

Imunoestimuladores - potencial para o tratamento de imunodepressões e doenças infecciosas

Sandra Cristina Barão e Selma Giorgio*

Departamento de Parasitologia, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, C.P. 6109, 13083-970, Campinas-São Paulo, Brazil. Fax: (019) 289-3124, e-mail: sgiorgio@uol.com.br. *Author for correspondence.

RESUMO. No presente trabalho, revisamos os agentes que restauram e ampliam a habilidade do sistema imunológico de reagir contra uma gama de patógenos e tumores, e que também aumentam a imunogenicidade das vacinas. As várias condições patológicas causadas pelo inadequado funcionamento do sistema imune, tais como as imunodeficiências congênitas e adquiridas (exemplificadas pela AIDS), aumentaram a importância de pesquisas na área de imunoestimulantes. Moléculas de origem endógena e compostos naturais e sintéticos são descritos nesta revisão. Ênfase especial é dada à origem, à estrutura química e às principais atividades imunológicas de dois imunoestimuladores: produtos de origem bacteriana e derivados de ácidos nucleicos. As perspectivas de uso desses compostos na clínica são também discutidos.

Palavras-chave: derivados de guanosina, imunoestimuladores, imunologia, leishmaniose.

ABSTRACT. Immunostimulants - potential for immunodepression and treatment of infectious diseases. The agents that restore and enhance the ability of the immune system to react to a myriad of pathogens and tumors and increase the immunogenicity of vaccines are discussed in this article. The several pathological conditions which are caused by inadequate functioning of the immune system such as congenital and acquired immunodeficiencies (dramatically exemplified by AIDS) have brought immunostimulation into focus. Many different types of compounds have been demonstrated to possess immunostimulatory properties. The rich arsenal of endogenous molecules together with natural and synthetic exogenous compounds are here described. Special emphasis has been given to the origin, chemical structure and main immunologic activities of two immunomodulators, products of bacterial origin and derived from nucleic acids. An attempt is made to envisage the future of these pharmacological agents with an emphasis on their potential medical usefulness.

Key words: guanosine derivatives, immunology, immunostimulants, leishmaniasis.

O sistema imunológico é constituído por uma complexa rede de células e moléculas envolvidas na defesa do organismo contra agentes infecciosos. A importância do sistema imune pode ser apreciada pelo fato de que o número de células de nosso corpo envolvidas nessa atividade é aproximadamente igual ao número de células do cérebro; são mais de 10^{12} clones celulares e 10^{11} tipos de receptores que, não importando a forma ou o tamanho dos microorganismos invasores, os reconhecerão e desencadearão mecanismos de eliminação desses corpos estranhos (Koshland, 1990; Nossal, 1993).

A imunologia é uma das áreas de pesquisa que guarda uma das mais interessantes questões em biomedicina: como um sistema celular pode responder de maneira específica a uma quantidade quase infinita de microorganismos e moléculas? E,

ainda, distinguir esses invasores de suas próprias estruturas? Em outras palavras, como o sistema imune é capaz de distinguir o que é próprio ("self") do que é estranho ("non self")? É evidente que essa discriminação nem sempre é perfeita, e assim ocorrem as doenças auto-imunes, como, por exemplo, a artrite reumatóide e a esclerose múltipla. Os indivíduos que sofrem dessas patologias apresentam respostas imunológicas aberrantes contra suas próprias células e tecidos. De 5% a 7% da população mundial sofre de algum tipo de doença auto-imune (Koshland, 1990, Steinman, 1993).

Do outro lado da "moeda imunológica", há várias condições patológicas que são o resultado da deficiência do sistema imune em reconhecer e combater microorganismos invasores; são as deficiências imunes, tragicamente representadas pela

AIDS; outros exemplos são doenças de origem genética, como a síndrome da imunodeficiência ligada ao cromossomo X e a síndrome de DiGeorge (Greene, 1993). No grupo de indivíduos imunodeprimidos, incluem-se os pacientes transplantados submetidos a terapia com imunossuppressores e pacientes recebendo quimioterapia e radioterapia contra o câncer, que também apresentam queda na imunidade. Como o título do artigo aponta, nosso objetivo é apresentar e discutir uma das formas encontradas por pesquisadores para estimular o sistema imunológico: os imunostimuladores, moléculas com propriedade de ativar as células imunes, que no presente estão sendo testadas em laboratórios e também na clínica (Werner e Jolles, 1996).

