



AUTARQUIA ASSOCIADA À UNIVERSIDADE
DE SÃO PAULO

**AÇÃO DA RADIAÇÃO IONIZANTE SOBRE A MORFOLOGIA,
FISIOLOGIA E CRESCIMENTO DA *Leishmania amazonensis*,
COM AVALIAÇÃO DE SEU PODER IMUNOGÊNICO
EM MODELOS EXPERIMENTAIS**

FRANCO CLAUDIO BONETTI

Dissertação apresentada como parte
dos requisitos para obtenção do Grau
de Mestre em Ciências na Área de
Tecnologia Nuclear - Aplicações.

Orientadora:
Dra. Nanci do Nascimento

São Paulo
2002

INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES
Autarquia associada à Universidade de São Paulo

**AÇÃO DA RADIAÇÃO IONIZANTE SOBRE A MORFOLOGIA, FISILOGIA E
CRESCIMENTO DA *Leishmania amazonensis*, COM AVALIAÇÃO DE SEU
PODER IMUNOGÊNICO EM MODELOS EXPERIMENTAIS.**

FRANCO CLAUDIO BONETTI



Dissertação apresentada como parte dos
requisitos para obtenção do Grau de
Mestre em Ciências na área de
Tecnologia Nuclear - Aplicações

Orientadora:
Dra. Nanci do Nascimento

SÃO PAULO
2002

À memória de meus avós

Aos meus pais pelo incentivo, e por acreditarem que eu seria capaz.

AGRADECIMENTOS

À Andréa Sanchez Martins por todo o esforço de me aturar nos momentos de mau humor e estar ao meu lado para comemorar nos momentos de alegria, além de ser mãe do nosso filho maravilhoso: Ian.

À minha orientadora Profa. Dra. Nanci do Nascimento pela oportunidade, pelos conselhos, e por me guiar ao longo de todo o trabalho.

Ao Prof. Dr. Heitor Franco de Andrade Jr., por me acolher no Laboratório de Protozoologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, e colaborar diretamente para o bom andamento do trabalho.

Ao Roberto Mitsuiooshi Hiramoto, pela amizade e por todo o ensinamento de diversas técnicas utilizadas ao longo do trabalho.

Ao Andrés Jimenez Galisteo Jr. e ao Daniel Perez Vieira, por suas amizades e auxílio.

Ao Dr. Patrick Jack Spencer pela amizade e pelos conselhos.

À Byanca Paiva pelo auxílio nas técnicas de Biologia Molecular.

À Roselaine Pereira Alvim Cardoso pelo auxílio técnico e pela amizade.

À Dna. Francisca pelo cafezinho e pelas boas risadas.

À todos os amigos do Instituto de Medicina Tropical da Faculdade de Medicina da USP, pelo companheirismo.

À todos os amigos do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares - IPEN - pela amizade.

À Elizabeth S. R. Somessarie e ao Carlos Gaia da Silveira, Engenheiros do CTR – IPEN, pelo auxílio técnico do processo de irradiação dos parasitas utilizados neste trabalho.

Aos Professores Dr. José Maria Barata e Délsio Natal, da Faculdade Saúde Pública da Universidade de São Paulo, por me incentivarem desde o início das minhas atividades Acadêmicas dentro desta Universidade.

À todas as outras pessoas que apesar de não estarem aqui relacionados certamente serão sempre lembrados por sua colaboração.

Ao CNPq e à FAPESP pelo suporte financeiro ao projeto.

AÇÃO DA RADIAÇÃO IONIZANTE SOBRE A MORFOLOGIA, FISIOLOGIA E CRESCIMENTO DA *Leishmania amazonensis*, COM AVALIAÇÃO DE SEU PODER IMUNOGÊNICO EM MODELOS EXPERIMENTAIS.

Franco Claudio Bonetti

RESUMO

A leishmaniose é uma doença que afeta milhares de pessoas no Brasil e no mundo, sendo que a manifestação clínica mais comum é a leishmaniose tegumentar americana. O causador desta doença é um protozoário do gênero *Leishmania spp*, que tem como reservatórios mamíferos silvestres e urbanos, inclusive o homem. Este protozoário é transmitido vetorialmente por meio da picada de um inseto da família dos flebotomíneos, que inocula a forma promastigota dos parasitas no momento do repasto sanguíneo. Dentro do hospedeiro, o parasita infecta e se multiplica dentro dos macrófagos, na forma amastigota. Atualmente existem alguns tratamentos para a leishmaniose, porém estes tratamentos têm um alto custo, além de serem demorados, o que acaba fazendo com que alguns pacientes desistam antes da cura total podendo haver reincidência da doença. O controle ao vetor e aos hospedeiros intermediários, como os cães por exemplo, é muito difícil, haja vista as implicações sociais e econômicas necessárias para a destruição dos criadouros do inseto e para o extermínio dos cães. A radiação ionizante do tipo gama, produzida em fonte de ^{60}Co , mostrou-se uma ferramenta interessante para matar os parasitas, sem no entanto acabar com sua imunogenicidade. O que se mostra um dado promissor para futuros trabalhos utilizando parasitas mortos por radiação como forma de tratar ou até mesmo imunizar contra *Leishmania spp*.

THE ACTION OF IONIZING RADIATION ON THE MORPHOLOGY,
PHYSIOLOGY AND GROWTH OF *Leishmania amazonensis*, WITH
AVALIATION OF THEIR IMMUNOGENIC POWER IN EXPERIMENTAL
MODELS.

Franco Claudio Bonetti

ABSTRACT

Leishmaniasis is a disease which affects thousands of people in the Tropical regions around the world, is caused by a protozoan of the genus *Leishmania spp.*, with urban and wild mammals acting as reservoirs. In the mammal host, the amastigote form of the parasite infects and multiplies into macrophages. Treatments for leishmaniasis have a high cost and are long lasting, frequently resulting in therapy interruption. This procedure culminates with a selection of resistant parasite strains, inducing tolerance to the therapy. Either the control of vectors or the mammal host are difficult due the social and economic implications. Thus, the search for alternatives treatments against these protozoans have been stimulated. The gamma radiation (^{60}Co) shown to be an efficient tool to kill these parasites maintaining their immunogenicity. Cellular viability, Electronically microscopy and Multiplex-PCR techniques showed that, after irradiation, the parasites had their growth inhibited by cytoplasmatic and nucleic material disorganization, appointing the gamma radiation as important in terms of immunogens improvement.

LISTA DE ABREVIATURAS

^{60}Co - $^{60}\text{Cobalto}$

APC - Célula Apresentadora de Antígeno

ATP - Adenosina Trifosfato

c.p.m. - contagens por minuto

DNA - Ácido Desoxirribonucleico

Gy - Grey

HCl - Ácido Clorídrico

ISCOMs - Complexos imunoestimulantes

MHC - Complexo Maior de Histocompatibilidade

PBS - Tampão Salina Fosfato

PBST - Tampão Salina Fosfato Tween

PBSTL - Tampão Salina Fosfato Tween Leite

T. gondii - *Toxoplasma gondii*

TCA - Ácido Tricloro Acético

SUMÁRIO

	PÁGINA
RESUMO.....	5
ABSTRACT.....	6
LISTA DE ABREVIATURAS.....	7
SUMÁRIO.....	8
INTRODUÇÃO.....	11
1. Considerações gerais.....	11
2. Aspectos Morfológicos e Metabólicos da <i>Leishmania spp</i>	14
3. Aspectos Imunológicos.....	15
4. Estudos vacinais.....	15
5. Radiação Ionizante.....	16
OBJETIVOS.....	18
1. Geral.....	18
2. Estratégia e Metodologia Experimental.....	18

MATERIAIS E MÉTODOS	19
1. Cultivo dos Parasitas.....	19
2. Irradiação.....	17
3. Teste de viabilidade por diluição limitante.....	20
4. Estudos Metabólicos.....	20
4.1. Prolina	20
4.2. Hipoxantina	21
5. Microscopia Eletrônica.....	21
6. Extrato de Antígeno Solúvel	22
7. Imunização dos camundongos.....	22
8. Estudos de cooperação celular (IVIAP).....	22
9. Ensaio de Imunossorvância (ELISA).....	24
10. Reação em cadeia da polimerase - <i>Multiplex (Multiplex-PCR)</i>	25
10.1. Desenho dos <i>primers</i>	25
10.2. Preparação do Mix.....	25
10.3. Programação do termociclador.....	25
10.4. Extração do DNA (TRIzol).....	26
10.5. Eletroforese em gel de Poliacrilamida para o produto do PCR.....	26
11. <i>Western Blot</i>	26
11.1. Eletroforese em gel de Poliacrilamida para o <i>Western Blot</i>	26
11.2. Transferência para membrana de nitrocelulose	27

RESULTADOS	29
1. Teste de Viabilidade por Diluição Limitante.....	29
2. Viabilidade por contagem de radioativos.....	32
2.1.Prolina	32
2.2.Hipoxantina	33
3. Estudos de cooperação celular -IVIAP.....	34
4. Titulação de Anticorpos em soro de camundongos.....	36
5. Lesões causadas pelos parasitas.....	37
6. Microscopia Eletrônica.....	38
7. Reação em cadeia da polimerase - <i>Multiplex</i> (Multiplex-PCR).....	39
8. <i>Western Blot</i>	40
DISCUSSÃO	41
CONCLUSÃO	49
BIBLIOGRAFIA	50

INTRODUÇÃO

1. Considerações gerais

A *Leishmania spp* é um protozoário patogênico da ordem *Kinetoplastida* e família *Trypanosomatidae* que causa diferentes doenças no homem, tendo diferentes espécies de vertebrados como reservatórios (LAINSON *et al*, 1987). Segundo o último levantamento realizado pela Organização Mundial da Saúde (WHO) em 1998, estima-se que 12 milhões de pessoas estão afetadas pelas várias formas da leishmaniose, com cerca de 600 mil casos novos registrados por ano, sendo classificada como uma das principais endemias da Zona Tropical.

A doença causada por este protozoário é transmitida de um hospedeiro ao outro por meio de um vetor, insetos da família *Phlebotominae*. No Velho Mundo são os do gênero *Phlebotomus* os transmissores e os do gênero *Lutzomyia* são responsáveis pela transmissão nas Américas, incluindo o Brasil (STRICKLAND, 2000).

No inseto, as *Leishmania spp* apresentam-se na forma promastigota e vivem na luz do intestino, alimentando-se de nutrientes oriundos da digestão. Algumas alterações fisiológicas no tubo digestório, como a alteração do pH (GARLAPATI *et al.*, 1999), sinalizam para os protozoários que o inseto irá se alimentar novamente (repasto sangüíneo), fazendo com que eles migrem para as glândulas salivares do flebotomíneo.

Ao picar o vertebrado, o inseto inocula um pouco de saliva, antes de sugar o sangue. Ao mesmo tempo em que injeta anticoagulantes, formas promastigotas de *Leishmania spp* são inoculadas no interstício do hospedeiro (RANGEL *et al.*, 1986) e prontamente procuram se instalar em células nucleadas para garantir sua sobrevivência. Normalmente as células infectadas são as do sistema primário de defesa, como macrófagos, que fagocitam os protozoários. Ao serem internalizados, estes parasitas permanecem em um vacúolo parasitóforo e sofrem a ação de enzimas específicas liberadas pelos lisossomos que se fundem a este vacúolo para lisarem as *Leishmanias*. Porém,

a *Leishmania spp* consegue inibir a ação destas enzimas ao se transformar em amastigota, sua forma de vida nas células do hospedeiro. Amastigotas conseguem se multiplicar por bipartição e rompem a membrana da célula infectada permitindo que novas células sejam infectadas pelos protozoários (Figura 1). Portanto estes protozoários são dimórficos, ocorrendo na forma promastigota no aparelho digestório do flebotomíneo e na forma amastigota em células nucleadas dos hospedeiros, onde se comportam como um parasita intracelular obrigatório (PIRMEZ, 1992).

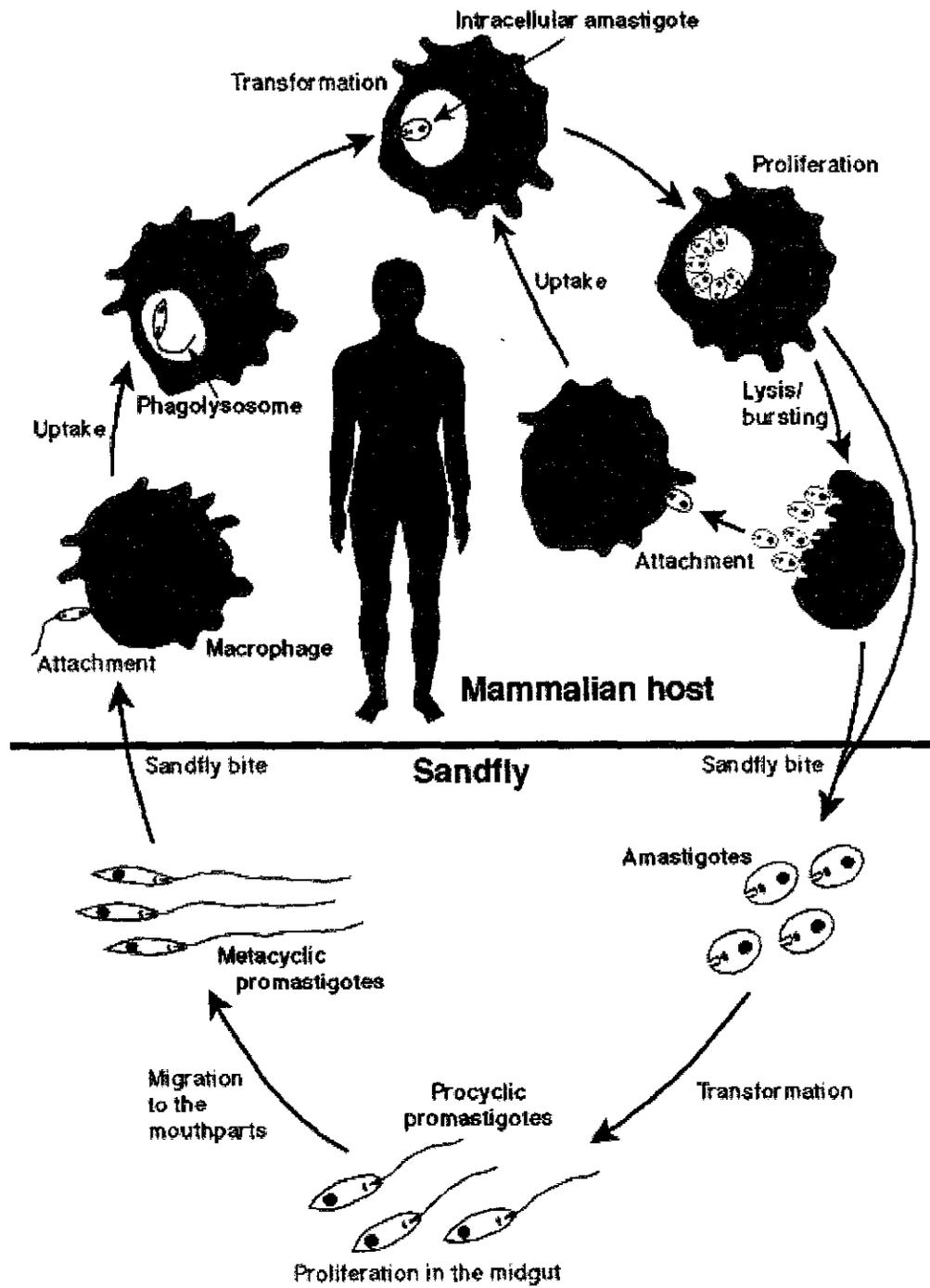


FIG1: Ciclo de vida da *Leishmania* spp.

