



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

DANIELE SAPEDE ALVARENGA

**ATIVIDADE LEISHMANICIDA E HEPATOPROTETORA DA  
CONCANAVALINA-A NA INFECÇÃO EXPERIMENTAL POR  
*L. amazonensis***

DANIELE SAPEDE ALVARENGA

**ATIVIDADE LEISHMANICIDA E HEPATOPROTETORA DA  
CONCANAVALINA-A NA INFECÇÃO EXPERIMENTAL POR  
*L. amazonensis***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de mestre em Patologia Experimental.

Orientadora: Profa. Dra. Ivete Conchon  
Costa

Londrina  
2016

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

Alvarenga, Daniele.

ATIVIDADE LEISHMANICIDA E HEPATOPROTETORA DA CONCANAVALINA-A NA INFECÇÃO EXPERIMENTAL POR *L. amazonensis* / Daniele Alvarenga. - Londrina, 2016.  
55 f. : il.

Orientador: Ivete Conchon Costa.

Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental, 2016.

Inclui bibliografia.

1. *Leishmania amazonensis* - Tese. 2. Concanavalina-A - Tese. 3. Leishmaniose - Tese. I. Conchon Costa, Ivete. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental. III. Título.

DANIELE SAPEDE ALVARENGA

**ATIVIDADE LEISHMANICIDA E HEPATOPROTETORA DA  
CONCANAVALINA-A NA INFECÇÃO EXPERIMENTAL POR  
*L. amazonensis***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de mestre em Patologia Experimental..

**BANCA EXAMINADORA**

---

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dra. Ivete Conchon  
Costa  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Prof. Dr. Wagner Loyola  
Universidade Estadual do Norte do Paraná -  
UENP

---

rofa. Dra. Suelen Santos da Silva  
Faculdade de Ensino Superior Dom Bosco -  
FACDOMBOSCO

Londrina, 03 de agosto de 2016

## **AGRADECIMENTOS**

Aos meus pais Sergio e Sandra, pelo carinho, pelo exemplo como pais, família e como pessoas, sempre ao lado me apoiando, ajudando em qualquer situação, incentivando sempre a estudar.

Agradeço à minha orientadora Ivete Conchon, pela oportunidade de realização deste projeto e pela orientação.

Ao meu namorado Lucas Rolim que sempre foi meu amigo e esteve ao meu lado me apoiando e me mantendo firme a qualquer situação.

Ao nosso técnico Pedro, por ter me acompanhado nos experimentos e me ensinado muitas vezes.

Aos professores Wagner Loyola e Suelen Santos, por aceitarem meu convite para banca avaliadora da qualificação e defesa, e contribuírem intelectualmente para a melhoria do meu trabalho.

Aos demais professores do programa, por contribuírem para a minha formação e pelo exemplo profissional.

À Capes, pela bolsa de estudos que contribuiu na realização desta etapa na minha vida.

ALVARENGA, D. S. **Atividade leishmanicida e hepatoprotetora da Concanavalina-A na infecção experimental por *L. amazonensis***. 2016. p. 55. Dissertação apresentada ao programa de pós-graduação em Patologia Experimental – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Brasil.

## RESUMO

A leishmaniose é considerada a sexta doença de maior importância pela Organização Mundial da Saúde (WHO). É causada por protozoários flagelados do gênero *Leishmania* e é responsável por um espectro de desordens em animais e humanos. O curso da doença é determinado pela resposta imunológica, no qual citocinas como interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), fator de necrose tumoral-  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) e espécies reativas de oxigênio (ROS) representam importantes elementos para controlar a doença. Vários estudos têm mostrado o potencial imunomodulador da concanavalina-A (Con-A) em infecções experimentais. Sendo assim, o objetivo deste estudo foi avaliar a resposta imunológica de camundongos pré-tratados com Con-A ou PBS e infectados por *Leishmania amazonensis* e verificar se o tratamento é eficiente para modular o curso da infecção. Neste estudo, camundongos BALB/c foram pré-tratados intraperitonealmente com Con-A (250 $\mu$ g mL<sup>-1</sup> PBS) ou PBS (250 $\mu$ L) por 72h e infectados com 10<sup>7</sup> promastigotas para avaliar a migração celular, citocinas, produção de NO, ROS e o aspecto histológico do fígado. Foi encontrado maior número de linfócitos e macrófagos após o tratamento com Con-A no começo da infecção que no grupo PBS. O percentual de macrófagos infectados pré-tratados com Con-A *in vivo* foi significativamente maior quando comparado com o grupo PBS. Macrófagos pré-tratados com Con-A e infectados eliminaram mais *Leishmania*. Um significativo aumento da produção de TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  também foram observados. Encontramos níveis de ROS em 30 minutos após a infecção no grupo Con-A mas não no grupo PBS. O número absoluto de células por área de infiltrado no fígado do grupo Con-A foi significativamente reduzido quando comparado ao grupo PBS. Nossos dados demonstram que Con-A teve um efeito imunomodulatório na leishmaniose experimental, sugerindo que a estimulação inicial em macrófagos leva ao aumento da eliminação de parasitas devido à produção de NO e ROS no sítio inflamatório, prevenindo injúria hepática na fase crônica da doença.

**Palavras-chave:** Concanavalina-A. *Leishmania amazonensis*. proteção hepática.

ALVARENGA, D. S. **Leishmanicide activity and hepatoprotective of concanavalin-A in experimental infection by *L. amazonensis***. 2016. p. 55. Dissertation presented to the post graduate program in Experimental Pathology – State University of Londrina, Londrina, Brazil.

### ABSTRACT

The leishmaniasis is considered the sixth disease of greater importance by World Health Organization (WHO). It is caused by protozoans flagellated of genus *Leishmania* and is responsible for a spectrum of disorders in animals and humans. The course of disease is determined by immune response, on which macrophages, cytokines such as interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), tumor necrosis factor-  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) and reactive oxygen species (ROS) represents an important elements to control disease. Several studies have been show the potential imunomodulador of concanavalin-A (Con-A) in experimental infections. Thus, the aim of this study was evaluate the immune response of mice pretreated with Con-A or PBS and infected by *Leishmania amazonensis* and verify if the treatment is efficient to modulate the infection course. In this study, BALB/c mice were pretreated intraperitoneally with Con-A ( $250\mu\text{g mL}^{-1}$  PBS) or PBS ( $250\mu\text{L}$ ) for 72h and infected with  $10^7$  promastigotes form, to evaluate the cell migration, cytokines, NO, ROS production and liver histological aspect. Was found a higher number of lymphocytes and macrophages after treatment with Con-A at early of infection then PBS group. The percentage of infected macrophages pretreated with Con-A *in vivo* was statistically higher when compared with PBS group. Macrophages pretreated with Con-A and infected eliminate more *Leishmania*. A significant increase of TNF- $\alpha$  and IFN- $\gamma$  production in Con-A group was also observed. We found ROS levels in 30 minutes post infection in Con-A group but not in PBS group. The absolute number of cells per infiltrate area on the liver of Con-A group was significantly reduced when compared with PBS group. Our data demonstrate that Con-A has an immunomodulatory effects in experimental leishmaniasis, suggesting that the initial stimulation in macrophages led to increase elimination of parasites and due to NO and ROS production at inflammatory site, preventing liver injury in the chronic phase of disease.

**Key-words:** Concanavalin-A. *Leishmania amazonensis*. liver protection.

## LISTA DE ABREVIATURAS

APC	<i>Antigen Presenting Cell</i>
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
Con-A	Concanavalina-A
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
gp63	Glicoproteína 63
IDRM	Intradermorreação de Montenegro
IFN	<i>Interferon</i>
IL	Interleucina
iNOS	Óxido nítrico sintase induzível
L	<i>Leishmania</i>
LC	Leishmaniose Cutânea
LCD	Leishmaniose Cutânea Difusa
LCM	Leishmaniose Cutaneomucosa
LPG	Lipofosfoglicano
LT	Leishmaniose Tegumentar
LTA	Leishmaniose Tegumentar Americana
LV	Leishmaniose Visceral
M1	Macrófago tipo 1
M2	Macrófago tipo 2
MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i>
NK	<i>Natural Killer</i>
PCR	<i>Polimerase Chain Reaction</i>
RIFI	Reação de Imunofluorescência Indireta
SC	Sistema Complemento
TGF	Transforming Growth Factor
Th	Linfócitos T <i>helper</i>
TNF	<i>Tumoral Necrosis Factor</i>
V	<i>Viannia</i>

## SUMÁRIO

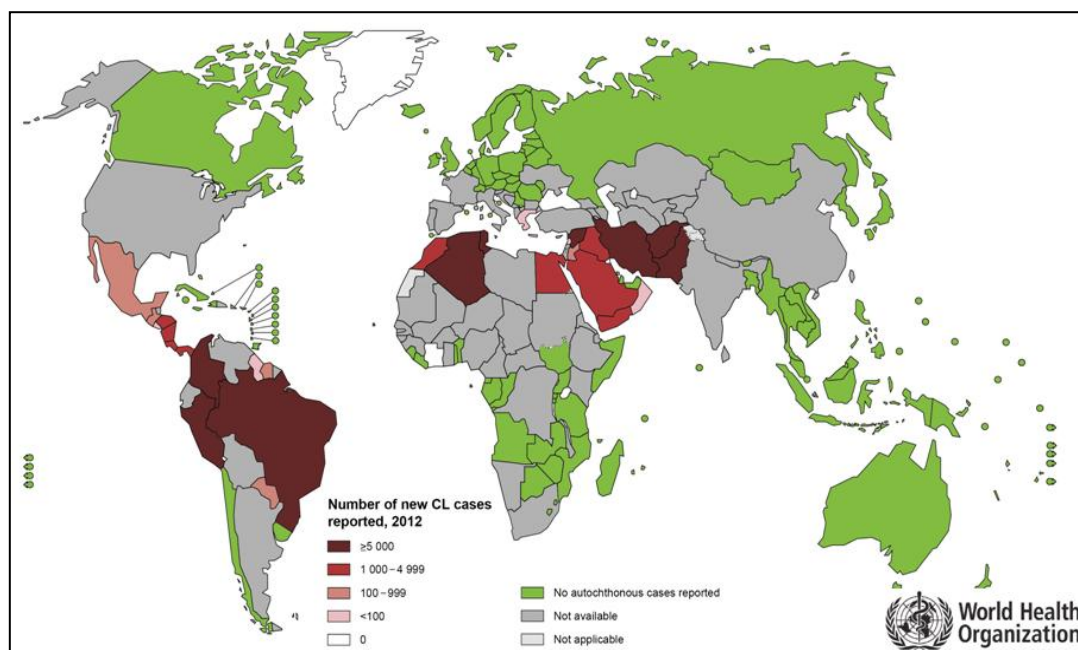
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	10
1.1 Epidemiologia.....	10
1.2 Agentes Etiológicos e Ciclo Biológico.....	11
1.3 Formas Clínicas da Leishmaniose.....	14
1.3.1 Leishmaniose Cutânea (LC) .....	15
1.3.2 Leishmaniose Cutânea Difusa (LCD) .....	15
1.3.3 Leishmaniose Cutaneomucosa (LCM) .....	15
1.4 Imunopatogenia .....	16
1.5 Diagnóstico e Tratamento .....	18
1.6 Concanavalina-A.....	20
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	22
3.1 Objetivos Gerais.....	22
3.2 Objetivos Específicos .....	22
<b>3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	23
<b>4. PRODUÇÃO CIENTÍFICA</b> .....	31
<b>5. CONCLUSÃO</b> .....	53
<b>6. ANEXOS</b> .....	54

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 Epidemiologia

As Leishmanioses formam um grupo de doenças não contagiosas, causadas por protozoários unicelulares pertencentes ao gênero *Leishmania*. De acordo com o *World Health Organization 2012* (WHO), estima-se que, no mundo, 310 milhões de pessoas estejam expostas ao risco de se infectar, com 1 milhão de casos registrados nos últimos 5 anos. Na literatura, são classificadas de acordo com o tropismo do parasito pelo tecido do hospedeiro vertebrado, em leishmaniose tegumentar (LT) e leishmaniose visceral (LV).

Nas Américas, a forma tegumentar tem sido classificada como Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) devido às características geográficas, espécies envolvidas e manifestações clínicas observadas (SVS/MS, 2010; GONTIJO, DE CARVALHO, 2003).



**Figura 1.** Distribuição da leishmaniose tegumentar no mundo Fonte: *World Health Organization Map Production: Control of neglected Tropical Diseases (NTD)*. WHO, 2012.

A LTA tem ampla distribuição nas regiões tropicais e subtropicais, onde há registro de casos principalmente no Brasil (Figura 1). No Leste do país, a incidência cresce a partir da floresta atlântica, na encosta do planalto, e se prolonga por esta, rumo ao oeste. É bastante disseminada na Bahia. Em Minas

Gerais, as áreas mais afetadas estão na bacia do rio Mucuri e rio Doce, que se continuam no Estado do Espírito Santo; e outras áreas endêmicas como sul de Minas e Triângulo Mineiro, além de Mato Grosso do Sul, Goiás e principalmente no Norte, na Floresta Amazônica (OLIART-GUZMÁN *et al.*, 2013; SILVEIRA *et al.*, 2008).

No país, as principais espécies responsáveis são *L. (Leishmania) amazonensis*; *L. (Viannia) braziliensis*, e *L. (V.) guyanensis* (DA-CRUZ, PIRMEZ, 2005; SILVEIRA *et al.*, 1999).

Em um estudo realizado por Negrão e Ferreira (2014) sobre a epidemiologia da LTA, observaram que no período de 2001 a 2010 ocorreram 248.834 casos no Brasil, sendo 6.878 só na região sul. Dentre estes, 5388 foram detectados no estado do Paraná, correspondendo a 78,33% da região, com aproximadamente o triplo da média anual registrada para toda a região sul (2,27) e a metade da média anual brasileira (13,63).

A LTA está entre as doenças infecciosas de maior importância para a saúde pública, não só pela ocorrência de deformidades na população, mas também o envolvimento psicológico, com reflexos no campo social e econômico, uma vez que, na maioria dos casos, pode ser considerada uma doença ocupacional, além pertencer ao grupo de doenças negligenciadas (WERNECK, *et al.*, 2011; GONTIJO, DE CARVALHO, 2003).

## 1.2 Agentes Etiológicos e Ciclo Biológico

O agente etiológico das leishmanioses são protozoários flagelados, pertencentes à ordem *Kinetoplastida*, família Trypanosomatidae e gênero *Leishmania*, podendo pertencer aos subgêneros *Viannia* ou *Leishmania* (MASLOV, PODLIPAEV, LUKES, 2001). São parasitos intracelulares obrigatórios do sistema fagocítico mononuclear. Durante o ciclo biológico apresenta-se sob duas formas principais: forma amastigota, que é ovóide e sem flagelo livre, e a forma promastigota, que é alongada e com flagelo livre (GONTIJO, DE CARVALHO, 2003; SVS/MS, 2010).

A *Leishmania* possui um ciclo heteroxeno, sendo que seus hospedeiros invertebrados são fêmeas de insetos da ordem *Diptera*, família Psychodidae, subfamília *Phlebotominae* e nas Américas do gênero *Lutzomyia*, os quais são

conhecidos popularmente como flebotomíneos (RANGEL, LAINSON, 2009; KILLICK-KENDRICK, 1999).

