

## ASPECTOS MORFOLÓGICOS DA *Leishmania amazonensis* SUBMETIDA À AÇÃO DA RADIAÇÃO IONIZANTE

Bonetti, F. C.<sup>1</sup>., Hiramoto, R. M.<sup>1</sup>., Paiva, B.<sup>2</sup>., Andrade Jr, H. F.<sup>2</sup>, Nascimento, N.<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Laboratório de Biologia Molecular do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – IPEN/CNEN/SP

<sup>2</sup>Instituto de Medicina Tropical da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo – IMTSP-FMUSP

### RESUMO

*Leishmania amazonensis* é um protozoário transmitido pela picada de insetos e causa lesões de pele em humanos e outros hospedeiros mamíferos, sendo considerado uma das mais importantes doenças endêmicas de Saúde Pública. A radiação ionizante tem sido usada como uma excelente ferramenta para matar estes parasitas, bloqueando o seu crescimento pela quebra do ácido nucléico (DNA) e interrompendo o seu metabolismo respiratório. Neste estudo foram analisados os efeitos da radiação ionizante sobre a morfologia da *Leishmania amazonensis* e a capacidade de infecção em modelo experimental. Os parasitas radioesterilizados tiveram sua superfície de membrana preservada, enquanto outras proteínas importantes foram destruídas. Estes resultados sugerem um novo modelo antigênico que poderia ser usado como um possível protocolo de vacina.

Keywords: leishmaniasis, ionizing radiation, vaccine

### I. INTRODUÇÃO

A *Leishmania spp* é um protozoário patogênico da ordem *Kinetoplastida* e família *Trypanosomatidae*, que causa diferentes doenças no homem, tendo algumas espécies de vertebrados como reservatórios (LAINSON *et al.*, 1987). Atualmente a Organização Mundial da Saúde estima que 12 milhões de pessoas estão afetadas pelas várias formas da leishmaniose, com cerca de 400 mil casos novos por ano, sendo incluídas como uma das principais endemias mundiais.

Transmitidos vetorialmente por insetos do gênero *Phlebotomus* no Velho Mundo, e *Lutzomyia* no Novo Mundo (STRICKLAND, 2000), estes protozoários são dimórficos, ocorrendo na forma promastigota no intestino do inseto e na forma amastigota em células dos hospedeiros, onde se comporta como um parasita intracelular obrigatório (PIRMEZET, 1992).

As doenças humanas na América causadas por este grupo de protozoários são divididas em dois grupos: as cutâneas e as viscerais (kala-azar), com comprometimento dos órgãos ricos em células macrofágicas, como o fígado e o baço (TEIXEIRA, 1998).

Diversos trabalhos vêm sendo realizados com o intuito da descoberta de novos tratamentos, e ainda para produção de vacinas eficazes, o que seria um grande passo para a medicina preventiva.

As vacinas produzidas com antígenos de parasitas mortos ou com proteínas específicas mostraram-se pouco eficazes e algumas, com baixa especificidade (MARZOCHI *et al.*, 1998; KHAL *et al.*, 1989) quando comparadas a outros

métodos, como por exemplo, o uso de parasitas irradiados, com radiação ionizante (ALEXANDER J, 1982).

A radiação ionizante possui ação direta e indireta sobre as moléculas celulares, sendo o efeito indireto, através da radiólise das moléculas de água, mais sensível nas soluções diluídas na presença de oxigênio, assim como um efeito protetor de outras substâncias orgânicas presentes na solução. Este fato mostra que o efeito final da irradiação das proteínas diferirá de acordo com as condições de irradiação (NASCIMENTO *et al.*, 1996).

Trabalhos realizados com parasitas irradiados parecem ser mais eficientes uma vez que os protozoários perdem sua capacidade patogênica mantendo todos seus aspectos morfológicos iguais, conseguindo produzir resposta específica, demonstrando êxito da utilização deste tipo de antígeno num estudo vacinal com doses de 1500 Gy de radiação ionizante (RIVIER *et al.*, 1993).

Este trabalho teve como objetivo, estudar os efeitos da radiação ionizante sobre as características morfológicas da *Leishmania amazonensis*, visando o conhecimento para o desenvolvimento futuro de reagentes para tratamentos, ou mesmo de uma vacina para este importante problema de Saúde Pública. (MAYRINK *et al.*, 1979).