Extraído de <http://www.wehi.edu.au/research/infimm/leishman.html>

Nas Américas, a doença humana causada por este grupo de protozoários é dividida em dois grupos: a cutânea ou tegumentar, causada pelas espécies *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, *Leishmania (Vianna) braziliensis* entre outras e a visceral, conhecida como kala-azar, causada principalmente pela espécie *Leishmania (Leishmania) chagasi*, com comprometimento dos órgãos ricos em células macrofágicas, como o fígado e o baço (TEIXEIRA, 1998).

A leishmaniose tegumentar é causada pela *Leishmania amazonensis* e é a forma de maior ocorrência no Brasil, justificando, portanto, maiores considerações sobre esta apresentação clínica da doença. Três diferentes manifestações clínicas podem ser observadas:

1-Leishmaniose cutânea: forma mais freqüente da doença, com lesões formadas, geralmente, no local da picada do inseto, sem disseminação à distância.

2-Leishmaniose cutâneo-mucosa: com lesões tanto na pele quanto na mucosa das vias aéreas superiores, com intensa atividade imunopatológica e metastatização das lesões.

3-Leishmaniose cutânea difusa: forma mais rara da doença, com inúmeras lesões nodulares disseminadas por todo o tegumento, ricas em parasitas, caracterizando uma anergia. (MAYRINK *et al*, 1979)

2. Aspectos Morfológicos e Metabólicos da *Leishmania spp*

Não existem diferenças significativas entre as formas promastigotas das espécies de *Leishmania*, no que diz respeito à morfologia (FURTADO, 1987). As formas promastigotas destes parasitas apresentam membrana citoplasmática, com invaginação na sua parte posterior onde se localizam os desmossomos, organelas responsáveis pela fixação do parasita às outras células. No citoplasma, observam-se estruturas semelhantes às das células humanas, como mitocôndrias e retículo endoplasmático, além de outras organelas como cinetoplasto e corpo parabasal, de onde surgem o flagelo, acantossomo, glicosomo, corpo multivesiculado e vacúolo. O núcleo é composto por carioteca e nucléolos (VICKERMAN, 1974).

Seu metabolismo para obtenção de energia, quando na fase promastigota, é estritamente aeróbico e, quando submetido aos meios sem

presença de oxigênio, demonstra uma brusca redução de suas atividades como, por exemplo, a degradação de glicose (VAN HELLEMOND *et al.*, 1997). Suas mitocôndrias utilizam glicólise e oxidação de prolinas para a formação das Adenosinas Trifosfatos (ATPs), sua forma de armazenar energia (ALVÁREZ-FORTES *et al.*, 1998).

3. Aspectos Imunológicos

As formas promastigotas, quando fagocitadas pelos macrófagos, permanecem em um vacúolo fagolisossomal, onde deveriam ser degeneradas. Porém, o parasita consegue multiplicar-se e disseminar-se por todo tecido, sem ser destruído, devido à produção de proteínas protetoras contra a ação de enzimas e citocinas (RITTIG & BOGDAN, 2000), inibindo assim, a capacidade de destruição e reconhecimento, impedindo, conseqüentemente, a resposta do sistema imune contra o agente agressor (ANTOINE *et al.*, 1999).

As primeiras lesões aparecem após aproximadamente um mês de incubação. Dessa forma, a imunidade na leishmaniose é complexa e tem resultado em inúmeros estudos, bastante elucidativo, de imunologia celular humana, como a descoberta dos subgrupos de linfócitos Th1 e Th2 (BRETSCHER *et al.*, 1997).

4. Estudos vacinais

Tentativas de prevenção da doença mostraram que, embora envolvendo um alto custo social e econômico, o vetor e os reservatórios são passíveis de controle, enquanto que estudos vacinais têm apresentado resultados conflitantes utilizando diferentes preparações antigênicas (PASSOS *et al.*, 1999).

Trabalhos com o intuito de vacinação, utilizando radiação ionizante, têm sido feitos em diferentes parasitas há alguns anos (GREENSTOCK, 1981). Em 1993, SONG e colaboradores irradiaram, com doses aproximadas de 550 Gy, cistos de *T. gondii* teciduais e demonstraram que estes cistos perderam completamente sua capacidade de infecção. Ainda com *T. gondii*, foram feitos estudos de irradiação a 255 Gy, que resultaram em esterilização das formas infectantes do protozoário (HIRAMOTO *et al.*, 2002). Outro estudo, feito com protozoários do gênero *Trypanossoma cruzi*, irradiados e inoculados em

camundongos, mostrou que os parasitas tiveram sua capacidade de infecção inibida de acordo com a dose de radiação recebida e a cepa utilizada (TRISCHMANN, 1982).

Assim, diversos trabalhos vêm sendo realizados, principalmente utilizando radiação ionizante, com o intuito da descoberta de novos tratamentos e até mesmo a produção de vacinas eficazes, o que seria um grande passo para a medicina preventiva.

5. Radiação Ionizante

A radiação ionizante possui dois tipos de ação: direta ou indireta. Na primeira, ocorre uma ação direta sobre a molécula alvo com transferência de energia, provocando ionização e alterações nas propriedades físico-químicas e na estrutura secundária e terciária dos polímeros, além de perda de função biológica. Essas mudanças estão relacionadas com a perda da atividade enzimática, hormonal ou tóxica e com as alterações das propriedades imunológicas (HRAZDIRA e SKALKA, 1970).

O efeito indireto da radiação é maior nas soluções diluídas, na presença de oxigênio e conta com um efeito protetor de outras substâncias orgânicas presentes na solução. Este fato mostra que o efeito final diferirá de acordo com as condições de irradiação (NASCIMENTO *et al.*, 1996). Outros fatores que também influenciam o efeito da radiação são temperatura, dose, taxa de dose e pH.

Segundo KEMPNER (1988), os raios gama e elétrons de alta energia causam ionizações ao acaso através da massa da matéria colocada no campo de radiação. Cada ionização primária resulta na transferência de 65 elétron Volt (~1500 kcal/mol) da radiação para a molécula alvo. Esta energia é absorvida por diferentes mecanismos atômicos e moleculares, incluindo excitações, ionizações e formação de radicais livres. Alguns desses mecanismos resultam em mudanças irreversíveis na macromolécula por quebras de ligações covalentes e mudanças conformacionais.

Uma vez que a água constitui a grande maioria do material biológico das moléculas, muitas das interações da radiação resultam na produção de OH[•], elétron aquoso, H₂O₂ e uma variedade de outros produtos potencialmente danosos. Quando em solução, esses produtos da radiólise da água, podem

difundir e reagir com macromoléculas bioquimicamente ativas, causando perda de atividade biológica (NASCIMENTO *et al*, 1996).

No caso da radiação ionizante, a espécie mais reativa gerada pela radiólise da água é o radical hidroxila (OH^{*}) (CHAPMAN, 1973) que junto com o ânion superóxido (O₂^{*-}), o elétron aquoso e o peróxido de hidrogênio (H₂O₂) são capazes de produzir dano às moléculas (GREENSTOCK, 1981).

Assim, por meio de trabalhos realizados com vários protozoários, incluindo *Leishmanias*, modificados pela ação da radiação, mostrou-se que ocorre perda da capacidade patogênica, mantendo, entretanto, os seus aspectos morfológicos. Tais condições permitiram a passagem do parasita pelo sistema primário de defesa, atingindo os macrófagos e produzindo resposta específica (RIVIER *et al*, 1993).

Baseado nos dados citados, estudar os efeitos da radiação ionizante sobre os protozoários, buscando o conhecimento para o desenvolvimento futuro de reagentes para tratamentos, ou mesmo uma vacina, contribuiria sobremaneira para solucionar este importante problema de Saúde Pública.

OBJETIVOS

1. Geral

Verificar a ação da radiação ionizante sobre a morfologia, fisiologia e crescimento de *Leishmania amazonensis*, com avaliação de seu poder imunogênico em modelos experimentais.

2. Estratégia e Metodologia Experimental

- Irradiar as formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* com diferentes doses de radiação, para um estudo de radiosensibilidade;
- Verificar as alterações morfológicas e fisiológicas dos parasitas;
- Avaliar a capacidade de resposta imunológica dos camundongos quando imunizados com *Leishmania amazonensis* irradiadas.

MATERIAIS E MÉTODOS

Todos os sais e demais reagentes utilizados foram de qualidade pró-análise; a água utilizada foi purificada em sistema Milli Q (Millipore), apresentando resistividade de 18.2 Ω . Reagentes específicos têm sua fonte citada ao longo do texto. Foram utilizados camundongos da linhagem BALB/c, machos, isogênicos e pesando em torno de 22g, mantidos com água e alimentação *ad libitum*, provenientes do biotério da Faculdade de Medicina da USP (FMUSP).

1. **Cultivo dos Parasitas:** As formas promastigotas da cepa MPRO/BR/72/LV79 de *L. amazonensis*, cedidas pela Dra. Silvia Celina Alfieri, do Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biomédicas da USP, isoladas de pata de camundongos infectados, foram cultivadas em meio RPMI 1640 (SIGMA®) com 20% de soro fetal bovino, adicionado de 20 $\mu\text{g/ml}$ de Estreptomicina e 50 $\mu\text{g/ml}$ de Gentamicina, e mantidos em estufa do tipo B.O.D., à temperatura de 24° C.

2. **Irradiação:** O processo de irradiação foi realizado no Centro de Tecnologia da Radiação (CTR) do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – IPEN/CNEN-SP, em fonte de ^{60}Co (GAMMACELL, Atomic Energy of Canadá Ltd.), de forma homogênea, em presença de oxigênio, a uma taxa de dose de 6,36 KGy/hora. As doses de radiação utilizadas foram de 50, 100 e 200Gy, sem atenuador; e 400, 800, 1000, 1100, 1200, 1300, 1400, 1500, 1600 e 3200Gy, com atenuador de 90%, a fim de se evitar que as doses mais altas de radiação não afetassem diretamente os parasitas, podendo alterar os propósitos dos experimentos. Irradiou-se 10^7 parasitas por mililitro de meio de cultura RPMI 1640 em tubos contendo 5 ml de cultura.

3. Teste de viabilidade por diluição limitante: Os parasitas irradiados foram distribuídos em placas de 96 poços, com diluição progressiva de 1:10 e concentração inicial de 1×10^7 parasitas/ 100 μ l. As placas foram então deixadas na estufa, a 24° C por 24 horas, quando foi feita a leitura em microscópio óptico invertido, contando-se o número de parasitas sobreviventes por poço, utilizando um contador manual. Após 48 e 72 horas foram realizadas novas leituras. De acordo com o número de parasitas vivos encontrados por poço, foram atribuídos índices de crescimento variando de zero a quatro. Desta maneira foi possível determinar o crescimento dos parasitas, em diferentes concentrações, e avaliar a viabilidade após a exposição às diferentes doses de radiação. Os resultados desta análise foram determinados por gráfico elaborado no Graph Pad[®] (Prisma).

4. Estudos Metabólicos: Foram realizados dois tipos de ensaios para avaliar o metabolismo celular do parasita: utilizando-se prolina na averiguação do metabolismo protéico e hipoxantina, na síntese de DNA, ambas marcadas com Trício (³H).

4.1 Prolina: O estudo do metabolismo celular para *Leishmania* foi realizado com a utilização de prolina tritiada (³H-prolina). Após a irradiação, os parasitas foram centrifugados por 10 minutos a 800 g. O sobrenadante foi desprezado e os parasitas colocados em meio de cultura DME (Dulbecco's Modified Eagle's Medium), acrescido de ³H-prolina ($3,7 \times 10^8$ Bq/ml). A cultura foi estabelecida em placa de 24 poços, com concentração de 3×10^6 parasitas/ml a 37° C com 5% de CO₂. Nos intervalos de tempo (0, 1, 2, 4 e 18 horas) foram retirados 100 μ l da cultura e colocados em papel de filtro tipo Whatmann 3 mm, os quais foram mantidos à temperatura ambiente até estarem completamente secos. Todos os papéis foram colocados em solução de TCA 10% por uma hora e, em seguida, em TCA 5% por mais uma hora, finalizando com etanol 100% por trinta minutos. Uma vez completamente secos estes papéis filtro foram colocados em tubos contendo 3 ml de líquido de cintilação (PPO 2,5 Diphenyloxazone [5,0g] + POPOP (1,4-Bis[2-(5Phenyl) Oxazolyl]Benzene [0,5]

+ 1 litro de tolueno p.a.), sendo efetuada a leitura de ^3H por cinco minutos. A radioatividade incorporada foi determinada em β -cintilador (leitura de ^3H por cinco minutos), sendo a contagem apresentada em c.p.m. (contagens por minuto).

4.2 Hipoxantina: Após a irradiação, os parasitas foram centrifugados por 10 minutos a 800 *g* e o sobrenadante, desprezado. Acrescentou-se então, meio de cultura com ^3H -hipoxantina ($3,7 \times 10^8$ Bq/ml), sendo a cultura realizada em placa de 24 poços, com concentração de 1×10^7 parasitas por ml, a 37° C com 5% de CO_2 . Nos diferentes intervalos de tempo (0, 1, 2, 4 e 18 horas) foram retirados 100 μl da cultura, colocados em papel de filtro tipo Whatmann 3 mm e mantidos à temperatura ambiente, até estarem completamente secos. Todos os papéis foram colocados em solução de TCA 10% por uma hora, em seguida em TCA 5% por mais uma hora, finalizando com etanol 100% por trinta minutos. Após totalmente secos estes papéis filtro foram colocados em tubos contendo 3 ml de líquido de cintilação (PPO 2,5 Diphenyloxazone [5,0g] + POPOP (1,4-Bis[2-(5Phenyl) Oxazoly]Benzene [0,5] + 1 litro de tolueno p.a.), sendo efetuada a leitura de ^3H por cinco minutos. A radioatividade incorporada foi determinada em β -cintilador (leitura de ^3H por cinco minutos) e a contagem apresentada em c.p.m. (contagens por minuto).

