELA 2** Número de casos de Leishmaniose tegumentar americana no Brasil – período de 1976 a 1980

REGIÕES	1976	1977	1978	1979	1980	TOTAL
<b>NORTE</b>						
Acre	-	-	23	-	41	64
Amazonas	614	798	1414	792	1355	4973
Para	119	99	174	233	342	967
Amapá	-	-	-	-	127	127
Roraima	-	-	-	-	-	-
Rondonia	-	-	-	-	2	2
<b>NORDESTE</b>						
Maranhão	-	-	-	-	87	87
Piauí	132	85	31	51	110	409
Ceará	2553	1615	1768	1624	915	8473
Rio G. do Norte	-	-	-	-	4	4
Paraíba	81	135	103	96	29	444
Pernambuco	-	-	-	-	31	31
Alagoas	-	-	-	-	36	36
Sergipe	-	3	-	-	22	25
Bahia	133	31	46	86	458	754
<b>CENTRO-OESTE</b>						
Goiás	-	-	-	-	75	75
Mato Grosso	40	37	80	45	76	279
Distrito Federal	-	-	-	-	-	-
<b>SUDESTE</b>						
Minas Gerais	24	12	37	90	452	613
Espírito Santo	59	22	100	84	70	355
Rio de Janeiro	33	19	33	51	63	199
São Paulo	-	-	-	-	48	48
<b>SUL</b>						
Paraná	-	-	-	-	194	194
Santa Catarina	-	-	-	-	-	-
Rio Grande do Sul	-	-	-	-	2	2
<b>TOTAL</b>	<b>3788</b>	<b>2856</b>	<b>3809</b>	<b>3152</b>	<b>4539</b>	<b>18144</b>

1976 - 1979 - SUCAM

1980 - SUCAM E CLÍNICAS UNIVERSITÁRIAS

do ambos fornecidos através do órgão Superintendência das Campanhas de Saúde Pública. (13, 16).

## 2. LECTINAS COMO INSTRUMENTO DE INVESTIGAÇÃO EM LEISHMANIA

### 2.1 Lectinas e seus açúcares específicos

O problema do reconhecimento celular é de fundamental importância em muitas áreas biológicas. Para o imunologista é de real valor entender a complexa relação parasito-hospedeiro entre células e o sistema imune, tanto a fagocitose quanto a não fagocitose e sua habilidade para reconhecer e reagir aos agentes estranhos.

A superfície celular expressa carboidratos ou porção de carboidratos presentes em tecidos e fluidos que são envolvidos no reconhecimento do fenômeno em larga variedade de plantas e espécies animais. As moléculas de carboidratos são reconhecidas por interagirem por meio de ligações por moléculas protéicas ou glicoprotéicas chamadas lectinas. (16).

Como descreve WEIR (1980) o termo "lectina" foi originalmente usado para descrever moléculas de carboidratos derivadas de plantas semelhante a fitohaemaglutinina de feijão vermelho e concanavalina de jaca. Certamente lectinas interagem com somente estruturas complexas, tais como aquelas que ocorrem na superfície de células glicoprotéicas. As lectinas são usualmente compostas de subunidades e ocorrem em grupos que encerram em glicoprotéicas ou isolectinas de propriedades semelhantes química e biológica.

As lectinas podem auxiliar a proteção das plantas contra plantas patógenas, insetos predadores, e principalmente no sistema de cruzamento de plantas inferiores. (16)

As lectinas têm sido empregadas para detecção, isolamento e caracterização de materiais contendo carboidratos tais como glicolipídeos, polissacarídeos e glicoproteínas segundo DULANEY (1978). É importante compreender-se que elas têm sido encontradas induzindo uma série de respostas biológicas numa variedade de células, através das quais tem permitido o estudo de mecanismos básicos dos fenômenos biológicos. A maioria desses efeitos depende certamente da interação de lectinas com a membrana plasmática.