## II. MATERIAL E MÉTODOS

Todos os sais e demais reagentes usados foram de qualidade pró-análise, sendo a água utilizada purificada em sistema Milli Q (Millipore), apresentando resistividade de 18.2  $\Omega$ . Reagentes específicos têm sua fonte citada ao longo do texto.

**Cultivo dos Parasitas:** Foram utilizadas *Leishmania amazonensis*, forma promastigota, cedidas pela Dra. Silvia Celina Alfieri, do Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biomédicas da USP, isolada de pata de camundongo infectado e posteriormente mantida em meio de cultura RPMI 1640 sem vermelho de fenol (Sigma<sup>®</sup>) com 20% de soro fetal bovino, adicionado de 20  $\mu\text{g/ml}$  de Estreptomicina e 50  $\mu\text{g/ml}$  de Gentamicina., Em estufa tipo B.O.D. a temperatura de 24°C.

**Animais:** Foram utilizados camundongos isogênicos da linhagem Balb/c, machos, com aproximadamente 20g, mantidos com água e alimento *ad libitum*. Esta linhagem foi escolhida por ser suscetível à infecção por parasitas do gênero *Leishmania*.

**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 <sup>60</sup>Co (GAMMACELL, Atomic Energy of Canada, Ltd.), de forma homogênea, em presença de oxigênio, a uma taxa de dose de 6,36 KGy/h. As doses utilizadas foram: 50, 100 e 200Gy sem atenuador; e 400, 800, 1500, 1600 e 3200Gy com atenuador de 90%.

**Microscopia Eletrônica:** A metodologia de Microscopia eletrônica seguiu o protocolo de DUARTE *et al.*, 1992. Amostras de formas promastigota de *Leishmania amazonensis* normais e irradiadas com dose de 1500 Gy, foram centrifugadas por 10 minutos a 1000 g, o sobrenadante, retirado, e o *pellet* resultante foi fixado em uma solução com 3% de glutaraldeído com formolaldeído 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. As amostras foram então fixadas em Tetróxido de Ósmio 2% por trinta minutos. Após nova lavagem por três vezes, o material foi mantido em 5% de acetato de urânio com 100% de etanol (solução final: 2,5% de urânio, 50% de etanol) por cinco minutos, seguido de nova lavagem por três vezes 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*<sup>®</sup> com Araldite 502<sup>®</sup> (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. Corte semifinos e ultrafinos foram feitos e fixados em acetato de urânio 70% em metanol.

A avaliação da morfologia das promastigotas após o tratamento com raios gama de <sup>60</sup>Co foi realizada em microscópio eletrônico (JEOL) localizado na Faculdade de

Medicina da USP. Os tubos contendo *Leishmania amazonensis* irradiadas e outros contendo *Leishmania amazonensis* nativas (não irradiadas) foram submetidos à centrifugação de 400 g, sendo o sobrenadante retirado e os *pellets* contendo os parasitas, fixados em glutaraldeído e tetróxido de ósmio, e posteriormente incluídos em resina Araldite para corte histológico.

**Extrato de Antígeno Solúvel** (MINEO, 1982): Centrifugaram-se culturas de *Leishmania amazonensis* em tubos cônicos até a obtenção do “*pellet*”, e em seguida foram adicionados 5 ml de água destilada. A suspensão diluída foi submetida a ultra-som (THORNTON-INPEC<sup>®</sup>) 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.