5. Microscopia Eletrônica: A metodologia de Microscopia eletrônica seguiu o protocolo de DUARTE e colaboradores (1992) e foi realizada em microscópio eletrônico (JEOL) da Faculdade de Medicina da USP. Amostras de formas promastigota de *Leishmania amazonensis* normais e aquelas irradiadas com dose de 1500 Gy, foram centrifugadas separadamente por 10 minutos a 1000 *g*, o sobrenadante retirado, e o *pellet* resultante foi fixado em uma solução com 3% de glutaraldeído com formaldeído em tampão cacodilato (0,1 M, pH 7,0) por trinta minutos. Posteriormente, o material foi lavado três vezes com tampão cacodilato com 2% de sucrose e foi feita a fixação em Tetróxido de Ósmio 2% por trinta minutos. Após três novas lavagens, o material foi mantido em 5% de acetato de uranil com 100% de etanol (solução final: 2,5% de uranil, 50% de etanol) por cinco minutos, seguido de três lavagens em etanol 70%. Os espécimes foram desidratados em 2,2 dimetoxipropano acidificado com 0,05 ml

de HCl (1 M) por cinco minutos, sendo então colocados em solução de sulfato cúprico anidro por dois minutos. As amostras foram embebidas em *acetona Epon Polybed*[®] com *Araldite 502*[®] (1:1) por trinta minutos e novamente mergulhados mais duas vezes nesta solução por dez minutos. A polimerização foi dada a 100°C por uma hora. Cortes semifinos e ultrafinos foram feitos e fixados em acetato de uranil 70% em metanol.

6. Extrato de Antígeno Solúvel (MINEO, 1982): Centrifugou-se culturas de *Leishmania amazonensis* em tubos cônicos até a obtenção do precipitado e em seguida foram adicionados 5 ml de água destilada. A suspensão diluída foi submetida ao ultra-som (THORNTON-INPEC[®]) a 40 ciclos por períodos de 30 segundos em banho de gelo. Após a certificação da lise completa dos protozoários, foram acrescentados 5 ml de solução de NaCl 0,3 M para isotonzar a suspensão e centrifugou-se a 10.000 g, por trinta minutos, a 4°C. O sobrenadante foi distribuído em alíquotas de 0,5 ml e armazenado a -70° C.

7. Imunização dos camundongos (BRETSCHER et al., 1997): Camundongos Balb/c, suscetíveis à infecção por *Leishmania amazonensis*, foram imunizados em intervalos quinzenais com três doses de 100 µl, contendo 10⁶ parasitas em meio de cultura RPMI 1640 (SIGMA[®]), irradiados com dose de 800 ou 1500 Gy de radiação gama de ⁶⁰Co, com inóculos subcutâneos na base da cauda.

8. Estudos de cooperação celular (*in vitro inducible antibody production - IVIAP*) (CANDOLFI et al., 1994): Foram utilizados: baço de camundongos normais (livres de parasitas), infectados com *L. amazonensis* viáveis, e imunizados com *L. amazonensis* irradiadas com doses de 1500 Gy; meio de cultura RPMI 1640 (SIGMA[®]) acrescido de 10% de soro fetal bovino; Ficoll-Paque (densidade 1.077 ± 0.001 g/ml), preparado com 5,7 g Ficoll 400 e 9g de sodium diatriziate com cálcio EDTA por 100 ml [(7g Ficoll 400 + água q.s.p. 90 ml (autoclavada a 110° C por 10 minutos) + 20 ml de Hipaque] (AMERSHAN PHARMACIA[®]); ³H-Timidina a 37 x 10⁴ Bq/ml em meio de cultura e líquido de cintilação (descrito nos procedimentos para Prolina).

Em um fluxo laminar estéril, o baço, retirado de camundongo normal, infectado com *Leishmania amazonensis* viáveis ou imunizado, foram macerados em meio de cultura RPMI 1640 em três placas de Petri (um em cada placa) e colocados em Ficoll-Paque na proporção 2:1 de meio de cultura/Ficoll-Paque, com a finalidade de criar um gradiente de centrifugação para separar os linfócitos das demais células presentes na cultura. Centrifugou-se a 400 g por 20 minutos à temperatura ambiente e o sobrenadante, com a camada de linfócitos, foi retirado com uma pipeta Pasteur e adicionado à 1 ml de meio de cultura. Centrifugou-se novamente a 250 g por 15 minutos à temperatura ambiente e removeu-se o sobrenadante. Lavou-se duas vezes, em meio de cultura, por centrifugação (150 g por 10 min) e foi removida uma alíquota de células para determinar o número de linfócitos viáveis por mililitro. Ajustou-se a concentração para 2×10^6 linfócitos/ml, por contagem em câmara de Neubauer.

Uma placa de 96 poços (CORNING®) foi previamente sensibilizada com 50 µl de antígeno de *Leishmania* na concentração de 10µg/ml em tampão Carbonato 0,1 M (esterilizado em filtro de 0,22 µm - Millipore®) pH 9,0 durante 18 horas a 4°C, posteriormente lavada com PBS e incubada com albumina bovina 2% (SIGMA®) por uma hora em câmara úmida a 37°C para bloqueio de eventuais sítios inespecíficos. Em cada poço da placa foram colocados 50 µl de RPMI 1640, 50 µl de antígeno total de *Leishmania* (item 6), 50µl da suspensão de linfócitos e 50µl de soro de camundongos normais, infectados com parasitas viáveis ou de camundongos imunizados com parasitas irradiados com doses de 1500 Gy. A placa foi posteriormente colocada em estufa com 5% de CO₂ por 24 horas. Após este período, o material presente nos poços foi transferido com o auxílio de um pipetador multicanal para outra placa semelhante, sendo a primeira reservada para o ensaio de imunoabsorvância. A magnitude da resposta mitótica foi determinada pela adição de 50µl de ³H-Timidina para cada poço, por 18 horas, antes da transferência do material para um papel filtro apropriado (FINNPETTE STEPPER-SIGMA®) por meio de um coletor de células. Utilizou-se um coletor de células (*cell harvester*) semi-automático (WALLAC®) para transferir o material, sendo que os discos de papéis filtro com as células secaram por três horas a 37°C. Cada disco foi colocado em um

frasco com fluido de cintilação, e fez-se as contagens num contador de partículas Beta (WALLAC®).

9. Ensaio de imunoabsorvância (Enzyme Linked Immunosorbent Assay - ELISA): Os ensaios de imunoabsorvância foram utilizados para a detecção da produção de anticorpos *in vivo* e *in vitro*. Para a realização do teste para verificação da produção de anticorpos produzidos por linfócitos esplênicos *in vitro*, foi utilizada a microplaca reservada do ensaio descrito no item 7. Realizou-se um novo ciclo de lavagens com PBSTL por três vezes. Foi aplicado conjugado anti-IgG de camundongo (SIGMA®) na diluição de 1:20.000 em PBSTL sob agitação. A placa foi levada à estufa de CO₂ a 37° C por mais uma hora. Lavou-se com PBSTL por seis vezes e foram aplicados 100 µl de OPD (orto-fenilenodiamina 1 mg/ml, H₂O₂ 0,03% em Tampão fosfato – citrato 0,2 M pH 5,0) por trinta minutos em câmara escura. Cinquenta microlitros de HCl 4N foram adicionados para interromper a reação e, em seguida, foi feita a leitura em leitor de microplacas (Multiscan-UNISCIENCE®) em comprimento de onda de 492 nm. Os resultados foram analisados em gráficos elaborados no Graph-Pad Prisma 3.0.

Para a realização do ensaio de imunoabsorvância para a detecção da titulação de anticorpos produzidos em soro de camundongos Balb/c, *in vivo*, sensibilizou-se uma placa de 96 poços (CORNING®) com 100 µl de antígeno de *Leishmania* na concentração de 10µg/ml em tampão Carbonato 0,1 M (esterilizado em filtro de 0,22 µm - Millipore®) pH 9,0 durante 18 horas a 4°C em câmara úmida. Lavou-se posteriormente com PBST três vezes, sendo incubada com PBSTL por uma hora em câmara úmida a 37°C, para o bloqueio de eventuais sítios inespecíficos. Após três novas lavagens com PBSTL aplicou-se 100 µl de soro de camundongos imunizados com parasitas irradiados com 800 ou 1500 Gy diluídos (1:200) em cada poço, mantendo a placa por mais uma hora em estufa a 37°C. Aplicou-se 100 µl de conjugado anti camundongo (1:20.000), deixando a placa por mais uma hora em estufa com 5% de CO₂ a 37°C. A seguir a placa foi lavada por seis vezes com PBSTL e aplicou-se 100 µl de OPD (orto-fenilenodiamina 1 mg/ml, H₂O₂ 0,03% em Tampão fosfato – citrato 0,2 M pH 5,0). Após trinta minutos em câmara escura

foram adicionados HCl 4N a fim de parar a reação. A leitura da densidade óptica foi realizada em leitor de microplacas (Multiscan-UNISCIENCE®) a 492 nm. O resultado foi analisado em gráfico elaborado no Graph-Pad Prisma 3.0.

10. Reação em Cadeia da Polimerase - Multiplex (*Multiplex Polymerase Chain Reaction - Multiplex-PCR*) (HARRIS *et al.*, 1998): O material a ser processado por reação em cadeia da polimerase (PCR), para amplificação e detecção de DNA de *Leishmania amazonensis*, foi coletado por raspagem da lesão ocorrida nos camundongos Balb/c imunizados com *Leishmania amazonensis* irradiadas com 800 Gy, utilizando uma lâmina de bisturi estéril.

10.1 Desenho dos primers: Para a amplificação do material foram utilizados um iniciador (*primer*) com homologia para genes da região do mini-exon conservado nos três complexos do gênero (*Leishmania brasiliensis*, *Leishmania mexicana* e *Leishmania donovani*) (LU-5A), e três específicos para cada complexo (LB-3C, LM-3A e LC-3L), com a finalidade de identificar a presença de DNA de *Leishmania amazonensis*. Estas seqüências foram escolhidas por não apresentarem homologia com outros protozoários como *T. cruzi*, *T. brucei*, *T. rangeli* e *Crithidia fasciculata*.

LU-5A: 5'- TTT ATT GGT ATG CGA AAC TTC -3'

LB-3C: 5'- CGT (C/G)CC GAA CCC CGT GTC-3'

LM-3A 5'- GCA CCG CAC CGG (A/G)CC AC-3'

LC-3L: 5'- GCC CGC G(C/T)G TCA CCA CCA T-3'

Os primers foram sintetizados pela Life Technologies®.

10.2 Preparação do mix: 1,5 mM MgCl₂, 2,0 µl de dNTP (200 µM/µl), 2,5 µl de PCR buffer (50 mM KCl + 10 mM Tris pH 8,3), 1 µl de cada *primer* (0,4 µM LU-5A, e 0,2 µM LB-3C, LM-3A e LC-3L), 15 µl de água e 0,1 µl de Taq Polimerase ((Life Technologies®). Distribuiu-se 20 µl deste *mix* por tubo e acrescentou-se 5 µl do material a ser analisado. Centrifugou-se a 11000 g por 1 minuto para sedimentar e evitar bolhas. Colocou-se no termociclador.

10.3 Programação do termociclador: Temperatura de 95° C por 5 minutos para denaturação inicial. A seguir foram feitos 35 ciclos de 95° C por 1 minuto (denaturação), 54° C por 1 minuto (anealing), 72° C (extensão). Posteriormente, a 72° C por 6 minutos para extensão final.

10.4 Extração do DNA utilizando TRIzol (Life Technologies®): Centrifugou-se a 10000 g a 4° C e adicionou-se 1 ml de TRIzol por tubo contendo o tecido de raspado da cauda dos camundongos imunizados com parasitas irradiados com 800 Gy, utilizados nos ensaios de imunização. Colocou-se 200µl de clorofórmio (MERK® M-119, 39g/ml) e agitou-se no vórtex. Centrifugou-se novamente a 10000 g a 4° C por 15 minutos. Descartou-se a fase aquosa contendo RNA e adicionou-se ao tubo 300µl de etanol. Centrifugou-se a 2000 g por 5 minutos a 4° C. Retirou-se a fase fenólica e ressuspendeu-se o precipitado em 10 µl de água.

10.5 Eletroforese em gel de Poliacrilamida para o produto do PCR: O produto da amplificação do PCR foi analisado em gel de poliacrilamida, sendo que o tamanho da banda esperada para *Leishmania amazonensis* varia em torno de 200 pares de base (200 bp). A reação de eletroforese foi realizada em gel de acrilamida 6%, preparada com 10 ml de solução de Acrilamida, acrescidos de 125 µl de Persulfato de Amônio e 30 µl de TEMED para polimerização. Preparado o gel, as amostras foram colocadas nos respectivos poços sob uma corrente elétrica de 90 V até a entrada no gel, sendo então ajustada para 60 V até o final do gel. O padrão de Peso Molecular utilizado apresenta bandas a partir de 50 pares de bases. Terminada esta etapa o material foi retirado da cuba de corrida e fixado com uma solução preparada com: 1 ml de Ácido acético, 15 ml de etanol e 136 ml de água bidestilada, por 15 minutos. A coloração do gel foi feita utilizando Nitrato de Prata (0,3 g) adicionado de 50 ml de água bi-destilada por 5 minutos. O gel foi lavado com água bidestilada por três minutos. A revelação foi obtida com uma solução de 2 ml de formol, com 4,5 g de hidróxido de Sódio e 148 ml de água bidestilada por aproximadamente 8 minutos (BASSAM *et al.*, 1991).

11. Western Blot (SILVEIRA *et al.*, 2001):

11.1 Eletroforese em gel de Poliacrilamida para o Western Blot: Primeiramente preparou-se um gel de empilhamento formado por uma mistura de 10 ml de solução contendo 30 g de Acrilamida (71,08 M), 0,8 g de N,N-metileno-bisacrilamida (154,2M) e 100 ml de H₂O bidestilada, 6,5 ml de solução (0,5 M, pH 6,8) contendo 18,17 g de Trizma base, 0,4 g de SDS, 40 ml de H₂O

bidestilada, ajustando o pH para 6,8 com HCl 1N, completando o volume com 12,5 ml de H₂O. Acrescentou-se 50 µl de Persulfato de amônio e 10 µl de TEMED à solução, para polimerização, e homogeneizou-se. Verteu-se esta solução entre duas placas montadas em um sistema, para a formação de um gel com 0,75 mm, fechado em sua parte superior com um pente plástico dentado. Após a polimerização do gel este pente foi retirado e nos poços formados foram adicionados o padrão de peso molecular e o antígeno de *Leishmania amazonensis* (item 6) adicionado de 2-mercaptoetanol e azul de bromofenol. Este sistema foi colocado em uma cuba contendo tampão de corrida (3,0 g de Tris (25mM), 144 g de Glicina (192mM), 10 g de SDS (0,1%)) e submetido a uma corrente de 120 Volts por cerca de uma hora, até que o bromofenol atingisse o final do gel. Ao final da corrida o gel foi retirado da placa e as proteínas, já separadas, foram submetidas à transferência para a membrana de nitrocelulose.