No Brasil, as principais espécies envolvidas são *Lutzomyia whitmani*, *L. flaviscutellata*, *L. umbratilis*, *L. intermedia*, *L. longipalpis*, *L. migonei*, *L. pessoai*, *L. wellcomei*. Quanto aos hospedeiros vertebrados, estão envolvidos uma grande variedade de mamíferos silvestres ou domésticos, como roedores, edentados (tatu, tamanduá, preguiça), marsupiais (gambá), canídeos e primatas, incluindo os seres humanos (GONTIJO, DE CARVALHO, 2003).

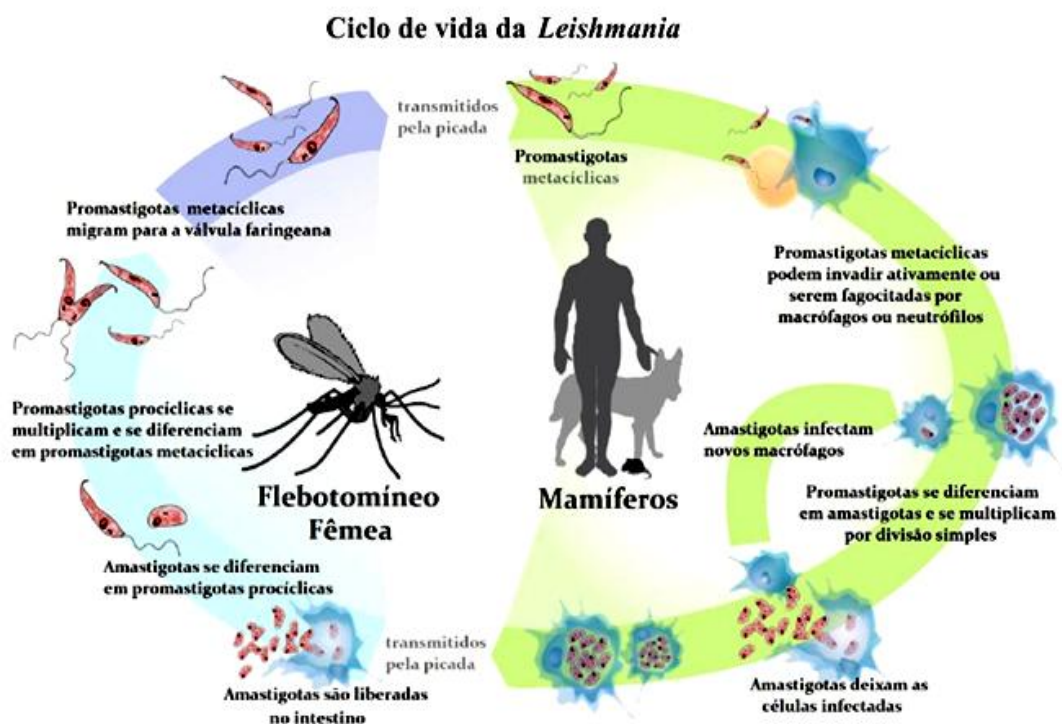
A manutenção do ciclo deste protozoário se dá quando o flebotomíneo infectado faz o repasto sanguíneo e transfere para o hospedeiro vertebrado, as formas promastigotas metacíclicas. A saliva do inseto tem um papel importante por ser um fator anticoagulante, além de ter propriedades vasodilatadoras e antiagregação das plaquetas, favorecendo o fluxo de sangue para a hematofagia. Além disso, a saliva é capaz de desencadear um processo inflamatório, levando a quimiotaxia de células *natural killer* (NK), monócitos, polimorfonucleares (neutrófilos e eosinófilos) sendo um imunoregulador (TAVARES *et al.*, 2011; DE MOURA *et al.*, 2010; MENEZES *et al.*, 2008).

As formas promastigotas metacíclicas são resistentes à lise do sistema complemento (SC) pela presença de lipofosfoliglicano (LPG) na membrana, que faz com que as frações C3 e C3b não se liguem diretamente à mesma, impedindo assim, a formação do complexo C5b-9 ou a formação de C5 convertase. Além disso, a presença da proteína gp63, uma metaloprotease também na membrana do parasito, promove a clivagem de C3b em C3bi, impedindo a ação do SC (REIS, GONTIJO, 2012; SILVEIRA *et al.*, 2008).

A internalização da *Leishmania* se faz através da fagocitose ou endocitose mediada por receptores na superfície do macrófago, sendo que várias espécies foram relacionadas a moléculas de interação diferentes com receptores do macrófago, como o receptor para molécula de manose-6-fosfato em *L. (L.) amazonensis* (SARAIVA, ANDRADE, DE SOUZA, 1987), manose-fucose em *L. (L.) donovani* (WILSON, PEARSON, 1986; BLACKWELL *et al.*, 1985), receptores para lectina, glicoconjugados e LPG envolvidos na adesão de *L. (L.) major* e *L. (L.) donovani* (PALATNIK *et al.*, 1989; HANDMANN, GODING, 1985).

Durante este processo, a célula hospedeira aumenta intensamente sua atividade, liberando produtos como óxido nítrico, hidróxidos e superóxidos, que são altamente lesivos para membranas celulares. Novamente, o LPG aparece no mecanismo de defesa para o parasito contra a ação destes radicais livres. Outro mecanismo de escape das promastigotas metacíclicas é utilizar a opsonização com C3b e C3bi para se ligarem aos receptores CR1 e CR3 do macrófago. Estes receptores promovem a fagocitose sem estimular o aumento da atividade respiratória da célula (SILVEIRA *et al.*, 2008).

Dentro do vacúolo parasitóforo do macrófago, as formas promastigotas se diferenciam em amastigotas, tornando-se capazes de se desenvolver e multiplicar por divisão binária. A multiplicação pode levar ao rompimento da célula, liberando amastigotas que podem ser fagocitadas por outros macrófagos (GONTIJO, DE CARVALHO, 2003; CUBA, 2000).



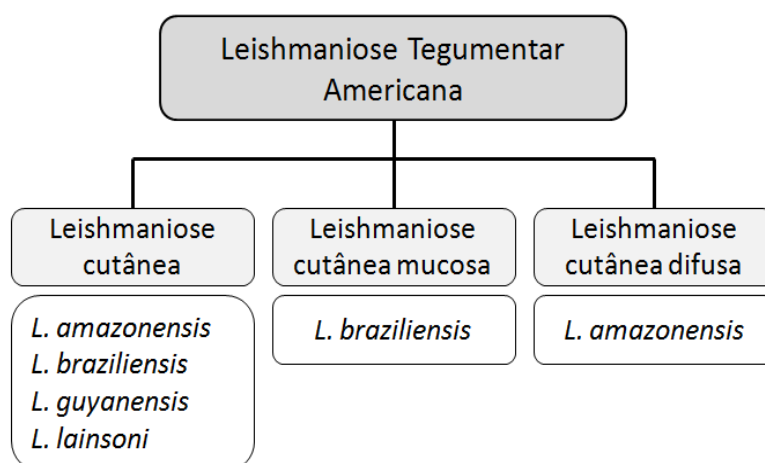
**Figura 3.** Ciclo de transmissão da *Leishmania* sp. Fonte: <http://www.apelocanino.org/>. Acesso: janeiro, 2016.

A infecção do hospedeiro invertebrado ocorre quando este realiza o repasto sanguíneo em mamíferos infectados e ingere as formas amastigotas. No intestino médio do flebotomíneo, as formas amastigotas se diferenciam em

formas promastigotas reiniciando o ciclo (REIS, GONTIJO, 2012; SILVEIRA *et al.*, 2009) (Figura 3).

### 1.3 Formas Clínicas da Leishmaniose

A LTA apresenta um amplo espectro de manifestações clínicas, histopatológicas e imunológicas, variando de lesões autorresolutivas a lesões desfigurantes. A infecção pode ser assintomática em indivíduos com a resposta imune inicial capaz de controlar a progressão, ou sintomática, resultando em alterações na pele e/ou mucosas (SILVEIRA *et al.*, 2008). Sendo assim, a LTA pode ser dividida em: leishmaniose cutânea (LC), leishmaniose cutânea difusa (LCD) e leishmaniose cutaneomucosa (LCM) (REITHINGER *et al.*, 2007; CUBA, 2000) (Figura 4).



**Figura 4.** Principais espécies de *Leishmania* relacionadas às formas clínicas na LTA. (CUBA, 2000; REITHINGER *et al.*, 2007).

A progressão da doença mediada pela resposta imune pode evoluir para os aspectos de hiperreatividade, caracterizado por hipersensibilidade, sendo a necrose do tecido mucoso a principal manifestação (LCM); ou hiporreatividade, com inibição parcial/total da hipersensibilidade, com disseminação das lesões nodulares (LCD). Enquanto as infecções por espécies do subgênero *Viannia* desenvolvem o estado de hiperreatividade (resposta intensa de linfócitos T CD4<sup>+</sup> *helper* 1 – Th1), espécies do subgênero *Leishmania*, como a *L.(L.) amazonensis*, podem evoluir para a hiporreatividade (resposta CD4<sup>+</sup> tipo Th2) (SILVEIRA *et al.*, 2008).

### **1.3.1 Leishmaniose Cutânea (LC)**

A LC é a forma mais comum da LTA, sendo caracterizada pela formação de úlceras únicas ou múltiplas na derme. As lesões geralmente aparecem em áreas expostas da pele com um eritema inicial, evoluindo para uma pápula ou nódulo com bordas elevadas, até tornar-se centralizada de fundo granuloso. A lesão cutânea cicatriza quando os pacientes recebem a terapia recomendada pelo Ministério da Saúde, podendo ainda ser curada de forma espontânea (REIS, GONTIJO, 2012; SVS/MS, 2010). A disseminação hematogênica ou linfática pode ocorrer em até 2% dos casos. Neste caso, as lesões são pequenas úlceras, numerosas e distantes do local das picadas (CARVALHO *et al.*, 1994).

### **1.3.2 Leishmaniose Cutânea Difusa (LCD)**

A LCD é uma manifestação grave e rara, caracterizada pela formação de lesões difusas não-ulceradas por toda a pele, contendo grande número de amastigotas. O curso da doença está relacionado com a deficiência imunológica do paciente, em que a resposta celular está deprimida com relação aos antígenos de *Leishmania* levando-o a um estado de anergia imunológica (REIS, GONTIJO, 2012; SILVEIRA *et al.*, 2009; COSTA, 2009; SILVEIRA *et al.*, 2008).

### **1.3.3 Leishmaniose Cutaneomucosa (LCM)**

Esta manifestação cursa de maneira crônica no qual 70% dos casos apareceram cinco anos após a lesão primária cutânea (REIS, GONTIJO, 2012). O processo ulcerativo é grave com múltiplas ou extensas lesões destrutivas da cavidade oral e nasofaríngea, podendo propagar-se pela face. Estas mutilações são decorrentes de uma intensa resposta inflamatória que leva à perda tecidual e geralmente, não se cura espontaneamente (SILVEIRA *et al.*, 2009; OLIVEIRA-NETO *et al.*, 1998).

## 1.4 Imunopatogenia

A infecção decorrente da LTA gera respostas imunológicas muito complexas. A evolução e o curso da doença dependem da espécie de *Leishmania*, da interação parasito-hospedeiro e das populações celulares envolvidas na resposta imunológica gerada na infecção, como tipo e quantidade de citocinas produzidas e secretadas (SILVEIRA *et al.*, 2009).

Após a infecção, inicia-se uma resposta inflamatória, que resulta na quimiotaxia de uma variedade de células, como neutrófilos, células NK, células dendríticas e monócitos. Os neutrófilos representam a primeira população celular a chegar ao sítio inflamatório, com uma importante participação na fagocitose e destruição da *Leishmania*. Os macrófagos são posteriormente recrutados para o sítio inflamatório, através da secreção de citocinas e quimiocinas liberadas, onde ocorre o fenômeno conhecido como "Cavalo de Tróia", quando os parasitos são transferidos para o macrófago após a fagocitose do neutrófilo infectado em apoptose (GOMES-SILVA, 2011; COSTA, 2009; SILVEIRA *et al.*, 2009).

Os macrófagos e as células dendríticas possuem um papel essencial durante a infecção, além de representarem as populações de células hospedeiras para a *Leishmania*, também contribuem para a destruição da mesma. Uma vez ativados, aumentam a expressão e síntese da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS), e leva por consequência, ao aumento da produção de óxido nítrico (NO) e radicais livres, contribuindo para a eliminação do parasito (STENGER *et al.*, 1994). Existem estudos demonstrando que espécies de *Leishmania*, como a *L. amazonensis* são capazes de inibir a ativação de macrófagos ou resistir aos mecanismos leishmanicidas gerados, com menor responsividade aos estímulos por citocinas (WANASEN *et al.*, 2007; QI *et al.*, 2004).

A capacidade biológica funcional, diversidade e plasticidade de monócitos e macrófagos têm sido determinadas em estudos *in vitro*, demonstrando a natureza de macrófagos M1 (ativados classicamente) e M2 (ativados alternativamente). A atividade fisiológica dos macrófagos envolve a regulação da resposta imune, a ação efetora inata, e também os processos associados à reparação tecidual (MANTOVANI *et al.*, 2013).

Após a estimulação por citocinas Th1, em particular o Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), os macrófagos intensificam a função efetora contra patógenos intracelulares, alterando-se classicamente para o fenótipo M1. As citocinas Th2, como as Interleucinas IL-4, IL-13, IL-33, IL-10, o Fator de transformação do crescimento- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) (MARTINEZ, HELMING, GORDON, 2009), ou por indução de microorganismos (PEARCE, MACDONALD, 2002), são capazes de polarizar alternativamente para M2. Macrófagos da classe M2 podem impedir a imunidade protetora contra protozoários. Já foi demonstrado em modelo animal de LC, que a indução de macrófagos M2 favorece a progressão da doença (HÖLSCHER *et al.*, 2006).

Os macrófagos também atuam como células apresentadoras de antígenos (APCs) aos linfócitos T CD4<sup>+</sup>, no contexto do MHC classe II (GOMES-SILVA, 2011; BOYMAN *et al.*, 2009). As APCs são capazes de reconhecer moléculas presentes na superfície da *Leishmania*, como o lipofosfoglicano (LPG) e a metaloprotease gp63, levando à produção de citocinas próinflamatórias por linfócitos, como Fator de Necrose Tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), Interferon-  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), interleucina-12 (IL-12), IL-1, IL-6, que são decisivas para o controle da disseminação do parasito ou para a evolução das lesões, visto que, em níveis muito elevados, estas citocinas podem levar a destruição tecidual local (GOMES-SILVA, 2011; SILVEIRA *et al.*, 2009). O LPG presente na *Leishmania* é responsável por inibir a geração de metabólitos oxidativos e a ação de enzimas lisossomais, eliminando os radicais de oxigênio de macrófagos, enquanto que a gp63 degrada enzimas lisossomais (SVS/MS, 2010). Em um estudo realizado por Gomez e cols. em 2009, demonstrou que a gp63 também é capaz de clivar tirosina fosfatases no citoplasma de macrófagos ativados.

Na LTA, o desenvolvimento da lesão e o curso da doença são determinados pela resposta imunológica mediada pelos linfócitos T. A resistência e a susceptibilidade do hospedeiro foram observadas em modelos murinos, pelo balanço entre as citocinas produzidas pelos linfócitos T CD4<sup>+</sup> Th1 (principalmente IL-2, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ ) e Th2 (que inclui IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13) (SILVEIRA *et al.*, 2009; GOMES-SILVA, 2011; SCOTT *et al.*, 2004; BACELLAR *et al.*, 2002; REINER, LOCKSLEY, 1993; PIRMEZ *et al.*, 1993). O TNF- $\alpha$  é

capaz de atuar sinergicamente com o IFN- $\gamma$  em macrófagos, aumentando a atividade leishmanicida destas células (GOMES *et al.*, 2003).

