

AÇÃO DA RADIAÇÃO IONIZANTE SOBRE A MORFOLOGIA, FISIOLOGIA E CRESCIMENTO DA *Leishmania spp.*

Franco C. Bonetti**, Heitor F. A. Jr* Patrick J. Spencer**, and Nanci do Nascimento**

*Instituto de Medicina Tropical de São Paulo- FMUSP
Av Dr Enéas Carvalho de Aguiar, 470 – 05403-000 – São Paulo, SP, BRASIL

**Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – IPEN/CNEN/SP
Travessa R, 400, Butantã – São Paulo, SP, BRASIL

SUMÁRIO

A Leishmania spp é um protozoário patogênico, causador de diferentes doenças no homem. As doenças humanas na América, causadas por este grupo de protozoários são divididas em cutâneas ou tegumentares e viscerais, conhecidas como kala-azar. Neste trabalho, nosso principal objeto de estudo foi as espécies causadoras de Leishmaniose tegumentar, no Brasil. Estudos metabólicos de respiração celular e síntese de proteínas e ácidos nucléicos foram realizados utilizando radiação gama como forma de esterilizar os parasitas sem no entanto destruir sua capacidade imunogênica. As formas promastigotas de *Leishmania. spp* irradiadas mostraram-se totalmente esterilizada com a dose de 1500 Gy, tendo sua capacidade reprodutora e de síntese de proteínas e ácidos nucléicos bloqueadas.

INTRODUÇÃO

A Leishmania spp é um protozoário patogênico do filo Kinetoplastidae, causador de diferentes doenças no homem (LAINSON & SHAW 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* (LUTZ & NEIVA, 1912) no Velho Mundo, e *Lutzomyia* no Novo Mundo (FORATTINI, 1970), estes

protozoários são dimórficos, ocorrendo na forma promastigota no intestino do inseto e na forma amastigota em células dos hospedeiros, onde comportam-se como um parasitas intracelulares obrigatório (PIRMEZET et al, 1992).

As doenças humanas na América causadas por este grupo de protozoários são divididas em dois grupos: as cutâneas, ou tegumentares, causadas pelas espécies *L.(L.) amazonensis*, *L.(V.) brasiliensis*, e a doença visceral conhecida como kala-azar, causada pela espécie *L.(L.) chagasi* com comprometimento dos órgãos ricos em células

macrofágicas, como o fígado e o baço (TEIXEIRA, 1998).

Considerações sobre a leishmaniose tegumentar:

Nesta forma da doença podemos observar três diferentes manifestações clínicas: Leishmaniose cutânea, leishmaniose cutâneo-mucosa e leishmaniose cutânea difusa (MAYRINK *et al.*, 1979). No que diz respeito à sua morfologia, e seu metabolismo para obtenção de energia, não existem diferenças significativas entre as espécies de *Leishmania*, que, quando na fase promastigota, tem metabolismo respiratório estritamente aeróbio, tanto que quando submetidos a meios sem oxigênio demonstram uma brusca redução de suas atividades, como por exemplo a degradação da glicose (VAN HELLEMOND *et al.*, 1997). Suas mitocôndrias utilizam-se de glicólise e oxidação de prolinas para a formação dos ATPs, sua forma de armazenar energia (ALVÁREZ-FORTES *et al.*, 1998).

Radiação Ionizante:

Trabalhos 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. Em outro estudo, feito com protozoários da espécie *Trypanosoma cruzi* irradiados e inoculados em camundongos, mostrou que os parasitas tiveram sua capacidade de infecção inibida dependendo da dose de radiação a eles aplicadas e também da cepa utilizada (TRISCHMANN, 1982). Esporozóitos de plasmódios, do filo Apicomplexa, causadores da malária foram irradiados e mantiveram sua capacidade de invadir células hepáticas e transformar-se em trofozoítos, porém degeneravam-se após esta fase como na resposta natural da doença.