**Produção de Anticorpos:** In vitro inducible antibody production - IVIAP: Sensibilizou-se uma microplaca de 96 poços de fundo chato com extrato de antígeno solúvel, na concentração de 10 $\mu\text{g/ml}$ , diluído em tampão Carbonato - Bicarbonato 0,1 M esterilizado em filtro de 0,22  $\mu\text{m}$ / Millipore, pH 9, 0, (100  $\mu\text{l}$  por poço), que foi deixada, por 24 horas em câmara úmida a 4° C. Camundongos imunizados com *Leishmania amazonensis* irradiadas com 1500 Gy de radiação ionizante, tiveram o baço retirado (em fluxo laminar - estéril), macerado, e as células esplênicas homogeneizadas com meio RPMI 1640 acrescido de 50  $\mu\text{l}$  de Anfotericina B (0,25  $\mu\text{g}$ ), 50  $\mu\text{l}$  de Estreptomicina (200 mg/ml), 20  $\mu\text{l}$  de Penicilina (10000 UI), 35  $\mu\text{l}$  de  $\beta$ -mercaptoetanol e 10% de soro fetal bovino. As células foram colocadas em um tubo cônico contendo 5 ml de Ficoll-Hypaque (90 ml Ficoll/Sigma<sup>®</sup> + 20 ml Hypaque 50%/ Sanofi Winthrop Farmacêutica Ltda). Centrifugou-se a solução a 800 g por 30 minutos, e o sobrenadante foi retirado com uma pipeta Pasteur. Ressuspendeu-se o “*pellet*” em 2 ml do meio, lavou-se duas vezes por centrifugação (150 g por 10 min), e removeu-se uma alíquota de células para determinar o número de linfócitos viáveis por mililitro. Foi ajustada a concentração para 2 x 10<sup>6</sup> linfócitos/ml, e fez-se a contagem em Câmara de Neubauer. A concentração foi ajustada para 2x10<sup>6</sup> células/ml. A placa deixada em câmara úmida para sensibilizar foi então lavada com PBSTL (Phosphate Buffer Saline + Tween + Leite em pó desnatado) estéril, e bloqueada com BSA 2% por 1 hora a 37° C. Foi feita nova lavagem com PBSTL estéril e colocou-se 100  $\mu\text{l}$  das células previamente preparadas, acrescidas de 100  $\mu\text{l}$  de meio de cultura por poço. Novamente a placa foi incubada por 72 horas a 37° C na presença de CO<sub>2</sub>. No tempo de 48 horas adicionou-se 20  $\mu\text{l}$  (1 $\mu\text{C}$ /poço) de Timidina tritiada por poço. Transferiu-se o sobrenadante para outra microplaca (placa 2) para a realização do ELISA (procedimentos descritos abaixo). Utilizando um transferidor semi-automático (CELL HARVESTER -SKATRON<sup>®</sup>), foi feita a transferência do material da microplaca para um papel filtro

(Filter MAT - SKATRON®). Após totalmente secos os papéis filtros foram colocados em tubos contendo líquido de cintilação, e contados em um contador de partículas Beta ( $\beta$ -cintilador).

**Titulação dos Anticorpos:** Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA): Para realização deste teste foi utilizada a microplaca com o material transferido dos ensaios de IVIAP. Após todo o procedimento realizado anteriormente, a microplaca foi incubada por mais 1 hora em estufa 37° C, e ao final, foi realizado um novo ciclo de lavagens com PBSTL por três vezes. Foi aplicado conjugado anti-IgG de camundongo na diluição de 1:20.000 em PBSTL sob agitação. A placa foi levada à estufa de CO<sub>2</sub> a 37° C por mais uma hora. Lavou-se com PBSTL por seis vezes e foi aplicado OPD (orto-fenilenodiamina 1 mg/ml, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 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 parar a reação, e em seguida foi feita leitura em leitor de microplacas em comprimento de onda de 492 nm. Os resultados foram analisados em gráficos elaborados no Graph-Pad Prisma 3.0.