11.2. Transferência para membrana de nitrocelulose: Após a corrida, o gel foi montado em forma de "sanduíche", da seguinte maneira: uma esponja, dois papéis filtros (todos do tamanho do gel), o gel, uma membrana de nitrocelulose, dois papéis filtro e outra esponja. Este "sanduíche" foi colocado em uma cuba de transferência, evitando-se a formação de bolhas, submetendo o sistema a uma diferença de potencial de 1.5 watts por 40 minutos na presença de tampão Towbin de transferência (25mM de Trizma base, 192 mM de glicina, e 20% de metanol pH 8,1-8,5). Após a transferência desmontou-se o "sanduíche" e corou-se (coloração reversível) a membrana com uma solução de Ponceau, (0,5 g Ponceau S, 1 ml de ácido acético glacial, e 1000mL de H₂O bidestilada) por cinco minutos sob agitação lenta. O lado onde estavam as bandas foi identificado e recortou-se o padrão. O resto da membrana foi recortado em tiras, que foram lavadas com tampão fosfato (PBS) (82 g de NaCl, 10,5 g de Na₂HPO₄ e 3,55 g de NaH₂PO₄, pH 7,2) contendo 3% de leite sem gordura (PBSL) por uma hora sob agitação. Após o bloqueio as tiras foram lavadas com PBS por três vezes e acrescentaram-se 500 µl de amostra (soro de camundongos normal, infectado com parasitas viáveis e imunizados com parasitas irradiados com 800 ou 1500 Gy) diluída em PBSL na concentração de 1:50 (50 µl de soro + 450 µl de PBSL), mantendo sob agitação overnight a - 4° C. No dia seguinte, após mais três lavagens com PBS, foram acrescentados 500 µl de conjugado

anticamundongo (1:10000) (SIGMA®) por uma hora sob agitação. Finalmente revelou-se com solução de diaminobenzidina (DAB) (10 mg de 3,3-diaminobenzidina, 10 ml de PBS, e 15 µl de H₂O₂).

RESULTADOS

1. Teste de Viabilidade por Diluição Limitante:

A prova de diluição limitante foi realizada para verificar a radiosensibilidade das formas promastigotas da *Leishmania amazonensis*, com concentração inicial de 1×10^7 parasitas/ml, em diluições seriadas de 1:10, frente a doses de radiação variando entre 50 e 3200 Gy. Na FIGURA 2(a) apresenta-se o índice de crescimento das formas promastigotas irradiadas com diferentes doses de radiação, determinado por contagem manual dos parasitas sobreviventes na cultura, mostrando que a partir da dose de 400 Gy de radiação diminui a sobrevivência dos parasitas, sendo que nas doses de 1600 e 3200 Gy nenhum parasita sobreviveu. Nas menores doses foi observado um aumento do número de parasitas em relação ao grupo controle, mais significativo nas populações com menos *Leishmania*. Este gráfico foi determinado através da análise das curvas de crescimento exponencial (GraphPad Prisma®) dos parasitas mantidos em cultura em diferentes concentrações, durante 72 horas, frente à diferentes doses de radiação gama.

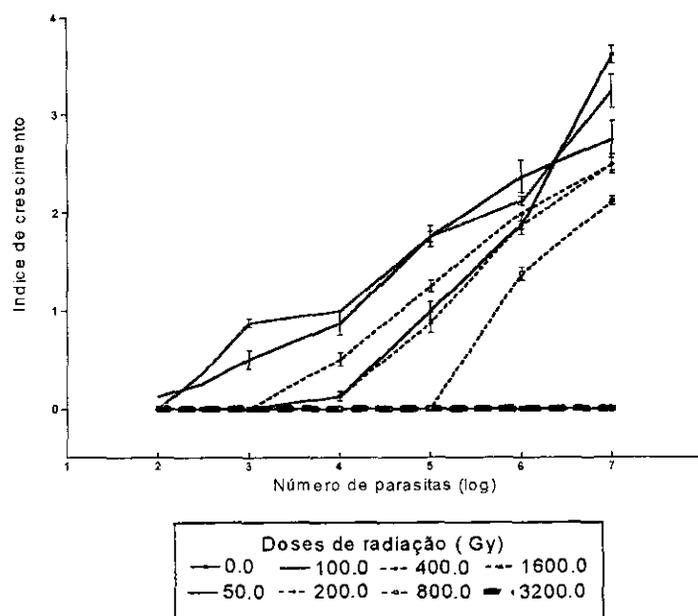


FIG.2(a): Índice de crescimento das formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* submetidas às doses de 50, 100, 200, sem atenuador, e 400, 800, 1600 e 3200 Gy de radiação gama de ^{60}Co , com atenuador de 90%.

Feita a curva de crescimento com as doses relacionadas anteriormente, observou-se que o intervalo de doses para a esterilização das formas promastigotas estava compreendido entre as doses de 800 e 1600 Gy, na qual nenhum parasita cresceu. Assim, repetiu-se o experimento utilizando um novo intervalo de doses.

Na FIGURA 2(b) pode ser visto o índice de crescimento das formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* submetidas às doses de 1000, 1100, 1200, 1300, 1400, 1500 e 1600 Gy de radiação gama, com atenuador de 90%, mostrando que a menor dose capaz de matar os parasitas em sua totalidade foi a dose de 1500 Gy, sendo que as doses intermediárias diminuíram o crescimento do parasita sem, no entanto, matar a todos. Assim como o gráfico anterior, este foi determinado pela análise das curvas de crescimento exponencial dos parasitas mantidos em cultura em diferentes concentrações, durante 72 horas, frente à diferentes doses de radiação gama.

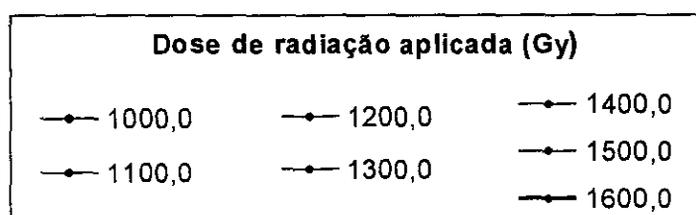
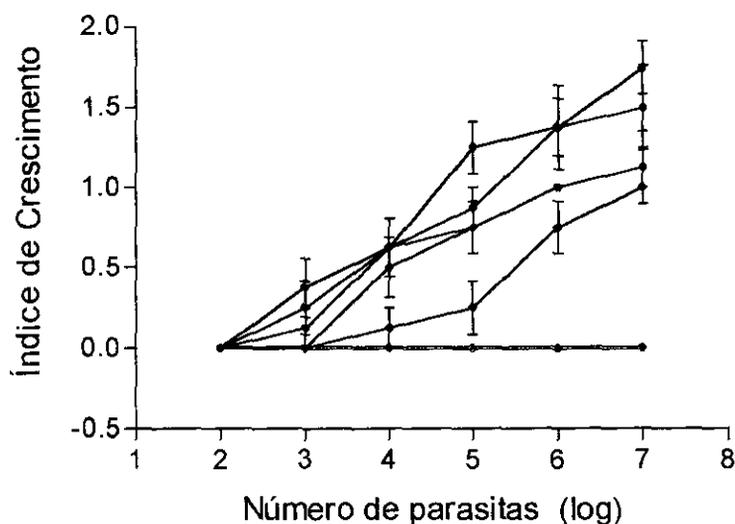


FIG.2(b):Índice de crescimento das formas promastigotas de *Leishmania amazonensis*, submetidas às doses de radiação gama variando entre 1000 a 1600 Gy, com atenuador de 90%.

Determinada a mínima dose efetiva de radiação para esterilização total dos parasitas, determinou-se então a curva da velocidade de crescimento dos parasitas sobreviventes em relação ao aumento da dose de radiação.

Na FIGURA 3 observa-se a curva da velocidade de crescimento das formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* sobreviventes na cultura, após a irradiação com doses variando de 50 à 3200 Gy de radiação gama. Este gráfico foi elaborado por meio do cálculo de uma curva de regressão não linear do tipo dose-resposta (GraphPad Prisma[®]), determinada a partir do índice de crescimento dos parasitas sobreviventes em relação ao aumento da dose de radiação mostrado nos gráficos anteriores (FIGURAS 2a e 2b). A curva de velocidade se mantém constante até a dose de 1000 Gy, com uma diminuição acentuada desta velocidade nas doses entre 1000 e 1500 Gy. Através deste cálculo foi possível determinar a dose de radiação gama eficaz para diminuir em 50% a velocidade de crescimento dos parasitas sobreviventes (EC50), e a variação desta velocidade nas diferentes concentrações de parasitas (R^2). O resultado foi uma dose de 1338 Gy para a diminuição de 50% da velocidade de crescimento dos parasitas, com um baixo índice de variação da velocidade entre as diferentes diluições de parasitas no meio de cultura.

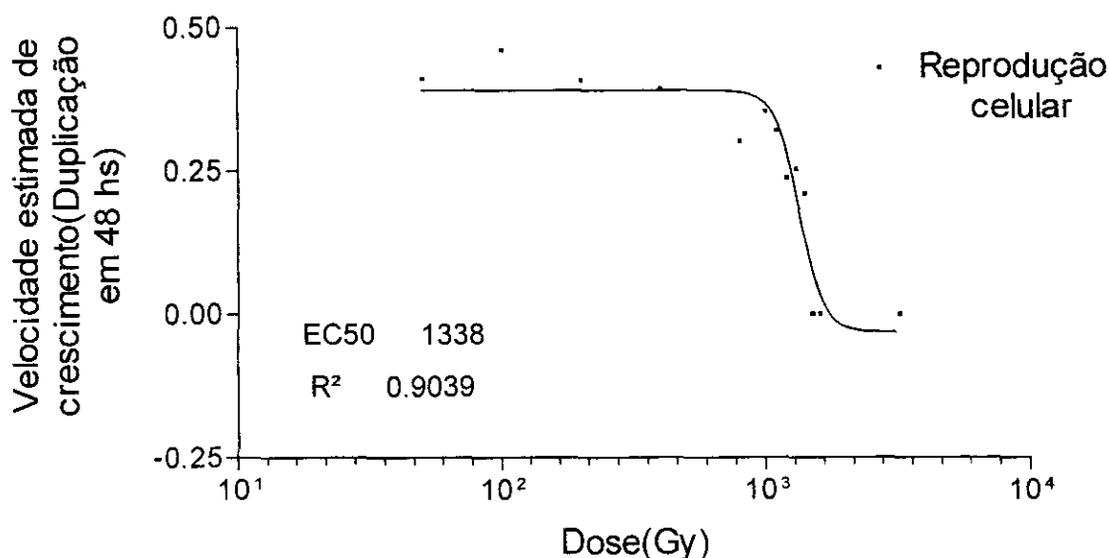


FIG.3: Curva de velocidade de crescimento das formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* sobreviventes, frente às doses de radiação gama variando de 50 a 3200 Gy, com análise da EC50 e do índice de variação da velocidade entre as diferentes concentrações de parasitas (R^2).

2. Viabilidade por contagem de radioativos: Com o intuito de se verificar a capacidade do protozoário irradiado em metabolizar proteínas e ácidos nucléicos, foram realizados testes utilizando prolina e hipoxantina marcadas.

2.1. Prolina: Os testes de viabilidade por contagem radioativa (^3H -Prolina), permitiram avaliar a capacidade de metabolismo protéico. Este teste confirmou, de uma outra maneira, a capacidade da radiação gama de esterilizar as *Leishmania amazonensis*. O resultado apresentado na FIGURA 4(a) mostra que, comparadas à *Leishmania* não irradiada, existe uma diminuição gradativa da capacidade de síntese protéica pelas *Leishmanias* irradiadas, até a dose de 400 Gy. Acima desta dose, não é observada qualquer modificação significativa do padrão de incorporação de ^3H Prolina, demonstrando a existência de uma síntese basal de proteínas até a dose de 1500 Gy.

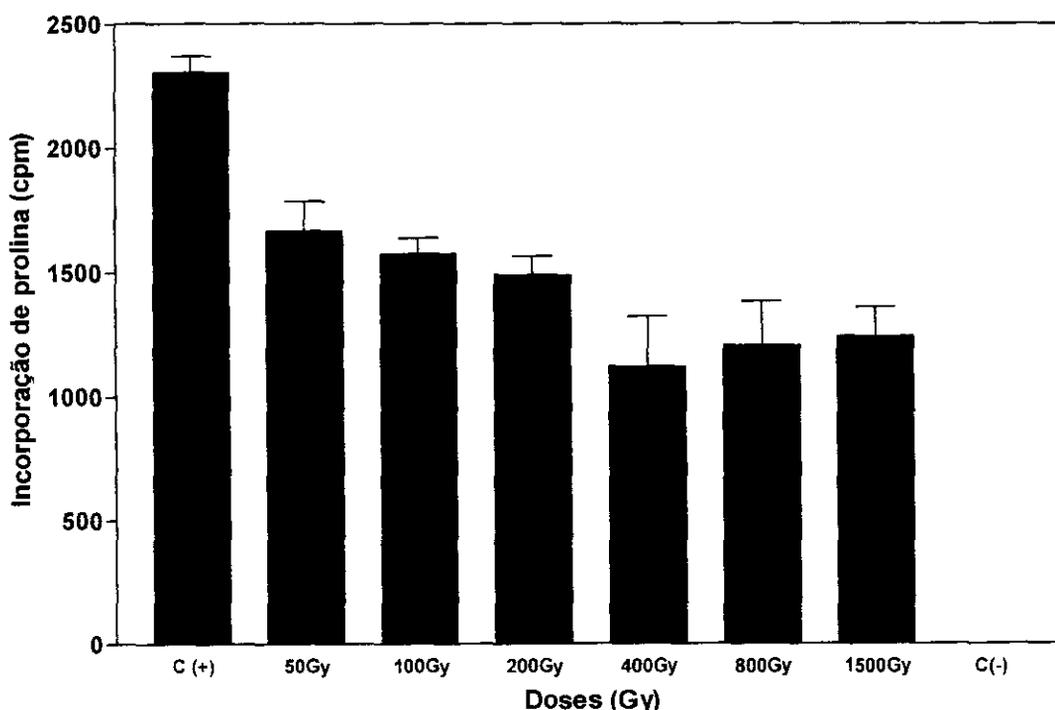


FIG.4(a): Testes de viabilidade por contagem de ^3H -Prolina, utilizando-se *L. amazonensis*, cultivadas a 24°C em meio RPMI 1640 (SIGMA®), submetidas às diferentes doses de radiação gama ^{60}Co . Controle(+): Parasitas não irradiados; Controle(-): meio de cultura sem *Leishmania*.