Parasitas do gênero *Leishmania*, vivem como fazem os outros tripanosomatídeos, em íntimo contato com os tecidos orgânicos. HERNÁNDEZ e col. (1981) faz referência à invasão desses parasitas, como eles se desenvolvem e sobrevivem dentro do hospedeiro, daí atenção especial deve ser dada à superfície celular dos mesmos. Tendo em vista ser esta estrutura alvo de muitos ataques que podem ser evidenciados pelo sistema imune do hospedeiro principalmente pela sua importância sob o ponto de vista de intervenção terapêutica, como também pelo significado da membrana em relação aos demais sinais recebidos no meio ambiente e traduzidos em alterações na superfície celular e diferenciação do parasita.

Na abordagem acima referida, as lectinas podem representar um poderoso instrumento para investigar diferenças entre parasitos, sendo que as alterações acompanham a diferenciação destes e a superfície celular são características e determinam a sua patogenicidade.

Os carboidratos específicos e algumas lectinas estão relacionadas na tabela III, de acordo com WEIR, (1980) e HERNÁNDEZ (1981):

### 2.2 Interação de Lectinas e *Leishmania* em seus estágios evolutivos

A interação de lectinas com células tem sido usada como sondagem de alterações na superfície da membrana celular. Estes estudos têm evoluído, segundo HERNÁNDEZ (1981), através da habilidade que têm as lectinas de aglutinar células. A referida aglutinação é rápida e pode ser feita por diferentes métodos e critérios.

O grau de aglutinação tem sido avaliado visualmente através de escala arbitrária em diluições seriadas por meio de kit com microtítulos os quais são feitos em pequenos tubos ou sobre placas escavadas. Diversas concentrações de lectinas são misturadas com igual volume de suspensão de células contendo um número de células padrão. A seguir incuba-se por um tempo e temperatura padrão que condicione o contato entre células, e então o grau de aglutinação pode ser determinado macroscopicamente numa escala de - a ++++, que depende da agregação celular. É sempre importante, em cada caso deixar um espaço vazio, isto é sem lectina para ser observado posteriormente (16).

A aglutinação também pode ser mensurada através de decréscimo na absorção de células na presença de várias concentrações diferentes de Concanavalina A (Con A), cuja leitura é feita em espectrofotômetro com comprimento de onda apropriado, o qual é feito através da diferença máxima de absorção. As referências dos autores que trabalham com para-

sitas abordam que têm usado 660nm (ALVES e COLLI, 1974; HERNÁNDEZ, 1981). Importante também é sempre deixar em cada experimento um vazio, sem lectina (Con A). A percentagem de aglutinação é dada pela expressão:  $(x-y/x)$ . 100 onde x é absorção no tempo zero e y o líquido absorvido em algum dado tempo de incubação.

MACA e HOAK, (1974) fazem referência a outro método de mensuração de aglutinação por meio do agregômetro.

Um método simples e prático para detectar a presença de carboidratos na superfície de parasitas é feito através de lectina conjugada com fluoresceína, disponíveis comercialmente como simples quite (2). Segundo HERNÁNDEZ (em trabalho não publicado), em estudos de cepas de *Leishmania brasiliensis* quanto a superfície celular, investigando a presença de carboidratos através da lectina Con A realizou o seguinte procedimento metodológico:

Aglutinação por Con A - As formas promastigotas foram coletadas na fase logarítmica de crescimento e após submetidas à centrifugação a 1.500 rpm durante 10 minutos sendo lavadas em seguida 3 vezes com tampão fosfato (PBS) pH 7.2. Para estudo de aglutinação a suspensão de células ( $10^6$  células/ml) foi incubada à temperatura ambiente por 15 minutos com várias concentrações de Con A (Sigma Chemical Co). Depois de 10 minutos de incubação as alíquotas foram examinadas e fotografadas sob microscópio de contraste de fase.