Os alvos dos imunostimuladores

As várias populações celulares que compõem o sistema imune são mostradas na Figura 1. Essas células se espalham em vários tecidos do corpo, como, por exemplo, os gânglios linfóides, o baço e o fígado, e circulam relativamente livres pelo sangue e pela linfa. Essas populações celulares são organizadas

de maneira complexa e a comunicação entre elas é realizada por sinais químicos (proteínas, na maioria, com baixo peso molecular) conhecidos como citocinas, que são os interferons, as interleucinas e os fatores quimiotáticos (Nossal, 1993). Na mesma Figura 1 é apresentado, de maneira simplificada, o modelo de ativação do sistema. Esse modelo, o mais aceito atualmente, considera que células macrófágicas são capazes de fagocitar e “apresentar” antígenos (moléculas estranhas ao organismo) a linfócitos T (tanto do tipo Th1 quanto Th2, para uma revisão, ver Nossal, 1993), ativando-os para a produção de citocinas, que por sua vez ativariam os macrófagos vizinhos e também atrairiam outros tipos de células para combater uma infecção. A esse tipo de resposta do sistema denominamos “celular”. Os linfócitos B teriam a capacidade de se ligar e reconhecer moléculas estranhas sem a ajuda de macrófagos (reconhecimento de antígenos solúveis), produzir citocinas e principalmente diferenciarem-se em células produtoras de anticorpos; chamamos a essa resposta do sistema imune de “humoral” (Nossal, 1993).