Assim, trabalhos realizados com parasitas radioatenuados que permaneceram vivos, parecem ser mais promissores uma vez que os protozoários simplesmente perdem sua capacidade patogênica mantendo todos os seus aspectos morfológicos, e conseguindo assim passar pelo sistema primário de defesa, atingindo os macrófagos, produzindo conseqüentemente, resposta específica. Isto demonstra o êxito da utilização deste tipo de

antígeno num estudo vacinal com doses de 1500 Gy de radiação ionizante para *Leishmania spp* (RIVIER *et al.*, 1993). A radiação ionizante possui dois tipos de ação sobre as moléculas celulares; direto ou indireto. No primeiro, ocorre uma ação direta sobre a célula alvo com transferência de energia para suas moléculas, provocando ionização, e alterações nas propriedades físico-químicas, e na estrutura secundária e terciária desses polímeros, além de perda de função biológica. Essas mudanças estão relacionadas com a perda da atividade enzimática, hormonal ou tóxica, assim como com as mudanças das propriedades imunológicas após a irradiação (HRAZDIRA e SKALKA, 1970). O efeito indireto da radiação mostrou uma maior sensibilidade das 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). Outros fatores que também influenciam o efeito da radiação são o tipo e qualidade de irradiação.

Sendo assim, pretendemos estudar os efeitos da radiação ionizante sobre as características morfológicas e fisiológicas de alguns protozoários, dando ênfase às *Leishmanias spp* existentes no Brasil, visando o conhecimento para o desenvolvimento futuro de reagentes para tratamentos, ou mesmo uma vacina para este importante problema de Saúde Pública.

MATERIAIS E MÉTODOS :

Cultivo de Células e dos Parasitas:

As cepas PH8 de *L. (L.) amazonensis*, foram cultivadas em meio RPMI 1640 (SIGMA) sem vermelho de fenol com 20% de soro fetal bovino, adicionado de 20 µg/ml de Estreptomicina e Gentamicina.

Irradiação: O processo de irradiação foi feito no Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – IPEN/CNEN-SP, em fonte de ⁶⁰Co (GAMMACELL). As doses de radiação utilizadas foram de 50, 100 e 200Gy sem blindagem; e 400, 800, 1500, 1600 e 3200Gy com blindagem de 90%.

Estudos Metabólicos:

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 6×10^4 parasitas/ 100µl. As placas foram então deixadas na estufa à 28° C por 24 horas para verificação do crescimento dos parasitas. A leitura foi feita em microscópio óptico invertido, contando-se o número de parasitas por poço. Novas leituras foram realizadas após 48 e 72 horas. Assim foi possível determinar o crescimento dos parasitas, em diferentes concentrações, e com isso avaliar sua viabilidade após a exposição a diferentes doses de radiação. Os resultados desta distribuição foi analisados através de um gráfico elaborado no Graph Pad[®] (Prisma).

Prolina: O estudo do metabolismo celular para *Leishmania spp* foi realizado com a utilização de prolina tritiada. 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, que não continham prolina, acrescido de ³H-prolina ($3,7 \times 10^8$ Bq/ml), tendo sido a cultura realizada 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 µl da cultura e colocados em papel de filtro tipo Whatmann 3 mm, estes sendo 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, e finalmente em 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. e a contagem apresentada em c.p.m. (contagens por minuto).

Hypoxantina: Após a irradiação os parasitas foram centrifugados por 10 minutos à 800 g, e o sobrenadante desprezado. Acrescentou-se, então, meio de cultura com ³H-hypoxantina ($3,7 \times 10^8$ Bq/ml), sendo a cultura realizada em placa de 24 poços, com concentração de 3×10^6 parasitas por ml, a 37° C com 5% de CO₂. O restante do procedimento foi exatamente igual ao realizado nos testes com a Prolina.

RESULTADOS:

Nesta primeira etapa foram realizados testes de viabilidade por diferentes metodologias.