**PCR:** Multiplex Polymerase Chain Reaction: Para a amplificação do PCR seguiu-se seguinte o protocolo: Preparação do mix com: 2,0  $\mu$ l de DNTP, 2,5  $\mu$ l de PCR buffer, 1 $\mu$ l de primers (sense e anti-sense), 15 $\mu$ l de água e 0,1  $\mu$ l de Taq Polimerase. Distribuiu-se 20 $\mu$ l de mix por tubo e acrescentaram-se 5 $\mu$ l de amostra. Centrifugou-se a 11000 g por 1 minuto para sedimentar e evitar bolhas. Colocou-se no termociclador. Programação do termociclador: Temperatura de 95° C por 5 minutos para desnaturação inicial. A seguir foram feitos 35 ciclos de 95° C por 1 minuto (desnaturação), 54° C por 1 minuto (annealing), 72° C (extensão). Posteriormente, 72° C por 6 minutos para extensão final, e finalmente um *told* a 4° C. Extração do DNA (Trizol): 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 desafiados com parasitas íntegros. Colocou-se 200 $\mu$ l de clorofórmio (Merk M-119, 39g/ml) e agitou-se. Centrifugou-se novamente a 10000g a 4° C por 15 minutos. Descartou-se a fase aquosa contendo RNA, e adicionou-se ao tubo 300 $\mu$ l de etanol. Centrifugou-se a 2000 g por 5 minutos a 4° C. Retirou-se a fase fenólica, e ressuspendeu-se o *pellet* em 10  $\mu$ l de água. Eletroforese: A reação de eletroforese foi realizada em gel de agarose 6%, preparada com 10 ml de solução de Acrilamida, 125  $\mu$ l de Persulfato de Amônio, 30  $\mu$ l de TEMED. O tampão de amostra (TBE 2,5X) foi preparado com sacarose 40% (v/v) e Azul de Bromofenol (v/v), filtrados em filtro de 22  $\mu$ m. Feito 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 a visualização das bandas. Terminada esta etapa o material foi fixado com uma solução preparada com: 1 ml de Ácido acético, 15 ml de etanol e 136 ml de água bi-distilada, por 15 minutos. A coloração do gel foi feita utilizando Nitrato de Prata (0,3 g) adicionado de 50 ml de

água bi-distilada por 5 minutos. O gel foi lavado com água bi-distilada 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 bi-distilada por aproximadamente 8 minutos.

### III. RESULTADOS

#### Microscopia Eletrônica:

A Microscopia Eletrônica foi realizada em *Leishmania amazonensis* normais e irradiadas com 1500 Gy de radiação gama (Fig.1). A radiação causou uma total destruição do núcleo e do material citoplasmático, preservando, porém, a membrana plasmática e o citoesqueleto dos parasitas.

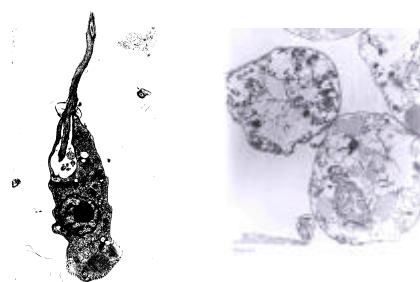


Figura 1: Microscopia eletrônica de *Leishmania amazonensis*, nativas (A) e irradiadas com 1500 Gy de radiação gama (B).

#### Titulação de Anticorpos:

Os ensaios imunológicos realizados por ELISA representados na Figura 2, referem-se à titulação de anticorpos (Ac) produzidos por células esplênicas de camundongos imunizados com *Leishmania amazonensis* irradiada com doses de 800 Gy (não esterilizante) e 1500 Gy (ideal para a completa esterilização dos parasitas), e submetidos ao desafio, 15 dias após o último inóculo (dia 60).

Nos primeiros 60 dias houve um aumento progressivo dos níveis de Ac dos animais imunizados com parasitas irradiados com ambas as doses, seguido de uma queda destes títulos após o desafio com parasitas viáveis (não irradiados).

Após 15 dias do desafio, o título de Ac dos camundongos imunizados com parasitas estéreis teve uma desaceleração de sua queda e começou a se estabilizar, uma vez que não havia estímulo de parasitas viáveis.

Nos animais imunizados com parasitas irradiados a 800 Gy, os níveis de anticorpos aumentaram rapidamente nos 20 primeiros dias, estabilizando-se por um período de aproximadamente 25 dias e voltando a aumentar após o terceiro inóculo, isto porque os parasitas ainda vivos desencadearam uma resposta imune nos camundongos, uma vez que sob esta dose os parasitas continuam infectantes.

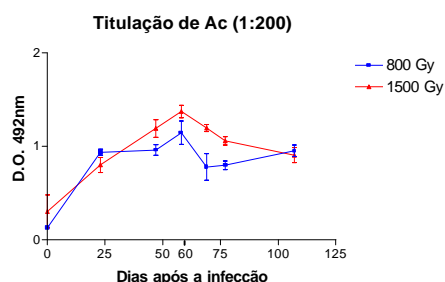


Figura 2: Titulação da produção de anticorpos, de camundongos Balb/c imunizados com *Leishmania amazonensis*, irradiadas com doses de 800 Gy e 1500 Gy, submetidos a desafio no dia 60.