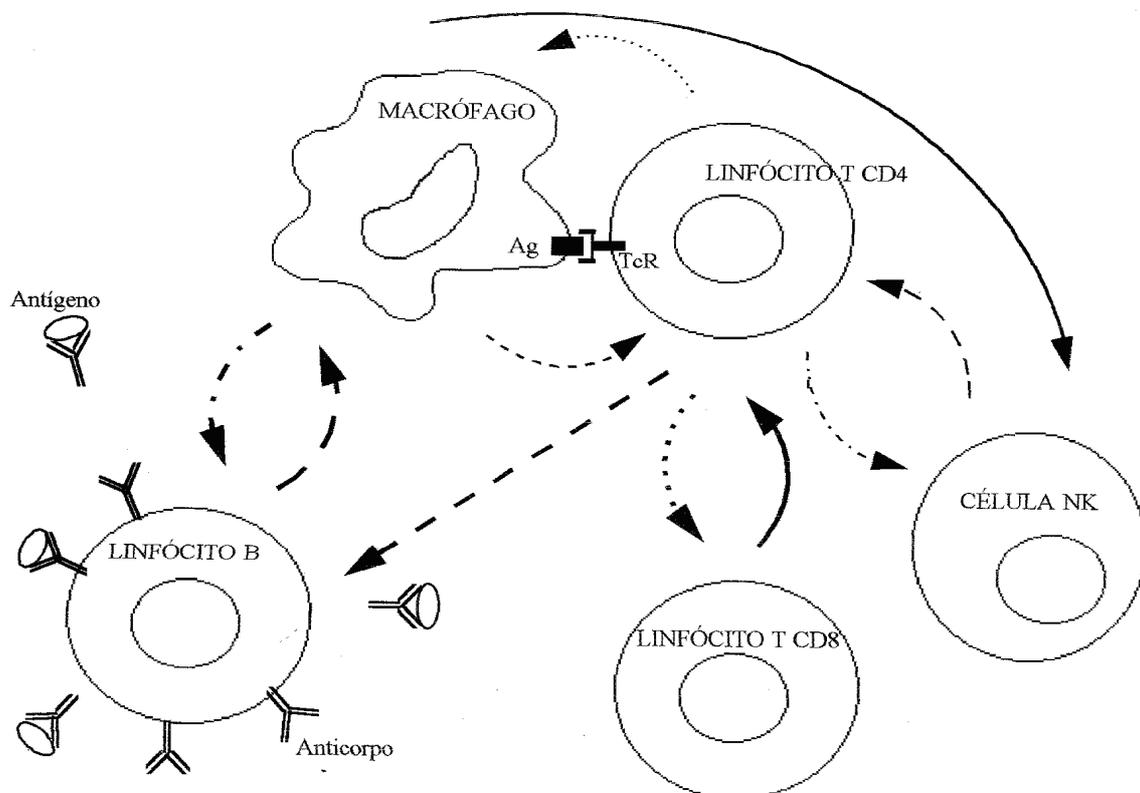


Figura 1. Esquema simplificado das células e do mecanismo de estimulação do sistema imunológico. Linfócitos B possuem receptores para antígenos, que são os anticorpos, depois liberados para o meio (resposta humoral). Linfócitos T possuem receptores que reconhecem antígenos expostos na superfície de macrófagos. O reconhecimento de antígenos desencadeia em linfócitos T, proliferação e liberação de citocinas (resposta celular), que agirão em outras células do sistema imune e que também produzirão citocinas (cada seta representa diferentes citocinas liberadas pelas células). Para detalhes, ver texto

Assim explicado, é possível presumir os caminhos que os imunologistas estão seguindo para estimular o sistema quando este não se apresenta eficaz: a investigação de moléculas que possam, quando administradas em indivíduos imunodeprimidos, ativar as células ou substituir as citocinas, para que o sistema imunológico responda energeticamente contra microorganismos invasores.

Os tipos de imunostimuladores

Atualmente, os imunostimuladores são divididos em dois grandes grupos (Tabela 1): aqueles de origem endógena, como as citocinas, e os de origem exógena, que discutiremos mais à frente. Nos últimos anos têm-se estudado intensamente as atividades biológicas de dezenas de citocinas. As propriedades de várias delas têm atraído a atenção, devido ao potencial que oferecem como imunostimuladores (para uma revisão mais detalhada, ver Hadden, 1993; Werner e Jolles, 1996). A título de exemplos, podemos citar o interferon alfa, usado nos tratamentos de hepatites virais dos tipos B e C e a terapia com G-CSF (fator estimulante de granulócitos), que acelera a neutrofilia após tratamento quimioterápico contra o câncer e aumenta a atividade da medula óssea transplantada (Werner e Jolles, 1996; Contreras, 1996). No entanto, apesar do potencial terapêutico das várias citocinas, essas moléculas endógenas também causam sérios efeitos colaterais quando administradas em humanos e animais. A razão para tais problemas encontra-se no fato de que as citocinas são moléculas com atividades pleiotrópicas, isto é, uma citocina pode ser produzida por inúmeras células e tem como alvo também vários tipos de células, podendo induzir em cada uma delas efeitos diferentes. É óbvio que nos indivíduos saudáveis as citocinas endógenas agem todas em

concordância, apesar do pleiotropismo e da redundância em atividades, mas a introdução artificial (tratamento) com uma ou várias delas pode originar total desequilíbrio do sistema imune e até do organismo, levando à morte (Cohen, 1995; Werner e Jolles, 1996).

O outro grupo de imunostimuladores são os do tipo exógeno; podem ser de origem biológica (de bactérias e fungos, por exemplo), semi-sintéticos ou sintéticos (Tabela 1). No caso desse tipo de imunostimulador, as possibilidades de estudo e desenvolvimento de compostos de diferentes fontes são quase ilimitadas (Hadden, 1993; Werner e Jolles, 1996). É evidente, também, que as atividades dessas substâncias devem-se às suas interações com as células do sistema imune, estimulando-as a produzir citocinas. As vantagens dos imunostimuladores exógenos sintéticos e semi-sintéticos em relação às citocinas são várias. Muitos deles têm massa molecular muito pequena, possibilitando a síntese química e o estudo farmacocinético. A maioria pode ser administrada oralmente, é estável à temperatura ambiente e a dosagem necessária para obtenção de resultados favoráveis pode ser mais facilmente pesquisada do que com moléculas de citocinas, mais complexas do ponto de vista bioquímico. Devemos também salientar que a síntese química e o controle analítico dos compostos são de custo menor que a produção de citocinas recombinantes, obtidas por processos biotecnológicos (Werner e Jolles, 1996). Outra grande vantagem desses imunostimuladores exógenos está no fato de que se pode lançar mão da moderna técnica de "drug design", isto é, a manipulação por computador da estrutura dos compostos e a construção ou desenho de moléculas com conformações ideais para realizar determinadas atividades (Bugg *et al.*, 1993).