O subtipo Th1 desempenha um papel importante na ativação dos macrófagos via IFN- $\gamma$ . Por outro lado, os mecanismos para o agravamento da doença estão relacionados com a produção de citocinas do tipo II que inibem a diferenciação de Th1 e conseqüentemente, produção de TNF- $\alpha$ ,  $\beta$  e IFN- $\gamma$ ; (ALEXANDER, BRYSON, 2005; SCOTT *et al.*, 2004; COUTINHO *et al.*, 1998). Estudos mostraram que a espécie *L. amazonensis* é capaz de induzir uma resposta anti-inflamatória, com a produção de IL-10 (BARRETO-DE-SOUZA *et al.*, 2015).

### 1.5 Diagnóstico e Tratamento

O diagnóstico clínico é realizado com base na característica da lesão que o paciente apresenta associado à anamnese. No entanto a doença só pode ser diagnosticada após exame laboratorial. Os exames laboratoriais podem ser através da pesquisa do parasita, provas imunológicas e métodos de biologia molecular (SAMPAIO *et al.*, 2002; CUBA, 2000).

A Intradermoreação de Montenegro (IDRM) é um teste imunológico baseado na mensuração da resposta imune celular com a injeção intradérmica de antígenos do parasito na face interna do braço. É bastante utilizado no Brasil como auxílio no diagnóstico. Alguns autores descreveram o uso deste teste em pacientes após o tratamento para verificar a anergia imunológica. A reação é positiva quando ocorre uma resposta inflamatória local, resultando numa pápula ou nódulo num período de 48 a 72 horas, sendo consideradas positivas as reações com área de endureção maior ou igual a 5 mm. (GUERRA *et al.*, 2003; SILVEIRA *et al.*, 1999).

Os testes sorológicos avaliam a presença de anticorpos anti-*Leishmania* circulantes e podem ser realizados através do ensaio imuno-enzimático (ELISA) e a reação de imunofluorescência indireta (RIFI), com sensibilidade relativamente alta (CUBA, 2000; SILVEIRA *et al.*, 1999) (Tabela 1).

Para o tratamento da LTA, faz-se o uso de antimoniais pentavalentes com administração intramuscular, intravenosa ou local. Estes possuem ação leishmanicidas por interferirem no metabolismo bioenergético das formas

amastigotas de *Leishmania* (PELISSARI *et al.*, 2011; ALMEIDA, SANTOS, 2011; ROMERO *et al.*, 2001).

**Tabela1.** Diferenças em achados laboratoriais nas formas clínicas da LTA. Adaptado de Atlas de Leishmaniose Tegumentar Americana – Diagnóstico clínico e diferencial; Ministério da Saúde, 2006.

Achados	Formas Clínicas		
	LCD	LC	LCM
1. Clínicos	Placas infiltradas e nódulos não ulcerados disseminados	Úlcera(s) limitada(s)	Lesão destrutiva do septo/palato
2. Imunológicos			
Resposta celular			
IDRM	Não reator	Reator	Reator (exacerbada)
Citocinas	Sem produção de IFN- $\gamma$ , $\downarrow$ TNF- $\alpha$	$\uparrow$ IFN- $\gamma$ $\uparrow$ TNF- $\alpha$	$\uparrow$ IFN- $\gamma$ $\uparrow\uparrow$ TNF- $\alpha$
Linfoproliferação	Negativa	Positiva	Positiva
Resposta humoral (sorologia)	Reator	Reator	Reator
3. Esfregaço	Riqueza parasitária	Escassez parasitária	Escassez/Ausência
4. Histopatológico	Sem formação de granuloma, poucos linfócitos e muitos macrófagos infectados	Com formação de granuloma e infiltração de linfócitos	Escassa formação de granuloma e infiltração de mononucleares
5. Espécie de <i>Leishmania</i> envolvida	<i>L. (L.) amazonensis</i>	<i>L. (L.) amazonensis</i> <i>L. (V.) braziliensis</i>	<i>L. (V.) braziliensis</i>
6. Cura espontânea	Não	Possível	Não

Entretanto esta medicação possui algumas desvantagens, como alto custo, difícil administração e alta toxicidade, podendo desencadear efeitos adversos como artralgia, mialgia, anorexia, náusea, dor abdominal, pancreatite, distúrbios intestinais, cefaléia, alterações cardíacas e hepáticas, e insuficiência renal aguda (NOGUEIRA, SAMPAIO, 2001). Além do mais, não deve ser administrado em gestantes, pacientes com idade acima dos 50 anos, cardiopatas, nefropatas, hepatopatas e portadores da doença de Chagas (MAYRINK *et al.*, 2006; NOGUEIRA, SAMPAIO, 2001).

Na maioria dos casos, o tratamento é efetivo, porém, a dose do medicamento e o tempo de tratamento dependem da forma clínica. Os pacientes são considerados curados quando apresentam epitelização completa

da lesão, regressão total da infiltração e eritema em até três meses após a conclusão do esquema terapêutico (SVS/MS, 2010).

A recidiva da doença e a resistência ao tratamento são fatores que motivam a busca de compostos mais eficientes e menos agressivos, considerando que o controle da doença por prevenção é de grande complexidade (FALQUETO, SESSA, 2005).

## 1.6 Concanavalina-A

A Concanavalina-A (Con-A) é uma lectina extraída da semente de *Canavalia ensiformis*, da família *Fabaceae*, tem sido amplamente utilizada nas pesquisas pela sua capacidade de intensificar a resposta imune, levando à produção de citocinas do tipo 1 por linfócitos e consequente ativação de células (PASSWELL *et al.*, 1986).

A Con-A é ligante de manose e glucose  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$  dependente. Sua forma monomérica é composta por 237 resíduos de aminoácidos, formando duas folhas  $\beta$  anti-paralelas (LI *et al.*, 2011). Sua organização estrutural é dependente do pH, sendo que acima de 5,5 se apresenta em tetrâmero e abaixo de 5,5, dímero (AGRAWAL, GOLDSTEIN, 1965).

Sabe-se que a Con-A é capaz de induzir a uma linfoproliferação pela ligação direta à molécula CD3 e ao receptor TCR de linfócitos T (DE CARVALHO *et al.*, 2012). Ao se ligar à célula, a Con-A dispara uma cascata de eventos, que envolve a fosforilação de proteínas, fluxo de cálcio e geração de mensageiros secundários resultando na transcrição de genes pró-inflamatórios como iNOS, TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-12, INF- $\gamma$  (KESHERWANI, SODHI, 2007).

Além disso, a Con-A aumenta a expressão de receptores de manose em macrófagos (GERALDINO *et al.*, 2010; LOYOLA *et al.*, 2002) que, associado ao aumento de citocinas como INF- $\gamma$  e IL1 $\beta$  e IL-17, melhora a capacidade fagocítica frente a patógenos (DE CARVALHO *et al.*, 2012; KESHERWANI, SODHI, 2007). Uma vez ativados pela Con-A, os macrófagos também conseguem produzir uma quantidade aumentada de peróxido de hidrogênio, contribuindo para a destruição da *Leishmania* (PASSWELL *et al.*, 1986).

Muitos modelos foram propostos relacionando a Con-A com injúria hepática, levando a uma resposta exacerbada de linfócitos T CD4<sup>+</sup> Th1, com

uma produção aumentada de citocinas, como o IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ , levando a destruição nos hepatócitos (HU *et al.*, 2014; WANG *et al.*, 2012; NAKAMURA *et al.*, 2001). Contudo, outros estudos com doses menores desta lectina, mostraram uma resposta imune eficiente contra *Candida albicans*, aumentando a atividade fagocítica de macrófagos, bem como a expressão de receptores de manose, e a população de macrófagos e neutrófilos no sítio inflamatório (GERALDINO *et al.*, 2010; CONCHON-COSTA *et al.*, 2007; LOYOLA *et al.*, 2002).

Em um estudo *in vitro* utilizando *L. major* e monócitos estimulados com Con-A, observou-se aumento de IFN- $\gamma$  e consequente atividade leishmanicida, além do aumento da produção de peróxido de hidrogênio pelas células estimuladas (PASSWELL *et al.*, 1986).

Embora alguns trabalhos tenham sido propostos utilizando o papel imunomodulador da Con-A, pouco se sabe da interação desta lectina em modelo *in vivo* de infecção com *L. amazonensis*. Sendo assim, considerando o efeito da Con-A para induzir a resposta Th1 em linfócitos, com consequente produção de citocinas pró-inflamatórias levando ao aumento da atividade fagocítica de macrófagos, torna-se interessante verificar a atividade *in vivo* em modelo de infecção com *L. amazonensis*, bem como avaliar se nestas condições a Con-A desempenha um papel importante para controlar a infecção.

## **2. OBJETIVOS**

### **3.1 Objetivos Gerais**

Estudar os efeitos *in vivo* da Concanavalina-A em infecção experimental por *Leishmania (L.) amazonensis* em camundongos BALB/c.

### **3.2 Objetivos Específicos**

Avaliar a migração celular em camundongos BALB/c após o pré-tratamento intraperitoneal com Con-A ou PBS e infecção por *L. amazonensis*.

Verificar a capacidade fagocítica e o efeito leishmanicida de macrófagos pré-tratados e infectados *in vivo* com formas promastigotas.

Quantificar a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), Óxido nítrico e de citocinas em células de camundongos pré-tratados com Con-A ou PBS e infectados.

Estudar os efeitos da Con-A na fase crônica em cortes histológicos de fígado de camundongos BALB/c infectados por *L. amazonensis*.

### 3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRAWAL, B. B. L.; GOLDSTEIN, I. J. Specific binding of concanavalin-A to cross-linked dextran gels. **J Biochem.** v. 96. p. 23c–25c, 1965.

ALEXANDER, J; BRYSON, K; T helper (h) 1/Th2 and *Leishmania*: paradox rather than paradigm. **Rev. Immunol.** v. 99. p. 17-23, 2005.

ALMEIDA, O. L. S.; SANTOS, J. B. Avanços no tratamento da leishmaniose tegumentar do novo mundo nos últimos dez anos: uma revisão sistemática da literatura. **An Bras Dermatol.** v. 86. p. 497-506, 2011.

BACELLAR, O.; LESSA, H.; SCHRIEFER, A.; MACHADO, P.; RIBEIRO, J.; DUTRA, W. O.; GOLLOB, K. J.; CARVALHO, E. M. Up-regulation of Th1-type responses in mucosal leishmaniasis patients. **Infect Immun.** v. 70. p. 6734-40, 2002.

BARRETO-DE-SOUZA, V.; FERREIRA, P. L.; VIVARINI, A. C.; CALEGARI-SILVA, T.; SOARES, D. C.; REGIS, E. G.; PEREIRA, R. M.; SILVA, A. M.; SARAIVA, E. M.; LOPES, U. G.; BOU-HABIB, D. C. IL-27 enhances *Leishmania amazonensis* infection via ds-RNA dependent kinase (PKR) and IL-10 signaling. **Immunobiology.** v. 220. n. 4. p. 437-44, 2015.

BLACKWELL, J. M.; EZEKWITZ, A. B.; ROBERTS, M. B.; CHANNON, J. Y.; SIM, R. B.; GORDON, S. Macrophage complement and lectin-like receptors bind *Leishmania* in the absence of serum. **J Exp Med.** v.162. p.224-231, 1985.

BOYMAN, O.; LÉTOURNEAU, S.; KRIEG, C.; SPRENT, J. Homeostatic proliferation and survival of naïve and memory T cells. **Eur. J. Immunol.** v. 39. p. 2088–2094, 2009.

CARVALHO, E. M.; BARRAL, A.; COSTA, J. M. ; BITTENCOURT, A.; MARSDEN, P. Clinical and immunopathological aspects of disseminated cutaneous leishmaniasis. **Acta Trop.** v. 56. n. 4. p.315-25, 1994.

CONCHON-COSTA, I.; LOYOLA, W.; GAZIRI, L. C. J.; CUSTODIO, L. A.; FELIPE, I. Low dose of concanavalina-A enhances innate immune response and prevents liver

injury in mice infected with *Candida albicans*. **FEMS Immunol Med Microbiol.** v. 49. p. 330-336, 2007.

COSTA, J. F.; WANDERLEY, J. L. M.; COSTA, J. M. L.; BARCINSKI, M. A. BARRAL, A.; BORGES, V. M. Mimetismo Apoptótico como possível mecanismo imunopatogênico da Leishmaniose Cutânea Difusa (LCD). **Gaz. Med. Bahia.** v. 79. p. 40-44, 2009.

COUTINHO, S. G.; DA-CRUZ, A. M.; BERTHO, A. L.; SANTIAGO, M. A.; DE-LUCA, P. Immunologic patterns associated with cure in human American cutaneous leishmaniasis. **Braz J Med Biol Res.** v. 31. p.139-142, 1998.

CUBA, C. Diagnostico parasitologico de la Leishmaniasis Tegumentaria Americana. **Rev Med Exp.** v.17. p.1-4, 2000.

DA-CRUZ, A. M.; PIRMEZ, C. Leishmaniose Tegumentar Americana. In: Coura Jr, Dinâmica das doenças infecciosas, ed. Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan**, 2005.

DE CARVALHO, P. G. C.; CUSTÓDIO L. A.; QUIRINO, G. F. S.; ANDRADE, C. G. T. J.; CONCHON-COSTA, I.; FELIPE, I.. Concanavalin-a induces il-17 production during the course of *Candida albicans* infection. **FEMS Immunol Med Microbiol.** v. 64. n. 2. p. 273-279, 2012.

DE MOURA, T. R.; OLIVEIRA, F.; RODRIGUES, G. C.; CARNEIRO, M. W.; FUKUTANI, K. F.; NOVAIS, F. O.; MIRANDA, J. C.; BARRAL-NETTO, M.; BRODSKYN, C.; BARRAL, A.; DE OLIVEIRA, C. I. Immunity to *Lutzomyia intermedia* Saliva Modulates the Inflammatory Environment Induced by *Leishmania braziliensis*. **PLoS Negl Trop Dis.** v. 4. e712. 2010.

FALQUETO, A.; SESSA, P.A. Leishmaniose tegumentar americana. In: VERONESI, R.; FOCACCIA, R. Tratado de Infectologia. 3 ed. São Paulo: **Atheneu**, p.1543-1557, 2005.

GERALDINO, T. H.; VITO, E.; CUSTÓDIO, L. A.; CONCHON-COSTA, I.; GAZIRI, L. C. J.; FELIPE, I.; LOYOLA, W.; BONIFÁCIO, K. L. Increased tumour necrosis factor-  $\alpha$  production, higher mannose receptor activity and ability to kill *Candida* by

concanavalin-A-activated macrophages. **FEMS Immunol Med Microbiol.** v. 59. p. 11–17, 2010.

GOMES, I. N.; CALABRICH, A. F.; TAVARES, Rda S.; WIETZERBIN, J.; DE FREITAS, L. A.; VERAS, P. S.. Differential properties of CBA/J mononuclear phagocytes recovered from an inflammatory site and probed with two different species of *Leishmania*. **Microbes Infect.** v. 5. n. 4. p. 251-260, 2003.