Lectina e ferritina cationizada - Con A conjugada com fluoresceína isocianato (Con A - FITC) e Con A ferritina (Con A-Fe) (Miles-Yeda, Ltda.) foram utilizadas para estudos de microscopia fluo-

TABELA III: Lectinas e seus açúcares específicos

Origem	Abrev.	Carboidratos específicos
<b>PLANTAS</b>		
Fitoaemaglutinina P (feijão vermelho)	PHA-P	N-acetil-D-galactosamina
Aglutinina Germe trigo	WGA	N-acetil-D-glicosamina
<i>Ricinus communis</i> (Óleo rícino)	RCA	D-galactose; N-acetil-D-galactosamina
Aglutinina Feijão/soja	ABA	N-acetil-D-galactosamina D-galactose
Concanavalina A (de jaca)	Con A	D-glicose D-manose Manose; glicose
<i>Lens culinaris</i> (lentilha)		
<i>Arachis hypogaea</i> (amendoim)		Galactose; D-galactose-(1-3)-N-acetil D-galactosamina
ou		
Aglutinina amendoim	PNA	
<b>BACTÉRIAS</b>		
<i>Escherichia coli</i>		Manose
<i>Salmonella typhimurium</i>		Manose
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		Galactose
Toxina da cólera		Ganglioside
Toxina diftérica		Oligossacarídeos de parede de célula <i>Salmonella cholerae suis</i> e glicopeptídeo ovoalbumina
<b>ANIMAL</b>		
Fígado de coelho		Galactose
Fígado de ave		Glicose; N-acetil-glicosamina
<i>Helis pomatia</i> (ervilha/caracol)		Galactose; N-acetil-glicosamina
<i>Limulus polyphemus</i> (horseshoe crab)		N-acetil-ácido neuramínico
<i>Electrophorus electricus</i> (célula elétrica)		-D-Galactoside
Células de fígado de rato		Galactose
Linfócitos de camundongo (timo e baço)		D-Galactoside; D-Galactose N-acetil glicosamina; D-manoside
Peritônio de camundongo (macrófagos)		Glicose; Galactose; Glicose N-acetil glicosamina; galactose N-acetil glicosamina.



rescente e eletrônica consequentemente. As amostras foram incubadas com 125 µg/ml de Con A FITC ou Con A Fe, lavadas três vezes e montada para observação.

Para estudos com ferritina cationizada seguiu-se a técnica de DANON e col. (1979) e os parasitas (10<sup>6</sup> células/ml) foram incubados com a referida ferritina cationizada (Miles-Yeda Ltda.) com 1.5 mg/ml durante 10 minutos a 0<sup>o</sup>C. A seguir foram levados duas vezes e observados sob microscópio eletrônico. Os controles dos experimentos constituem as células incubadas com lectina na presença de 0.2 M α - metil-D-manopiranoside (α-MAM) que é um inibidor específico de receptores moleculares contendo glicose e manose.

Microscopia eletrônica - as células que foram incubadas com Con A-Fe e ferritina cationizada foram fixadas em 2,5% (W/V) de glutaraldeído em 0.1 M de tampão cacodilato em pH 7.4 durante duas horas, e em seguida lavadas duas vezes no mesmo tampão. Após a fixação permaneceu em OsO<sub>4</sub> a 1% em 0.1 M tampão de cacodilato durante 90 minutos à temperatura ambiente, e foi progressivamente desidratado em etanol e embtido em Epon 812. Secções ultrafinas foram cortadas em ultra-micrótomo UM03 e examinados instantaneamente em microscópio eletrônico Phillips 201 operando a 60 KV.

Efeitos de lectinas sobre diferentes estágios de *Leishmania*, têm sido verificados por DAWIDOWIZ e col. (1975), ao examinar o complexo *brasiliensis*, em suas formas amastigotas e promastigotas. Os estágios infectivos das cepas em estudo têm demonstrado existir diferenças após um número limitado de vezes de transferências em cultura. Nesse estudo em refe-

rência, evidenciou-se a presença de receptores específicos para Con A (α D-manose, α D-glicose) e para *Ricinus communis* (α D-glicose) em amastigotas e promastigotas subcultivadas em pequeno número de vezes. No entanto promastigotas não infectivas desses mesmos estoques não foram aglutinadas por RCA, sugerindo ausência desses receptores ou mesmo a sua presença em número reduzido, devido terem sido subcultivadas 500 vezes aproximadamente. As diferenças entre esses achados de resíduos de polissacarídeos sobre a superfície de membrana de *L. brasiliensis* pode ser explicado pelas diferentes propriedades patogênicas da célula. No entanto, a presença do receptor em formas patogênicas de *Leishmania* pode ser expressão da relação parasito-hospedeiro e a redução pode refletir em alterações do parasita o qual encontra-se não apto para parasitar células hospedeiras.