Tabela 1. Origem e atividades imunológicas de importantes imunostimuladores

Origem	Tipo	Atividades imunológicas
Endógena	Citocinas (TNF, INF, IL1, IL2...IL12)*	várias (ver texto)
Endógena	Hormônios do Timo (TIMOSINA)	↑** produção de anticorpos ↑ atividade tumoricida de macrófagos ↑ produção de IL2
Exógena	Produtos de Bactérias (MDP*** e Lipídio A)	↑ produção de anticorpos ↑ atividade tumoricida de macrófagos ↑ produção de TNF e IL1
Exógena	Produtos de Fungos (Glucanas)	↓ incidência de infecção de pacientes operados ↑ produção de IL1 e IL2
Exógena	Vitaminas (A ou Retinol e E ou α-Tocoferol)	↑ resistência a infecção por bactérias e fungos em roedores ↓ formação de tumores em Hamsters
Exógena	Ribonucleosídeos (8BromoGuanosina)	↑ produção de anticorpos ↑ atividade leishmanicida de macrófagos (ver texto)

* TNF = Fator Necrosante Tumoral; INF = Interferon; IL = Interleucina; ** ↑ = aumento; ↓ = diminuição; *** MDP = N-acetilmuramyl-L-alanyl-D-isoglutamina (Ver texto para detalhes)

A pesquisa de imunostimuladores exógenos também foi impulsionada pelo sucesso obtido com os imunossuppressores sintéticos, que já fazem parte do dia-a-dia da clínica médica, na prevenção de rejeições a transplantes e no tratamento de doenças auto-imunes (Georgiev, 1993).

Neste artigo, optamos por discutir mais detalhadamente os imunostimuladores exógenos pesquisados na atualidade. Escolhemos dois deles: os produtos de bactérias, devido à sua importância histórica e ao sucesso no trabalho de síntese química de seus análogos, e os derivados de ácidos nucleicos, que estão sendo utilizados, atualmente, em um projeto conjunto do nosso laboratório com o grupo de pesquisa da professora Ohara Augusto, do Departamento de Bioquímica do Instituto de Química da Universidade de São Paulo.

Imunostimuladores exógenos

Uma das principais fontes de imunostimuladores exógenos está em produtos de micobactérias. Estudos do final do século passado sugeriam que filtrados de cultura de bactérias aumentavam a rejeição de tumores em pacientes tratados com esse material (Coley, 1895). Com o passar dos anos a pesquisa foi se sofisticando, a ponto de os detalhes químicos da parede celular das micobactérias serem conhecidos, como, por exemplo, as subunidades que formam as peptidoglicanas da parede. Tal conhecimento possibilitou a síntese de um pequeno fragmento, em que o ácido N-acetilmuramínico é ligado a um dipeptídeo, a L-alanil-D-glutamil. O MDP ou N-Acetilmuramil-L-alanil-D-isoglutamina, resultado dessa síntese química, tem as mesmas propriedades imunostimuladoras das micobactérias mortas (como aquelas presentes na vacina BCG e no adjuvante completo de Freund) (Leclerc e Chedid, 1982). Desde a síntese do MDP, dezenas de testes foram realizados, tanto *in vitro* como *in vivo*, e observou-se que esse composto e outros análogos químicos sintetizados a partir dele induzem vários efeitos no sistema imunológico: o aumento da produção de anticorpos, o aumento da resistência de camundongos contra a infecção com o vírus da encefalomioscardite, e o aparecimento de atividade tumoricida de macrófagos (Werner e Jolles, 1996). Além das atividades imunológicas, MDP e alguns análogos também provocam efeitos farmacológicos, tais como leucopenia transitória, liberação de serotonina de plaquetas e febre, sendo este último considerado um efeito colateral. Há evidências experimentais de que esses compostos induzem a produção de várias citocinas, entre elas a interleucina 1, apontando pirogênia (Leclerc e Chedid, 1982). Dos vários análogos sintéticos de MDP, alguns não induzem febre, quando administrados oralmente, e

estão, atualmente, sendo testados na França e no Japão, para induzir a recuperação da medula óssea de indivíduos submetidos a quimioterapia contra o câncer e, também, para melhorar respostas imunes a peptídeos isolados do vírus HIV, candidatos à vacina contra a AIDS (Hadden, 1993). Neste último caso, os análogos de MDP agiriam como adjuvantes, substâncias com capacidade de aumentar a resposta imune específica contra um determinado antígeno, injetado simultaneamente (Giorgio, 1996; Werner e Jolles, 1996).