GOMES-SILVA, A. Ativação de linfócitos remanescentes na infecção por *Leishmania (Viannia) braziliensis*: reflexões sobre prognóstico, critérios de cura e imunoprofilaxia na leishmaniose tegumentar Americana. 2011. Tese (Doutorado em Medicina Tropical) – Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro;

GOMEZ, M. A.; CONTRERAS, I.; HALLÉ, M.; TREMBLAY, M. L.; MCMASTER, R. W.; OLIVIER, M. *Leishmania* GP63 Alters Host Signaling Through Cleavage-Activated Protein Tyrosine Phosphatases. **Sci Signal.** v. 2. n. 90. ra58, 2009.

GONTIJO, B.; DE CARVALHO, M. L. R. Leishmaniose tegumentar americana. **Rev Soc Bras Med Trop.** v. 36. n.1. p. 71-80, 2003.

GUERRA, J. A. O.; TALHARI, S.; PAES, M. G.; GARRIDO, M.; TALHARI, J. M. Aspectos clínicos e diagnósticos da leishmaniose tegumentar americana em militares simultaneamente expostos à infecção na Amazônia. **Rev Soc Bras Med Trop.** v. 36. p. 587-590, 2003.

HANDMAN, E.; GODING, J. W. The *Leishmania* receptor for macrophage is a lipid containing glycoconjugate. **Eur Mol Biol Org J.** v.4. p. 329-336, 1985.

HÖLSCHER, C.; ARENDSE, B.; SCHWEGMANN, A.; MYBURGH, E.; BROMBACHER, F. Impairment of alternative macrophage activation delays cutaneous leishmaniasis in nonhealing BALB/c mice. **J Immunol.** v. 176. p. 1115–21, 2006.

HU, B.; ZOU, Y.; LIU, S.; WANG, J.; ZHU, J.; LI, J.; BO, L.; DENG, X. Salidroside Attenuates Concanavalin A-Induced Hepatitis via Modulating Cytokines Secretion and Lymphocyte Migration in Mice. **Mediators Inflamm.** v. 2014, ID 314081, 2014.

KESHERWANI, V.; SODHI, A. Differential activation of macrophages in vitro by lectin Concanavalin A, Phytohemagglutinin and Wheat germ agglutinin: Production and regulation of nitric oxide. **Nitric Oxide**, v. 16, p. 294–305, 2007.

KILLICK-KENDRICK, R. The biology and control of phlebotomine sand flies. **Clin Dermatol**. v. 17. p. 279–89, 1999.

LI, W. W.; YU, J. Y.; XU, H. L.; BAO, J. K. Concanavalin A: A potential anti-neoplastic agent targeting apoptosis, autophagy and anti-angiogenesis for cancer therapeutics. **Biochem Biophys Res Commun**. v. 414. n. 2. p. 282–286, 2011.

LOYOLA, W.; GAZIRI, D. A.; GAZIRI, L. C.; FELIPE, I. Concanavalin-A enhances phagocytosis and killing of *Candida albicans* by mice peritoneal neutrophils and macrophages. **FEMS Immunol Med Microbiol**. v. 3. n. 3. p. 201-8, 2002.

MANTOVANI, A.; BISWAS, S.; GALDIERO, M. R.; SICA, A.; LOCATI, M. Macrophage plasticity and polarization in tissue repair and remodelling. **J Pathol**. v. 229. p. 176–185, 2013.

MARTINEZ, F. O.; HELMING, L.; GORDON, S. Alternative activation of macrophages: an immunologic functional perspective. **Annu Rev Immunol**. v. 27. p. 451–483, 2009.

MASLOV, D. A.; PODLIPAEV, S. A. LUKES, J. Phylogeny of the kinetoplastida: taxonomic problems and insights into the evolution of parasitism. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. v. 96. n. 3. p. 397-402, 2001.

MAYRINK, W.; BOTELHO, A. C.; MAGALHÃES, P. A.; BATISTA, S. M.; LIMA, A. O.; GENARO, O.; COSTA, C. A.; MELO, M. N.; MICHALICK, M. S.; WILLIAMS, P.; DIAS, M.; CAIAFFA, W. T.; NASCIMENTO, E.; MACHADO-COELHO, G. L. Immunotherapy, immunochemotherapy and chemotherapy for American cutaneous leishmaniasis treatment. *Rev Soc Bras Med Trop*. v. 39. n. 1. p. 14-21, 2006.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. Atlas de Leishmaniose Tegumentar Americana: Diagnósticos Clínico e Diferencial - 1ª ed. 2006.

MENEZES, M. J.; COSTA, D. J.; CLARÊNCIO, J.; MIRANDA, J. C.; BARRAL, A.; BARRAL-NETTO, M.; BRODSKYN, C.; DE OLIVEIRA, C. I. Immunomodulation of

human monocytes following exposure to *Lutzomyia intermedia* saliva. *BMC Immunol.* v. 10. p. 09-12, 2008.

NAKAMURA, K.; OKADA, M.; YONEDA, M.; TAKAMOTO, S.; NAKADE, Y.; TAMORI, K.; ASO, K.; MAKINO, I. Macrophage inflammatory protein-2 induced by TNF-alpha plays a pivotal role in concanavalin A-induced liver injury in mice. *J Hepatol.* v. 35. n. 2. p. 217-24, 2001.

NEGRÃO, G. N.; FERREIRA, M. E. M. C. Considerações sobre a Leishmaniose Tegumentar Americana e sua expansão no território brasileiro. *Rev Percorso.* v. 6. n. 1. p. 147- 68, 2014.

NOGUEIRA, L. S. C.; SAMPAIO, R. N. R. Estudo hospitalar da leishmaniose tegumentar Americana (LTA): epidemiologia e tratamento. *An Bras Dermatol.* v. 76. n. 1. p. 51-62, 2001.

OLIART-GUZMÁN, H.; MARTINS, A. C.; MANTOVANI, S. A. S.; BRAÑA, A. M.; DELFINO, B. M.; PEREIRA, T. M.; SANTOS, A. P.; FILGUEIRA JÚNIOR, J. A.; CASTELO BRANCO, F. L. C.; CAMPOS, R. G.; OLIVEIRA, C. S. M.; MUNIZ, P. T.; SILVA-NUNES, M. Epidemiological profile of American cutaneous leishmaniasis in the amazonian frontier: a retrospective study in Assis Brasil, Acre, Brazil. *Rev patol trop.* v. 42. n. 2. p. 187-200, 2013.

OLIVEIRA-NETO, M. P.; MATTOS, M.; SOUZA, C. S.; FERNANDES, O.; PIRMEZ, C. Leishmaniasis recidiva cutis in New World cutaneous leishmaniasis. *Int J Dermatol.* v. 37. n. 11. p. 846-9, 1998.

PALATNIK, C. B.; BOROJEVIC, R.; PREVIATO, J. O.; MENDONÇA-PREVIATO, L. Inhibition of *Leishmania donovani* promastigote internalization into murine macrophages by chemically defined parasite glycoconjugate ligands. *Inf and Immunity.* v. 57. p. 754-763, 1989.

PASSWELL, J. H.; SHOR, R.; GAZIT, E.; SHOHAM, J. The effects of Con A-induced lymphokines from the T-lymphocyte subpopulations on human monocyte leishmaniacal capacity and H2O2 production. *Immunol.* v. 59. p. 245-250, 1986.

PEARCE, E. J.; MACDONALD, A. S. The immunobiology of schistosomiasis. **Nat Rev Immunol.** v. 2. p. 499–511, 2002.

PELISSARI, D. M.; CECHINEL, M. P.; SOUZA-GOMES, M. L.; LIMA-JÚNIOR, F. E. F. Tratamento da Leishmaniose Visceral e Leishmaniose Tegumentar Americana no Brasil. **Epidemiol Serv Saúde.** v. 20. p. 107-110, 2011.

PIRMEZ, C.; YAMAMURA, M.; UYEMURA, K.; PAES-OLIVEIRA, M.; CONCEIÇÃO-SILVA, F.; MODLIN, R. L.; Cytokine patterns in the pathogenesis of human leishmaniasis. **J Clin Invest.** v. 91. p. 1390-5, 1993.

QI, H.; JI, J.; WANASEN, N.; SOONG, L. Enhanced replication of *Leishmania amazonensis* amastigotes in gamma interferon-stimulated murine macrophages: implications for the pathogenesis of cutaneous *Leishmaniasis*. **Infect Immun.** v. 72. n. 2. p. 988-995, 2004.

RANGEL, E. F.; LAINSON, R. Proven and putative vectors of American cutaneous leishmaniasis in Brazil: aspects of their biology and vectorial competence. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* v. 104. n. 7. p. 937-954, 2009.

REINER, S. L.; LOCKSLEY, R. M. Cytokines in the differentiation of Th1/Th2 CD4+ subsets in leishmaniasis. **J Cell Biochem.** v. 53. p. 323-8, 1993.

REIS, A. B.; GONTIJO, C. M. F. Leishmaniose Tegumentar Americana. In: NEVES, David Pereira (Ed.). *Parasitologia Humana.* 12 ed. São Paulo: **Atheneu**, 2012. cap.8.

REITHINGER, R.; DUJARDIN, J. C.; LOUZIR, H.; PIRMEZ, C.; ALEXANDER, B.; BROOKER, S. Cutaneous leishmaniasis. **Lancet Infect Dis.** v. 7. p. 581–96, 2007.

REY, L. *Leishmania* e leishmaníases: os parasitos. In: Rey, L. *Parasitologia.* 4<sup>a</sup> ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; p.359-371, 2008.

ROMERO, G. A. S; GUERRA, M. V. F; PAES, M. G; MACÊDO, V. O. Comparison of cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania (Viannia) brasiliensis* and *L. (V) guyanensis* in Brazil: Therapeutic response to meglumine antimoniate. **Am. J. Trop. Med Hyg.** v. 65. p. 456-465, 2001.

SAMPAIO, R. N. R.; ANDRADE, G. B.; PEREIRA, A. C.; DA SILVA, E. A.; CUBA, C. A. C. Estudo comparativo de técnicas de demonstração de amastigotas e isolamento de promastigotas no diagnóstico da leishmaniose tegumentar americana. **An. Bras. Dermatol**, v. 77. p. 557-561, 2002.

SARAIVA, E. M. B.; ANDRADE, A. F. B.; DE SOUZA, W. Involvement of the macrophage mannose-6-phosphate receptor in the recognition of *Leishmania mexicana amazonensis*. **Parasitol Research** v. 73. p. 411-416, 1987.

SCOTT, P.; ARTIS, D.; UZONNA, J.; ZAPH, C. The development of effector and memory T cells in cutaneous leishmaniasis: the implications for vaccine development. **Immunol Rev.** v. 201. p. 318-338, 2004.

SILVEIRA, F. T.; LAINSON, R.; GOMES, C. M. C.; LAURENTI, M. D.; CORBETT, C. E. P. Immunopathogenic competences of *Leishmania (V.) braziliensis* and *L. (L.) amazonensis* in American cutaneous leishmaniasis. **Parasite Immunol.** v. 31. p. 423-431, 2009.

SILVEIRA, F. T.; MÜLLER, S. R.; DE-SOUZA, A. A. A.; LAINSON, R.; GOMES, C. M. C.; LAURENTI, M. D.; CORBETT, C. E. P. Review of the pathogenesis of the American Tegumentary Leishmaniasis in Amazonian, with emphasis to the disease due to *Leishmania (V.) braziliensis* e *Leishmania (L.) amazonensis*. **Rev Para Med.** v. 22, p. 9-20, 2008.

SILVEIRA, T. G. V.; ARRAES, S. M. A. A.; BERTOLINI, D. A.; TEODORO, U.; LONARDONI, M. V. C.; ROBERTO, A. C. B. S.; RAMOS, M.; SOBRINHO, A. N.; ISHIKAWA, E.; SHAW, J. Observações sobre o diagnóstico laboratorial e a epidemiologia da leishmaniose tegumentar no Estado do Paraná, sul do Brasil. **Rev Soc Bras Med Trop.** v. 32. p. 413-423, 1999.

STENGER, S.; THURING, H.; ROLLINGHOFF, M.; BOGDAN, C. Tissue expression of inducible nitric oxide synthase is closely associated with resistance to *Leishmania major*. **J Exp Med.** v. 180. n. 3. p. 783-79, 1994.

SVS/MS (MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde). [Internet] Normas e Manuais Técnicos. Brasília - 2ª ed. [atualizada em 2010]. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana; [acesso em 2012 em Abril].

Disponível: [bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual\\_vigilancia\\_leishmaniose\\_tegumentar\\_america.pdf](http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_vigilancia_leishmaniose_tegumentar_america.pdf).

TAVARES, N. M.; SILVA, R. A.; COSTA, D. J.; PITOMBO, M. A.; FUKUTANI, K. F.; MIRANDA, J. C.; VALENZUELA, J. G.; BARRAL, A.; DE OLIVEIRA, C. I.; BARRAL-NETTO, M.; BRODSKY, C. *Lutzomyia longipalpis* Saliva or Salivary Protein LJM19 Protects against *Leishmania braziliensis* and the Saliva of Its Vector, *Lutzomyia intermedia*. **PLoS Negl Trop Dis**. v. 5. e1169, 2011.

WANASEN, N.; MACLEOD, C. L.; ELLIES, L. G.; SOONG, L. L-arginine and cationic amino acid transporter 2B regulate growth and survival of *Leishmania amazonensis* amastigotes in macrophages. **Infect Immun**. v. 75. n. 6. p. 2802-2810, 2007.

WANG, H-X.; LIU, M.; WENG, S-Y.; LI, J-J.; XIE, C.; HE, H-L.; GUAN, W.; YUAN, Y-S.; JIN GAO, J. Immune mechanisms of Concanavalin A model of autoimmune hepatitis. **World J Gastroenterol**. v. 18. n. 2. p. 119-125, 2012.

WERNECK, G. L.; HASSELMANN, M. H.; GOUVÊA, T. G. Panorama dos estudos sobre nutrição e doenças negligenciadas no Brasil. **Ciênc saúde coletiva**. v. 16. p. 39-62, 2011.

WHO, World Health Organization. *Leishmaniasis* [Internet]; [acesso em 2015 Abril 06]. Disponível em: [http://www.who.int/Leishmaniasis/Leishmaniasis\\_maps/en/index.html](http://www.who.int/Leishmaniasis/Leishmaniasis_maps/en/index.html)

WILSON, M. E.; PEARSON, R. D. Evidence that *Leishmania donovani* utilizes a mannose receptor on human mononuclear phagocytes to establish intracellular parasitism. **J Immunol**. v.136. p. 4681, 1986.

#### 4. PRODUÇÃO CIENTÍFICA

### CONCANAVALIN-A INCREASE LEISHMANICIDE EFFECT IN MACROPHAGES AND PREVENTS LIVER INJURY IN BALB/C MICE INFECTED BY *Leishmania (L.) amazonensis*

ALVARENGA, D. S.; MIRANDA-SAPLA, M. M.; DA SILVA, S. S.; TOMIOTTO-PELISSIER, F.; MELANDA, F.; COSTA, I. N.; PAVANELLI, W.; CONCHON-COSTA, I.

Department of Experimental Pathology – Laboratory of Experimental Protozoology, State University of Londrina, Londrina, Brazil.