SHARON e LIS (1972) demonstraram que existem células em que a superfície mesmo após tratada com tripsina não aglutinam com determinadas lectinas. No caso em experimento, os receptores de Con A e RCA detectados em *L. brasiliensis* parecem ser específicos, pois foram testadas outras lectinas, tais como WGA, SBA e PHAP e não se evidenciou aglutinação, que pode ser interpretados como receptores ausentes ou mesmo existirem em número muito reduzido. Nas formas promastigotas, subcultivadas 500 vezes não aglutinaram com RCA, sugerindo ausência de resíduos semelhante à galactose.

### 2.3 Lectinas e patogenicidade de protozoários

Algumas lectinas, especialmente Con A e RCA têm sido usadas para caracte-

terizar superfície celular de diferentes estágios do ciclo celular de parasitos patogênicos e não patogênicos. Tem sido descrito que as formas patogênicas de *T. cruzi* não são aglutinadas por Con A, ao passo que a forma não patogênica de cultura é aglutinada facilmente. (1)

Diferenças em aglutinação com Con A também tem sido verificada nas formas promastigotas e amastigotas de *L. donovani* e *L. mexicana*. (16, 17).

É importante ressaltar que ainda que a virulência de protozoários patogênicos não esteja necessariamente associada com aglutinação por Con A e RCA, essas lectinas contudo revelam diferenças consistentes nas propriedades de superfície entre certos protozoários patogênicos e não patogênicos.

### 2.4 Problemas taxonômicos de *Leishmania*

A classificação das leishmanioses tem sido aspecto de grande discussão, daí inúmeros critérios terem sido introduzidos na tentativa de atingir um consenso. DAWIDOWICZ e col. (1975) sugeriram que algum problema de classificação poderia ser resolvido se a presença de certos grupos de carboidratos específicos pudessem ser demonstrados e usados como critério bioquímico para auxiliar a identificação de diferentes espécies de *Leishmania*.

HERNANDEZ e col. (1981) caracterizaram cepas Venezuelanas de acordo com seus fatores de excreção. Promastigotas dessas cepas são aglutinadas por Con A e RCA mas não por WGA, ABA, e PHAP ou H (PHAH). O fato de que não se diferenciam por aglutinação com Con A e RCA pode ser devido pertencerem a grupos de sorotipos tais como A3, A4, A5, A6.

SCHOTTELIUS e col. (1982) ao realizar estudo de carboidratos através de lectinas em cepas de *Leishmania* do Novo Mundo pertencentes aos complexos *mexicana* e *brasiliensis* evidenciou que todas foram aglutinadas por *C. ensiformis*, *R. communis-120* e *A. polypoides*. Nenhuma reação de aglutinação foi evidenciada com *P. vulgaris*, *D. biflorus*, *A. papillata II*, *E. europaeus* e *L. alpinum* e *A. hypogaea*, enquanto que algumas cepas de *L. mexicana mexicana* e de *L. b. brasiliensis* não mostraram nenhuma reação de aglutinação com as quatro lectinas que aglutinaram cepas de *L. m. pifanoi* e *L. m. amazonensis* (*S. hispida*, *U. europaeus*, *L. alpinum* e *A. hypogaea*). Através de aglutinação por lectina, com os dados citados no trabalho acima, pode-se agrupar as cepas estudadas em dois grupos, mas ainda essas variações intra-específicas em *Leishmania* ainda devem ser estudadas mais sob o ponto de vista imunológico.

As lectinas usadas não foram capazes de diferenciar os dois complexos agindo igualmente como os outros métodos, tais como caracterização por isoenzimas estudo da densidade do núcleo e cinetoplasto e outros. (6, 12, 14) No entanto o autor pôde separar cepas de ambos os complexos em dois subgrupos aglutinados por testes de lectinas.