### Lesões causadas pelos parasitas:

Camundongos inoculados com *Leishmania amazonensis* irradiada com dose de 800 Gy (não letal), tiveram o aparecimento de 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 (Figura 3).

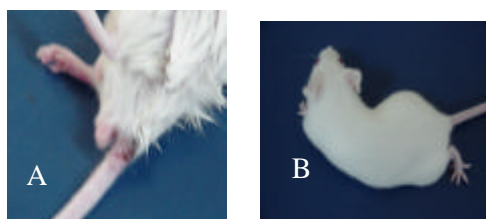


Figura 3: Fotografia de lesão causada na base da cauda de camundongo Balb/c inoculado com parasitas irradiados com dose de 800 Gy (A), cauda dos camundongos inoculados com dose de 1500 Gy (B) onde não foi encontrada lesão, mesmo após o desafio.

### Multiplex-PCR:

A reação de Multiplex-PCR feita para confirmação da infecção por *Leishmania amazonensis* íntegras, mostrou-se eficaz, conforme demonstrado na Figura 4. A amostra retirada por raspagem, da base da cauda do camundongo imunizado com parasitas irradiados com dose não esterilizante (800 Gy) e posteriormente desafiado com parasita normal (a), apresentou um resultado compatível com infecção por *Leishmania amazonensis* (La), e negativo para as outras espécies (Lb e Lc).

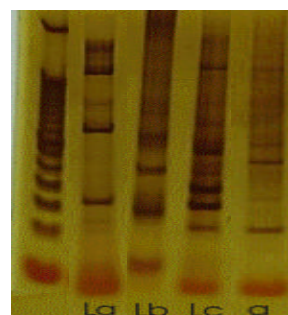


Figura 4: Gel de eletroforese de uma reação de Multiplex-PCR, apresentando bandas para diferentes espécies de *Leishmania*. La = *Leishmania amazonensis*, Lb = *Leishmania brasiliensis*, Lc = *Leishmania chagasi*, e a = amostra de raspado de pele retirada de um dos camundongos infectados com *Leishmania amazonensis*.

### IVIAP:

A proliferação celular *in vitro* de linfócitos viáveis, de baços de camundongos normais, infectados com *Leishmania amazonensis* patogênica e imunizados com *Leishmania amazonensis* irradiada com 1500 Gy de radiação ionizante, foi determinada por contagem de emissão de partículas beta, em um beta cintilador. Os resultados estão expressos na Figura 5:

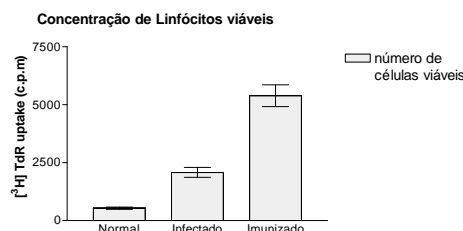


Figura 5: Concentração de linfócitos viáveis (produtores de Anticorpo anti *Leishmania amazonensis*), em baço de camundongos normais, infectados e imunizados.

### ELISA:

Os ensaios imunoenzimáticos foram realizados para determinar a eficiência das células esplênicas em produzir anticorpos *in vitro*, induzidas por inóculos com *Leishmania amazonensis* esterilizadas com radiação gama (1500 Gy). Os resultados apresentados na Figura 6 mostram a eficiência destas células irradiadas em relação à dos camundongos normais e infectados com *Leishmania amazonensis* patogênica:

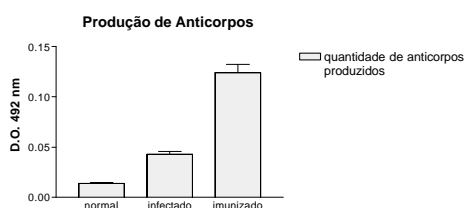


Figura .6: Quantidade de Anticorpos produzidos por células esplênicas de camundongos normais, infectados e imunizados.