#### ABSTRACT

Macrophages, cytokines Th1 such as interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) and reactive oxygen species (ROS) represent an important elements in the immune response to eliminate *Leishmania spp.* *Leishmania amazonensis* induces anti-inflammatory response, prospering the infection. Several studies have been shown the immunomodulatory potential of Concanavalin-a (Con-A) in experimental infections, inducing proinflammatory cytokines. Thus, the aim of this study was evaluate the immune response of mice pretreated with Con-A or PBS and infected by *Leishmania amazonensis* and verify if the treatment is efficient to modulate the infection course. In this study, BALB/c mice were pretreated intraperitoneally with Con-A (250 $\mu$ g mL<sup>-1</sup> PBS) or PBS (250 $\mu$ L) for 72h and infected with 10<sup>7</sup> promastigotes form, to evaluate the cell migration, cytokines, NO, ROS production and liver histological aspect in chronic phase. We found a higher number of lymphocytes and macrophages after treatment with Con-A at early of infection then PBS group. The percentage of macrophages infected pretreated with Con-A *in vivo* was statistically higher when compared with PBS group. It was observed a leishmanicide effect in macrophages, eliminating more amastigotes with ROS and NO production but not in PBS group. A significant increase of TNF- $\alpha$  and IFN- $\gamma$  production in Con-A group was also observed. The absolute number of cells per infiltrate area on the liver of Con-A group was significantly reduced when compared with PBS group. Our data demonstrate that Con-A has an immunomodulatory effects in experimental leishmaniasis. Thus, our model suggest that the initial role of Con-A in stimulation of macrophages leads to destruction of parasite, preventing in the chronic phase liver injury.

**Key-words:** *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, Concanavalin-A, Liver protection.

## INTRODUCTION

Cutaneous leishmaniasis is caused by protozoans of genus *Leishmania spp*, transmitted by sandflies. This zoonosis is considered a disease of great importance by deformities occurrences and the impact generated in society (WERNECK, *et al.*, 2011). The promastigote form of the parasite is transmitted when an infected sandfly takes a blood meal. Promastigotes are rapidly taken up by phagocytic cells, and transform into the intracellular amastigote form (GONCALVES *et al.*, 2010).

The amastigotes may remain at the inoculation site or disseminate in the host tissues, within the cells of mononuclear phagocyte systems, including macrophages, histiocytes, epithelioid and Kupffer cells, and consequent histological damage to lymph nodes, liver, spleen, and bone marrow (DUARTE, CORBETT 1987).

Macrophages have an essential role during the infection, besides representing populations of host cells for *Leishmania* also contribute to the destruction of the same. *L. amazonensis* are capable of inhibiting the activation of macrophages or resist antileishmanial mechanisms generated with lower responsiveness to cytokine stimulation (WANASEN *et al.*, 2007; QI *et al.*, 2004).

The course of disease and lesion formation depends on the persistence of *Leishmania* and host immune response mediated by T cells (SILVEIRA *et al.*, 2009). The difference between resistance and host susceptibility is attributed on the predominance of T helpers cytokines pattern response type 1 and 2 (SILVEIRA *et al.*, 2009; SCOTT *et al.*, 2004; BACELLAR *et al.*, 2002; REINER, LOCKSLEY, 1993; PIRMEZ, *et al.*, 1993).

*L. amazonensis* is capable to induce anti-inflammatory response with IL-10 production (BARRETO-DE-SOUZA *et al.*, 2015; COELHO *et al.*, 2010). Therefore, macrophages, cytokines Th1 such as interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), interleukin-12 (IL-12), tumor necrosis factor-  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) and effectors molecules represent important elements in the immune response to kill the parasite (CARNEIRO *et al.*, 2016; MASPI *et al.*, 2016; OLEKHNOVITCH, BOUSSO, 2015; SILVEIRA *et al.*, 2009).

The treatment of leishmaniasis available at moment is not satisfactory. The leishmanicide drugs are toxic and have to be used for prolonged periods,

causing adverse effects such as arthralgia, myalgia, anorexia, nausea, abdominal pain, pancreatitis, intestinal disturbances, headache, heart and liver disorders, and acute renal failure (NOGUEIRA, SAMPAIO, 2001). Therefore, it becomes necessary to search for effective leishmanicidal compounds.

Concanavalin-A (Con-A) is a lectin derived from the seeds of jack beans (*Canavalia ensiformis*), that stimulate lymphoproliferation by direct bind to CD3 and TCR on T helper cells and subsequent IFN- $\gamma$  production, recruiting and activating macrophages (DE-CARVALHO *et al.*, 2012). Several studies have been show the potential imunomodulador of Con-A in experimental infections with different pathogens, *in vitro* (BERTRAM, 1997; BARRAL-NETTO, BARRAL, 1986; PASSWELL, 1986) and *in vivo* (DE-CARVALHO *et al.*, 2012; GERALDINO *et al.*, 2010; CONCHON-COSTA *et al.*, 2007), however it is not known the effect of lectin in experimental infection with *Leishmania* species. Loyola *et al.* (2002) showed an increase of macrophages in 72 hours after treatment intraperitoneal with Con-A.

Thus, the aim of this study is to evaluate the immune response of mice infected intraperitoneally by *Leishmania (L.) amazonensis* (LLa) after stimulation for 72 hours with Con-A and verify if macrophages pretreated are efficient to modulate the infection course.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Culture of parasites**

*Leishmania (Leishmania) amazonensis* (MHOM/BR/1989/166MJO) were obtained from popliteal lymph nodes of BALB/c mice and maintained in 199 culture medium (GIBCO-Invitrogen) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS; GIBCO-Invitrogen), 1M HEPES, 0.1% human urine, 0.1% L-glutamine, 10 U/mL penicillin and 10  $\mu$ g/mL streptomycin (GIBCO-Invitrogen) and 10% sodium bicarbonate. Cells were maintained in 25 cm<sup>2</sup> flasks in a BOD type incubator at 24°C. We used promastigote forms in the stationary growth phase for the infection.

## Treatment and infection

Male BALB/c mice aged 6–8 weeks old were obtained from the Instituto Carlos Chagas-Fiocruz, Curitiba-PR, Brazil. Groups of 6 male BALB/c mice received Con-A ( $250\mu\text{g mL}^{-1}$  PBS) according to Conchon-Costa *et al.* (2007) or Phosphate-buffered saline (PBS) ( $250\mu\text{L}$ ) intraperitoneally, for 72h according to Loyola *et al.* (2002). Next, the mice were infected with  $10^7$  of promastigotes. The PBS group was used as a control. Concanavalin-A (Type IV from *Canavalia ensiformis*), was obtained from Sigma–Aldrich Chemicals, USA. This study was approved by Londrina State University Ethics Committee for Animal Experimentation No. 056/2013.

## Evaluation of phagocytosis and peritoneal cells

The animals were pretreated intraperitoneally for 72h with Con-A ( $250\mu\text{g mL}^{-1}$  PBS) or PBS ( $250\mu\text{L}$ ) and infected with  $10^7$  for 30 min, 2, 6, 18 and 24 hours *in vivo*. Exudate cells were collected by rinsing the peritoneal cavity with 2mL of PBS. Then, the samples were centrifugated, the supernatant were separated for cytokines and NO analysis. The pellet was resuspended in 1mL of RPMI-albumin medium, distributed  $50\mu\text{L}$  on coverslips for migration analysis and  $2 \times 10^5$  cells for phagocytosis. The cells were stained by May–Grumwald–Giemsa and analyzed by light microscopy by counting 10 fields. Exudates cells of 30 min post infection were also distributed ( $2 \times 10^5$ ) on coverlips in 24-well plate with 1mL RPMI-albumin medium and incubated at  $37^\circ\text{C}$  ( $\text{CO}_2$  5%) for 24h. During the periods of 2, 6, 18 and 24 hours post infection, supernatant were collected for cytokines analysis. Then, the cells were washed and stained by May–Grumwald–Giemsa and analyzed by light microscopy by counting 10 fields.

## Recovery promastigotes assay

After the treatment intraperitoneal for 72h with Con-A ( $250\mu\text{g mL}^{-1}$  PBS) or PBS ( $250\mu\text{L}$ ) the mice were infected with  $10^7$  of promastigotes for 30 min *in vivo*. Exudates cells were collected and  $2 \times 10^5$  distributed in 24-well plate with

1mL RPMI-albumin medium and incubated at 37°C (CO<sub>2</sub> 5%) for 24h. Then, the cells were washed and added 1mL 199 culture medium and incubated in a BOD at 24°C. The leishmanicide action was determined by assessing the number of extracellular motile promastigotes, counting in Neubauer Chamber on the third, fourth and fifth days to obtain the kinetics of recovery promastigote.

### **Cytokine assay**

The exudates and supernatants obtained from the culture of phagocytosis assay were used to determine the levels of TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-10 and IL-1 $\beta$  using eBioscience commercial kits capture enzyme-linked immune sorbent assay (ELISA) (San Diego, CA, USA), according to the manufacturer's instructions. The absorbance was read at 450 nm using a spectrophotometer.

### **Colorimetric nitrite assay**

The liberation of free nitrite was determined using a modification of the colorimetric Griess assay, according to Miranda *et al.* (2015). Briefly, 50 $\mu$ L of 75mM ZnSO<sub>4</sub> and 70  $\mu$ L of NaOH were added to 60 $\mu$ L of supernatant obtained of exudate and centrifuged for 5 min at 10.000 rpm. Next, the sample was diluted in glycine buffer (45 g/L, pH 9.7) and cadmium granules were rinsed with distilled sterile water and added to a 5mM CuSO<sub>4</sub> in glycine-NaOH buffer (15 g/L, pH 9.7), followed by 5 min incubation. Activated granules were added to glycine buffer-diluted supernatant and a Griess reagent. The sample were incubated at room temperature for 10 min, centrifuged at 10.000 rpm for 2 min and disposed in a 96-well microplate. A calibration curve was prepared using dilutions of NaNO<sub>2</sub>, and the absorbance was determined at 550nm in a microplate reader.

### **Determination of reactive oxygen species (ROS) by florescence**

In order to evaluate ROS production, the mice were pretreated with Con-A (250 $\mu$ g mL<sup>-1</sup> PBS) or PBS (250 $\mu$ L) for 72h and infected for 30 min as described above for the phagocytic assay and cultured in 96-well black plates containing

20 $\mu$ L of peritoneal washing and incubated in the dark for 30 minutes at 37°C in an atmosphere containing 5% CO<sub>2</sub> with 2 $\mu$ M H<sub>2</sub>DCFDA (diacetate 2', 7'-dichlorofluorescein) (Sigma-Aldrich) diluted in DMSO adjusted to 200 $\mu$ L. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (200 $\mu$ L) for 30 min was used as a positive control. Reactive oxygen species (ROS) were measured as an increase in fluorescence caused by the conversion of nonfluorescent dye to highly fluorescent 20,70-dichlorofluorescein, with an excitation wavelength of 488 nm and emission wavelength of 530 nm in a fluorescence microplate reader (Victor X3, PerkinElmer, Finland).

### **Histological analysis**

Five animals per group were pretreated with Con-A (250 $\mu$ g mL<sup>-1</sup> PBS) or PBS (250 $\mu$ L) for 72h and infected with 10<sup>7</sup> promastigotes forms for 15 days. The non-treated and infected mice were used as a control. The liver of each animal was removed, perfused with saline, and sectioned into standardized fragments. One of the fragments was fixed in Bouin's solution for 48 hours. Subsequently, the tissue was processed for paraffin embedding, sectioned (6  $\mu$ m) and stained with hematoxylin eosin (H&E). Next, were examined by photomicroscope (Olympus, Miami, FL, USA) at a final magnification of 40x. We analyzed the total area per cut, and observed the presence of granuloma, pyknotic nucleus, karyorrhexis, karyolysis and loss of hepatocyte membrane. Cellular infiltrate scored by counting the number of cells in infiltration, absolute number of infiltration area.

### **Statistical analysis**

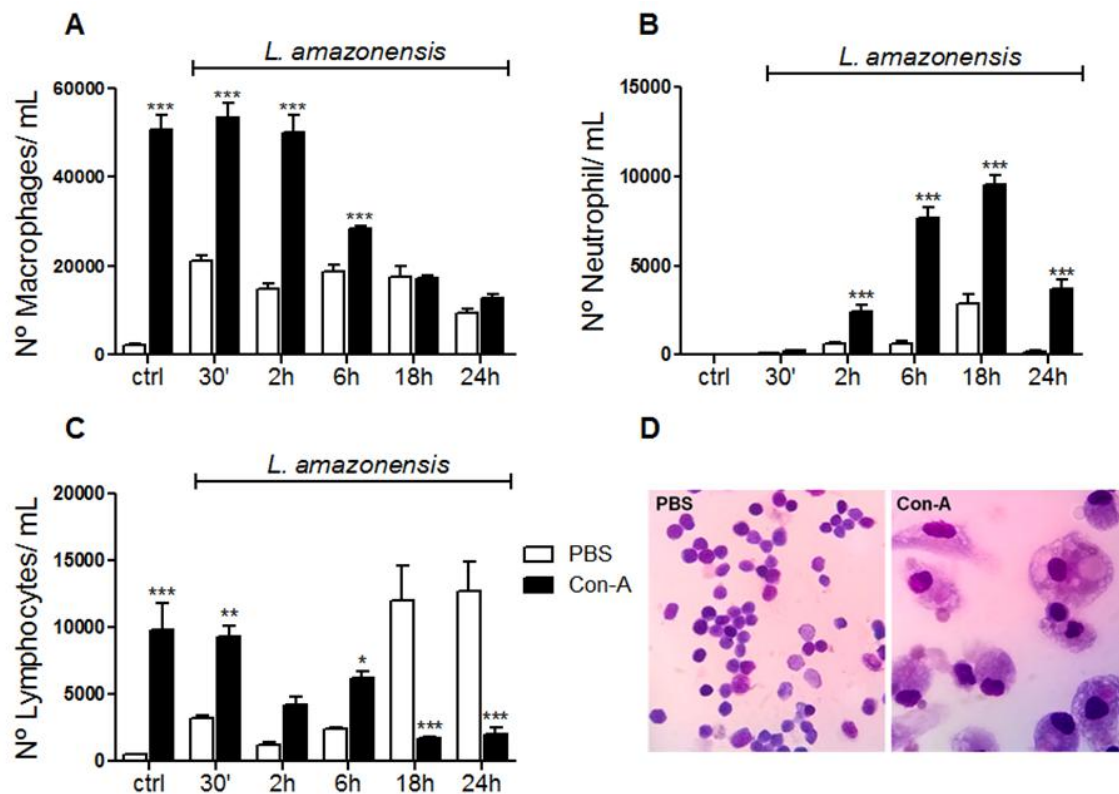
The results were expressed as the mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM) and analyzed with the Prism 5.0 statistical program (GraphPad Software, San Diego, CA), using the one-way ANOVA, followed by Tukey's test and Student t-test. Differences were considered significant when P<0.05.

## **RESULTS**

### **Con-A leads to cellular migration intraperitoneal in BALB/c mice**

It is known that the Con-A induces the recruitment of neutrophils and macrophages in swiss mice, we intend verify if this event also occur in BALB/c mice. Our group verified in this animals that Con-A to recruit cells to the peritoneum after treatment for 72h and also post infection with promastigotes forms of *L. amazonensis*.

Firstly, we treated the mice intraperitoneally with Con-A or PBS for 72h and infected with  $10^7$  promastigotes for 30 minutes, 2, 6, 18 and 24h. The number of macrophages at 72h post treatment (50.700 cells/mL), 30 min (53.426 cells/mL), 2h (50.000 cells/mL) and 6h (28.467 cells/mL) post infection were statistically significant when compared with PBS group (Fig 1A).