2.2.Hipoxantina: A capacidade de metabolizar material nucléico (DNA) do protozoário foi avaliada, utilizando-se ^3H -Hipoxantina. O resultado apresentado na FIGURA 4(b) mostra que ocorreu uma diminuição mais acentuada da síntese de material nucléico em relação ao aumento da dose, sendo que na dose de 1500 Gy houve uma redução de 90% da síntese de material nucléico:

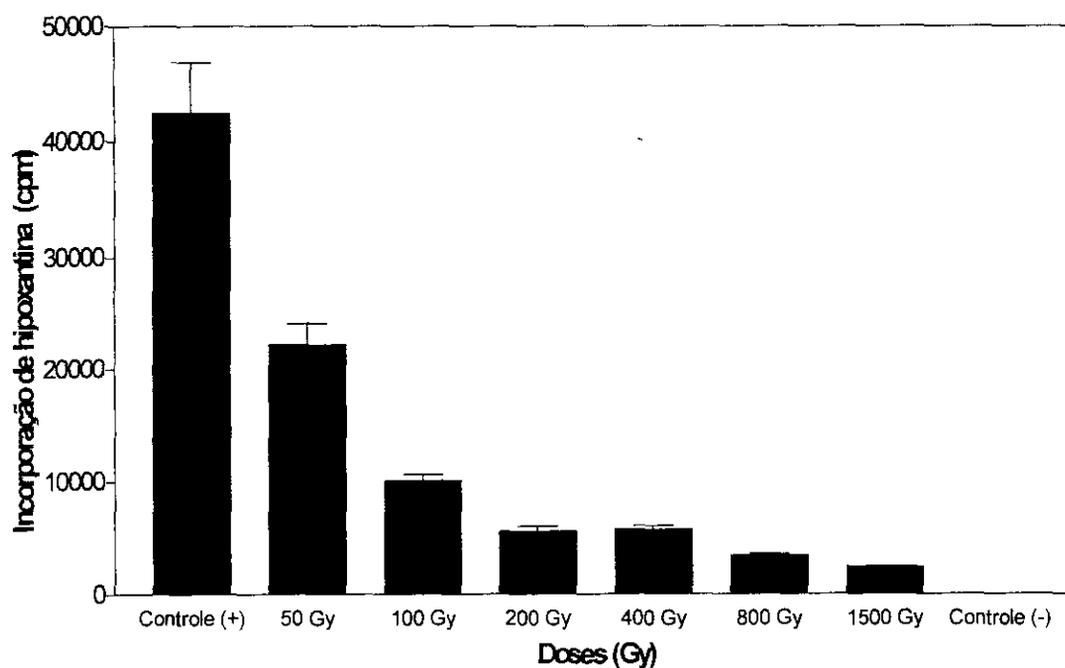


FIG.4(b): Avaliação da síntese de DNA de *L. amazonensis*, cultivadas a 24°C em meio RPMI 1640 (SIGMA®), utilizando ^3H -hipoxantina, frente às diferentes doses de radiação gama de ^{60}Co . Controle(+): parasitas não irradiados; Controle(-): meio de cultura sem *Leishmania*.

3. Estudos de cooperação celular - VIAP: A indução de proliferação celular de linfócitos *in vitro* foi realizada para comparar a viabilidade das células esplênicas de animais imunizados com *Leishmania amazonensis* irradiadas com dose de 1500 Gy, com o ocorrido em camundongos normais e infectados com parasitas viáveis. Esta capacidade de proliferação foi determinada pela incorporação de timidina marcada com trício (^3H), mostrando que as células retiradas do baço dos camundongos imunizados tiveram uma produção de linfócitos esplênicos maior que nos outros dois grupos, como mostrado na FIGURA 5a:

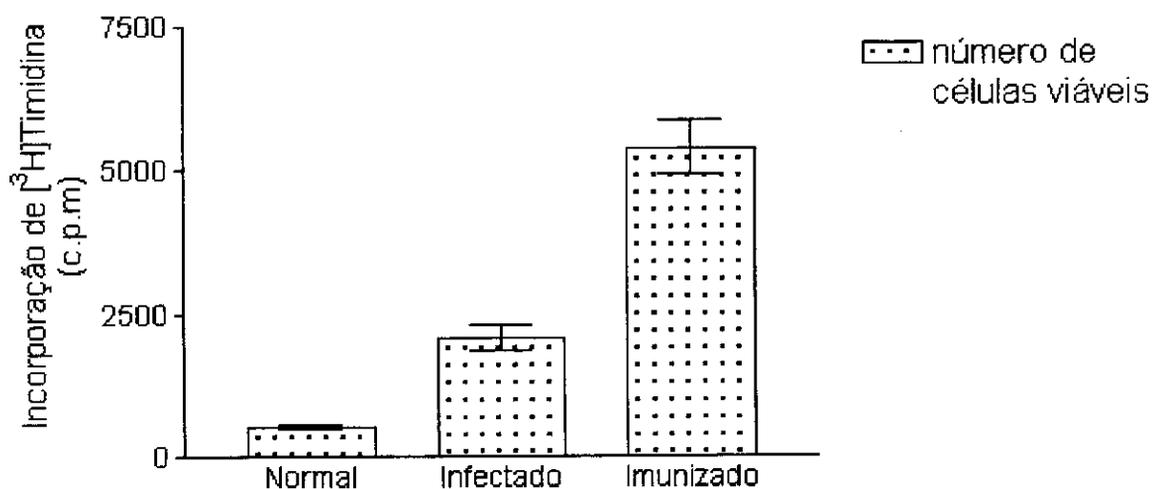


FIG.5(a): Incorporação de ^3H -timidina por linfócitos viáveis de baço de camundongos normais, infectados com parasitas viáveis ou imunizados com parasitas irradiados com dose de 1500 Gy.

A partir do teste de proliferação celular *in vitro*, foi possível determinar por ensaio de imunossorvância (ELISA) a capacidade destes linfócitos produzirem anticorpos. Os títulos encontrados são proporcionais ao crescimento das células presentes na cultura. Isto comprova a presença de linfócitos diferenciados, produtores de anticorpos anti-*Leishmania* (FIGURA 5b):

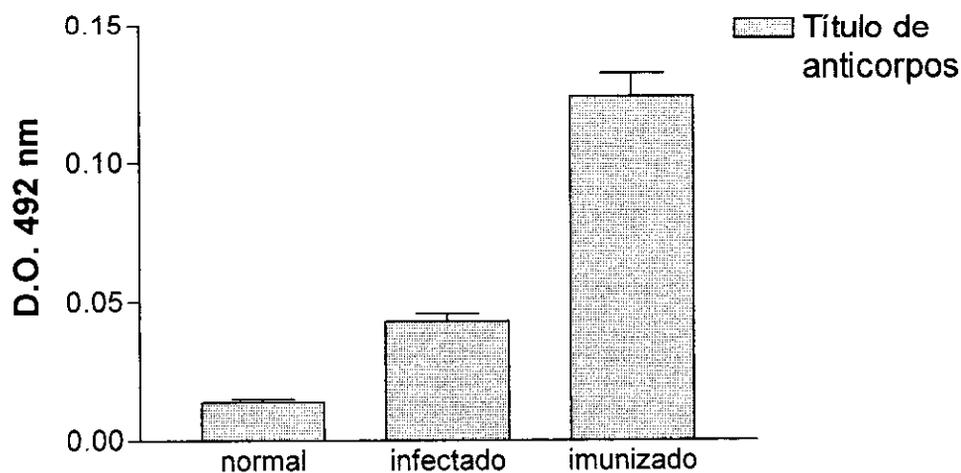


FIG5(b): Título de anticorpos produzidos por linfócitos esplênicos de camundongos Balb/c normais, infectados com *Leishmania amazonensis* nativas, ou imunizados com *Leishmania amazonensis* irradiadas com 1500 Gy de radiação gama de ^{60}Co . Os valores do gráfico estão expressos pela densidade óptica a 492 nm (D.O.₄₉₂) da reação colorimétrica de imunossorvância (ELISA).

4. Titulação de Anticorpos em soro de camundongos: Para os ensaios imunológicos *in vivo* foram utilizados camundongos de linhagem Balb/c, inoculados com parasitas irradiados com duas doses diferentes: 800 e 1500 Gy, posteriormente desafiados com formas promastigotas viáveis de *Leishmania amazonensis*.

Os ensaios imunológicos foram avaliados por ELISA e estão representados na FIGURA 6. A titulação de anticorpos (Ac) produzidos por camundongos imunizados com dose de 1500 Gy e desafiados 15 dias após o último inóculo foi maior que o título encontrado nos camundongos imunizados com parasitas irradiados com 800 Gy, desafiados no mesmo período:

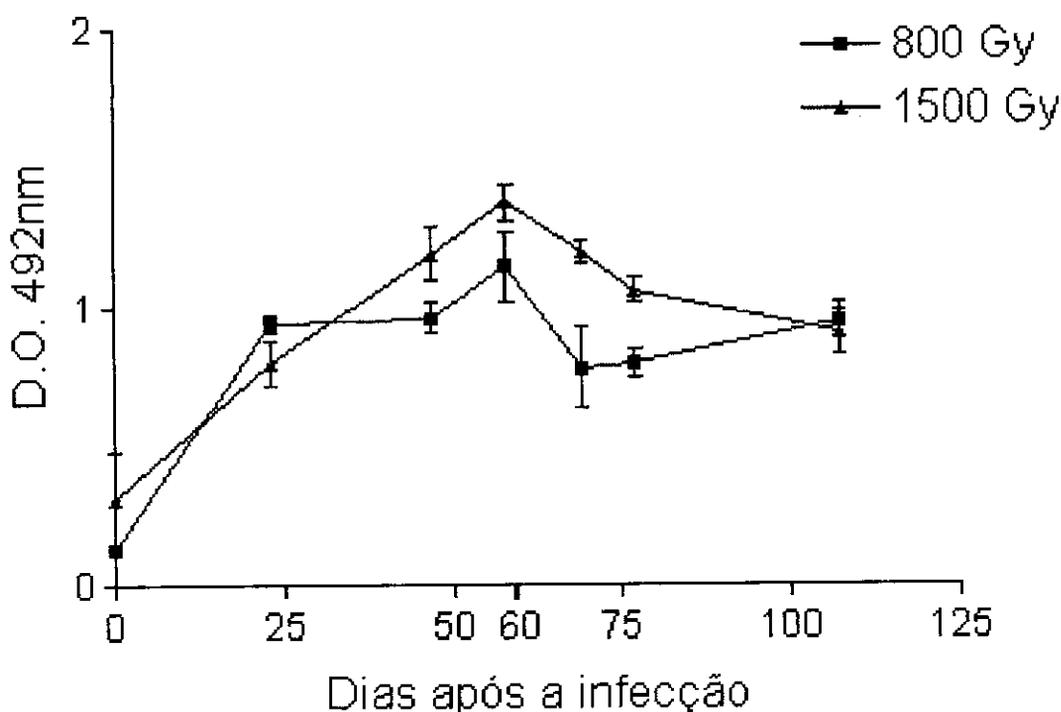


FIG.6: Título de anticorpos produzidos no soro de camundongos imunizados com promastigotas de *Leishmania amazonensis* irradiadas com doses de 800 e 1500 Gy de radiação gama, e desafiados com *Leishmania amazonensis* viáveis quinze dias após o último inóculo. Os valores do gráfico estão expressos pela densidade óptica a 492 nm (D.O.₄₉₂) da reação colorimétrica de imunossorvância (ELISA).

5. Lesões causadas pelos parasitas:

Camundongos inoculados com *Leishmania amazonensis* irradiada com dose de 800 Gy (não letal) apresentaram lesões no local do inóculo para imunização, antes mesmo do desafio com parasitas viáveis. Por outro lado, camundongos inoculados com parasitas irradiados com dose letal (1500 Gy) não sofreram o desenvolvimento da doença, mesmo após o desafio com protozoários patogênicos conforme FIGURA 7:

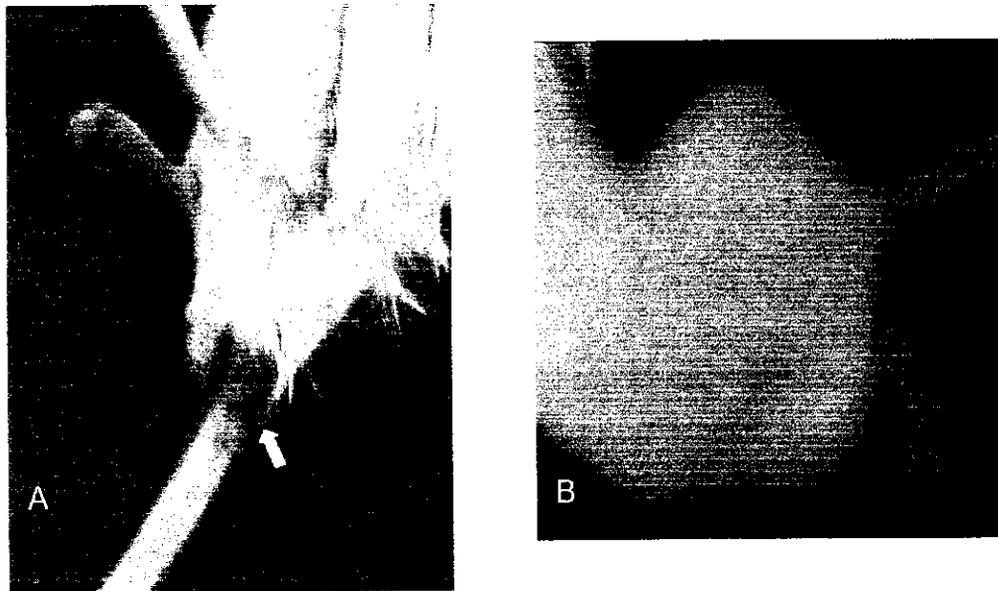


FIG.7: (A) Fotografia de lesão causada na base da cauda de camundongo Balb/c imunizado com parasitas irradiados com 800 Gy, (B) cauda de camundongo imunizado com parasitas irradiados com dose de 1500 Gy – sem lesão.