O outro grupo de moléculas com potencial imunostimulador são os derivados de purinas, os componentes dos ácidos nucleicos, os ribonucleosídeos substituídos no carbono de posição 8, como, por exemplo, a 8-Bromoguanosina (8BrGuo) (Figura 2). A síntese desses compostos, alguns análogos da adenosina e outros análogos da guanosina, iniciou-se na década de 70 (revisada por Bonnet e Robins, 1993). Vários laboratórios estudam o potencial modulador dos ribonucleosídeos no sistema imune. A ação observada dos análogos de adenosina está relacionada à inibição das funções imunes, enquanto que a atividade dos análogos de guanosina é estimular células do mesmo sistema (Goodman, 1991; Bonnet e Robins, 1993). O composto 8BrGuo e alguns outros derivados de guanosina têm sido analisados há vários anos por pesquisadores do Instituto de Pesquisa da Clínica Scripps, na Califórnia, EUA (Goodman, 1995; Pope *et al.*, 1995). As pesquisas iniciais foram realizadas *in vitro* e em camundongos, e os efeitos dos compostos em células do sistema imune são vários, sendo a ampliação das respostas de linfócitos B, com a produção de anticorpos e proliferação celular, a primeira ação relatada (Goodman e Weigle, 1982). Esses resultados mostraram a possibilidade de uma “fonte” alternativa de auxílio a linfócitos B prestada normalmente por linfócitos T CD4 (Figura 1), isto é, os ribonucleosídeos substituiriam as citocinas, produzidas pelas células T, necessárias para ativar a proliferação de linfócitos B e a produção de anticorpos. De fato, os resultados dos experimentos realizados com animais imunodeficientes foram muito animadores. Camundongos da linhagem CBA/N com deficiência na produção de linfócitos B, quando tratados com esses imunostimuladores, restauraram as atividades humorais (produção de anticorpos) (Goodman e Weigle, 1983). Em linhagens de camundongos deficientes em linfócitos T (camundongos atímicos conhecidos como “nude”) também se observou, após tratamento com os ribonucleosídeos, restauração na habilidade das células em responder contra antígenos, mesmo na falta de linfócitos T funcionais (Goodman e Weigle, 1983). Outra demonstração das potencialidades desses compostos está no estudo realizado em

camundongos senis (com três anos de idade), que normalmente apresentam relativa imunodepressão tanto na resposta humoral como na celular (fenômeno similar pode ser observado em humanos). As células imunocompetentes desses animais expostas a ribonucleosídeos restauram a capacidade de resposta contra vários antígenos, proliferando a níveis comparáveis ao de linfócitos dos animais adultos saudáveis. O mesmo tipo de imunoestimulação foi observado em camundongos neonatos (com uma semana de idade), que são normalmente maus respondedores para antígenos. As respostas imunes são comparáveis à dos adultos, quando as células dos neonatos são incubadas com ribonucleosídeos (Goodman e Weigle, 1985).

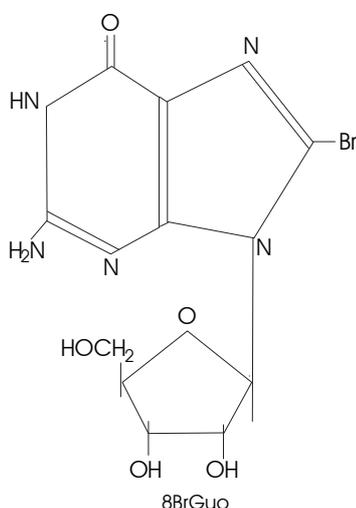


Figura 2. Estrutura química de um ribonucleosídeo substituído no carbono 8. A 8 - Bromoguanosina (8BrGuo)

As atividades desses compostos em outras células do sistema imune também foram investigadas. Os resultados são muito interessantes. Enquanto que em linfócitos T humanos e de roedores não foi observada estimulação ou proliferação, uma ativa estimulação de outras células, tais como macrófagos e células “natural killers”, foi detectada em testes *in vitro* e *in vivo* (Koo *et al.*, 1988, Ojo-Amaize *et al.*, 1990). Nos EUA estudos farmacocinéticos e clínicos estão sendo realizados para avaliar a dosagem, a toxicidade e o efeito de ribonucleosídeos de guanosina, em pacientes com câncer e refratários aos quimioterápicos e em pacientes com falha renal crônica, submetidos a hemodiálise, ambos com grau avançado de imunodepressão. Os primeiros resultados mostraram que o composto não é tóxico, tem uma meia vida de 8 a 12 horas e apresenta atividade imunoestimuladora nos pacientes com falha renal crônica. E os autores se propuseram a testá-lo em indivíduos com diferentes tipos de imunodeficiências (Goodman, 1995).