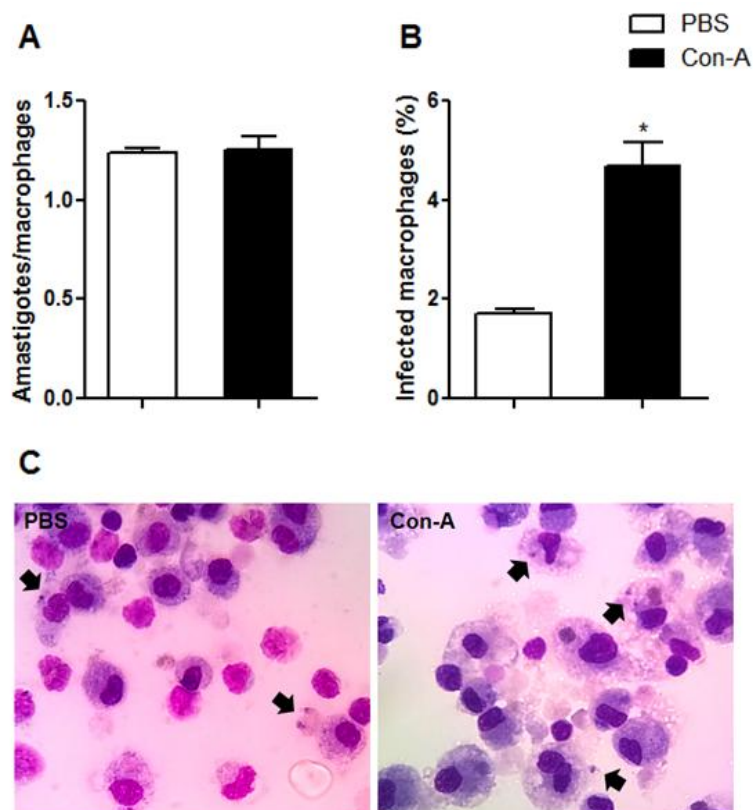
**Fig. 1.** Migration of intraperitoneal cells. The mice were treated with PBS (250 $\mu$ L) (white bars) or Con-A (250 $\mu$ g mL<sup>-1</sup> PBS) (black bars) i.p. for 72h (ctrl). After, were infected with  $10^7$  promastigotes of LLa for 30 min, 2h, 6, 18 and 24h. The cells were represented in (A) Macrophages, (B) Neutrophils and (C) Lymphocytes. (D) Treatment with PBS or Con-A for 72h, final magnification of 40x. The values were considered when \*P<0.05; \*\*P<0.01; \*\*\*P<0.001.

We also observed a significant increase in the number of neutrophils from 2h (2.400 cells/mL), 6h (7.633 cells/mL), 18 hours (9.500 cells/mL) and 24h (3.666 cells/mL ) post infection when treated with Con-A (Fig 1B).

In relation to the lymphocyte profile, after 72h of treatment (9.766 cells/mL) and 30 minutes post infection (9.346 cells/mL), occurs increase significant when compared with PBS group and decrease from 2h (Fig 1C). In the PBS group, the greater number of lymphocytes occurs at 18 (12.000 cells/mL) and 24 hours (12.666 cells/mL) post infection, characterizing the beginning of adaptive response.

### Con-A enhances phagocytosis of peritoneal macrophages *in vivo*

To evaluate whether recruited macrophages activated by Con-A *in vivo* are able of interfering in the phagocytosis process, was used the counting of amastigotes per macrophages the percentage of infected macrophages.

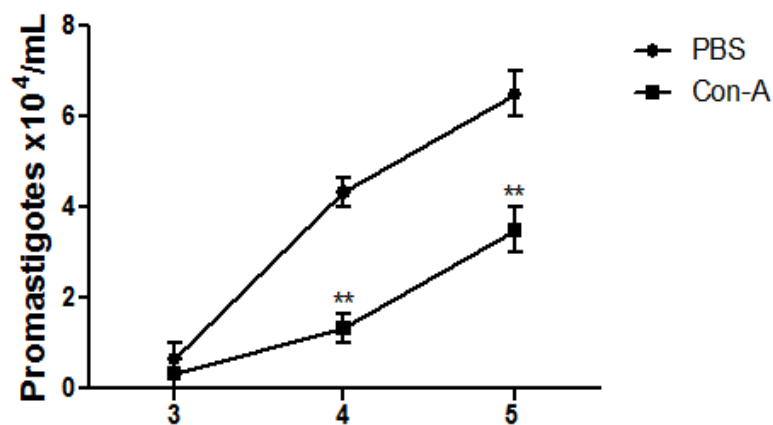


**Fig. 2.** Phagocytosis assays. The mice were treated with PBS (250 $\mu$ L) (white bars) or Con-A (250 $\mu$ g mL<sup>-1</sup> PBS) (black bars) i.p. for 72h. After, were infected with 10<sup>7</sup> promastigotes of LLa for 30 min. (A) Number of amastigotes per macrophages, (B) Percentage of infected cells and

(C) presence of amastigotes in PBS and Con-A group post infection (black arrows). Final magnification of 40x. \*P<0.05.

In our model, we observed that in 30 minutes, macrophages pretreated with Con-A *in vivo* not exhibited significantly more amastigotes per infected cell than the PBS group (Fig 2A and C), but, the percentage of macrophages phagocytosing pretreated with Con-A was significantly higher than the PBS group (Fig 2B).

In order to verify if the largest number of macrophages phagocytosing resulted in efficient death of amastigotes forms we evaluated if the parasite can survive to activated macrophages with Con-A (Fig 3).



**Fig. 3.** Recovery promastigotes assay. The mice were treated with Con-A (250 $\mu$ g mL<sup>-1</sup> PBS) or PBS (250 $\mu$ L) i.p. for 72h. After, were infected with 10<sup>7</sup> promastigotes of LLa for 30 min for phagocytosis. The cells were collected and cultivated for five days. The free promastigotes were counting on the third, fourth and fifth days. \*\*P<0.01.

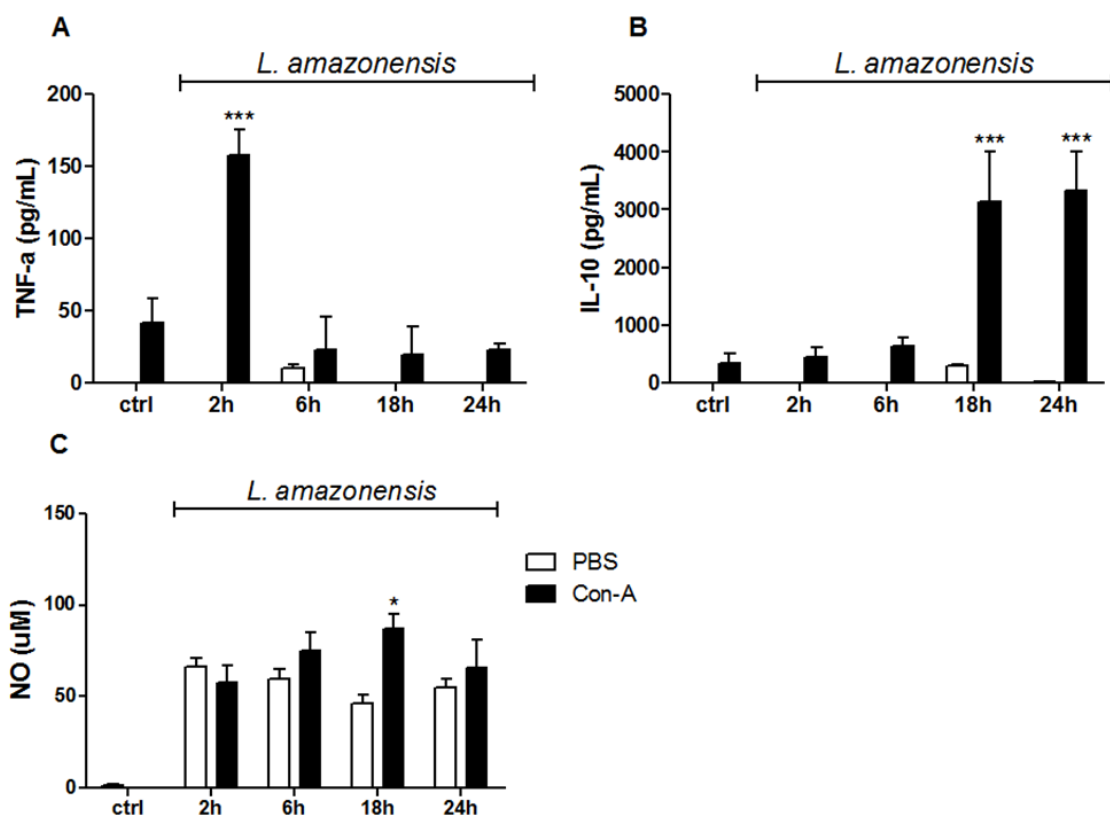
The number of promastigotes in Con-A group on fourth and fifth days was significantly lower when treated with PBS (Fig. 3). This suggests that macrophages pretreated with Con-A were able to eliminate more amastigotes forms.

### **Con-A induces cytokines and NO production by exudates cells pretreated *in vivo***

As we observed that macrophages of pretreated mice with Con-A presented larger capacity phagocytic and leishmanicide, we decided verify if

this treatment interfere in cytokines levels. Therefore, we evaluate cytokines produced by cells pretreated *in vivo* and infected, obtained from exudates.

A significant increase of TNF- $\alpha$  level was observed at 2h post infection in Con-A group but not in PBS mice (Fig 4A). Higher levels of IL-10 were detected in Con-A group after 18 and 24 hours post infection (Fig. 4B). It is known that TNF- $\alpha$  may induce NO production by macrophages activated. Therefore, we evaluated NO production by exudates cells pretreated *in vivo*. We observed increase of NO levels in Con-A group infected at 18h post infection (Fig. 4C). We did not find IL-1 $\beta$  production after treatments and infection (date not shown).

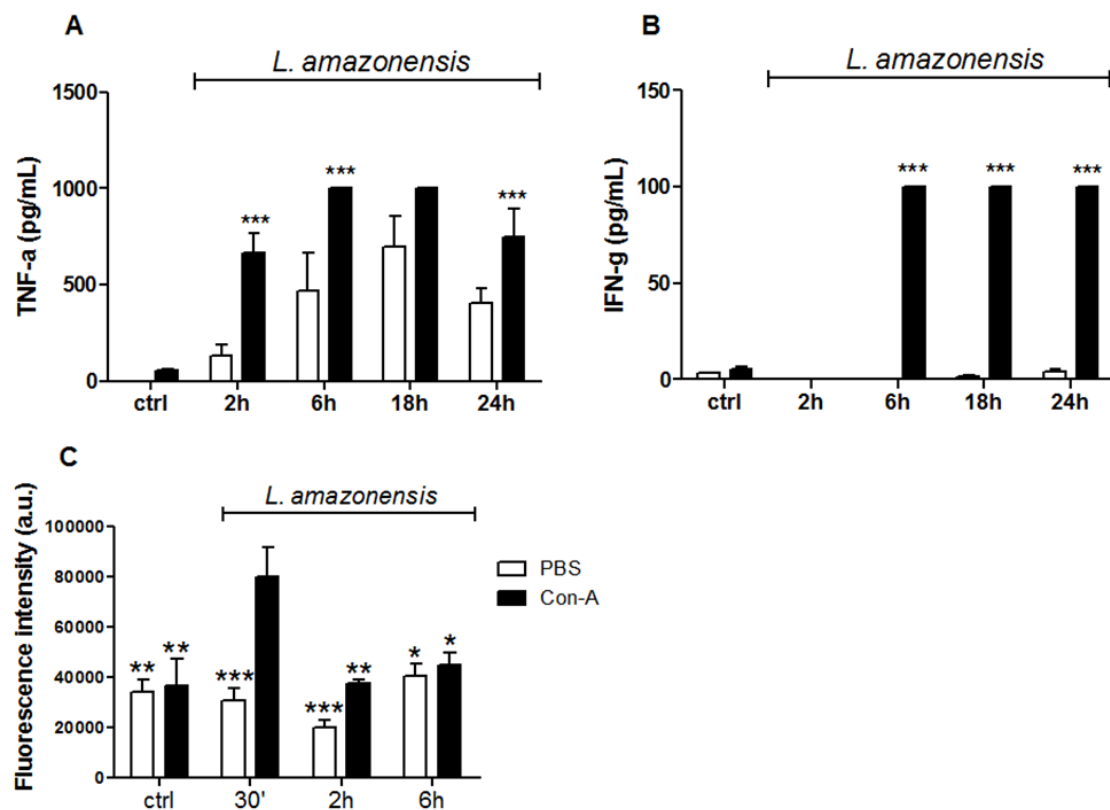


**Fig. 4.** TNF- $\alpha$ , IL-10 and NO production by exudates cells pretreated with Con-A or PBS and infected. The mice were pretreated with PBS (250 $\mu$ L) (white bars) or Con-A (250 $\mu$ g mL<sup>-1</sup> PBS) (black bars) i.p. for 72h (ctrl). After, were infected with 10<sup>7</sup> promastigotes of LLa for 2, 6, 18 and 24h. The exudates cells were collected and centrifuged. The supernatant were separated for cytokines analysis and Griess. The values were considered when \*P<0.05, \*\*\*P<0.001.

**Con-A induces TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  and ROS production in culture by macrophages and lymphocytes pretreated *in vivo* but not IL-1 $\beta$**

In order to verify only cytokines production by macrophages and lymphocytes pretreated *in vivo*, we collected exudates cells and maintained in culture for 24h. We evaluated TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and IFN- $\gamma$  production and observed a significant increase of TNF- $\alpha$  level after 2, 6 and 24h post infection in Con-A group when compared with PBS mice (Fig. 5A). The levels of IFN- $\gamma$  in Con-A group increased after 6, 18 and 24h post infection but not in PBS (Fig. 5B).

We investigated if these macrophages were able to produce oxygen species. We observed increase of ROS production at 30 min post infection in Con-A group when compared with PBS group (Fig. 5C) and others periods. Furthermore, observed that at 6h the levels of ROS both Con-A and PBS stabilizes post infection.

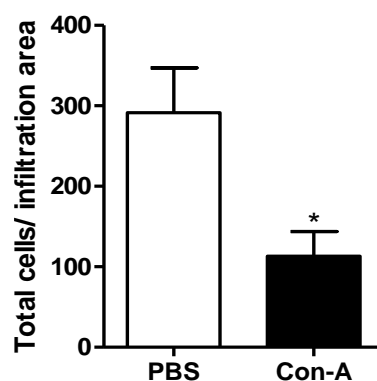


**Fig. 5.** TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  and ROS production by cells from culture pretreated with Con-A or PBS *in vivo*. The mice were treated with PBS (250 $\mu$ L) (white bars) or Con-A (250 $\mu$ g mL<sup>-1</sup> PBS) (black bars) i.p. for 72h (ctrl). After, were infected with 10<sup>7</sup> promastigotes of LLa for 30 min. The cells were collected and maintained in culture. The supernatant were collected at 2, 6, 18 and 24h post infection. ROS production was evaluated by fluorescence probe H2DCFDA. The data are expressed as the mean fluorescence (in arbitrary units)  $\pm$  SD of at least three independent experiments. \*P<0.05; \*\*P<0.01; \*\*\*P<0.001; significant difference compared with Con-A 30 min group.

