

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

**ESTUDO DO USO DA RADIAÇÃO IONIZANTE COMO FERRAMENTA DE
SELEÇÃO DE FORMAS PROMASTIGOTAS METACÍCLICAS DE
Leishmania amazonensis, E A INDUÇÃO DE RESPOSTA IMUNOLÓGICA
EM MODELOS EXPERIMENTAIS.**

FRANCO CLAUDIO BONETTI

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

Orientadora:
Dra. Nanci do Nascimento

SÃO PAULO
2006

“Omne vivum ex vivo”

(Um ser vivo sempre provém de outro ser vivo)

William Harvey

Ao meu filho Ian e à
minha eterna namorada, Andréa Sanchez.

À minha mãe pela torcida.

Ao meu pai e à Meire pelo incentivo.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Profa. Dra. Nanci do Nascimento por me guiar ao longo de mais este trabalho e nunca negar apoio às minhas idéias.

Ao Prof. Dr. Heitor Franco de Andrade Jr., por me proporcionar mais esta oportunidade, e ceder espaço no Laboratório de Protozoologia da FMUSP, além de sua irrestrita colaboração para o bom andamento do trabalho.

Ao Andrés Jimenez Galisteo Jr., por seu otimismo e confiança nos bons resultados, ao longo de todo trabalho.

Ao Daniel Perez Vieira, por seu bom humor diário, sempre solícito.

À Byanca Paiva pelo auxílio nas técnicas de Biologia Molecular.

À Janaina Alves Baptista pela amizade e pelo auxílio com os ensaios com Imunoglobulinas.

À Neide pela manutenção dos animais imunodeficientes.

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

À Dna. Francisca pelo cafezinho, pelas boas risadas e manutenção da ordem e dos bons costumes nos momentos de euforia coletiva.

À Solange Fernandes Ferreira dos Santos, pela burocracia envolvida.

Ao Luciano Monteiro da Silva, por fazer o laboratório funcionar.

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

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

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

Ao LIM49FMUSP e a Supervisão de Radiobiologia/IPEN pelo suporte ao projeto.

À CAPES pelo suporte financeiro ao projeto.

ESTUDO DO USO DA RADIAÇÃO IONIZANTE COMO FERRAMENTA DE SELEÇÃO DE FORMAS PROMASTIGOTAS METACÍCLICAS DE *Leishmania amazonensis*, E A INDUÇÃO DE RESPOSTA IMUNOLÓGICA EM MODELOS EXPERIMENTAIS.

Franco Claudio Bonetti

RESUMO

Atualmente, milhões de pessoas, por todo o globo, estão sob risco de serem infectados por um protozoário transmitido vetorialmente por pequenos insetos flebotomíneos. Este parasita é a *Leishmania spp.*, causadora de uma patologia de amplo espectro, que varia desde a moléstia cutânea (tegumentar) até a visceral (kala-azar). A leishmaniose cutânea é a manifestação clínica de maior ocorrência (mais de 90% dos casos). A radiação ionizante, gerada em fonte de ^{60}Co , tem sido utilizada com sucesso para promover alterações físico-químicas em diferentes protozoários, incluindo a *Leishmania spp.* Em trabalhos anteriores determinou-se que formas promastigotas de *Leishmania amazonensis*, irradiadas com diferentes doses de radiação gama, perdem sua viabilidade mantendo, porém, sua imunogenicidade. No presente trabalho, estudou-se a utilização da radiação ionizante como ferramenta na seleção de formas metacíclicas do parasita em cultura axênica para a possível produção de imunógenos irradiados mais eficientes. Os resultados demonstram que culturas irradiadas com 400 Gy de radiação gama, possuem uma concentração de aproximadamente 75% de parasitas metacíclicos, capazes de produzir, *in vitro*, uma infecção que mimetiza a ocorrida naturalmente. Estes parasitas irradiados têm sua estrutura celular interna modificada mantendo, entretanto, seu arcabouço externo intacto. Camundongos de uma linhagem suscetível imunizados com leishmanias irradiadas com diferentes doses tiveram sua produção de imunoglobulinas aumentada, e mantiveram os títulos elevados após o desafio com parasitas não irradiados. Em outras linhagens pesquisadas este padrão se manteve, porém em títulos menores, sendo que camundongos imunodeficientes não responderam à imunização nem ao desafio.