Ribonucleosídeos de guanosina e o modelo da *Leishmania*

Como já citado anteriormente, os ribonucleosídeos de guanosina são capazes de ativar macrófagos, isto é, induzem nessas células a produção de metabólitos tóxicos, os reativos de oxigênio, como o ânion superóxido. Esse processo de ativação de macrófagos e produção de radicais livres de oxigênio é denominado “burst oxidativo” (Nossal, 1993). Ojo-Amaize e colaboradores (1990) demonstraram que a 8BrGuo tem a capacidade de ativar o “burst” em macrófagos, e sugerem que esse ribonucleosídeo poderia capacitar macrófagos a eliminar patógenos fagocitados por essas células.

A linha de pesquisa em nosso laboratório vem sendo, desde o início (1994), o estudo de mecanismos tóxicos ao parasita *Leishmania* (Gatti *et al.*, 1995; Giorgio *et al.*, 1996; Augusto *et al.*, 1996). Resumidamente, podemos definir a leishmaniose como uma parasitose causada por um protozoário transmitido por inseto flebotomíneo hematófago. O parasita vive exclusivamente dentro dos macrófagos, e dependendo da espécie de *Leishmania*, a doença se manifesta diferentemente (WHO, 1990). Em nosso laboratório, trabalhamos com a espécie *L. amazonensis*, que é muito comum no Norte e Nordeste do Brasil e causa uma infecção cutânea simples ou uma forma de doença mais grave, a leishmaniose cutânea difusa, que se caracteriza por lesões cutâneas espalhadas pelo corpo do paciente, por apresentar imunidade específica deprimida e resistência ao tratamento com as drogas usuais (antimoniais pentavalentes) (WHO, 1990). O enfoque do trabalho é mostrado simplificado na Figura 3. O objetivo principal é estudar os efeitos dos ribonucleosídeos de guanosina em macrófagos infectados com *L. amazonensis*. Alguns dos compostos sintetizados no laboratório da professora O. Augusto, da Universidade de São Paulo, já foram testados em ensaios *in vitro*, para a padronização das dosagens, tempos de tratamento e toxicidade em modelo murino (macrófagos de camundongos infectados com o parasita) (Barão *et al.*, 1997; Giorgio *et al.*, 1998). Os primeiros resultados são promissores, apontando um efeito da 8BrGuo na ativação de macrófagos, capacitando essas células a eliminar uma grande percentagem das leishmanias intracelulares. Nossos próximos passos serão os testes *in vivo* com roedores infectados com *L. amazonensis*, e o entendimento do mecanismo que leva à morte dos parasitas dentro das células. O projeto tem sido financiado por agências de fomento à pesquisa, federais e estaduais, e tem estimulado a colaboração de grupos de bioquímicos, químicos, parasitologistas e imunologistas.