### Con-A prevents liver injury in BALB/c mice infected with *L. amazonensis*

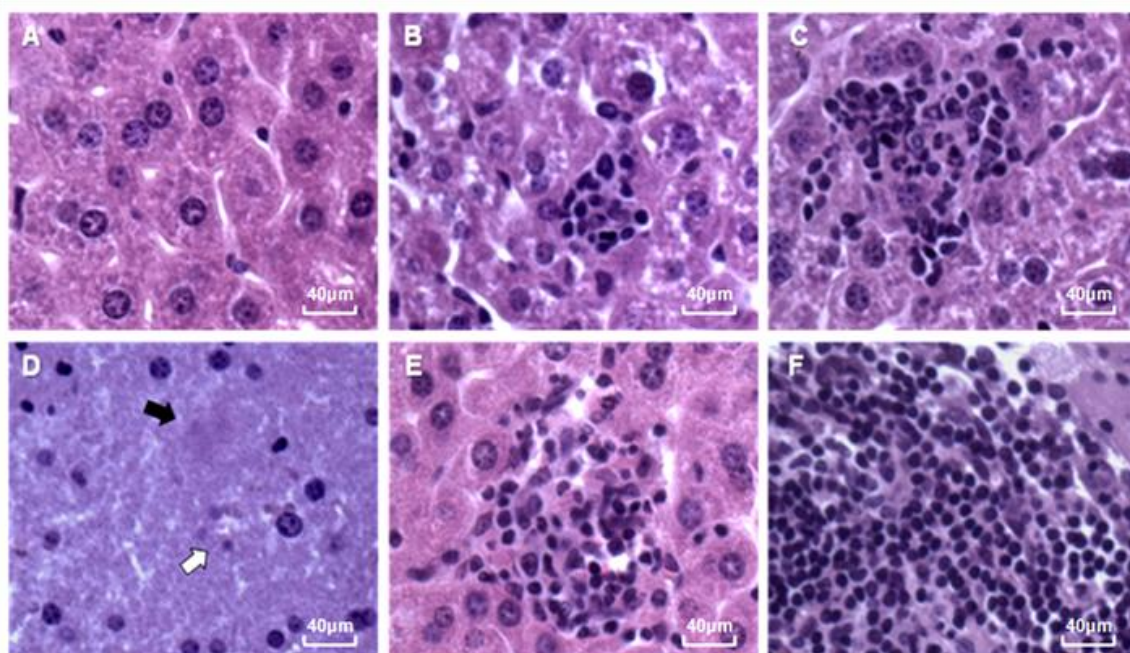
We evaluated effect of pretreatment on liver in experimental infection in chronic phase. We observed that Con-A ( $7,6 \pm 2,50$ ) leads to lower number of infiltrates when compared with PBS group ( $10,2 \pm 1,78$ ) and absolute number of cells per infiltrate area (Fig. 6).

We analyzed the morphological aspect of liver by presence of granuloma formation, pyknotic nucleus, karyorrhexis, karyolysis and loss of hepatocyte membrane (Fig. 7).



**Fig. 6.** Absolute number of cells per infiltration area. BALB/c mice were treated with PBS (250 $\mu$ L) (white bars) or Con-A (250 $\mu$ g mL<sup>-1</sup> PBS) (black bars) i.p. for 72h and infected with  $10^7$  promastigotes for 15 days. The livers were analyzed and the infiltrating cells per cut were counted by photomicroscope at a final magnification of 40x. \*P<0.05.

In our model, we did not observe granuloma formation in 15 days post infection when infected with *L. amazonensis*. Karyorrhexis and karyolysis were not also found. We observed the presence of pyknotic nucleus and loss of hepatocyte membrane in PBS group (Fig. 7D).



**Fig. 7.** Photomicrograph showing the main histological changes found in the liver of animals infected with *L. amazonensis*. BALB/c mice were treated for 72h with Con-A or PBS and infected with  $10^7$  promastigotes for 15 days. (A) animals without treatment or infection; (B) and (C) cellular infiltration in Con-A group; (D-F) PBS group. (D) pyknotic nucleus (white arrow) and loss of hepatocyte membrane (black arrow); (E) and (F) cellular infiltration.

## DISCUSSION

This study showed that Con-A exerted chemoattractant activity to peritoneal cavity in BALB/c mice, similar to studies have been shown the immunomodulatory role of Con-A to recruiting macrophages, neutrophils and lymphocytes in swiss mice (DE-CARVALHO *et al.*, 2012; CONCHON-COSTA *et al.*, 2007). BALB/c mice were susceptible to *L. amazonensis* and this chemotactic effect was not suppressed to the presence of parasite.

Macrophages represents essential element in leishmaniasis and immune response for being the population of host cells and by production of effectors molecules capable to destroy *Leishmania spp.* (CARNEIRO *et al.*, 2016; MASPI *et al.*, 2016; OLEKHNOVITCH, BOUSSO, 2015). Therefore, macrophages activated early in inflammatory site would act more efficiently in infection.

Loyola *et al.* (2002) reported that Con-A induce phagocytosis of neutrophils and macrophages in fungal infection, mediated by complement and mannose receptors after 4 days of treatment with Con-A. In leishmaniasis, promastigotes forms use mannose receptors to enter the macrophages in a

relatively silent manner, avoiding the signaling cascades associated with activation (CHAKRABORTY, GHOSH, BASU, 2001; PRIVE, DESCOTEAUX, 2000).

Then evaluated the phagocytosis only at 30 minutes post infection *in vivo*, because after 1 hour we did not find promastigotes in the peritoneum (date not shown). Thus, the number of amastigotes per macrophages in both groups did not significant but the percentage of macrophages phagocytosing pretreated with Con-A was higher when compared with PBS group. Therefore, we can conclude that Con-A induce phagocytosis consequently by membrane receptors and in 30 minutes post infection we not yet observed leishmanicide effect.

The phagocytosis does not ensure the elimination capacity of parasite and hence, we investigated if in our model macrophages pretreated can eliminate amastigotes forms. We observed the lower number of promastigotes in Con-A group on fourth and fifth days than PBS group. Thus, macrophages pretreated with Con-A were capable to eliminate more amastigotes internalized.

It is known that Con-A induces production of IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  in lymphocytes and macrophages (WANG *et al.*, 2012; DE-CARVALHO, *et al.* 2012; CONCHON-COSTA *et al.*, 2007). However, *L. amazonensis* is able to induce anti-inflammatory response with IL-10 production (BARRETO-DE-SOUZA *et al.*, 2015) and therefore, we investigated if Con-A modulate immune response after the infection by *L. amazonensis*.

We analyzed cytokines production obtained from exudates. However, Con-A can activate others cells in the peritoneum. We observed a significant increase of TNF- $\alpha$  level after 2h post infection when treated with Con-A and also IL-10 at 18 and 24h.

Studies showed the participation of CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> FoxP3<sup>+</sup> T regulatory cells (Treg) after intravenous administration of Con-A in BALB/c mice, leading to IL-10 production to keep the immune tolerance state in ConA-induced hepatitis model (YE *et al.*, 2009). Therefore, we believe that this IL-10 production at 18 and 24h from exudates cells in Con-A group is due to Treg action because we did not find IL-10 production from culture cells (date not shown).

In order to verify only cytokines production by macrophages and lymphocytes pretreated *in vivo*, we collected exudates cells in 30 min post infection and maintained in culture for 24h. We also observed a significant

increase of TNF- $\alpha$  level after 2h post infection and 6h in Con-A group, decreasing in 24h. IFN- $\gamma$  release occurs after 6 hours post infection remained at 24h. This, suggest that the pretreatment with Con-A induce macrophages and lymphocytes to produce TNF- $\alpha$  and IFN- $\gamma$  even in presence of *L. amazonensis*.

IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  are capable of increase activity of inducible nitric oxide synthase (iNOS) and NADPH oxidase in macrophages activated, with consequent production of nitric oxide (NO) and ROS (SACKS *et al.*, 2002; CUNNINGHAM, 2002). Among the microbicidal mechanisms exhibited by phagocytic cells, NO and ROS production has been shown as the most important for eliminating *Leishmania spp.* (OLEKHNOVITCH *et al.*, 2014; VAN ASSCHE *et al.*, 2011; JONES *et al.*, 2002). In our model, we found NO production from exudates after 18h post treatment with Con-A and infection *in vivo* but not in PBS group. The increase of TNF- $\alpha$  in 2h obtained *ex vivo* indicates that NO stimulation occurs by TNF- $\alpha$  route but not IL-1 $\beta$ .

*Leishmania spp.* has been described as numerous escape mechanisms (OLIVIER, GREGORY, FORGET, 2005). For instance, it can reduce NO production in macrophages by increasing the expression of arginase, which catalyzed the cleavage of L-arginine (DA SILVA *et al.*, 2012; WANASEN, SOONG, 2008; BOGDAN, RÖLLINGHOFF, 1999). Therefore, we investigated if the treatment and infection induce ROS levels. We observed a significant increase of ROS in Con-A group at 30 min post infection but not in PBS group.

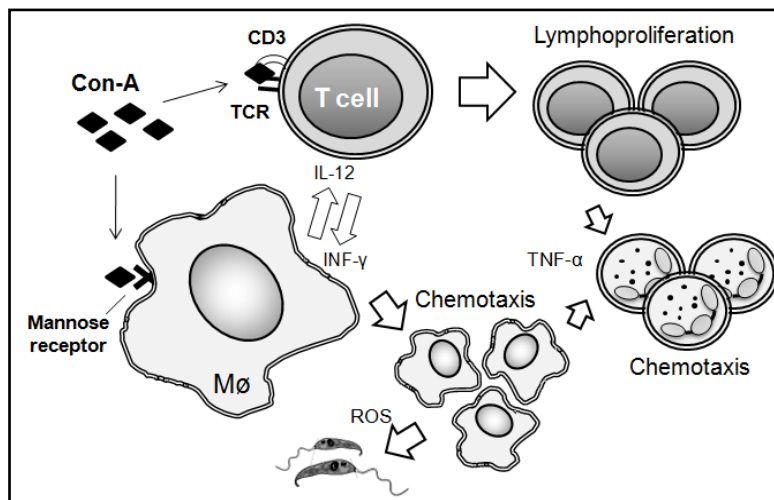
*L. amazonensis* can triggers less ROS production by macrophages from CBA mice *in vitro* at 30 min post infection (ALMEIDA *et al.*, 2012). However, production of ROS by macrophages from C57BL/6 mice infected with *L. amazonensis* 30 min and 5 days post-infection has been reported (GIBSON-CORLEY *et al.*, 2014). BALB/c mice are susceptible to *L. amazonensis* infection, however, the pretreated with Con-A induced a ROS production at 30 minutes and therefore, we find a lower number of free promastigotes in a recovery assay indicating an increase of leishmanicidal activity of these macrophages.

Several studies have demonstrated that *L. amazonensis* is able produce a large spectrum of lesions in mice, which include lesions in the liver, skin, spleen, kidney, bone marrow, bone, and brain (COSTA *et al.*, 2006; ABREU-SILVA *et al.*, 2003; ABREU-SILVA *et al.*, 2004). ROS production has been

shown to play a role in the containment of metastasis to spleen and lymph nodes in experimental *L. major* infection (BLOS, *et al.*, 2003). Therefore, we investigated the chronic infection in BALB/c mice pretreated with Con-A and infected by *L. amazonensis* once we find ROS production early stage of infection.

Con-A was associated with protector role on the liver in fungal and bacterial models (GERALDINO *et al.*, 2010; CONCHON-COSTA *et al.*, 2007; KUO *et al.*, 2007). In our model, we observed histological changes in the liver of BALB/c including as to presence of cellular infiltrates in Con-A and PBS group, pyknotic nucleus and loss of hepatocyte membrane.

The treatment with Con-A lead to lower number of infiltrates and absolute number of cells per infiltrate area. Pyknotic nucleus and loss of hepatocyte membrane were found in PBS group, characterizing the initial process of lesion which can lead to necrosis.



**Fig. 8.** Action mechanisms of Concanavalin-A in intraperitoneal model. Con-A binds to TCR and CD3 in T cells (DE CARVALHO *et al.*, 2012) leading to lymphoproliferation, IFN- $\gamma$  production and consequent chemotaxis of macrophages. Con-A can binds to mannose receptor of macrophages (LOYOLA *et al.*, 2002) leading to activation and reactive oxygen species (ROS) production. Lymphocytes and macrophages produce TNF- $\alpha$  and recruit neutrophils. Macrophages activated phagocyte promastigotes forms.

The escape mechanism of *Leishmania* spp. remain a great challenge to therapy and treatment. Concanavalin-A is not used in therapy but could be a resource interesting in immunocompromised patients to stimulate the immune response against pathogens.

Our data demonstrate that Con-A has an immunomodulatory effects in 72 hours of treatment, acting in the chemotaxis of lymphocytes, macrophages and neutrophils, enhancing their phagocytic capacity, with the elimination of the parasite due to production of NO and ROS. Our model suggest that the initial action of Con-A at the inflammatory site contributed to the higher elimination of *L. amazonensis* and preventing liver injury, with a lower number of cell in infiltrates. Furthermore, we not observed the beginning of the lesion as found in PBS group infected. Concanavalin-A is also enables us understanding the parasite-host relation to promote future studies.

## REFERENCES

ABREU-SILVA, A. L.; CALABRESE, K. S.; CUPOLILO, S. M.; CARDOSO, F. O.; SOUZA, C. S.; GONÇALVES DA COSTA, S. C. Histopathological studies of visceralized *Leishmania (Leishmania) amazonensis* in mice experimentally infected. **Vet Parasitol.** v. 121. n. 3. p. 179–87, 2004.

ABREU-SILVA, A. L.; CALABRESE, K. S.; TEDESCO, R. C.; MORTARA, R. A.; GONÇALVES DA COSTA, S. C. Central nervous system involvement in experimental infection with *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. **Am J TropMed Hyg.** v. 68 n. 6. p. 661–5, 2003.

ALMEIDA, T. F.; PALMA, L. C.; MENDEZ, L. C.; NORONHA-DUTRA, A. A.; VERAS, P. S. *Leishmania amazonensis* fails to induce the release of reactive oxygen intermediates by CBA macrophages. **Parasite Immunol.** v. 34. n. 10. p. 492–8, 2012.

BACELLAR, O.; LESSA, H.; SCHRIEFER, A.; MACHADO, P.; RIBEIRO, J.; DUTRA, W. O.; GOLLOB, K. J.; CARVALHO, E. M. Up-regulation of Th1-type responses in mucosal leishmaniasis patients. **Infect Immun.** v. 70. p. 6734-40, 2002.

BARRAL-NETTO, M.; BARRAL, A. A simple method for assessing the binding of concanavalin A to mononuclear cell surfaces: no interference of visceral leishmaniasis serum on this binding. **Mem Inst Oswaldo Cruz.** v. 81. n. 3. p. 343-5, 1986.

BARRETO-DE-SOUZA, V.; FERREIRA, P. L.; VIVARINI, A. C.; CALEGARI-SILVA, T.; SOARES, D. C.; REGIS, E. G.; PEREIRA, R. M.; SILVA, A. M.; SARAIVA, E. M.; LOPES, U. G.; BOU-HABIB, D. C. IL-27 enhances *Leishmania amazonensis* infection via ds-RNA dependent kinase (PKR) and IL-10 signaling. **Immunobiology.** v. 220. n. 4. p. 437-44, 2015.