#### IV. DISCUSSÃO

Considerando-se que BONETTI *et al.*, em 2000, determinaram que a dose efetiva encontrada para total esterilização das *Leishmanias* era de 1500 Gy, bem acima dos valores obtidos para esterilização de células humanas ou de outros protozoários, foram realizados, neste trabalho, ensaios para avaliação morfológica dos parasitas. Por meio de fotografias de microscopia eletrônica, entre dois grupos de parasitas (normais e irradiados com dose de 1500 Gy), confirmou-se que após a irradiação das formas promastigotas da *Leishmania amazonensis* houve total destruição de materiais nucléico e citoplasmático, gerando perda de capacidade metabólica e impedindo o parasita respirar ou se reproduzir. No entanto sua membrana citoplasmática não sofreu alterações morfológicas, o que representa que a célula continuou sendo reconhecida como viável, pelas células apresentadoras de antígeno (APCs), como o macrófago.

As fitas de DNA são mais radiosensíveis em relação às demais proteínas da célula do protozoário, isto se deve, em parte, pelo processo mitótico que expõe as pontes de ligação das duas fitas, permitindo uma ação mais destrutiva pelos radicais livres, formados na hidrólise, sobre a molécula que por sua vez perde a capacidade de reestruturação na presença de oxigênio devido ao fato das moléculas de oxigênio terem maior afinidade pelas ligações covalentes, provocando alterações conformacionais da molécula.

Assim, uma vez que os epítomos de classe MHC (complexo maior de histocompatibilidade) do parasitas utilizados pelas APCs para seu reconhecimento, apresentam-se, quando estimulados, na membrana plasmática da célula, pode-se sugerir que este protozoário permaneceu viável do ponto de vista imunológico.

Assim, foi realizado um ensaio de produção de anticorpos em camundongos inoculados com parasitas irradiados a 1500 Gy e desafiados com parasitas normais, que se mostrou mais eficiente em relação à produção de anticorpos ocorrida nos camundongos que receberam imunização de parasitas irradiados com 800 Gy, dose não eficiente para esterilização das *Leishmanias*. Além do que, os camundongos inoculados com parasitas irradiados com a menor dose adoeceram antes mesmo do desafio, enquanto os camundongos imunizados com o outro grupo de

protozoários, não adoeceram em momento algum do ensaio. Estes resultados mostram a eficácia do uso de protozoários esterilizados com radiação gama para possíveis estudos de tratamento ou ainda uma vacina contra Leishmaniose cutânea.

Outro ensaio realizado para atestar a capacidade das células esplênicas desses camundongos na produção de anticorpos, a partir de inóculos subcutâneos de *Leishmania amazonensis* irradiada com doses de 1500 Gy de radiação gama, foi o da proliferação de linfócitos *in vitro*, com análises de sua capacidade de produção de anticorpos. Estes testes mostraram que as células de baço dos camundongos imunizados com protozoários irradiados são mais eficientes na produção de anticorpos, além de se proliferarem mais que as células dos camundongos inoculados com parasitas viáveis.

E, para atestar a confiabilidade do método, foi realizado uma reação em cadeia da polimerase, capaz de diferenciar espécies do gênero *Leishmania*, do material genético retirado por raspagem da lesão provocada em um dos espécimes estudados. Com a análise de um gel de eletroforese contendo amostras de diferentes espécies de *Leishmania* e uma amostra do material retirado de um dos camundongos, ficou comprovado que as lesões foram realmente provocadas por parasitas da espécie *Leishmania amazonensis*, e não por outra espécie do parasita.

#### V. CONCLUSÃO

Depois de realizados estes ensaios, ficou comprovada a eficácia da radiação ionizante em esterilizar as formas promastigotas da *Leishmania amazonensis*, o que pode ser muito útil em estudos futuros de produção de fármacos e até mesmo uma vacina contra leishmaniose cutânea.

Demonstrou-se ainda que os protozoários irradiados desencadearam uma resposta imunológica, em camundongos suscetíveis, melhor que nos modelos desafiados como na infecção natural da *Leishmania*. A células esplênicas dos camundongos imunizados reconheceram melhor os parasitas irradiados, sem, no entanto o desenvolvimento de lesão cutânea no local do inóculo, ou em qualquer outra parte do corpo dos animais.