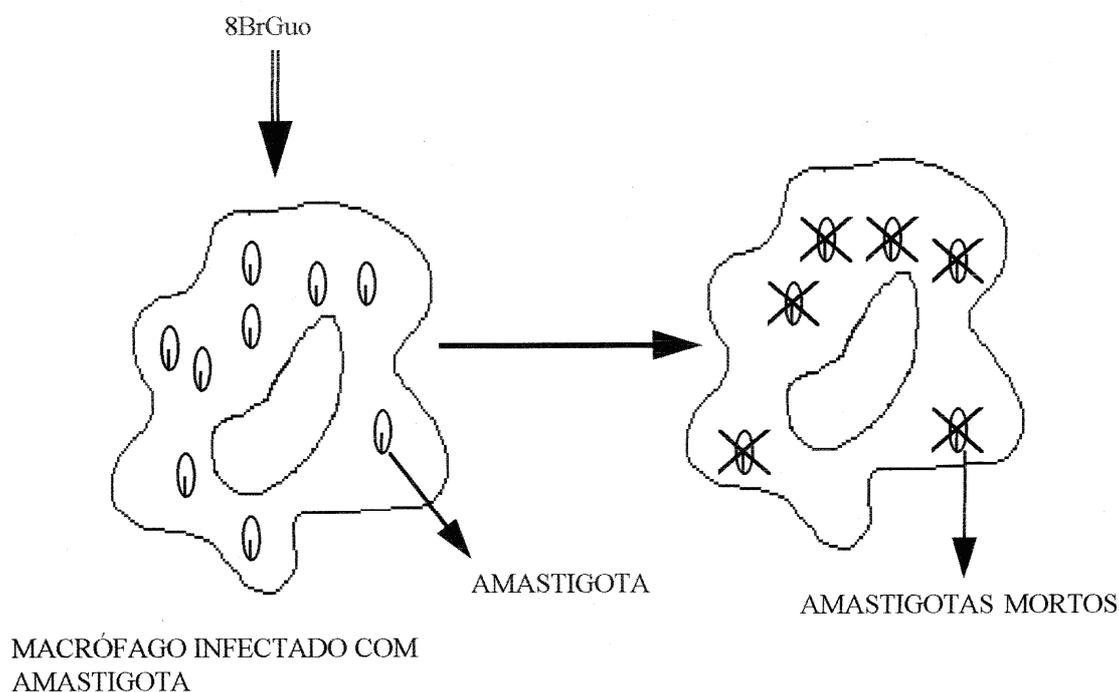


Figura 3. Esquema simplificado da hipótese de trabalho relacionada ao projeto em andamento em nosso laboratório. Macrófagos tratados com o imunostimulador 8BrGuo teriam seus mecanismos microbicidas ativados e seriam capazes de matar os amastigotas de *Leishmania amazonensis*. Para detalhes, ver texto

Perspectivas

O estudo de compostos que estimulam ou restauram a habilidade do sistema imune para combater infecções e tumores data do final do século passado e tem sido um grande desafio para imunologistas de todo o mundo. A epidemia da AIDS e as imunodeficiências permanentes ou temporárias originadas da quimioterapia contra o câncer e do tratamento de pacientes transplantados e em indivíduos senis aumentaram a importância de pesquisas na área. Os resultados dessas pesquisas com imunostimuladores têm mostrado que o uso de substâncias exógenas, como os produtos sintetizados a partir de estruturas de bactérias e de ácidos nucleicos, em pacientes imunodeprimidos, deve ocorrer num futuro próximo. Além dessa função importante, que poderá auxiliar no combate às infecções oportunistas, tão comuns nesses indivíduos, alguns dos imunostimuladores também mostram ação de adjuvante, isto é, capacidade de aumentar as respostas imunes específicas quando da fase de vacinação. As vantagens do uso clínico dessas substâncias são inúmeras; entre elas, uma menor incidência de resistência aos antibióticos é esperada, pois essas drogas serão utilizadas de maneira mais racional e em doses menores, pois deverão ser administradas juntamente a imunostimulantes (Casadeval, 1996). Podemos assim imaginar que a medicina terá, para futuro próximo, duas frentes de

“batalha” contra os patógenos, uma delas diretamente tóxica (os antibióticos, os antifúngicos e as drogas antiparasitárias) e outra, a de compostos que habilitarão o sistema imune a combater esses microorganismos (os imunostimuladores).

Agradecimentos

Ao grupo de pesquisa da professora Ohara Augusto, da Universidade de São Paulo, e às seguintes agências de fomento à pesquisa: CNPq, CAPES, FAPESP e FAEP.

Referências bibliográficas

- Augusto, O.; Linares, E.; Giorgio, S. Possible roles of nitric oxide and peroxynitrite in murine leishmaniasis. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 29(7):853-862, 1996.
- Barão, S.C.; Prazeres, J.N.; Giorgio, S. Efeito de imunostimuladores na fagocitose de *Leishmania amazonensis*. In: SEMANA DE BIOLOGIA DA UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ, 7, 1997, Maringá. *Caderno de Resumos*, 1997. p.11.
- Bonnet, P.A.; Robins R.K. Modulation of leukocyte genetic expression by novel purine nucleoside analogues: a new approach to antitumor and antiviral agents. *J. Med. Chem.*, 36(6):635-653, 1993.
- Bugg, C.E.; Carson, W.N.; Montgomery, J.A. Drugs by design. *Scient. Amer.*, 269(6):60-66, 1993.