6. Microscopia Eletrônica:

A Microscopia Eletrônica foi realizada em *Leishmania amazonensis* normais e irradiadas com 1500 Gy, dose capaz de matar os parasitas na sua totalidade, (FIGURAS 8(a) e 8(b)). Nos parasitas normais (não irradiados) pode-se notar claramente a presença do flagelo, saco flagelar, cinetoplasto, mitocôndrias e núcleo. Já no outro grupo, a radiação causou uma total desorganização do núcleo e do material citoplasmático, com perda do flagelo e da conformação celular, preservando porém, a membrana plasmática e parte do arcabouço celular formado pelos microtúbulos, não expondo o material intracelular para o meio.

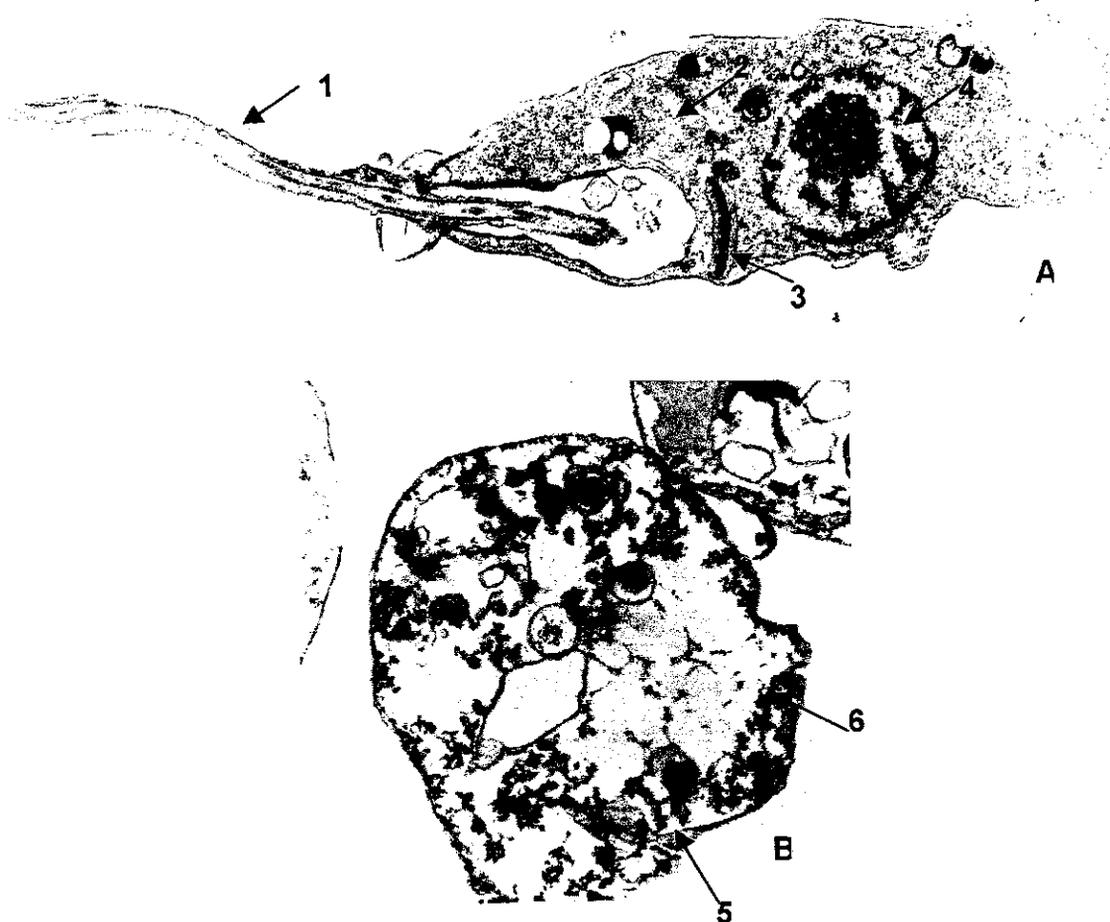


FIG.8: Fotos de Microscopia Eletrônica de *Leishmania amazonensis*. (A) *Leishmania amazonensis* normais: flagelo (1), cinetoplasto (2), mitocôndrias (3) e material genético (4); (B) *Leishmania amazonensis* irradiada com 1500 Gy: membrana plasmática (5) e citoesqueleto formado pelos microtubulos (6). Aumento de 12.000 x.

7. Reação em cadeia da polimerase - *Multiplex* (MULTIPLEX-PCR):

A reação de *Multiplex*-PCR foi realizada para confirmação da presença de *Leishmania amazonensis* na lesão causada em camundongos Balb/c imunizados com parasitas irradiados com dose de 800 Gy de radiação gama, utilizados nos ensaios de imunização, com a finalidade de comprovar a ausência de contaminação por outros agentes infecciosos. Iniciadores (*primers*) homólogos a genes alvo de repetição da região do mini-exon, um conservado para os três complexos do gênero (*Leishmania braziliensis*, *Leishmania mexicana* e *Leishmania donovani*) (LU-5A), e três específicos para cada complexo (LB-3C, LM-3A e LC-3L), foram escolhidos por não apresentarem cruzamento com outros protozoários. O mesmo padrão de bandas presente no padrão de *Leishmania amazonensis* (a), pode ser encontrado na amostra (d), diferente do que ocorre para os outros dois padrões: *Leishmania braziliensis* e *Leishmania chagasi* (b e c), conforme mostrado na FIGURA 9:

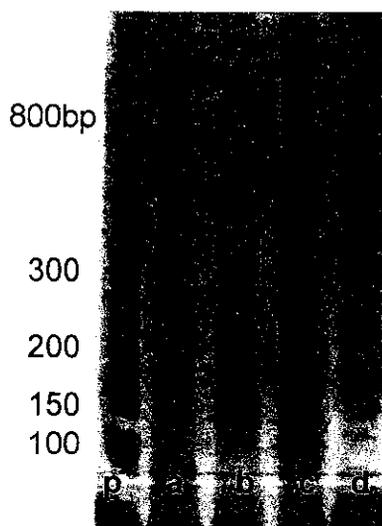


FIG.9: Eletroforese em gel de poli-acrilamida de uma reação de *Multiplex*-PCR, apresentando bandas para diferentes espécies de *Leishmania*. p= padrão de peso molecular, a = *Leishmania amazonensis*, b = *Leishmania braziliensis*, c = *Leishmania chagasi*, e d = amostra de raspado de pele camundongo imunizado com *Leishmania amazonensis* irradiadas com dose de 800 Gy de radiação gama.

8. Western Blot: Na FIGURA 10 estão representadas as proteínas de *Leishmania amazonensis* separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) 10% e transferidas para membrana de nitrocelulose. As fitas correspondem aos soros de camundongos normais, inoculados com *L. amazonensis* viáveis ou imunizados com *L. amazonensis* irradiadas com diferentes doses de radiação (800 ou 1500 Gy), sendo possível observar a presença de bandas de 63 e 70 kDa nas fitas incubadas nos soros dos camundongos inoculados com parasitas viáveis e imunizados com parasitas irradiados com 800 Gy e 1500 Gy, coletados após 15 dias do desafio.

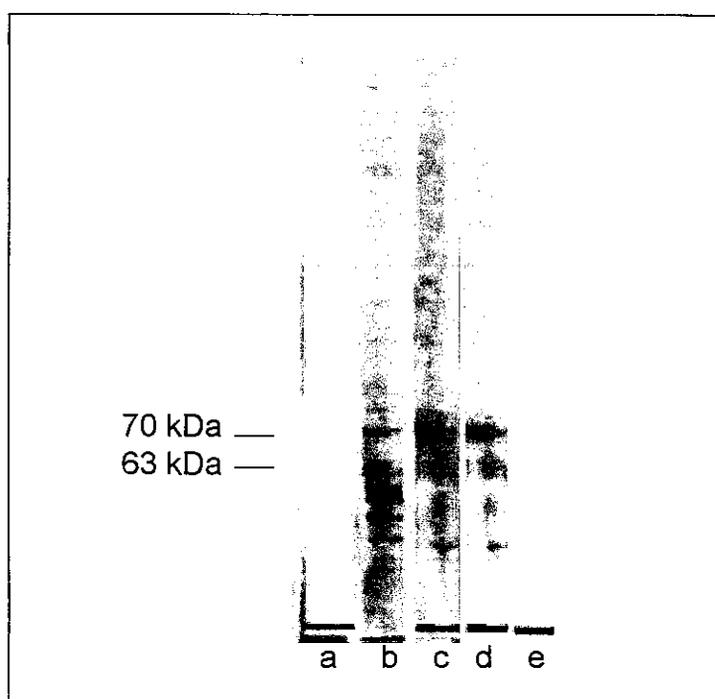


FIG.10: *Western blot* contendo proteínas de *Leishmania amazonensis*. As fitas representam respectivamente: (a) soro de camundongo normal, (b) camundongo infectado com *L. amazonensis*, (c) camundongo imunizado com parasitas irradiados com dose de 800 Gy (15 dias após desafio), (d) camundongo imunizado com parasitas irradiados com 1500 Gy (15 dias após desafio), (e) camundongos imunizados com parasitas irradiados com 1500 Gy (45 dias após desafio).

DISCUSSÃO

Os estudos da utilização de diferentes formas de imunização, em modelos experimentais, com parasitas mortos, atenuados ou preparos antigênicos com frações de *Leishmania spp*, vêm sendo realizados há algum tempo afim de que se encontre uma possível vacina contra a leishmaniose.

Um dos primeiros estudos de vacina contra leishmaniose cutânea envolveu a utilização de parasitas autoclavados. Esta metodologia foi testada em modelos experimentais e também em humanos (DE LUCA *et al.*, 1999). Os grupos de pesquisas que trabalham esta linha de estudos mostram ao final, resultados semelhantes e pouco alentadores. Este tipo de imunização, tanto em modelos experimentais, quanto em humanos, pode levar ao aparecimento de pequenas ulcerações autolimitadas oriundas de reação às frações antigênicas contidas na vacina (SATTI *et al.*, 2001).

O uso de um extrato de proteínas totais proveniente de diferentes espécies de *Leishmania*, aplicados em duas doses com intervalo semanal, em camundongos C57Bl/10, levou à proteção parcial dos animais, corroborando resultados obtidos com a única vacina contra leishmaniose cutânea existente no mercado, a Leishvacin® (BIOBRÁS S.A.) (MAYRINK *et al.*, 2002).

Outra forma encontrada para a produção de vacina foi a descrita por HANDMAN e colaboradores (1985) que usaram proteínas purificadas ou recombinantes inoculadas em camundongos. A mais utilizada entre elas é a glicoproteína de 63 kDa (gp63), encontrada em abundância na superfície da membrana plasmática da *Leishmania* e envolvida nos processos de reconhecimento e ligação do parasita à célula do hospedeiro. Utilizando esta mesma metodologia, PAPADOPOULOS e colaboradores (1998) utilizaram a gp63, agora com o uso de um adjuvante, os chamados complexos imunoestimulantes (ISCOMs) que aumentam a eficácia da vacina. Em ambos os casos não houve o desenvolvimento de uma resposta imune satisfatória, levando apenas a uma proteção parcial dos camundongos.

Vários outros adjuvantes foram testados com o intuito de aumentar o reconhecimento, como por exemplo, *Salmonella typhi* (GONZALES *et al.*, 1998)

e *Corynebacterium parvum* (SJOLANDER *et al.*, 1998). Contudo, segundo MORA e colaboradores (1999), para se conseguir uma proteção eficiente seria necessária a formação de um *cocktail* de proteínas purificadas de diferentes pesos moleculares e com diferentes características funcionais.

Cepas de protozoários menos virulentas vêm sendo utilizadas há mais de dez anos. Nestes casos, as formas promastigotas são modificadas geneticamente (BABIUK *et al.*, 2000) diminuindo a capacidade patogênica dos parasitas mantendo, porém, sua viabilidade (MITCHEL *et al.*, 1984). Em 1998, ALEXANDER e colaboradores realizaram uma experiência utilizando parasitas menos virulentos por modificação do gene responsável pela produção de cisteína (por ruptura do gene) em uma cepa de *L. (L.) amazonensis*. Foram imunizados camundongos Balb/c e C57BL/6, resultando no aparecimento de pequenas lesões autolimitadas, porém, com uma resposta imunológica exacerbada considerando-se o número de parasitas encontrados nas lesões.

Segundo GRADONI (2001) o processamento completo do antígeno é necessário para o estabelecimento de uma resposta imune eficiente, com ativação das células responsáveis pela produção de anticorpos específicos para os diversos epítomos presentes na membrana do parasita.

Assim, o problema encontrado ao longo destes estudos foi a baixa especificidade, devido à utilização de parasitas mortos, partes de citoplasma ou DNA de *Leishmania spp* (HANDMAN, 2001), o que facilita a fagocitose de forma rápida pelo sistema primário de defesa do organismo, não permitindo que as demais células do sistema imune sejam alcançadas (MARZOCHI *et al.*, 1998; KHAL *et al.*, 1989).

Para que no futuro seja possível se estabelecer um modelo de imunização, utilizando parasitas irradiados, neste trabalho foi feita a caracterização de protozoários da espécie *Leishmania amazonensis* quanto a sua fisiologia, morfologia e crescimento, além da avaliação do seu poder imunogênico em modelos experimentais.

Estes resultados complementam as informações relatadas anteriormente de que a radiação gama tem a capacidade de, dependendo das condições, destruir o DNA da *Leishmania* (BEVERLEY, 1989), sem no entanto destruir a membrana celular do parasita (SEO *et al.*, 1993) evitando assim a exposição do material citoplasmático para o meio externo. A utilização desta metodologia

já foi aplicada a outros protozoários como o *T. gondii* (HIRAMOTO *et al.*, 2002) e para *Schistosoma mansoni* (COULSON & WILSON, 1997), resultando em aumento da imunidade em modelos experimentais.

Com os resultados encontrados neste trabalho, foi possível avaliar preliminarmente a influência da radiação ionizante no crescimento das formas promastigotas da *L. amazonensis*, seguindo dados obtidos por RIVIER (1993). Estabeleceu-se para a esterilização das formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* a dose de 1500 Gy como dose mínima efetiva, bem acima dos valores obtidos para esterilização de células humanas ou de outros protozoários (HIRAMOTO, 2002). Doses intermediárias resultaram em uma diminuição proporcional da viabilidade, fato compatível com um efeito dose-resposta, já obtido em outros modelos (HIRAMOTO, 1998), tal que a velocidade de replicação destes parasitas caiu pela metade com a dose de 1338 Gy (EC50=1338). Considerando-se que a dose de 1500 Gy é suficiente para esterilizar a totalidade dos parasitas e que na dose de 1338 Gy metade dos protozoários apresentam-se mortos, verifica-se a possibilidade de que com o aumento da dose de radiação o efeito acontece em intervalos cada vez menores, pois a partir desta dose a queda da viabilidade diminui bruscamente até a dose mínima efetiva para esterilização.