A primeira prova realizada foi a diluição limitante, iniciada com 6×10^4 parasitas/ml, com diluições seriadas de 1:10 por toda a placa, com diferentes doses de radiação. Os resultados estão expressos no gráfico que se segue:

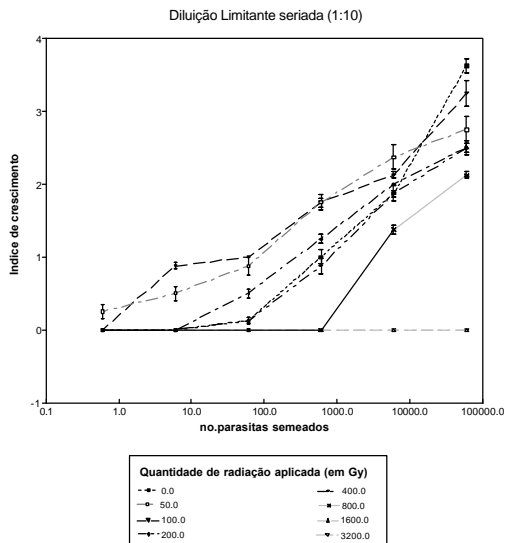


Fig1: Teste de diluição limitante (1:10) com concentração inicial de 1×10^7 parasita/ml, para análise da viabilidade de *Leishmania amazonensis* irradiada com diversas doses de radiação gama.

Os testes de viabilidade por contagem radioativa (Prolina e Hypoxantina), servem para detecção de metabolismo protéico e de DNA, respectivamente. Os resultados estão apresentados nos gráficos a seguir:

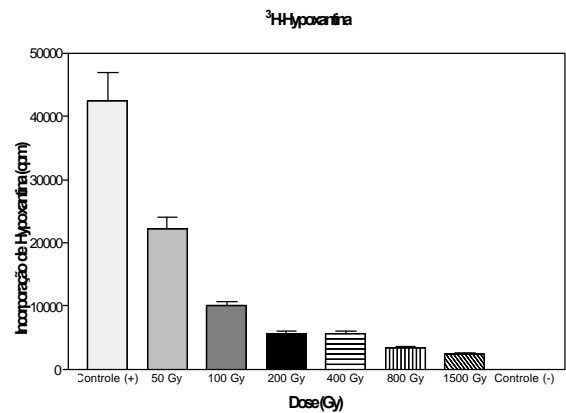


Fig2: Teste de viabilidade por contagem de ³H-hipoxantina agregada, para verificação de crescimento *L. amazonensis* sob aplicação de diferentes doses de radiação gama.

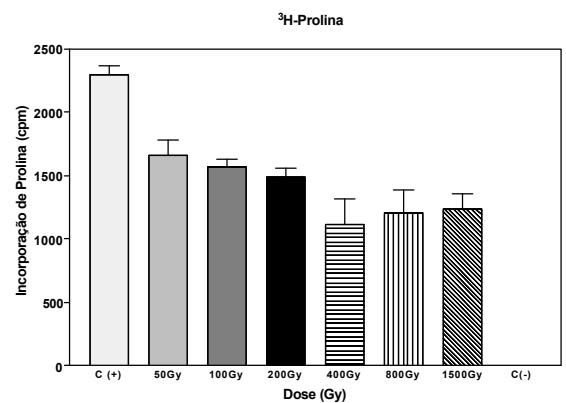


Fig3: Teste de viabilidade por contagem de ³H-prolina agregada, para verificação do crescimento de *L. amazonensis* sob aplicação de diferentes doses de radiação gama.

DISCUSSÃO:

A partir dos resultados encontrados, pudemos avaliar preliminarmente a influência da radiação gama ionizante sob o desenvolvimento das formas promastigotas da *L. amazonensis*. A dose efetiva encontrada para o início da esterilização das formas foi de 1,5 kGy, bem acima dos valores obtidos para esterilização de células humanas ou de parasitas semelhantes (Hiramoto et al., 1998). Outros autores apresentaram resultados semelhantes (Rivier, 1993) mostrando que estes agentes tem uma maior radioresistência. Doses intermediárias não foram capazes de

esterilizar a totalidade dos agentes, resultando em uma diminuição proporcional da viabilidade entre 800 e 200 Gy, fato compatível com um efeito dose-resposta, já obtido em outros modelos (Hiramoto et al., 1998).