- Casadeval, A. Crisis in infectious diseases: time for a new paradigm? *Clin. Infect. Dis.*, 23(4):790-794, 1996.
- Cohen J. IL-12 deaths: explanation and a puzzle. *Science*, 270(5238):908, 1995.
- Coley, W.B. The treatment of inoperable malignant tumors with the toxins of erysipelas and *Bacillus prodigiosus*. *Med. Res. Annals*, 47:65-70, 1895.
- Contreras, L.G. O papel das citocinas no tratamento do câncer. *Cancerologia*, 7:34-36, 1996.
- Gatti, R.M.; Giorgio, S.; Kwee J.K.; Augusto, O. Leishmanicidal activity of peroxy-nitrite. *Redox Report*, 1(3):261-265, 1995
- Georgiev, St. Immunomodulating drugs: major advances in research and development. *Ann. New York Acad. Sci.*, 685:1-10, 1993.
- Giorgio, S. Novas estratégias para o desenvolvimento de vacinas contra parasitas. *Rev. Ciênc. Tecnol.*, 5(9):17-24, 1996.
- Giorgio S.; Linares E.; Capurro, M.L.; Bianchi, A.G.; Augusto, O. Formation of nitrosyl hemoglobin and nitrotyrosine during murine leishmaniasis. *Photochem. Photobiol.*, 63(6):750-754, 1996.
- Giorgio, S. Barão S.C.; Augusto, O.; Kwee, J.K. *Leishmania amazonensis* infection is reduced in macrophages treated with guanine ribonucleosides. *Acta Tropica* (no prelo).
- Goodman, M.G.; Weigle, W.O. Induction of immunoglobulin secretion by a simple nucleoside derivative. *J. Immunol.*, 128(6):2399-2404, 1982.
- Goodman, M.G.; Weigle, W.O. Manifold amplification of *in vivo* immunity in normal and immunodeficient mice by ribonucleosides derivatized at C8 of guanine. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 80(11):3452-3455, 1983.
- Goodman, M.G.; Weigle, W.O. Restoration of humoral immunity *in vitro* in immunodeficient aging mice by C8-derivatized guanine ribonucleosides. *J. Immunol.*, 134(6):3808-3811, 1985.
- Goodman, M.G. A new approach to vaccine adjuvants In: Powel M.F.; Newman M.J. *Vaccine design: the subunit and adjuvant approach*, New York: Plenum Press, 1995. p.581-609.
- Goodman, M.G. Cellular and biochemical studies of substituted guanine ribonucleoside immunostimulants. *Immunopharmacology*, 21(1):51-68, 1991.
- Greene, W.C. AIDS and the immune system. *Scient. Amer.*, 269(3):66-73, 1993
- Hadden, J.W. Immunostimulants. *Immunol. Today*, 14(6):275-280, 1993.
- Koo G.C.; Jewell, ME.; Manyak C.L.; Sigal, N.H.; Wicker, L.S. Activation of murine natural killer cells and macrophages by 8-bromoguanosine. *J. Immunol.*, 140(9):3249-3252, 1988.
- Koshland D.E.Jr. Recognizing self from nonself. *Science*, 248(4961):1273, 1990
- Leclerc, C.; Chedid, L. Macrophage activation by synthetic muramyl peptides. In: Pick. E. (ed.). *Lymphokines 7*. New York: Academic Press, 1982. p.1-21.
- Nossal, G.J.V. Life, death and the immune system. *Scient. Amer.*, 269(3):20-30, 1993.
- Ojo-Amaize, E.A. Rubalcava B.; Avery, T.; Cottan, H.B.; Matsumoto, S.S.; Jolley, W.B.; Robins, R.K. Activation of the respiratory burst in murine phagocytes by certain guanine ribonucleosides modified at the 7 and 8 positions: possible involvement of pestussis toxin-sensitive G-protein. *Immunol. Lett.*, 23(3):173-178, 1990.
- Pope, L.P.; Macintyre P.; Kimball, E.; Lee, S.; Zhou, L.; Taylor, G.R.; Goodman, M.G. The immunostimulatory compound 7-allyl-8-oxoguanosine (loxoribine) induces a distinct subset of murine cytokines. *Cell. Immunol.*, 162(4):333-339, 1995.
- Steinman, L. Autoimmune disease. *Scient. Amer.*, 269(3):74-83, 1993
- Werner, G.H.; Jolles, P. Immunostimulating agents: what next? A review of their present and potential medical applications. *Eur. J. Biochem.*, 242(1):1-19, 1996.
- WHO, *Control of the leishmaniasis*- Technical Report Series 793, Geneva: World Health Organization, 1990.

Received 28 December 1997.

Accepted 22 May 1998.