Doses de 50 e 100 Gy de radiação parecem ter favorecido a velocidade de crescimento das colônias de parasitas. Este fato pode ser explicado com um fenômeno denominado hormese (STEBBING, 1982) que implica na otimização das condições normais de crescimento com pequenas doses de radiação ou outro agente físico ou químico.

A visualização em microscópio óptico invertido mostrou que nenhum parasita irradiado com dose de 1500 Gy havia sobrevivido sugerindo que esta dose seria então a dose mínima necessária para matar as formas promastigotas da *Leishmania amazonensis*. Para confirmar estes dados foram utilizados os testes de avaliação da capacidade de metabolismo de proteínas e de síntese de material nucléico, por incorporação de prolina e hipoxantina triciadas (^3H).

Este recurso foi escolhido, pois as formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* utilizam a prolina como forma de obtenção de carbono para seus metabolismos (MAZAREB *et al.*, 1999), enquanto a hipoxantina é necessária

no processo de síntese de alguns dos oligonucleotídeos do DNA deste parasita, que possui em seu ciclo de vida apenas a forma assexuada de reprodução.

Os dados mostram que a incorporação de é afetada significativamente pela ação da radiação, em um modelo tipo dose-resposta, entre 0 e 400 Gy, mas acima disso mantém-se em um nível basal, não sendo prejudicada por doses maiores. Esta incorporação basal de proteína é reduzida à metade nos parasitas irradiados com dose máxima de 1500 Gy, quando comparado ao grupo controle. Isto pode significar que a população de promastigotas estudada apresentava dois tipos celulares diferentes, um deles em rápido crescimento, altamente afetado pela radiação, como habitualmente descrito na literatura (SEO *et al.*, 1993) e uma outra população não envolvida em divisão celular, que mantém sua viabilidade, embora sem capacidade reprodutiva. Assim, a população celular de promastigotas, em crescimento constante, perde seus processos metabólicos de síntese de proteínas celulares em decorrência da morte celular induzida pela radiação, enquanto que a população que não está em divisão mantém sua síntese basal de proteínas como já foi demonstrado em outros protozoários (HIRAMOTO *et al.*, 2002). Nas populações de promastigotas em cultivo, mimetizando o que ocorre no intestino do inseto (BATES, 1994), pode estar ocorrendo uma metaciclogênese, preparando o organismo infectante para o próximo repasto sanguíneo do inseto e conseqüente transferência de hospedeiro; o que implica em modificações da superfície celular, preparando a promastigota para resistir aos sistemas de defesa do hospedeiro vertebrado. Isto é habitualmente conseguido pela inserção de maior número de resíduos de açúcares na superfície da promastigota, tornando-a mais resistente ao Complemento (DOMÍNGUEZ, 2002) e inibição de sua divisão celular, mais claramente evidenciada em outros cinetoplastídeos, como o *Trypanosoma cruzi* (ALLAOUI *et al.*, 1999), mas também já descrita em *Leishmania spp.* (LOUASSINI *et al.*, 1999). A radiação ionizante poderia então, ser utilizada como uma ferramenta para selecionar a forma metacíclica (infectante) do parasita, que possui uma conformação estrutural ideal para a produção de imunógenos com presença de epítomos que facilitam o seu reconhecimento pelo sistema imune do hospedeiro vertebrado, mas melhores estudos são necessários para confirmar esta hipótese.

A síntese de DNA foi severamente inibida nos parasitas irradiados, em um fenômeno tipo dose-resposta, chegando ao máximo de 90% de inibição da incorporação de hipoxantina na maior dose. Isto implica em um dano reprodutivo que explica a aparente ausência de infecção em níveis maiores de radiação (>800Gy). Interessante notar que a estrutura genômica das *Leishmanias* é muito complexa, com múltiplos pequenos cromossomos, que explicam a relativa radiorresistência do agente. Independentemente deste processo, a perda da incorporação de ácidos nucléicos é significativa em doses bem menores de radiação do que a perda da capacidade infectante. Este fato reforça a idéia de duas populações de promastigotas, uma em rápida divisão e responsável pelos altos níveis de incorporação de hipoxantina encontrados e outra, mais radiorresistente, que não estaria envolvida em divisão celular e, portanto não resultaria em níveis elevados de incorporação deste precursor, sempre relacionada à síntese de ácidos nucléicos, como já anteriormente discutido quando da avaliação da influencia da radiação sobre a síntese de proteínas. Os 10% de incorporação de hipoxantina que foram mantidos pode se dever ao fato que a hipoxantina é utilizada em outros processo bioquímicos celular como formação de RNA (mRNA e tRNA) (VOET & VOET, 1995), o que é compreensível visto que a síntese protéica em 1500 Gy permanece em um nível basal, porém estes dados serão estudados com maior profundidade em futuros experimentos.

Ainda sobre esta hipótese, o fato de um grupo de parasitas ser afetado com doses menores de radiação explica-se pela Lei de Bergonié & Tribondeau (HALL, 2000), determinando que células em processo de divisão ou células menos diferenciadas são mais rádiossensíveis em relação às outras. Portanto, as *Leishmanias* metacíclicas, que não se dividem, resistem à dose de 1500 Gy, enquanto o grupo em divisão (procíclicas), presente na mesma cultura, são afetadas por doses a partir de 800 Gy.

Em uma segunda etapa do trabalho foram realizados ensaios de avaliação morfológica do parasita, com o intuito de verificar possíveis alterações na membrana plasmática e citoesqueleto, além de determinar os níveis de desorganização nuclear e citoplasmática provocados pela alta dose de radiação ionizante (1500 Gy) necessários para completa morte do parasita.

Para tanto se recorreu à metodologia da microscopia eletrônica, por ser um método rápido e de fácil preparação. Por comparação feita com fotografias de microscopia eletrônica, entre um grupo de parasitas normais e outros irradiados, pôde-se confirmar que, após irradiação das formas promastigotas da *Leishmania amazonensis*, houve total destruição de materiais nucléico e citoplasmático. No entanto, a membrana plasmática e o citoesqueleto do parasita não sofreram alterações morfológicas, o que sugere que a célula continuaria sendo reconhecida como viável, pelas células apresentadoras de antígeno (APCs), como o macrófago. Este reconhecimento pode ainda ser, em alguns casos, otimizado pela radiação, que em doses elevadas, oxida as proteínas, elevando os índices de reconhecimento e acelerando a apresentação do antígeno aos linfócitos (CARDI *et al.*, 1998).

Assim pode-se sugerir que, uma vez que os macrófagos reconheceram a *Leishmania*, elas foram internalizadas e moléculas do MHC (Complexo Maior de Histocompatibilidade), junto a proteínas do parasita, foram apresentados aos linfócitos, que por sua vez produziram anticorpos anti-*Leishmania*. Esta suposição pode ser feita pois a *Leishmania amazonensis*, em particular, tem como forma de defesa inibir a apresentação das moléculas MHC aos linfócitos, diminuindo a capacidade de resposta (ANTOINE *et al.*, 1999). Portanto, poderia-se dizer que estes parasitas continuaram viáveis do ponto de vista imunológico (MUSATTI & DE-LIMA, 1989) sendo reconhecidos como organismo estranho (KIMA *et al.*, 2000), entretanto sem a capacidade de inibir a resposta imune do hospedeiro.

Sem conseguir metabolizar suas proteínas nem sintetizar material genético, o parasita morre por perdas de funções vitais, possivelmente, sem perder suas características morfológicas sugerindo que, apesar de morto, o parasita mantém suas propriedades imunogênicas, podendo ser reconhecido pelo sistema imune do hospedeiro tal qual um parasita vivo.

A produção de anticorpos em camundongos inoculados com parasitas irradiados com 1500 Gy, posteriormente desafiados com parasitas normais, foi mais eficiente quando comparada àquela apresentada pelos camundongos infectados com parasitas viáveis, e àqueles que receberam imunização com parasitas irradiados com dose de 800 Gy. Cabe ressaltar que camundongos inoculados com parasitas irradiados com a menor dose adoeceram antes

mesmo do desafio com parasitas viáveis, enquanto os imunizados com parasitas irradiados com a dose maior, não adoeceram em momento algum do ensaio. Isto porque a dose de 800 Gy não é suficiente para matar os protozoários na sua totalidade, desencadeando uma infecção cutânea, semelhante ao ocorrido no grupo controle.

A fim de confirmar a capacidade de reconhecimento de antígeno de parasitas viáveis, por anticorpos produzidos pelas células esplênicas dos camundongos imunizados com parasitas irradiados com duas doses diferentes de radiação ionizante (800 e 1500 Gy), foi realizado o ensaio de *Western blot*, utilizando extrato total de antígeno de *Leishmania amazonensis*, mostrando que parasitas irradiados com dose de 1500 Gy, foram capazes de induzir resposta imune nos camundongos durante pelo menos 45 dias após o desafio com parasitas viáveis, sendo que aos 120 dias, os títulos de anticorpos decresceram não sendo mais detectados pelo ensaio. Estes anticorpos demonstraram ser específicos para *Leishmania spp* nativas, pois quando ambos os soros foram colocados frente ao antígeno total de *Leishmania* não irradiada, reconheceram as mesmas frações protéicas. Este tipo de ensaio é amplamente utilizado para testar, por exemplo, a capacidade de imunização produzida por diferentes preparos antigênicos contra infecção por *Leishmania spp*, ou ainda para atestar a especificidade de alguns anticorpos contra formas promastigotas em detrimento ao reconhecimento das formas amastigotas (SILVEIRA *et al.*, 2001).

Para atestar a confiabilidade da imunização, demonstrando que não houve contaminação durante o ensaio, foi realizado um *Multiplex-PCR* do material genético retirado por raspagem da lesão provocada nos camundongos estudados, segundo metodologia proposta por HARRIS e colaboradores (1998). Com a análise da eletroforese de um gel contendo amostras de diferentes espécies de *Leishmania* e uma amostra do material retirado do camundongo, ficou comprovado pelo padrão de bandas apresentados, que as lesões foram provocadas por parasitas da espécie *Leishmania amazonensis* e não por outra espécie do parasita. Isto reforça ainda a idéia de que 800 Gy de radiação gama não são suficientes para esterilizar a totalidade dos protozoários.

Este tipo de ensaio já é utilizado em laboratórios de pesquisa como uma maneira confiável de se estabelecer qual parasita está sendo responsável por uma determinada infecção (REITHINGER *et al.*, 2000), podendo também ser utilizado para diferenciar espécies de parasitas do mesmo gênero, ou até mesmo de gêneros diferentes de uma mesma família, que poderiam ser detectados erroneamente por outros tipos de ensaios, numa reação cruzada inespecífica (HARRIS *et al.*, 1998), por exemplo com protozoários da espécie *Trypanosoma cruzi*, causadores da Doença de Chagas.

A radiação ionizante pode ser utilizada para modificar antígenos de forma a torná-los mais imunogênicos ou menos agressivos como no caso da *Leishmania amazonensis*. A apresentação de antígenos por parte das APCs é feita após a oxidação das proteínas do parasita para um melhor reconhecimento pelos linfócitos; a radiação ionizante tem a capacidade de oxidar estas proteínas, eliminando uma etapa da formação da resposta imune, o que facilita e acelera o processo de reconhecimento e apresentação, aumentando a eficácia do processo imunológico.

Os resultados obtidos neste estudo são muito promissores e abrem novas linhas para a busca da proteção contra a doença e ao mesmo tempo um melhor entendimento desta ferramenta importante que é a radiação ionizante do tipo gama produzida em fonte de ^{60}Co .

CONCLUSÃO

A dose de 1500 Gy de radiação ionizante é a ideal para inibir o crescimento e a patogenicidade das formas promastigotas de *L. amazonensis*.

Esta esterilização é eficiente ao ponto de impedir o desenvolvimento de lesão nos modelos experimentais imunizados.

Com a dose de 1500 Gy, os materiais citoplasmático e nucleares do parasitas são destruídos, entretanto sua membrana plasmática permanece íntegra.

Células esplênicas dos camundongos imunizados com parasitas que receberam 1500 Gy de radiação reconhecem melhor os parasitas não irradiados.

A *Leishmania amazonensis* irradiada preserva ou até otimiza suas características imunogênicas.

BIBLIOGRAFIA

1. ALLAOUI, A.; FRANCOIS, C.; ZENZOUIMI, K.; GUILVARD, E.; QUAISSI, A. Intracellular growth and metacyclogenesis defects in *Trypanosoma cruzi* carrying a targeted deletion of a c52 protein encoded allele. **Molecular Microbiology**, v. 32, n. 6, p. 1273-1286, 1999.
2. ALEXANDER, J.; COMMBS, G.H.; MOTTRAN, J.C. *Leishmania mexicana* cysteine proteinase- deficient mutants have attenuate virulence for mice and proteinase a Th1 response. **J. Immunol.**, v.161, n. 12, p. 6794-801, 1998.
3. ALVÁREZ-FORTES, E.; RUIZ-PÉREZ, L.M.; BOUILLAUD, F.; RIAL, E.; RIVAS, L. Expression and regulation of mitochondrial uncoupling protein 1 from brown adipose tissue in *Leishmania major* promastigotes. **Mol. Bioc. Parasitol.**, v. 93, n. 2, p.191-202, 1998.
4. ANTOINE, J.C.; LANG, T.; PRINA, E.; COURRET, N.; HELLIO, R. H-2M molecules, like MHC class II molecules, are targeted to parasitophorous vacuoles of *Leishmania* infected macrophages and internalized by amastigotes of *L. amazonensis* and *L. mexicana*. **J. Cell Sci.**, v. 112, n. 15, p. 2559-2570, 1999.
5. BABIUK, L.A.; BABIUK, S.L.; LOEHR, B.; LITTEL-VAN den HURK, S.D. Nucleic acid vaccines: research tool or commercial reality. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v. 76, p 1-23, 2000
6. BASSAM, B.J.; CAETANO-ANOLLÉS, G.; GRESSHOFF, P.M. Fast and sensitive silver stain of DNA in polyacrilamide gel. **Analytical Biochemistry**, v. 196, p. 80-83, 1991
7. BATES P.A., Complete developmental cycle of *Leishmania mexicana* in axenic culture. **Parasitology**, n. 108, p. 1-9, 1994.
8. BELLEI, N.; GRANATO, C.; TOMYIAMA, H. Use of the in vitro induced antibody production test (IVIAP) to elucidate inconclusive status of HIV-1 infection. **Diagn Microbiol Infect Dis**, v. 25, n. 2, p. 65-9, 1996.
9. BEVERLEY, S.M. Estimation of circular DNA size using gamma-Irradiation and pulsed-field gel electrophoresis. **Anal Biochem.**, v. 177, n. 1, p. 110-4, 1989.
10. BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem.**, v.72, p. 248, 1976.