### 3. COMENTÁRIOS E CONCLUSÕES

Somente um número limitado de lectinas tem sido estudado por inibição de hapteno.

O papel do imunologista para tal reconhecimento e observação de células tumorais, localização de metástases, patogenicidade de bactérias, vírus, parasitas e fundamentalmente o estágio de doença

e semelhantes interações, vêm provar um frutífero campo de investigações de ligação de lectinas em detecção da expressão de carboidratos específicos de superfícies celulares.

Em sendo assim, considerando a vigente sistemática das leishmanioses, em particular no Novo Mundo, e as inúmeras tentativas para padronização dos testes existentes com fins taxonômicos é que o teste com lectinas poderá ser de potente valor de identificação de cepas de *Leishmania*, tendo em vista a detecção de carboidratos específicos presentes nas superfícies celulares.

Com isso conclui-se que o teste de ligação de lectinas parece ser útil ao estudo taxonômico de protozoários em geral, principalmente em relação às leishmanioses que sem dúvida poderá contribuir também para o aprimoramento da terapêutica, surgindo então novas alternativas menos agressivas e de êxito total. No entanto, para atingir esses objetivos mais lectinas deverão ser estudadas e pesquisadas para que possibilitem a detecção de maior número de carboidratos celulares com a finalidade de diferenciação de cepas.

#### Agradecimentos

Ao Dr. Angel G. Hernandez, Vice-Reitor Acadêmico da Universidade Central da Venezuela pelas inúmeras publicações cedidas; à Dra. Arminda de Jesus Machado, professora de disciplina Imunologia Básica no Mestrado de Medicina Tropical pela oportunidade de fazer o presente estudo.

#### SUMMARY

##### Study of the cell surface cell of the strains of *Leishmania* using lectin binding

It consists in testing different carbohydrates for their ability to inhibit either haemagglutination or polysaccharide (or glycoprotein) precipitation by the lectin, which is to detect differences between cells basis for their taxonomic classification.

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 01 - ALVES, M.J.M & COLLI, W.J. - Agglutination of "Trypanosoma cruzi" by Concanavalin. A. J. Protozool., 21:575-578, 1974.
02. ARAÚJO, F. G.; HANDMAN, E.; REMINGTON, J. S. - Correlation of infectivity and concanavalin A agglutinability of algae exsymbiotic from "Paramecium bursaria" Journal of Protozoology, 1980 (In press).
- 03 - AUB, J. C.; TIESLAU, C.; LANKESTER, A. - Reactions of normal and tumor cell surfaces to enzymes. I. Whest germ-lipase and associated mucopolysaccharides. Proceedings of the National Academy of Sciences, USA. 50: 613-619, 1963.
- 04 - BERNHARD, W. & AVRAMEAS, S. - Ultrastructural visualization of cellular carbohydrate components by means of Concanavalin A. Experimental Cell Research, 64: 232-236, 1971.
05. BURGER, M. M. & GOLDBERG, A.R. - Identification of a tumor-specific determinant on neoplastic cell surfaces. Proceedings of the National Academy of Sciences, USA, 57: 59-366, 1967.
- 06 - CHANCE, M. L.; PETERS, W.; SHCHORY, L. - Biochemical taxonomy of "Leishmania". I Observations on DNA. Ann. Med. Parasitol., 68: 307-316, 1974.
- 07 - CONVIT, J. & PINARDI, M. E. - The clinical and immunopathological spec-