Tanto na sua morfologia, quanto na sua imunogenicidade, as cepas de *Leishmania amazonensis* tiveram suas características preservadas ou até mesmo otimizadas, enquanto seu crescimento, reprodução e patogenicidade foram inibidos, o que demonstra a eficiência do uso deste modelo de imunização.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALEXANDER J (1982). **A radiotenuated Leishmania major vaccine markedly increases the resistance of CBA mice to subsequent infection with Leishmania mexicana mexicana.** Trans. R. Soc. Trop. Med Hyg., 76:646-9.

BONETTI FC, ANDRADE Jr HF, SPENCER PJ, NASCIMENTO N (2000). **Efeitos da radiação ionizante sobre a forma promastigota da Leishmania spp.** V Encontro Nacional de Aplicações Nucleares: 361.

DUARTE MIS, MARIANO ON, TAKAKURA CFH UIP DE, CORBETT, CEP (1992). **A fast method for processing biologic material for electron microscopic diagnosis in infection disease.** Ultra structural Pathology, 16:475-482.

KAHL LP, SCOTT CA, LELCHUK R, GREGORIADIS G, LIEW FY (1989). **Vaccination against murine cutaneous leishmaniasis by using L. major antigen/liposome. Optimization and assessment of the requirement for intravenous immunization.** J Immunol, 142(12):4441-4449.

LAINSON R, RYAN L, SHAW JJ (1987). **Infective stages of Leishmania in the sandfly vector and some observations on the mechanism of transmittion.** Mem. Inst.Oswaldo Cruz, Sep. 82(3): 421-4

MARZOCHI KB, MARZOCHI MA, SILVA AF, GRATIVOL N, DUARTE R, CONFORT EM, MOLDEBBER F (1998). **Phase 1 study of an inactivated vaccine against american tegumentary leishmaniasis in normal volunteers in Brazil.** Mem Inst Osv Cruz, 93 (2): 205-12.

MAYRINK W, WILLIAMS P, COELHO MV, DIAS M, MARTINS AV, MAGALHAES PA, DA COSTA CA, FALCAO AR, MELO MN, FALCAO AL (1979). **Epidemiology of dermal leishmaniasis in the Rio Doce Valley, State of Minas Gerais, Brazil.** Ann Trop Med Parasitol, 73(2): 123-37.

MINEO JR (1982) **Detecção de antígenos e de anticorpos, com técnicas imunoenzimáticas, para o diagnóstico sorológico de toxoplasmose aguda.** São Paulo, (Dissertação de Doutorado - Instituto de Ciências Biomédicas – USP)

NASCIMENTO N., SEEBART S., FRANCIS B.ROGERO J.R., KAISER I. I (1996). **Influence of ionizing radiation on crotoxin: biochemical and immunological aspects.** Toxicon, 34(1): 123-131

PIRMEZET C. (1992). **Immunopathology of American cutaneous leishmaniasis.** Mem Inst Oswaldo Cruz, 87 (5): 105-9.

RIVIER D, SHAH R, BOVAY P, MAUEL J (1993). **Vaccine development against cutaneous leishmaniasis. Subcutaneous administration of radio attenuated parasites protects CBA mice against virulent L. major challenge.** Parasite Immunol, 15 (2): 75-84.

STRICKLAND GT (2000). **Infectious of the blood and reticulo endothelial system.** Hunter's Tropical Medicine and emerging infectious disease: 665-687.

TEIXEIRA SM (1998). **Control of gene expression in Trypanosomatidae.** Braz J Med Biol Res, 31(12): 1503-16.

## ABSTRACT

*Leishmania amazonensis* is a protozoan transmitted by a bite of a sandfly responsible for skin lesions in human and other mammalian hosts, being considered one of the most important endemic Public Health disease. Ionizing radiation shown to be an excellent method to kill these parasites, blocking their growth by nucleic acid (DNA) break, and stopping the respiratory metabolism. In this study, we analyze the effects of ionizing radiation on the morphology of the *Leishmania amazonensis* and the capacity of infection in experimental model. The radio sterilized parasites maintained their membrane surface preserved while destroyed the other proteins needed to their life, promoting the possible of a new antigenic model.