11. BRETSCHER, P.A.; OGUNREMI, O.; MENON, J.N. Distinct immunological states in murine cutaneous leishmaniasis by immunising with different amounts of antigen: the generation of beneficial, potentially harmful, harmful and potentially extremely harmful states. **Behring Inst. Mitt.**, n.98, p. 153-9, 1997.
12. CANDOLFI, E.; HUNTER, C.A.; REMINGTON, J.S. Mitogen and antigen specific proliferation of T cells in murine Toxoplasmosis is inhibited by reactive nitrogen intermediates. **Infection and Immunity**, v. 62, p. 1995-2001, 1994.
13. CARDI, B.A.; NASCIMENTO, N.; ANDRADE Jr, H.F. Irradiation of *Crotalus durissus terrificus* crotoxin with ⁶⁰Co gamma-rays induces its uptake by macrophages through scavenger receptors. **Int. J. Radiat. Biol.**, v. 73, n. 5, p. 557-64, 1998.
13. CHAPMAN, J.D. Radiation chemical studies with nitrofurazone as related to its mechanism of radiosensitization. **Radiat. Res.**, v. 53, n. 2, p. 190-203, 1973.
14. COULSON, P.; WILSON, R.A. Recruitment of Lymphocytes to the lung through vaccination enhances the immunity of mice exposed to irradiated *Schistosomes*. **Infection and Immunity**, v. 65, n. 1, p. 42-8, 1997.
15. DE LUCA, P.M.; MAYRINK, W.; ALVES, C.R.; COUTINHO, S.G.; OLIVEIRA, M.P.; BERTHO, A.L.; TOLEDO, V.P.; COSTA, C.A.; GENARO, O.; MENDONÇA, S.C. Evaluation of the stability and immunogenicity of autoclaved and non autoclaved preparations of a vaccine against American cutaneous leishmaniasis. **Vaccine**, v. 17, n. 9-10, p. 1179-85, 1999.
16. DOMINGUEZ, M.; MORENO, I.; LÓPEZ-TRACAZA, M.; TORAÑO, A. Complement interaction with trypanosomatid promastigotes in human serum. **J. Exp. Med**, v. 195, n. 4, p. 451-9, 2002.
17. FURTADO, T. Advances and perspectives in American cutaneous leishmaniasis. **Med Cutan Ibero Lat Am**, v. 15, n. 2, p. 105-16, 1987.
18. GARLAPATI, S.; DAHAN, E.; SHAPIRA, M. Effect of acid pH on heat shock gene expression in *Leishmania*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 100, p. 95-101, 1999.
19. GONZALES, C.R.; NORIEGA, F.R.; HUERTA, S.; SANTIAGO, A.; VEJA, M.; PANIAGUA, J.; ORTIZ- NAVARRETE, V.; ISIBASI, A.; LEVINE, M.M. Immunogenicity of a *Sallmonella typhi* CVD 908 candidate vaccine strain expressing the major surface protein gp63 of *L. mexicana mexicana*. **Vaccine**, v. 16, n. 9-10, p. 1043-52, 1998.

20. GRADONI, L. An update on leishmanial vaccine candidates and prospects for a canine *Leishmania* vaccine. **Veterinary Parasitology**, v. 100, p. 87-103, 2001.
21. GREENSTOCK, C.L. Redox processes in radiation biology and cancer. **Radiation Research**, v. 86, n. 2, p. 196-211, 1981.
22. HALL, E.J. **Radiobiology for the radiologist**, Lippincott Williams & Wilkins, 2000.
23. HANDMAN, E.; GODING, J.W. The *Leishmania* receptor for macrophages is a lipid containing glycoconjugate. **EMBO J**, v. 4, p. 329-336, 1985.
24. HANDMAN, E. Leishmaniasis: Current status of vaccine development. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 14, n. 2, p. 229-243, 2001.
25. HARRIS, E.; KROPP, G.; BELLI, A.; RODRIGUEZ, B.; AGABIAN, N. Single-step Multiplex-PCR assay for characterization of new world *Leishmania* complexes. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 36, p. 1989-1995, 1998.
26. HIRAMOTO, R.M. **Efeitos da radiação ionizante sobre a estrutura, o metabolismo e infecciosidade de um protozoário patogênico, *Toxoplasma gondii***, 1998. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo, p. 1-10.
27. HIRAMOTO, R.M.; GALISTEO JR, A.J.; NASCIMENTO, N.; ANDRADE JR, H.F. 200 Gy sterilised *Toxoplasma gondii* tachyzoites maintain metabolic functions and mammalian cell invasion, eliciting cellular immunity and cytokine response similar to natural infection in mice, **VACCINE**, v. 20, p. 2072-2081, 2002.
28. HRAZDIRA, I.; SKALKA, M. Changes produced by ultrasound in the deoxyribonucleoprotein complex in vitro. **Folia Biol. (Praha)**, v. 16, n. 2, p. 121-8, 1970.
29. KAHL, L.P.; SCOTT, C.A.; LELCHUK, R.; GREGORIADIS, G.; LIEW, F.Y. Vaccination against murine cutaneous leishmaniasis by using *L. major* antigen/liposome. Optimization and assessment of the requirement for intravenous immunization. **J Immunol**, v. 142, n. 12, p. 4441-4449, 1989.
30. KEMPNER, E.S. Molecular size determination of enzymes by radiation inactivation. **Adv. Enzymol Relat. Areas Mol. Biol.**, v. 61, p. 107-47, 1988.

31. KIMA, P.E.; CONSTANT, S.L.; HANNUM, L.; COLMENARES, M.; LEE, K.S.; HABERMAN, A.M.; SHLOMCHIK, M.J.; McMAHON-PRATT, D. Internalization of *Leishmania mexicana* Complex Amastigotes via the Fc receptor is required to sustain the infection in murine cutaneous leishmaniasis. **Journal of Exp. Med.**, v. 191, p. 1063-7, 2000.
32. LAINSON, R.; RYAN, L.; SHAW, J.J. Infective stages of *Leishmania* in the sandfly vector and some observations on the mechanism of transmission. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 82, n. 3, p. 421-4, 1987.
33. LAUNOIS, P.; TACCHINI-COTIER, F.; PARRA-LOPEZ, C.; LOUIS, J.A. Cytokines in parasitic diseases: the example of cutaneous leishmaniasis. **Int. Ver. Immunol.**, v. 17, n. 1-4, p. 157-80, 1998.
34. LOUASSINI, M.; FOULQUIE, M. R.; BENITEZ, R.; ADROHER, F.J. Activity of key enzymes in glucose catabolism during the growth and metacyclogenesis of *Leishmania infantum*. **Parasitol Res**, v. 85, v. 4, p. 300-6, 1999.
35. MARZOCHI, K.B.; MARZOCHI, M.A.; SILVA, A.F.; GRATIVOL, N.; DUARTE, R.; CONFORT, E.M.; MOLDEBBER, F. Phase 1 study of an inactivated vaccine against american tegumentary leishmaniasis in normal volunteers in Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 93, n. 2, p. 205-12, 1998.
36. MAYRINK, W.; WILLIAMS, P.; COELHO, M.V.; DIAS, M.; MARTINS, A.V.; MAGALHÃES, P.A.; DA COSTA, C.A.; FALCAO, A.R.; MELO, M.N.; FALCÃO, A.L. Epidemiology of dermal leishmaniasis in the Rio Doce Valley, State of Minas Gerais, Brazil. **Ann. Trop. Med. Parasitol.**, v. 73, n. 2, p. 123-37, 1979.
37. MAYRINK, W.; SANTOS, G.C.; TOLEDO, V.P.C.P.; GUIMARÃES, T.M.P.D.; MACHADO-COELHO, G.L.L.; GENARO, O.; COSTA, C.A. Vaccination of C57BL/10 mice against cutaneous leishmaniasis using killed promastigotes of different strains and species of *Leishmania*. **Rev. Soc. Brasil. Medic. Tropical**, v. 35, n. 2, p. 125-32, 2002.
38. MAZAREB, S.; FU, Z.Y.; ZILBERSTEIN, D. Developmental Regulation of Proline Transport in *Leishmania donovani*. **Experimental Parasitology**, v. 91, p. 341-348, 1999.
39. MINEO, J.R. **Detecção de antígenos e de anticorpos, com técnicas imunoenzimáticas, para o diagnóstico sorológico de toxoplasmose aguda.** São Paulo, 1982. Tese (Doutorado) - Instituto de Ciências Biomédicas – USP, São Paulo, p. 23.
40. MITCHEL, G.F.; HANDMAN, E.; SPITHILL, W. Vaccination against cutaneous leishmaniasis in mice using nonpathogenic cloned promastigotes of *L. major* and the importance of route of injection. **Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.**, v. 62, n. 2, p. 145-53, 1984.

41. MORA, A.M.; MAYRINK, W.; DA COSTA, R.T.; DA COSTA, C.A.; GENARO, O.; NASCIMENTO, E. Protection of c57/bl mice by vaccination with association purified proteins from *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo**, v. 41, n. 4, p. 243-8, 1999.
42. MUSATTI, C.C.; DE-LIMA, M.G. Funções biológicas das moléculas do complexo HLA. **Rev. Bras. Alerg. Imunol.**, v. 12, n. 6, p. 178-184, 1989.
43. NASCIMENTO, N.; SEEBART, C.S.; FRANCIS, B.; ROGERO, J.R.; KAISER, I.I. Influence of ionizing radiation on crotoxin: biochemical and immunological aspects. **Toxicon**, v. 34, n. 1, p. 123-131, 1996.
44. PAPADOPOULOS, G.; KARAGOUNI, E.; DOUTSIKA, E. ISCOMs vaccine against experimental leishmaniasis. **Vaccine**, v.1, 1998.
45. PASSOS, V.M.A.; FERNANDES, O.; LACERDA, P.A.F.; VOLPINI, A.C. *Leishmania (V.) brasiliensis* is the predominant species infecting patients with Am. tegumentar leishmaniasis in the state of MG, Brazil. **Acta Tropica**, v. 72, p. 251-258, 1999.
46. PIRMEZ, C. Immunopathology of American cutaneous leishmaniasis. **Mem Inst. Oswaldo Cruz**, v. 87, n. 5, p. 105-9, 1992.
47. RANGEL, E.F.; SOUZA, N.A.; WERMELINGER, E.D. BARBOSA, A.F.; ANDRADE, C.A. Biologia da *Lutzomia intermedia* (Lutz & Neiva, 1912) e *Lutzomia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912), em condições experimentais. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 81, n. 4, p. 431-8, 1986.
48. REITHINGER, R.; LAMBSON, B.E.; BARKER, D.C.; DAVIES, C.R. Use of PCR to detect *Leishmania (Vianna) spp* in dog blood and bone marrow. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 2, p. 748-751, 2000.
49. REQUENA, J.M.; ALONSO, C.; SOTO, M. Evolutionary conserved proteins as prominent immunogens during *Leishmania* infections. **Parasitology Today**, v. 16, n. 6, p. 246-50, 2000.
50. RITTIG, M.G.; BOGDAN, C. *Leishmania* host cell interaction: complexities and alternative views. **Parasitology Today**, v. 16, n. 7, n. 292-7, 2000.
51. RIVIER, D.; SHAH, R.; BOVAY, P.; MAUEL, J. Vaccine development against cutaneous leishmaniasis. Subcutaneous administration of radioattenuated parasites protects CBA mice against virulent *L. major* challenge. **Parasite Immunol.**, v. 15, n. 2, p. 75-84, 1993.
52. SATTI, I.N.; OSMAN H.Y.; DAIFALLA, N.S.; YUNIS, A.S.; KHALIL, E.A.G.; ZIJLSTRA, E.E.; EL HASSAN, A.M.; GHALIB, H.W. Immunogenicity and safety of autoclaved *Leishmania major* plus BCG vaccine in health sudanese volunteers. **Vaccine**, v. 19, p. 2100-6, 2001.

53. SEO, M.; SHUN, D.K.; HONG, S.T.; LEE, S.H. Influence of heat shock, drugs, and radiation on karyotype of *Leishmania major*. **Korean J Parasitol.**, v. 31, n. 3, p. 277-83, 1993.
54. SILVEIRA, T.G.V.; SUZUKI, E.; TAKAHASHI, H.; STRAUS, A.H. Inhibition of macrophage invasion by monoclonal antibodies specific to *Leishmania (Vianna) brasiliensis* promastigotes and characterization of their antigens. **International Journal for Parasitology**, v.31, p. 1451-58, 2001.
55. SJOLANDER, A.; BALDWIN, T.M.; CURTIS, J.M.; BENGTSSON, K.L.; HANDMAN, E. Vaccination with recombinant parasite surface antigen 2 from *L.major* induces a Th1 type of immune response but does not protect against infection. **Vaccine**, v. 16, n. 20, p. 2077-84, 1998.
56. SONG, C.C.; YUAN, X.Z.; SHEN, L.Y.; GAN, X.X.; DING, J.Z. The effect of cobalt-60 irradiation on the infectivity of *Toxoplasma gondii*. **Int. J. Parasitol.**, v. 23, n. 1, p. 89-93, 1993.
57. STEBBING, A.R. Hormesis: the stimulation of growth by low levels of inhibitors. **Sci Total Environ.**, v. 22, n. 3, p. 213-34, Review, 1982.
58. STRICKLAND GT. Infectious of the blood and reticuloendothelial system. *Hunter's Tropical Medicine and emerging infectious disease*:665-687, 2000.
59. TEIXEIRA, S.M. Control of gene expression in *Trypanosomatidae*. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 31, n. 12, p. 1503-16, 1998.
60. TRISCHMANN, T.M. Suceptibility of radiation chimeras to *Trypanosoma cruzi*. **Infect Immunol**, v. 36, n. 2, p. 844-6, 1982.
61. VAN HELLEMOND, J.J.; VAN DER MEER, P.; TIELENS, A.G.M. *Leishmania infantum* promastigotes have a poor capacity for function anaerobic functioning and depend mainly on respiration for their energy generation. **Parasitology**, v. 114, n. 7, p. 351-360, 1997.
62. VICKERMAN, K. In: **Ciba Symp.**, 20 (new series), p. 171-89, 1974.
63. VOET, D.; VOET, J.G. *Biochemistry*, 2ª edição, p. 795-826, 1995.
64. WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Program for the surveillance and control of Leishmaniasis**, p. 1-3, 1998.
65. www.wehi.edu.au/research/infimm/leishman.html, acessado em 19/07/2002.