- trum in South America. Am. J. Trop. Med. Hyg., 261: 159-169.
- 000 DANON, D.; GOLSTEIN, L.; MARIKOWSKY, Y.; SKUTELSKY, E. - J. Ultrastruc. Res., 38-500, 1972.
- 009 DAWIDOWICZ, K.; HERNANDEZ, A.G.; INFANTE, R. B.; CONVIT, J. - The surface membranes of "Leishmania". I. The effects of lectins on different stages of "Leishmania brasiliensis." J. of Parasitology, 61(5): 950-953, 1975.
- 10 DULANEY, J. T. - Binding interactions of glycoproteins with lectins. Molecular and Cellular Biochemistry. 21: 43-63, 1978.
- 11 DWYER, D. M. - Proc. IV Int. Conf. Protozool., 1973. p. 129.
- 12 - EBERT, F. - Vergleichende elektrophoretische Untersuchungen an Erregertammen der kutanen Leishmaniose der Neuen Welt und ihre Beziehungen zu "Leishmania donovani" and L. tropica. Tropenmed. Parasit., 25: 259-266, 1974.
- 13 - FURTADO, T. & VIEIRA, J. B. F. - Geografia da leishmaniose tegumentar americana no Brasil. An. bras. Dermatol., 57(3): 135-140, 1982.
- 14 - GARDNER, P. J.; CHANCE, M. L.; PETERS, W. - Biochemical of "Leishmania". II. Electrophoretic variation of malate dehydrogenase. Ann. Trop. Med. Parasit., 68: 317-325, 1974.
- 15 - GREAVES, M. F. & BAUMINGER, S. - Activation of T and B lymphocytes by insoluble phytomitogens. Nature New Biology, 235: 67-70, 1972.
- 16 - HERNANDEZ, A. G. - Lectins as a tool in parasite research. Proceedings of a Workshop held at the Pan American Health Organization, Washington, D. C. 9-11 December, 1982. Biochemical characterization of "Leishmania". UNDP/WORLD BANK/ WHO Soecial Programme for Research and Training in Trop. Diseases, p. 181-196.
- 17 - HERNANDEZ, A.G.; ARGUELLO, C.; AYESTA, C; DAGGER, R.B.; INFANTE, D.; STOJANOVICH, K.; DAWIDOWICZ, F.; RIGGIONE, F.; RIVA G. - The surface membrane of "Leishmania". The Biochemistry of Parasites. Pergamon Press Oxford and New York. 1981. p. 47-65.
- 18 - HOEPRICH, P. D. - Infectious Diseases. Third edition, p.1269-1281. 1983.
- 19 - IMBAR, M. & SACHS, L. - Structural difference in sites on the surface membrane of normal and transformed cells. Nature, 223: 710-712, 1969.
- 20 - JAWETZ, E.; MELNICK, J. L.; ADELBURG, E. A. - Review of Medical Microbiology. 15th edition, p. 501-503, 1983.
- 21 - LAISON, R. & SHAW, J.J. - The role of animals in the epidemiology of South American Leishmaniasis, In: LUMSDEN, W. H. R. & EVANS, D. A.; eds. Biology of the Kinetoplastida. London/New York/ San Francisco, Academic Press, 1979. vol. 2. p. 1-16.
- 22 - LIS, H. & SHARON, N. - In: "The Biochemistry of Plants: A comprehensive treatise". (p. K. Stumpf and E. E. Conn, eds) 1981. Vol. 6. Protein and Nucleic Acids (Marcus, A., ed.) Academic Press. New York. 7.
- 23 - MACA, R. D. & HOAK, J. C. - Improved method for quantitation of Concanavalin A - induced agglutination. J. of National Cancer Institutes, 52: 365-367, 1974.
- 24 - SCHOTTELIUS, J. & COSTA, S. C. G. - Studies on the relationship between lectin binding carbohydrates and different strais of "Leishmania" from the New World. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 77(1): 19-27, 1982.
- 25 - SELA, B.; LIS, H.; SHARON, N.; & SACHS, L. - Different locations of carbohydrate-containing sites in the surface membrane of normal and transformed mammalian cells. J. of Membrane Biology, 3: 267-279, 1970.
- 26 - SUPERINTENDÊNCIA DE CAMPANHAS DE SAÚDE PÚBLICA SUCAM).

- Relatório 193/79. Diretrizes e normas para um programa de controle das "Leishmanioses".

27 - WEIR, D. M. - Surface carbohydrates and lectins in cellular recognition. *Immunology today*, august, 1980 p. 45-51.