BERTRAM, E. M.; JILBERT, A. R.; KOTLARSKI, I. Optimization of an *in vitro* assay which measures the proliferation of duck T lymphocytes from peripheral blood in response to stimulation with PHA and ConA. **Dev Comp Immunol.** v. 21. n. 3. p. 299-310, 1997.

BLOS, M.; SCHLEICHER, U.; SOARES ROCHA, F. J.; MEISSNER, U.; ROLLINGHOFF, M.; BOGDAN, C. Organ-specific and stage-dependent control of *Leishmania major* infection by inducible nitric oxide synthase and phagocyte NADPH oxidase. **Eur J Immunol.** v. 33. n. 5. p. 1224–34, 2003.

BOGDAN, C.; RÖLLINGHOFF, M. How do protozoan parasites survive inside macrophages? *Parasitol Today.* v. 15. p. 22–28, 1999.

CARNEIRO, P. P.; CONCEIÇÃO, J.; MACEDO, M.; MAGALHÃES, V.; CARVALHO, E. M.; BACELLAR, O. The Role of Nitric Oxide and Reactive Oxygen Species in the Killing of *Leishmania braziliensis* by Monocytes from Patients with Cutaneous Leishmaniasis. **PLoS One.** v. 11. n. 2 e0148084, 2016.

CHAKRABORTY, P.; GHOSH, D.; BASU, M. K. Modulation of macrophage mannose receptor affects the uptake of virulent and avirulent *Leishmania donovani* promastigotes. **J Parasitol.** v. 87. n. 5. p. 1023-7, 2001.

COÊLHO, Z. C.; TEIXEIRA, M. J.; MOTA, E. F.; FRUTUOSO, M. S.; SILVA, J. S.; BARRAL, A.; BARRAL-NETTO, M.; POMPEU, M. M. In vitro initial immune

response against *Leishmania amazonensis* infection is characterized by an increased production of IL-10 and IL-13. **Braz J Infect Dis.** v. 14. n. 5. p. 476-82, 2010.

CONCHON-COSTA, I.; LOYOLA, W.; GAZIRI, L. C.; CUSTÓDIO, L. A.; FELIPE, I. Low dose of Concanavalin-A enhances innate immune response and prevents liver injury in mice infected with *Candida albicans*. **FEMS Immunol Med Microbiol.** v. 49. n. 3. p. 330-6, 2007.

COSTA, A. A. U. M.; ABREU, A. L.; GOMES, C. M. C.; SALDANHA, A. C. R.; BARRAL, A.; COSTA, J. M. L.; CORBETT, C. E. P. Experimental model of chronic osteomyelitis caused by *Leishmania (L) amazonensis*. **Acta Trop.** v. 98. n. 2. p.125–9, 2006.

CUNNINGHAM, A. C. Parasitic adaptive mechanisms in infection by *Leishmania*. **Exp Mol Pathol.** v. 72. p. 132–41, 2002.

DA SILVA, M. F. L.; ZAMPIERI, R. A.; MUXEL, S. M.; BEVERLEY, S. M.; FLOETER-WINTER, L. M. *Leishmania amazonensis* arginase compartmentalization in the glycosome is important for parasite infectivity. **PLoS ONE** v. 7. e34022, 2012.

DE CARVALHO, P. G. C.; CUSTÓDIO L. A.; QUIRINO, G. F. S.; ANDRADE, C. G. T. J.; CONCHON-COSTA, I.; FELIPE, I.. Concanavalin-a induces il-17 production during the course of *Candida albicans* infection. **FEMS Immunol Med Microbiol.** v. 64. n. 2. p. 273-279, 2012.

DUARTE, M. I.; CORBETT, C. E. Histopathological patterns of the liver involvement in visceral leishmaniasis. **Rev Inst Med Trop São Paulo** v. 29. p. 131–136, 1987.

GERALDINO, T. H.; DE VITO, E.; CUSTÓDIO, L. A.; CONCHON-COSTA, I.; GAZIRI, L. C.; FELIPE, I.; LOYOLA, W.; BONIFÁCIO, K. L. Increased tumour necrosis factor-alpha production, higher mannose receptor activity and ability to kill

*Candida* by concanavalin-A-activated macrophages. **FEMS Immunol Med Microbiol.** v. 59. n. 1. p. 11-7, 2010.

GIBSON-CORLEY, K. N.; BOCKENSTEDT, M. M.; LI, H.; BOGGIATTO, P. M.; PHANSE, Y.; PETERSEN, C. A.; BELLAIRE, B. H.; JONES, D. E. An in vitro model of antibody-enhanced killing of the intracellular parasite *Leishmania amazonensis*. **PLoS One.** v. 9. n. 9. e106426, 2014.

GONCALVES, R.; ZHANG, X.; COHEN, H.; DEBRABANT, A.; MOSSER, D. M. Platelet activation attracts a subpopulation of effector monocytes to sites of *Leishmania major* infection. **J. Exp. Med.** v. 208. p. 1253-65, 2010.

JONES, D. E.; ACKERMANN, M. R.; WILLE, U.; HUNTER, C. A.; SCOTT, P. Early enhanced Th1 response after *Leishmania amazonensis* infection of C57BL/6 interleukin-10- deficient mice does not lead to resolution of infection. **Infect Immun.** v. 70. p. 2151-8, 2002.

LOYOLA, W.; GAZIRI, D. A.; GAZIRI, L. C.; FELIPE, I. Concanavalin-A enhances phagocytosis and killing of *Candida albicans* by mice peritoneal neutrophils and macrophages. **FEMS Immunol Med Microbiol.** v. 3. n. 3. p. 201-8, 2002.

MASPI, N.; GHAFARIFAR, F.; SHARIFI, Z.; DALIMI, A. Codelivery of DNA vaccination encoding LelF gene and IL-12 increases protection against *Leishmania major* infection in BALB/c mice. **Parasite Immunol.** v. 38. n. 4. p. 228-35, 2016.

MIRANDA, M. M.; PANIS, C.; CATANEO, A. H.; DA SILVA, S. S.; KAWAKAMI, N. Y.; LOPES, L. G.; MOREY, A. T.; YAMAUCHI, L. M.; ANDRADE, C. G.; CECCHINI, R.; DA SILVA, J. J.; SFORCIN, J. M.; CONCHON-COSTA, I.; PAVANELLI, W. R. Kaurenoic Acid Possesses Leishmanicidal Activity by Triggering a NLRP12/IL-1 $\beta$ /cNOS/NO Pathway. **Mediators of Inflammation** ID 392918, 2015.

NOGUEIRA, L. S. C.; SAMPAIO, R. N. R. Estudo hospitalar da leishmaniose tegumentar Americana (LTA): epidemiologia e tratamento. **An Bras Dermatol.** v. 76. n. 1. p. 51-62, 2001.

OLEKHNOVITCH, R.; RYFFEL, B.; MULLER, A. J.; BOUSSO, P. Collective nitric oxide production provides tissue-wide immunity during *Leishmania* infection. **J Clin Invest.** v. 124. p. 1711–22, 2014.

OLEKHNOVITCH, R.; BOUSSO, P. Induction, Propagation, and Activity of Host Nitric Oxide: Lessons from *Leishmania* Infection. **Trends Parasitol.** v. 31. n. 12. p. 653-64, 2015.

OLIVIER, M.; GREGORY, D. J.; FORGET, G. Subversion mechanisms by which *Leishmania* parasites can escape the host immune response: a signaling point of view. **Clin Microbiol Rev.** v. 18. p. 293–305, 2005.

PASSWELL, J. H.; SHOR, R.; GAZIT, E.; SHOHAM, J. The effects of Con A-induced lymphokines from the T-lymphocyte subpopulations on human monocyte leishmanicidal capacity and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production. **Immunology.** v. 59. n. 2. p. 245-50, 1986.

PIRMEZ, C.; YAMAMURA, M.; UYEMURA, K.; PAES-OLIVEIRA, M.; CONCEIÇÃO-SILVA, F.; MODLIN, R. L.; Cytokine patterns in the pathogenesis of human leishmaniasis. **J Clin Invest.** v. 91. p. 1390-5, 1993.

PRIVE, C.; DESCOTEAUX, A. *Leishmania donovani* promastigotes evade the activation of mitogen-activated protein kinases p38, c-Jun N-terminal kinase, and extracellular signal-regulated kinase-1/2 during infection of naive macrophages **Eur. J. Immunol.** v. 30. p. 2235-44, 2000.

QI, H.; JI, J.; WANASEN, N.; SOONG, L. Enhanced replication of *Leishmania amazonensis* amastigotes in gamma interferon-stimulated murine macrophages: implications for the pathogenesis of cutaneous *Leishmaniasis*. **Infect Immun.** v. 72. n. 2. p. 988-995, 2004.

REINER, S. L.; LOCKSLEY, R. M. Cytokines in the differentiation of Th1/Th2 CD4+ subsets in leishmaniasis. **J Cell Biochem.** v. 53. p. 323-8, 1993.

SACKS, D.; NOBEN-TRAUTH, N. The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice. **Nat Rev Immunol.** v. 2. p. 845–58, 2002.

SCOTT, P.; ARTIS, D.; UZONNA, J.; ZAPH, C. The development of effector and memory T cells in cutaneous leishmaniasis: the implications for vaccine development. **Immunol Rev.** v. 201. p. 318-38, 2004.

SILVEIRA, F. T.; LAINSON, R.; GOMES, C. M. C.; LAURENTI, M. D; CORBETT, C. E. P. Immunopathogenic competences of *Leishmania (V.) braziliensis* and *L. (L.) amazonensis* in American cutaneous leishmaniasis. **Parasite Immunol.** v. 31. p. 423–431, 2009.

VAN ASSCHE, T.; DESCHACHT, M.; DA LUZ, R. A. I.; MAES, L.; COS, P. Leishmania–macrophage interactions: Insights into the redox biology. **Free Rad Biol Med.** v. 51. p. 337–51, 2011.

YE, F.; YAN, S.; XU, L.; JIANG, Z.; LIU, N.; XIONG, S.; WANG, Y.; CHU, Y. Tr1 regulatory T cells induced by ConA pretreatment prevent mice from ConA-induced hepatitis. **Immunol Lett.** v.122. n. 2. p. 198-207, 2009.

WANASEN, N.; MACLEOD, C. L.; ELLIES, L. G.; SOONG, L. L-arginine and cationic amino acid transporter 2B regulate growth and survival of *Leishmania amazonensis* amastigotes in macrophages. **Infect Immun.** v. 75. n. 6. p. 2802-2810, 2007.

WANASEN, N.; SOONG, L. L-arginine metabolism and its impact on host immunity against *Leishmania* infection. **Immunol Res.** v. 41. p. 15–25, 2008.

WANG, H-X.; LIU, M.; WENG, S-Y.; LI, J-J.; XIE, C.; HE, H-L.; GUAN, W.; YUAN, Y-S.; JIN GAO, J. Immune mechanisms of Concanavalin A model of autoimmune hepatitis. **World J Gastroenterol.** v. 18. n. 2. p. 119-125, 2012.

WERNECK, G. L.; HASSELMANN, M. H.; GOUVÊA, T. G. Panorama dos estudos sobre nutrição e doenças negligenciadas no Brasil. **Ciênc saúde coletiva.** v. 16. p. 39-62, 2011.

## 5. CONCLUSÃO

O pré-tratamento com Con-A desempenhou um importante papel regulador no modelo de infecção intraperitoneal por *L. amazonensis* usado neste estudo. Sabe-se que esta espécie possui vários mecanismos de escape da resposta imunológica, incluindo a capacidade de invadir a célula por receptores de manose sem disparar a cascata de sinalização intracelular; ou reduzir a produção de NO e ROS por induzir o aumento da expressão de arginase e consequente clivagem de L-arginina; ou então, induzir a produção da citocina anti-inflamatória IL-10, que inibe a IL-12 e consequentemente IFN- $\gamma$ , impedindo a ativação de macrófagos.

No nosso modelo, observamos que o efeito quimiotático da Con-A não foi reduzido pela presença de *L. amazonensis* e levou a linfoproliferação e recrutamento de macrófagos e neutrófilos. Além do mais, mesmo estudos mostrando que a Con-A leva ao aumento da expressão de receptores de manose, observamos que os macrófagos obtidos de camundongos pré-tratados com Con-A foram capazes de produzir espécies reativas de oxigênio e levar a destruição do parasito, assim como a produção das citocinas inflamatórias IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ . Esta modulação inicial da Con-A na infecção experimental representou um elemento importante na fase crônica.

Quando avaliamos o perfil histológico do fígado de animais pré-tratados e infectados, observamos que àqueles que receberam a Con-A tiveram menos infiltrados celulares assim como uma quantidade menor de células no local. Já àqueles tratados com PBS, observamos alterações morfológicas indicando o início de uma lesão, como a perda da membrana do hepatócito e a presença de núcleo picnótico. Sendo assim, concluímos que o papel imunomodulador da Con-A no sítio inflamatório levou a um perfil menos agressivo observado no fígado durante a fase crônica, na infecção experimental por *L. amazonensis*.

## **6. ANEXOS**

---



Universidade  
Estadual de Londrina

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

OF. CIRC. CEUA N° 056/2013

Londrina, 19 de Março de 2013.

Prezada Pesquisadora,

A CEUA/UEL reunida em 19 de Fevereiro de 2013 avaliou o projeto de pesquisa intitulado "**Análise da atividade biológica da concavalina-A na Leishmaniose experimental**", processo CEUA n° **1677.2013.33**, do Centro de Ciências Biológicas, desenvolvido sob sua responsabilidade. Esclarecidos os aspectos metodológicos solicitados o projeto está **aprovado** para execução entendendo-se que os princípios éticos postulados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal estão respeitados.

Serão utilizados 198 camundongos Balb/c machos, com idade de 6 -8 semanas e peso aproximado a 25 gramas, procedentes do Biotério da Fiocruz de Curitiba-Pr. O projeto tem como objetivo avaliar a atividade biológica *in vitro* e *in vivo* da concavalina A na leishmaniose experimental. Os camundongos serão tratados previamente por via intraperitoneal ou não com concavalina A, e após 72 horas do tratamento os macrófagos da cavidade peritoneal serão coletadas e distribuídas em placas, até a aderência dos macrófagos. Será realizado a inoculação de formas promastigotas de *Leishmania amazonenses* na placa e após a infecção, o sobrenadante será coletado para dosagem de citocinas, quantificação de nitrito (NO), análise do índice fagocítico e do número de formas amastigotas por macrófagos, avaliação dos mecanismos de ação leishmanicidade da concavalina A, avaliação da migração celular, análise histológica e análise imunohistoquímica, dosagem de óxido nítrico, determinação da atividade da mieloperoxidase e Hepatotoxicidade. O projeto está aprovado para execução em 36 meses após aprovação da CEUA.

Cumpra orientar que caso pretendam-se quaisquer alterações no protocolo de aula prática aprovado, deve-se submeter o novo protocolo à apreciação da CEUA/UEL anteriormente à execução das modificações. Sem mais para o momento, subscrevo-me. Cordialmente,

*Waldiceu Ap. Verri Junior*  
Prof. Dr. Waldiceu Aparecido Verri Junior  
Coordenador da CEUA/UEL

Ilma. Sra.

**Profa. Dra. Ivete Conchon Costa**

Coordenadora do Projeto

Departamento de Ciências Patológicas

Centro de Ciências Biológicas

Com copia para Sra Égle Maria de Sousa (Chefe da DCA/PROPPG) e Diretora do Centro de Ciências Biológicas.