As doses de 50 e 100 Gy de radiação parecem ter favorecido, possivelmente, o crescimento das colônias de parasitas. Este fato pode se dever a um fenômeno denominado hormese (Stebbing, 1982); que implica numa otimização das condições normais de crescimento com pequenas doses de radiação ou por agentes químicos.

BIBLIOGRAFIA:

ALVÁREZ-FORTES E, RUIZ-PÉREZ LM, BOULLAUD F, RIAL E, RIVAS L,(1998). **Expression and regulation of mitochondrial uncoupling protein 1 from brown adipose tissue in *Leishmania major* promastigotes.** *Mol Bioc Parasitol*, **93** (2):191-202.

ANTOINE JC, LANG T, PRINA E, COURRET N, HELLIO R (1999). **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*, **112**(15):2559-2570.

FORATTINI OP, PATTOLI DBG, RABELO EX, FERREIRA CA (1970). *Rev Saude Pub*, **7**:181-84.

GREENSTOCK CL (1981). **Redox processes in radiation biology and cancer.** *Radiat Res May*, **86**(2):196-211.

HRAZDIRA I, SKALKA M(1970). **Changes produced by ultrasound in the deoxyribonucleoprotein complex in vitro.** *Folia Biol (Praha)*, **16**(2):121-8.

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

LUTZ A & NEIVA A (1912). **Contribuição para o conhecimento das espécies do gênero *Phlebotomus* existentes no Brasil.** *Mem. Inst. Osv. Cruz*, **4**: 82-95.

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

N.NASCIMENTO, C.S.SEEBART, B.FRANCIS, J.R.ROGERO, I.I.KAISER (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 radioattenuated parasites protects CBA mice against virulent *L. major* challenge.** *Parasite Immunol*, **15** (2):75-84.

RM HIRAMOTO, AJ GALISTEO, HF ANDRADE Jr (1998). **Effects of Cobalt60 ionizing radiation on the metabolism and infectivity of a parasitic protozoa, *T. gondii*.** *VII CGEN- General Conference of Nuclear Energy*.

SONG CC, YUAN XZ, SHEN LY, GAN XX, DING JZ (1993). **The effect of cobalt-60 irradiation on the infectivity of *Toxoplasma gondii*.** *Int J Parasitol*, **23**(1):89-93 .

STEBBING AR (1982). **Hormesis--the stimulation of growth by low levels of inhibitors.** *Sci Total Environ* **22**(3):213-34

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

TRISCHMANN TM (1982). **Suceptibility of radiation chimeras to *Trypanosoma cruzi*.** *Infect Immunol*, **36**(2):844-6.

VAN HELLEMOND. JJ, VAN DER MEER P, TIELENS AGM (1997). ***Leishmania infantum* promastigotes have a poor capacity for anaerobic function and depend mainly on respiration for their energy generaton.** *Parasitology*, **114**(7):351-360.

ABSTRACT:

The *Leishmania spp* is a patogenic protozoan, which cause different diseases in man. The human diseases, in America, caused by this group of protozoa are divided in cutaneous or tegumentar and visceral, known as kala-azar. In this work, our principal study object was the specie that causes tegumentar leishmaniasis, in Brazil. Metabolic studies of cellular respiration and proteins and nucleic acids synthesis were accomplished using radiation as a form of sterilizing the parasites without however affecting their immunogenic capacity The promastigotes forms of irradiated *Leishmania. spp* were totally sterilized with the dose of 1500 Gy, with their reproductive and nucleic acids, as well as protein synthesis capacity blocked.