**THE STUDY OF IONIZING RADIATION AS A TOOL FOR SELECT PROMASTIGOTES
FORMS OF *LEISHMANIA AMAZONENSIS*, AND THE IMMUNOLOGICAL RESPONSE
IN EXPERIMENTAL MODELS.**

Franco Claudio Bonetti

ABSTRACT

Actually, millions of people around the globe are under the risk of infection by a protozoan transmitted by a bit of a sand fly. This parasite is a *Leishmania spp.* This causes a wide spectrum disease, since a coetaneous disease to a visceral one. The coetaneous form is the major clinical manifestation (above 90%). The ionizing radiation, produced in a ^{60}Co font, had being successes used to promote physical-chemical transformations on different protozoans, including *Leishmania spp.* In previous work was determined that promastigotes forms of *Leishmania amazonensis*, irradiated with different doses of radiation, lost their viability maintaining, however, their immunogenicity. In this work, was studied the use of ionizing radiation as a tool for selection of metacyclic forms of the parasite in axenic culture, for a possible efficient irradiated immunogen production. Our results shown that cultures irradiated with 400 Gy of gamma irradiation, has 75% of metacyclic form, which are capable to produce, in vitro, an infection that is similar the natural occurrence. These irradiated parasites have their internal cellular structure modified, maintaining their external structure intact. Susceptible strain of mice immunized with leishmania irradiated with different doses had high immunoglobulin production, and maintained this production after the challenge with naive parasites. In other strains this default was similar, however in lower titles. Immunodeficient mice didn't produce immunoglobulin nor on the immunization or on the challenge.

SUMÁRIO

RESUMO	VII
ABSTRACT	VIII
SUMÁRIO	IX
LISTA DE FIGURAS	XII
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Considerações Gerais e Breve Resumo Histórico.....	1
1.2. Morfologia e Metabolismo Celular.....	3
1.3. Ciclo de vida.....	5
1.4. Dinâmica da infecção e Resposta Imune envolvida.....	7
1.5. Diagnóstico.....	9
1.6. Tratamento.....	10
1.7. A Radiação Ionizante.....	11
2. OBJETIVOS	13
2.1. Geral.....	13
2.2. Específicos.....	13
3. MATERIAL E MÉTODOS	14
3.1. Cultivo de células RAW.....	14
3.2. Cultivo dos Parasitas.....	14
3.3. Irradiação.....	14
3.4. Ensaio de fixação de complemento.....	15

3.5. Ensaio para determinação do tempo médio de metaciclogênese de <i>Leishmania amazonensis in vitro</i>	15
3.6. Ensaio de infecção de células RAW <i>in vitro</i>	15
3.7. Microscopia eletrônica.....	16
3.8. Ensaio de imunização.....	16
3.9. Ensaio Imunoenzimáticos (<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay – ELISA</i>).....	17
3.10. Sub-classes de Imunoglobulinas.....	17
3.11. Reação em cadeia da Polimerase (PCR).....	18
3.11.1 Extração das amostras.....	18
3.11.2. <i>Preparação da mix</i>	18
3.11.3. Desenho dos <i>primers</i>	18
3.11.4. Amplificação do material.....	18
3.11.5. Eletroforese.....	19
3.12. Análises estatísticas.....	19
4. RESULTADOS	20
4.1. Ensaio para determinação do tempo médio de metaciclogênese de <i>Leishmania amazonensis in vitro</i>	20
4.2. Ensaio de infecção de células RAW <i>in vitro</i>	21
4.3. Ensaio de fixação de complemento.....	23
4.4. Microscopia Eletrônica	24
4.5. Ensaio de Imunização de modelos experimentais.....	26
4.5.1. Titulação de anticorpos.....	26

Gracias por visitar este Libro Electrónico

Puedes leer la versión completa de este libro electrónico en diferentes formatos:

- HTML(Gratis / Disponible a todos los usuarios)
- PDF / TXT(Disponible a miembros V.I.P. Los miembros con una membresía básica pueden acceder hasta 5 libros electrónicos en formato PDF/TXT durante el mes.)
- Epub y Mobipocket (Exclusivos para miembros V.I.P.)

Para descargar este libro completo, tan solo seleccione el formato deseado, abajo:

