

INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES

Autarquia Associada à Universidade de São Paulo

***Aspectos da resposta imune frente a
antígenos protéicos irradiados com ^{60}Co***

Janaína Baptista Alves

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

Orientadora:

Prof^a. Dr^a. Nanci do Nascimento.

São Paulo

2004

Dedico este trabalho

A minha família: meus pais, Geni e Manoel, e meus irmãos, Lissandra e André. Devo tudo a vocês.

Ao meu amado companheiro Andrés, por segurar minhas mãos e estar a meu lado em todos os momentos.

“A vida não é um corredor reto e tranqüilo que nós percorremos livres e sem empecilhos, mas um labirinto de passagens, pelas quais nós devemos procurar nosso caminho, perdidos e confusos, de vez em quando presos em um beco sem saída. Porém, se tivermos fé, uma porta sempre será aberta para nós, talvez aquela sobre a qual nós mesmos nunca pensamos, mas aquela que definitivamente se revelará boa para nós.”

A J Cronin

AGRADECIMENTOS

A Deus pelo milagre da vida.

À Dr^a Nanci do Nascimento, minha orientadora, pela amizade, constante incentivo e apoio, por acreditar na minha capacidade de trabalho e por me mostrar sempre o melhor caminho, principalmente nos momentos de dúvida.

Ao Dr. Heitor Franco de Andrade Jr, pelos constantes ensinamentos e, por manter sempre abertas as portas de seu laboratório no Instituto de Medicina Tropical de São Paulo.

Ao Dr. Luiz Guilherme Stark Aroeira, por todo o auxílio prestado no início deste trabalho, por suas importantes sugestões e, por “pegar muito no meu pé” me incentivando a sua maneira.

A Dr^a Olga Zazuo Higa, pelo auxílio e orientação no ensaio de citotoxicidade.

A Dr^a Lígia Ely. Morganti Ferreira. Dias, por possibilitar a utilização de aparelhos e materiais de seu laboratório.

A Dr^a Maria Aparecida Pires Camilo, pelas sugestões dadas durante os seminários do grupo.

Ao Dr. Paolo Bartolini, por possibilitar a utilização de equipamentos dos laboratórios do TBM.

Ao amigão Patrick Jack Spencer, por suas idéias e sugestões sempre esclarecedoras, e por me mostrar que ser cientista não é apenas uma profissão e sim uma filosofia de vida.

Ao amigo João Ezequiel de Oliveira, “Jhonny”, pelo auxílio na cromatografia de exclusão molecular e, por toda a calma e paciência que sempre nos tranqüilizam.

Ao amigo Bruno Andrade Cardi, pelo seu interesse e sugestões importantes.

Ao meu maior amigo Andrés Jimenez Galisteo Jr, pelo auxílio no ensaio de proliferação celular e, por todo seu carinho e atenção.

A querida amiga Lucélia de Almeida Campos, por me ensinar o b-à-ba da cultura celular e, principalmente, por seu constante apoio e companheirismo.

A Murilo Casare da Silva e José Alberto Alves da Silva, meus amiguinhos e companheiros de bancada, por divertirem a todos com suas “histórias educativas”.

Ao amigo Luis Otavio Kosmiskas, “Tatú”, pelos momentos divertidos proporcionados pela sua criatividade.

Ao amigo Rui Seabra Ferreira Jr, pelas parcerias e trocas de experiências.

As minhas queridas amigas “Cobrinhas” : Fernanda Mendonça, Miriam, Adriana, Evelyn, Daniela, Fernanda Izilda, pelos inúmeros momentos compartilhados.

Ao amigo Daniel Perez Vieira, nosso “Mixirica”, pelos momentos compartilhados nos cursos da pós-graduação.

Ao amigo José Maria, por ser um exemplo para todos nós.

A Leonardo Mussi da Silva, nossa “mala sem alça” preferida, e Renan Loureiro, “oráculo de plantão”, por suas “histórias fantásticas” da cidade maravilhosa.

A amiga Patrícia Fagá, pelo auxílio prestado nos experimentos iniciais e pela sua companhia sempre agradável.

A Priscila Caproni, pelo auxílio com os experimentos finais e, por ouvir atentamente minhas palavras.

A amiga Rute Batista , por sua dedicação e por nossas longas conversas.

À amiga Andréa Rodas, pelas dicas importantes com relação ao trabalho no laboratório de cultura celular.

A Natália e Claudia, pelos seus divertidos “ensaios musicais”.

Aos integrantes da Comissão de Pós Graduação do IPEN, pelo empenho e dedicação para oferecer todas as condições necessárias aos pós-graduandos.

À CAPES pelo apoio financeiro.

Aos engenheiros Carlos e Elizabeth e ao Hélio, do CTR, por possibilitarem o tratamento com raios gama das proteínas utilizadas neste projeto.

A Eduardo de Moura, pelo cuidado e organização dos equipamentos presentes em cada laboratório do setor.

A Genivalda e José Longino, pelo cuidado e limpeza dos materiais do laboratório.

A Maria Neide Mascarenhas, “Neidinha”, técnica do biotério, pelo cuidado e tratamento dispensado aos animais.

Aos funcionários do biotério, Antônio Calixto, Cícero e Joaquim, pela manutenção dos materiais utilizados.

A Nice, pela limpeza dos laboratórios e salas de estudo.

Ao amigo Luís Antônio Lobo, “Lobinho”, por cuidar de nossa segurança por tanto tempo e pelos almoços sempre descontraídos.

A todos aqueles que, direta ou indiretamente, colaboraram para a realização deste trabalho, meu sincero obrigada.

Aspectos da resposta imune frente a antígenos protéicos submetidos aos efeitos da radiação gama de ^{60}Co

Janaína Baptista Alves

Resumo

Considerando os efeitos da radiação gama sobre proteínas e a capacidade do sistema imune de reconhecer macromoléculas modificadas, decidimos avaliar alguns aspectos imunológicos de camundongos B10.PL frente a ovalbumina e bothropstoxina-1 (BTHX-1), nas formas nativa e irradiada.

Para avaliar prováveis modificações estruturais nas moléculas das proteínas após o processo de irradiação (radiação γ de ^{60}Co), foi realizada a eletroforese em gel de poliacrilamida 15% para a ovalbumina e para a BTHX-1, nas formas nativa e irradiada. A ovalbumina também foi submetida à cromatografia de exclusão molecular, enquanto a BTHX-1 foi submetida à espectrometria de massa. Os resultados destes ensaios mostraram que a radiação γ foi capaz de promover alterações nas moléculas de ovalbumina e BTHX-1.

A fim de avaliar a toxicidade da BTHX-1 irradiada em relação à nativa realizou-se um ensaio de citotoxicidade celular em células CHO. O resultado mostrou que a toxina na sua forma irradiada apresentou, aproximadamente, cinco vezes menos toxicidade do que a toxina na sua forma nativa.

Com relação aos aspectos imunológicos, foram realizados ensaios de produção e identificação de anticorpos, nos quais, os animais foram imunizados com ovalbumina e BTHX-1, nas formas nativa ou irradiada. Observou-se que as proteínas nativas induziram, preferencialmente, uma resposta do tipo Th2, enquanto que as proteínas irradiadas induziram uma resposta do tipo Th1.

Realizou-se um ensaio de proliferação celular para avaliar o comportamento de esplenócitos, retirados do baço de camundongos B10.PL, imunizados com ovalbumina e BTHX-1, nativas ou irradiadas, cultivados em presença de ambas as formas das proteínas. Em relação à ovalbumina, os resultados mostraram que tanto as células dos animais imunizados com a ovalbumina nativa como aquelas dos animais imunizados com a proteína na sua forma irradiada apresentaram crescimento semelhante. No caso da BTHX-1, os resultados mostraram que as células dos animais imunizados com a toxina irradiada foram capazes de reconhecer a forma nativa da toxina, pois apresentaram crescimento semelhante ao das células dos animais imunizados com a BTHX-1 nativa.

Aspects of the immune response against proteic antigens submitted to the effects of ^{60}Co gamma radiation.

Janaína Baptista Alves

Abstract

Considering the effects of gamma radiation on proteins and the capacity of the immune system to recognize modified macromolecules, we decided to evaluate some immunological aspects of B10.PL mice exposed to native or irradiated ovalbumin and bothropstoxin-1 (BthTx-1).

In order to evaluate possible structural modifications of the molecules after being irradiated (^{60}Co γ rays), bothropstoxin-1 was analysed by electrophoresis, while ovalbumin was submitted to analytical size exclusion chromatography. The toxin was also analysed by ESI-mass spectrometry. Our results indicate that radiation promoted modifications on both the molecules.

Aiming to compare the toxicity of the native and irradiated forms of the toxin, an in vitro cytotoxicity assay, using CHO cells, was performed. According to our results, the modified toxin was 5 folds less toxic than its native counterpart.

Sera of animals immunized with the native and irradiated proteins were analyzed in order to evaluate levels of IgG, as well as to quantify specific isotypes. While the native proteins induced a predominant Th2 response, the irradiated molecules apparently promoted a switch towards a Th1 pattern.

We also performed a cell proliferation assay with splenocytes from mice immunized with either the native or the irradiated proteins, cultured in the presence of the antigens. Our results indicate that both the forms of the proteins induced a similar proliferative response. These data indicate a potential use of detoxified proteins as antigens for immunization.

SUMÁRIO

	Página
I – INTRODUÇÃO	1
1.1. Radiação Ionizante	1
1.2. Venenos	2
1.3. Atenuação de Venenos Animais	4
1.4. Sistema Imune	8
II – OBJETIVOS	12
III - MATERIAL E MÉTODOS	13
3.1. Reagentes	13
3.2. Animais	13
3.3. Purificação da BTHX-I	13
3.4. Irradiação das Proteínas	14
3.5. Eletroforese	14
3.6. Cromatografia de exclusão molecular	15
3.7. Espectrometria de massa	15
3.8. <i>Ensaio de Citotoxicidade</i>	16
3.8.1. <i>Cultura de Células CHO</i>	16
3.8.2. <i>Teste de Citotoxicidade</i>	17
3.9. Produção de anticorpos específicos antiproteínas nativas ou irradiadas	17
3.10. Ensaio Imunoenzimático (ELISA)	18
3.11. Proliferação Celular	19
IV – RESULTADOS	21
4.1. Purificação da BTHX-I	21
4.2. Eletroforese	22
4.3. Cromatografia de exclusão molecular	24
4.4. Espectrometria de massa	26
4.5. Ensaio de Citotoxicidade	28
4.6. Ensaio Imunoenzimático (ELISA)	29
4.7. Proliferação Celular	32

V – DISCUSSÃO	36
VI – CONCLUSÕES	41
VII – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	42

I - INTRODUÇÃO

1.1 Radiação Ionizante

No final do século XIX, especificamente em 1895, começa a história da radiação ionizante, com a descoberta dos raios-X por Wilhelm Conrad Röntgen. Logo em seguida, em 1896, Henry Becquerel verificou que o urânio constituía-se em um elemento radioativo natural (TURNER, 2004). O desenvolvimento tecnológico, decorrente destas e de outras descobertas, propiciou a ampla utilização das radiações ionizantes em diferentes áreas. Na medicina, por exemplo, as radiações são aplicadas na pesquisa, diagnóstico e no tratamento de doenças, principalmente as neoplásicas (SEGRETO & SEGRETO, 1997).

No que diz respeito à ação da radiação em materiais biológicos, o processo é iniciado por várias interações físicas, que dependem dos átomos presentes e da natureza química do sistema (BUTLER *et al*, 1984).

A radiação ionizante consiste de ondas eletromagnéticas formadas a partir de transições nucleares, tendo alta energia, ausência de massa (no caso da radiação gama), bem como a capacidade de promover ionização e excitação nos meios, possuindo um alto poder de penetração (GROSH & HOOPYWOOD, 1979). Seus efeitos podem ser diretos ou indiretos, sendo o primeiro uma consequência da interação direta com componentes celulares como o DNA, proteínas e lipídeos, provocando alterações estruturais em suas moléculas, o que constitui cerca de 30% do efeito biológico das radiações. O efeito indireto se dá quando a radiação interage com as moléculas de água presentes no meio intracelular, formando os chamados produtos da radiólise da água ($\text{OH}\cdot$, $\text{H}\cdot$, elétron aquoso e outros). Este efeito, denominado radiólise da água, corresponde à cerca de 70% do efeito biológico produzido pelas radiações e sua maior ocorrência, deve-se ao fato de a água ocupar grande parte da composição celular (MICHAELS & HUNT, 1978).

As alterações químicas que a radiação causa em proteínas são: fragmentação, "cross-linking", agregação e oxidação pelos produtos gerados na radiólise da água (MOON & SONG, 2001).

Esses produtos da radiólise da água passam por uma variedade de reações, incluindo a abstração de hidrogênio, transferência de elétrons (oxidação ou redução do substrato), adição, fragmentação e rearranjo, dimerização e substituição de aminoácidos, peptídeos e proteínas (HAWKINS & DAVIES, 2001). Nestas últimas, ainda, a interação dos produtos da radiólise da água com aminoácidos das cadeias protéicas promove desaminação (BUTLER *et al*, 1987; GARRISON, 1987). Apesar destes efeitos ocorrerem ao acaso, alguns sítios podem ser mais favoráveis, devido à transmissão de energia intramolecular (FARRAGI *et al*, 1978).

A irradiação de proteínas, no estado seco ou em solução aquosa, pode induzir uma série de alterações na estrutura protéica, indo desde simples ionizações, até alterações drásticas na sua estrutura primária. Podem ocorrer alterações oxidativas decorrentes da interação dos radicais livres primários, produzidos após a radiólise da água, com a molécula de proteína, alterando sua estrutura e podendo conferir à mesma, cargas negativas (WALES & KUSEL, 1992).

1.2 Venenos

No Brasil são encontrados quatro gêneros de serpentes peçonhentas de importância médica: *Bothrops* (jararacas), *Crotalus* (cascavéis) e *Lachesis* (surucucus), pertencentes à família *Viperidae*, e *Micrurus* (corais), pertencente à família *Elapidae* (CARDOSO & BRANDO, 1992; AMARAL *et al*, 1987; BJARDSON & FOX, 1988-89). Cerca de 20.000 casos de acidentes ofídicos são registrados anualmente no país, dos quais, mais de 70% estão relacionados às serpentes do gênero *Bothrops* (WANDY *et al*, 1998).

A composição dos venenos de serpentes varia de acordo com a espécie das mesmas. Por exemplo, venenos de cascavéis são constituídos por proteínas tóxicas com inúmeros efeitos bioquímicos, imunológicos e farmacológicos (NASCIMENTO *et al*, 1995).

Os venenos botrópicos, por sua vez, possuem uma grande quantidade de enzimas, dentre elas, a fosfolipase A₂ e a L-aminoácido oxidase. Apesar da

complexidade de componentes presentes nestes venenos, seus efeitos estão relacionados às suas propriedades proteolíticas, hemorrágicas e coagulantes (CARDOSO, 1999). Nos acidentes botrópicos, as lesões locais podem ser atribuídas à atividade proteolítica destes venenos sendo que, após sua absorção, ocorrem hemorragias em diversos órgãos e tecidos (GUARNIERI, 1992; CARDOSO, 1999).

Objeto deste estudo, a bothropstoxina I (BTHX I), um homodímero do veneno de *Bothrops jararacussu*, é uma miotoxina com 13721 Da.

Apesar de não apresentar atividade catalítica, a BTHX I pode ser considerada uma fosfolipase A₂ por apresentar grandes semelhanças com as fosfolipases A₂ de venenos de serpentes da família *Crotalidae* (SPENCER, 2000).

As fosfolipases A₂ são uma classe de enzimas cálcio-dependentes que catalisam a hidrólise da ligação 2-acil-ester do 3-sn-fosfolipídeo, sendo constituídas por uma cadeia simples de 122 resíduos de aminoácidos, com massa molecular em torno de 14000 Da (CHO *et al*, 1988). Essas enzimas podem ser isoladas de venenos de serpentes, apresentando propriedades tóxicas e digestivas; venenos de mamíferos e, mais recentemente, de extratos de plantas medicinais (LIZANO *et al*, 2003). Os venenos de serpentes contêm um grande número de isoenzimas de fosfolipase A₂, que podem apresentar propriedades neurotóxicas, miotóxicas, cardiotoxícas ou anticoagulantes (GUILLEMIN *et al*, 2003), o que representa um problema na clínica e terapia, uma vez que nos envenenamentos com serpentes cujo veneno encerra miotoxinas, a ação destes componentes não é de todo neutralizada pelo soro específico (antibotrópico).

Os anti-soros, único tratamento eficaz para uso humano (soros heterólogos), são medicamentos contendo imunoglobulinas específicas purificadas, geralmente a partir de plasma, de eqüídeos hiperimunizados com venenos de animais peçonhentos. Após o processo de purificação e de concentração são feitas as adequações necessárias para que o produto final, sob a forma líquida ou liofilizada, atenda às exigências de potência e de segurança, estabelecidas pela Organização Mundial de Saúde (SOERENSEN, 1990).

A produção de plasma ou soro hiperimune depende da imunogenicidade de cada veneno sendo que alguns gêneros de serpentes apresentam veneno com baixa capacidade imunogênica e alta toxicidade. Isto impede a inoculação de doses capazes de estimular uma resposta imunológica adequada, além de prejudicar o animal produtor, tendo, como consequência, uma baixa produtividade de soro (DANIEL *et al*, 1987).

Por estas razões é totalmente justificado o desenvolvimento de técnicas que reduzam a toxicidade do veneno, protegendo os animais soroprodutores e baixando o custo dispensado à manutenção dos mesmos, sem com isso prejudicar a resposta imunológica.

Uma vez que os venenos de serpentes são constituídos basicamente de proteínas vislumbrou-se a possibilidade de usar a radiação ionizante como ferramenta para modificar algumas propriedades das toxinas, buscando diminuir a toxicidade sem, contudo, abolir as propriedades imunológicas.

Dentre as metodologias mais estudadas estão a radiação U.V, formaldeído, carboximetilcelulose, raios-x, fotoxidação, glutaraldeído, iodação e raios gama, sendo que a radiação ionizante tem se destacado, mostrando ser uma excelente ferramenta na destoxicação de venenos por manter ou até mesmo melhorar suas propriedades imunológicas (CARDI *et al*, 1998).

1.3 Atenuação de Venenos Animais

O tratamento de materiais biológicos (como proteínas, enzimas e etc) utilizando a radiação, vem sendo aplicado em vários campos. Quando estes materiais biológicos são irradiados ocorrem várias mudanças em suas estruturas. Este fato é de grande importância, pois o entendimento destas mudanças provocadas pela radiação, pode ajudar a prevenir o dano ou melhorar a qualidade destes materiais (KUME & MATSUDA, 1995).

Na década de 60, ALEXANDER & HAMILTON verificaram que a irradiação de proteínas promove modificações estruturais nas mesmas, como por exemplo, desorganização da estrutura secundária, provavelmente devido à quebra de um grande número de pontes de hidrogênio (H-H).

Estes achados estimularam LAUHATIRANANANDA *et al.*, 1969 e SALAFRANCA, 1973, a irradiarem venenos de serpentes indianas, uma vez que os venenos de serpentes são constituídos basicamente por proteínas, podendo ter suas características modificadas.

No Brasil, na década de 80, devido à falta de soro antiofídico nos principais Institutos soro-produtores, iniciaram-se, no IPEN, pesquisas utilizando a radiação ionizante como ferramenta para destoxicar venenos de serpentes brasileiras. Dentre os trabalhos realizados desde então, está o de GUARNIERI (1992), que verificou os efeitos da radiação gama no veneno de *Bothrops jararaca*. A autora observou que o animal que recebeu o veneno de *Bothrops jararaca* nativo (Figura 1A) apresentou um foco de hemorragia pronunciado, diferentemente do animal que recebeu o veneno irradiado (Figura 1B).

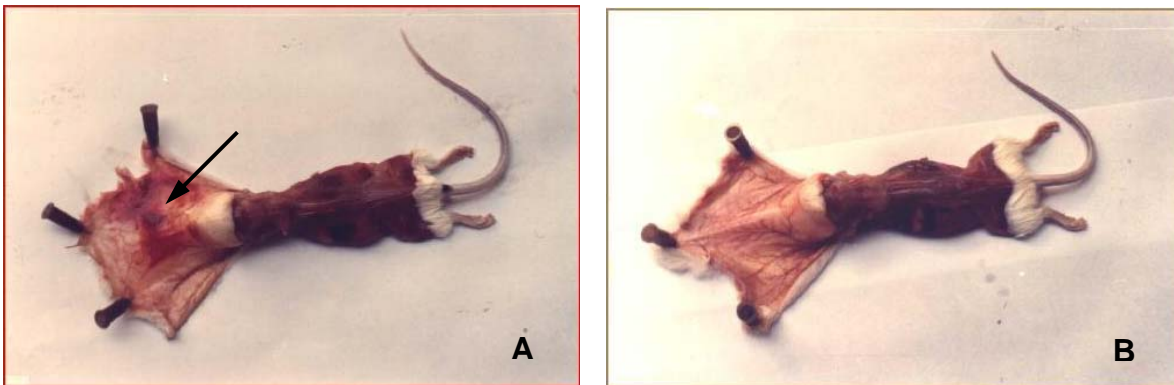


Figura 1 – Efeito do veneno de *Bothrops jararaca* nativo (A) ou irradiado (B) injetado via intradérmica, em camundongos.

Também pode ser citado o trabalho de CARDI (1999) que realizou estudos de captação da crotoxina nativa e irradiada por macrófagos peritoneais de camundongos, demonstrando que a crotoxina irradiada (Figura 2B) era mais facilmente fagocitada pelas células do que a crotoxina nativa (Figura 2A). Segundo o autor, este fato poderia ser explicado devido aos receptores de superfície, presentes em macrófagos, denominados receptores *scavengers*, que apresentam maior afinidade por macromoléculas oxidadas, como é o caso de toxinas

irradiadas. O autor observou ainda que a viabilidade como a morfologia dos macrófagos, expostos a crotoxina irradiada estavam mais preservadas.

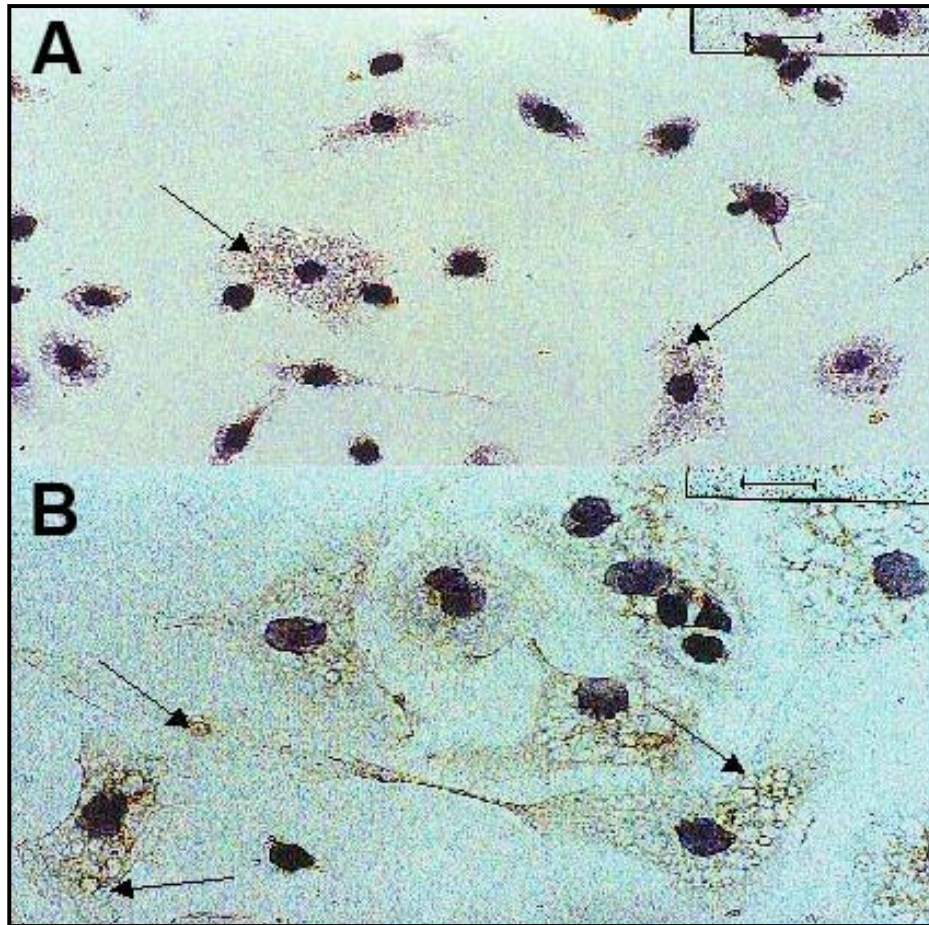


Figura 2 – Captação da crotoxina nativa (A) e da crotoxina irradiada (B) por macrófagos peritoneais de camundongos, ensaiados por imunoperoxidase indireta (Complexo Avidina – Peroxidase).

OLIVEIRA (2003) fez um estudo comparativo entre veneno de *Bothrops jararaca* nativo e irradiado (radiação gama de ^{60}Co) em caprinos. O autor observou que o animal que foi imunizado com o veneno de *Bothrops jararaca* nativo (Figura 3A) apresentou formação de edema no local do inóculo, enquanto o animal que recebeu o veneno irradiado (Figura 3B) não apresentou qualquer sinal de inchaço.



Figura 3 – Inóculo do veneno de *Bothrops jararaca* nativo (A) e irradiado (B) em caprinos.

Venenos de serpentes, geralmente, são altamente tóxicos e pouco imunogênicos. Acidentes envolvendo serpentes do gênero *Bothrops* (p.ex., jararaca, jararacussu e urutu), normalmente desencadeiam efeitos locais, tais como hemorragia, isquemia e necrose, bem como sistêmicos, que vão desde alterações na coagulação do sangue até quadros de insuficiência renal aguda (IRA).

Estudos com proteínas, submetidas à ação da radiação gama, têm demonstrado a eficiência do método como ferramenta na produção de melhores imunógenos, somado à vantagem de não adicionar novas moléculas à amostra durante o processo, como no caso do uso de agentes físicos ou químicos (GRASSET, 1945; GUIDOLIN *et al*, 1989) e à melhoria da antigenicidade de muitas proteínas (OKONOGI *et al*, 1979; PINHO *et al*, 1995; NASCIMENTO *et al*, 1996).

Destruição de aminoácidos e rompimento de cadeias peptídicas, alterações de ligações (H-H e S-S) intramoleculares e reorganização da molécula protéica por agregação, são algumas das alterações estruturais que podem ocorrer,

levando às mudanças nas propriedades biológicas (enzimáticas, farmacológicas e imunológicas) das proteínas (ADAMS *et al*, 1972; DERTINGER & JUNG, 1970; GARRISON, 1987). Existem indicações de uma diferença quanto à radiosensibilidade dessas várias funções biológicas, sendo as propriedades imunológicas as mais radorresistentes.

1.4 Sistema Imune

O sistema imune é uma entidade biológica altamente dinâmica. Em consequência disso, a resposta imune observada nos organismos superiores é, na verdade, produto de um longo período de interação entre os seres vivos. Por esta razão, é importante conceber a idéia de que organismos e moléculas novas são selecionadas a todo o momento, bem como os próprios seres vivos são selecionados por estes organismos e moléculas. Desta maneira, impõe-se à resposta imune uma elevada variabilidade, a qual pode ser observada através da adoção de diferentes estratégias, muitas simultâneas e, sistematicamente direcionadas com o propósito de obter uma situação de equilíbrio. Este amplo espectro de resposta foi e sempre será determinante à sobrevivência das espécies (JANEWAY *et al*, 2002).

O sistema imune é constituído por células e moléculas altamente especializadas no combate aos agentes infecciosos, havendo dois tipos fundamentais de resposta imune: a inata (ou natural) e a adaptativa. A resposta inata ocorre sem exigir uma prévia exposição ao agente infeccioso, enquanto a resposta adaptativa lança mão da produção de anticorpos contra um determinado agente e é adquirida durante a vida de um indivíduo como reação adaptativa à presença de patógenos específicos (DELVES & ROITT, 2000). Tanto a imunidade inata como a adaptativa dependem da atividade de células brancas do sangue, ou seja, os leucócitos. A imunidade inata é mediada, principalmente, por granulócitos e macrófagos. Os macrófagos de humanos e outros vertebrados parecem ter evoluído de células fagocitárias de animais mais simples e atuam como células apresentadoras de antígeno, muitas vezes utilizando-se de receptores presentes na superfície de sua membrana para interagir com antígenos, microrganismos ou

outras células. Já as respostas adaptativas são mediadas por linfócitos, que proporcionam a imunidade duradoura (AUGER & ROSS, 1992; JANEWAY *et al*, 2002).

Os componentes moleculares da resposta inata incluem o sistema complemento, proteínas de fase aguda, citocinas e interferons, enquanto a resposta adaptativa envolve a proliferação antígeno-específica de células B e T, que ocorre mediante a interação de receptores de superfície destas células com os antígenos.

Há dois caminhos pelos quais antígenos podem interagir com as moléculas expressas pelo Complexo de Histocompatibilidade Principal (MHC). Antígenos endógenos, como vírus ou proteínas tumorais, se ligarão às moléculas MHC de classe I e serão processados por vias intracelulares. Alternativamente, células especializadas na apresentação de antígenos podem capturar antígenos exógenos por meio da endocitose. Dentre as células apresentadoras de antígeno incluem-se as células dendríticas, as células B e os macrófagos. Esses antígenos exógenos são processados de uma forma diferente dos endógenos, sendo re-expressados por moléculas MHC de classe II (PARKIN & COHEN, 2001).

Existem dois tipos majoritários de células T efetoras, os linfócitos T auxiliares (*helper*) (Th) e os linfócitos T citotóxicos (Tc), que carregam em suas superfícies moléculas CD4 ou CD8, respectivamente. As células Th CD4+ são as orquestrantes da resposta imune, reconhecendo antígenos externos, e ativando outros caminhos da resposta imune mediada por células a fim de erradicar o patógeno. As células T CD8 lisam as células-alvo que apresentam fragmentos antigênicos, ligados às moléculas MHC de classe I (DELVES & ROITT, 2000).

As células Th CD4+ reconhecem antígenos ligados às moléculas MHC de classe II. As células Th CD4+ apresentam dois subtipos, células Th1 e células Th2, que surgem de um precursor Th0 e são diferenciadas de acordo com as citocinas que produzem, pois morfologicamente são indistinguíveis. Contudo, a resposta gerada é muito diferente. As células Th1 produzem a interleucina 2, que induz a proliferação das células T, incluindo aquelas células CD4+ da resposta autócrina. A interleucina 2 também estimula a divisão das células T CD8+ e sua

citotoxicidade. Outra citocina produzida pelas células Th1 é o interferon γ , responsável pela ativação de macrófagos que eliminam patógenos intracelulares como micobactérias, fungos, protozoários e ainda, induzem a citotoxicidade das células “natural killer”. Portanto, as citocinas produzidas pelas células Th1, são as principais responsáveis pela indução da resposta inflamatória (PARKIN & COHEN, 2001; CHANG, *et al*, 1990).

Existe um *feedback* positivo que se refere ao fato do interferon γ estimular as células Th0 a transformarem-se em células Th1 e, ao mesmo tempo, inibindo a diferenciação de células Th2. A resposta Th1 é essencial no controle da replicação de patógenos intracelulares, mas possivelmente contribui na patogênese de doenças autoimunes como a artrite reumatóide e a esclerose múltipla. As células Th2, por sua vez, produzem as interleucinas 4, 5, 6 e 10, que favorecem a produção de anticorpos. A interleucina 4 induz as células B a produzir IgE e a interleucina 5 promove o crescimento de eosinófilos. A interleucina 4 também promove um *feedback* positivo ao favorecer a indução da resposta Th2 e suprimir a diferenciação de células Th1. Assim, a resposta Th2 está associada com doenças alérgicas (DELVES & ROITT, 2000; PARKIN & COHEN, 2001).

As células B secretam imunoglobulinas e anticorpos antígeno-específicos, responsáveis pela eliminação extracelular de patógenos. O receptor de antígeno nas células B, também chamado de receptor de célula B, é uma molécula de imunoglobulina de superfície. Quando ativadas pelo antígeno, as células B diferenciam-se em células produtoras de anticorpos da mesma especificidade que seu receptor inicial. Há cinco classes de imunoglobulinas, IgG, IgA, IgM, IgD e IgE, sendo quatro subclasses de IgG e duas de IgA. Essas classes e subclasses de imunoglobulinas apresentam diferentes funções. Cada tipo de anticorpo pode ser produzido como uma molécula circulante ou como uma molécula estacionária. Esta última apresenta uma seqüência hidrofóbica transmembrana que ancora a molécula estacionária de anticorpo na membrana da célula B, configurando assim o receptor de célula B. Todas as imunoglobulinas são glicoproteínas e podem conter de 3 a 13 % de carboidratos, dependendo da classe de anticorpo, sendo

essenciais para a manutenção da estrutura do anticorpo (PARKIN & COHEN, 2001; DELVES & ROITT, 2000).

As células T auxiliam as células B na produção de anticorpos e podem eliminar patógenos intracelulares através da ativação de macrófagos e pelo aniquilamento de células infectadas. Ou seja, o antígeno reconhecido pela imunoglobulina de superfície da célula B é internalizado, processado e liga-se às moléculas MHC de classe II. Então, o complexo MHC de classe II: antígeno é exposto na superfície da célula B, onde poderá ser reconhecido por células T. Estas últimas, por sua vez, produzirão citocinas que estimularão o crescimento de células B conduzindo, assim, a sua divisão e maturação para a produção de anticorpos (JANEWAY *et al*, 2002; PARKIN & COHEN, 2001).

Considerando-se que inúmeras pesquisas têm revelado o poder da radiação em modificar proteínas, melhorando seu potencial imunológico e que estes achados são de relevante importância na busca e aprimoramento de imunógenos ou mesmo vacinas, um estudo mais aprofundado do tipo de resposta imunológica gerado contra uma proteína irradiada é de extrema importância, principalmente nos casos onde a substância é um mau imunógeno.

II – OBJETIVO

Avaliar aspectos da resposta imune de camundongos imunizados com Bothropstoxina I (BTHX I) nativa ou irradiada com raios gama de ^{60}Co .

III – MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Reagentes

Todos os reagentes utilizados neste projeto foram obtidos comercialmente e eram de qualidade pró-análise. A ovalbumina (SIGMA) foi utilizada como controle por não apresentar atividade tóxica.

3.2 Animais

Camundongos isogênicos B10.PL foram obtidos da colônia do Biotério do IPEN/CNEN/SP e mantidos em mini-isoladores com meio absorvente esterilizado, recebendo água e comida *ad libitum*. A manipulação destes animais, antes e durante os ensaios, esteve de acordo com as regras de cuidados de animais de laboratório (NIH publ. N° 86-23, revisado em 1985) e com os princípios de ética de experimentação animal (COBEA – Colégio Brasileiro de Experimentação Animal).

3.3 Purificação da BTHX-1

A BTHX-1 foi purificada do veneno total de *Bothrops jararacussu*, através de uma cromatografia de troca iônica, mais especificamente, de troca catiônica. Neste tipo de cromatografia, as moléculas ligam-se aos grupos de sinal contrário imobilizados na matriz, ou seja, os ânions ligam-se aos grupos catiônicos, nos trocadores de ânions, enquanto os cátions ligam-se aos grupos aniônicos dos trocadores de cátions (VOET *et al*, 2000).

Veneno total de *Bothrops jararacussu* cristalizado (Instituto Butantan) foi diluído em tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5,0 para uma concentração de 25 mg/mL, que foi centrifugada a 3000 *g* em uma micro centrífuga (Eppendorf). O sobrenadante foi filtrado em uma membrana com poro de 0,22 µm e injetado em uma coluna de troca catiônica Resource-S de 1 mL, conectada a um sistema FPLC (Farmacia), previamente equilibrada com tampão fosfato de sódio 25 mM, pH 7,8 (tampão A). O tampão B era constituído de fosfato de sódio 25 mM/NaCl 2M, pH 7,8. Após a injeção, a coluna foi lavada com 10 mL de tampão B 7,5%,

com um fluxo de 2,5 mL/minuto para eluição da fração não adsorvida à matriz. Em seguida, iniciou-se um gradiente linear (1%/mL) do tampão B, por 25 mL. Então, a coluna foi regenerada com 10 mL de tampão B, seguidos de 10 mL de A. A absorvância do eluato foi monitorada em 280 nm.

3.4 Irradiação das Proteínas

As proteínas (2 mg/mL) em solução salina foram submetidas à ação de raios gama de uma fonte de ⁶⁰Co (Gamma Cell, Atomic Agency of Canada Ltd) em uma taxa de dose de 5170 Gy/hora (dose total: 2000Gy). Todo o processo de irradiação foi desenvolvido sem a utilização de atenuador, de forma homogênea, na presença de oxigênio e uma amostra-controle foi mantida do lado de fora do irradiador durante todo o tempo de irradiação.

3.5 Eletroforese

Trata-se de um procedimento no qual macromoléculas são separadas, de acordo com sua carga ou tamanho, pela migração diferencial através de uma matriz de gel sob a influência de um campo elétrico. A eletroforese de proteínas é normalmente realizada em géis de agarose ou poliacrilamida com tamanho de poros característicos.

Amostras contendo 40µg das proteínas, na forma nativa ou irradiada, foram diluídas em tampão de amostra, com ou sem β-mercaptoetanol, e aquecidas a 95°C por 5 minutos. Em seguida, as amostras foram aplicadas em um gel de poliacrilamida a 15%, seguindo o protocolo descrito por LAEMMLI (1970). Também foram aplicados padrões de peso molecular conhecidos e a voltagem foi fixada em 90 v. Terminada a eletroforese, o gel foi corado com Coomassie blue 250-R.

3.6 Cromatografia de exclusão molecular (HPLC)

Nesta cromatografia os componentes da amostra analisada são separados de acordo com sua massa molecular.

A resina de exclusão molecular utilizada foi a TSK – 2000 da marca TOSOHAAS, previamente equilibrada com tampão fosfato de sódio (Na₂HPO₄) 0,02 M, em pH 7,0 e NaCl 0,15 M. A eluição da ovalbumina, na forma nativa ou irradiada, se deu em um fluxo de 1 mL/minuto.

3.7 Espectrometria de massa

A análise por espectrometria de massa identifica possíveis alterações estruturais em proteínas, por meio da massa dos compostos analisados.

O espectrômetro de massa é constituído por uma fonte de íons, um analisador de massa – que mede a relação carga/massa (m/z) do analíto ionizado – e um detector que registra o número de íons para cada valor de m/z.

Para realizar uma análise as amostras devem ser ionizadas, havendo dois métodos para tal:

- Ionização por “electrospray” (ESI);
- Ionização e desorção por laser da matriz assistida (MALDI) (AEBERSOLD & MANN, 2003).

O primeiro método, ESI, trabalha em pressão atmosférica, produzindo gotículas carregadas. Este processo pode ser utilizado para a produção de íons positivos ou negativos, mas no caso de proteínas e peptídeos utiliza-se, geralmente, o modo positivo.

Os íons gerados pelas fontes “electrospray” passam por um analisador de massa, que é responsável por separar os íons através de sua relação carga/massa (m/z).

As amostras de BTHX-1, nas formas nativa ou irradiada, foram submetidas à análise por espectrometria de massa. Para tanto, foram injetados 20 µL de cada amostra (2 mg/mL). O aparelho utilizado foi Q-Tof Ultima ES-MS Analysis.

3.8 Ensaio de Citotoxicidade

O ensaio segue o procedimento originalmente descrito por BOREFREUND e PUERNER, (1984) que se baseia na avaliação quantitativa de células viáveis após a exposição a um agente citotóxico, através da incubação com o corante supravital (do composto tetrazólico MTS) e um agente acoplador de elétrons (PMS). O MTS é biorreduzido pelas células a um produto denominado formazan, que é solúvel em meio de cultura celular e, a partir daí, efetua-se uma análise da coloração incorporada, de acordo com BARLTROP e col., (1991). A quantidade de MTS incorporado pela população celular é diretamente proporcional ao número de células viáveis em cultura. O agente testado que induz a toxicidade celular é medido em um intervalo de concentrações e, aquela que produzir uma redução de 50% na absorção do MTS, é aceita como parâmetro de citotoxicidade (CT50%).

3.8.1 Cultura de Células CHO

As células utilizadas no ensaio são da linhagem CHO K-1 (células de ovário de hamster chinês) obtida da American Tissue Culture Collection (ATCC). As células foram mantidas congeladas em tubos de 2 mL, em meio de cultura com DMSO. O descongelamento foi efetuado colocando-se o tubo em banho-maria a 37°C. Em seguida, as células foram centrifugadas a 500 g por 5 min com 10 mL de meio de cultura RPMI 1640, contendo 10% de soro fetal bovino (SFB) e 1% de antibiótico (penicilina e estreptomicina). O sobrenadante foi descartado e o precipitado de células foi retomado em 13 mL de meio de cultura com SFB e posteriormente transferido para um frasco de cultura de 75 cm² e, procedeu-se a incubação em incubadora de CO₂ à 5%, a 37°C.

Após a formação de uma monocamada de células, estas foram desprendidas do frasco com a enzima proteolítica tripsina. Antes, porém, as células foram lavadas com 10 mL de PBS (tampão fosfato de sódio), e depois adicionou-se 1,5 mL de tripsina 0,25% com EDTA. O frasco foi mantido em incubadora a 37° C até o desprendimento total das células. Adicionou-se então 10 mL do meio de cultura

com soro fetal e a suspensão celular foi centrifugada, a 500 g por 5 minutos, e o precipitado foi ressuspenso em meio RPMI 1640, contendo 10% de SFB. Em seguida, procedeu-se a contagem das células em câmara de Neubauer.

3.8.2 Teste de Citotoxicidade

A bothropstoxina nativa ou irradiada, numa concentração de 1mg/mL, foi adicionada em microplacas de 96 poços, em diluições crescentes, num volume de 50 µL/poço. Em seguida, as placas foram transferidas para incubadora de CO₂ a 5%, a 37°C, enquanto preparava-se a suspensão celular de 60000 células/mL. Posteriormente, as células foram plaqueadas numa concentração de aproximadamente 3000 células/poço, num volume de 50 µL/poço. O volume total nos poços foi de 100 µL. Os controles utilizados foram os seguintes: quatro poços contendo apenas meio de cultura (branco), num volume total de 100 µL/poço e quatro poços contendo meio de cultura mais células (controle negativo, ou seja, 100% de viabilidade celular), também no volume de 100 µL/poço. Em seguida, as placas foram incubadas em incubadora de CO₂ a 5%, a 37°C por 72 horas. Após este período, foi preparada uma mistura (20:1) de MTS 0,2% e PMS 0,9% em PBS, que foi adicionada as placas. Estas foram incubadas por duas horas em estufa de CO₂ a 37°C. A incorporação do corante foi medida, espectrofotometricamente, através de um leitor de microplacas a 490 nm contra o branco.

3.9 Produção de anticorpos específicos antiproteínas nativas ou irradiadas

Anticorpos antiproteínas, específicos, foram obtidos pela imunização de camundongos (B10.PL) com amostras de ovalbumina e BTHX I, nativas ou irradiadas, seguindo o método clássico de imunização preconizado por HARLOW & LANE (1988) com ligeiras modificações.

Durante todo o processo os camundongos foram inoculados, via subcutânea, no dorso, com soluções de 20µg/mL de cada amostra de proteína. No

primeiro inóculo utilizou-se adjuvante completo de Freund e após 15 dias, procedeu-se à coleta de sangue dos animais através do plexo retro-orbital, com o objetivo de pesquisar anticorpos específicos. No 2º inóculo, ovalbumina e BTHX I foram diluídas em adjuvante incompleto de Freund e passados 7 dias procedeu-se nova sangria. No 3º e 4º inóculos as proteínas foram diluídas em PBS e as coletas de sangue foram feitas a cada 7 dias.

O sangue dos animais foi colhido em tubos cônicos do tipo eppendorf, contendo 5ul de heparina (Liquemine - ROCHE), para evitar a coagulação. O plasma foi separado dos elementos figurados do sangue por centrifugação (Eppendorf Centrifuge 5810 R) (500 g, 10 minutos), imediatamente aliquotado e estocado (-80°C).

3.10 Ensaio Imunoenzimático (ELISA)

A presença de anticorpos específicos pode ser detectada pelo emprego de diferentes ensaios. Alguns medem a ligação direta do anticorpo ao seu antígeno, sendo estes ensaios baseados em interações primárias, como é o caso do ELISA (VENKATESAN & WAKELIN, 1993).

O plasma, obtido dos animais imunizados com ovalbumina ou BTHX I, na forma nativa ou irradiada, foi submetido ao ensaio de ELISA a fim de pesquisar-se a presença de anticorpos decorrente do processo de imunização e a reatividade das proteínas, na forma nativa, com os mesmos. Para tanto, o ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) foi feito em micro placas, às quais eram adsorvidas as proteínas (1,0µg/poço/100µl), em tampão carbonato/bicarbonato pH 9,6, “over night” a 4°C. Após sucessivas lavagens com PBS contendo 0,5% de Tween 20 (PBST), eventuais sítios de ligação foram bloqueados com solução de bloqueio (PBST + Leite-1g/100mL) por 1 hora, à temperatura ambiente. Após novas lavagens, o plasma foi diluído a 1/20000 e 1/40000, adicionado às placas e incubado por 1 hora, à temperatura ambiente. Seguindo a fase de lavagem acima descrita, os conjugados de peroxidase anti IgG1, IgG2a e IgG2b de camundongo, diluídos a 1/4000 em solução de bloqueio, foram adicionados nos poços predeterminados e incubados por 1 hora, à temperatura ambiente. As últimas

lavagens foram seguidas pela adição de cromógeno OPD (o-fenil-n-diamine), 0,5mg/mL de tampão citrato de sódio/ácido cítrico (0,05 M e pH 5,0), contendo 30% de H₂O₂ adicionado no momento do uso. A reação foi interrompida pela adição de 50ul de ácido cítrico 0,2M por poço e a absorvância, a 450nm, foi determinada em leitor de micro placas.

3.11 Proliferação Celular

Iniciou-se a padronização de um ensaio de proliferação celular para avaliar o comportamento de esplenócitos, retirados do baço de camundongos B10.PL, imunizados com ovalbumina e BTHX-1, nativas ou irradiadas, cultivados em presença de ambas as formas das proteínas.

O conteúdo do baço, retirado dos camundongos de forma estéril, foi lavado e homogeneizado com meio de cultura RPMI 1640 com 10% de SFB (soro fetal bovino) suplementado com antibióticos e transferido para tubos Falcon de 15 mL. Em seguida, esses tubos foram submetidos à centrifugação, em centrífuga CELM LS-3 plus, a 840 g, por 15 minutos. Posteriormente, trabalhando em fluxo laminar, o sobrenadante foi descartado, o “pellet” foi homogeneizado com 10 mL de solução de lise [cloreto de amônio 0,16M/Tris (hidroximetil) aminometane 0,17M] para romper as hemácias e novamente submetido à centrifugação. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o “pellet”, onde estavam os esplenócitos, foi homogeneizado com meio de cultura. Então, essa solução foi diluída para uma concentração de 1/1000 e procedeu-se a contagem das células em câmara de Neubauer. Após acertar a concentração de células (1x10⁶ células/poço), estas foram aplicadas em placas de 96 poços na presença do antígeno (ovalbumina e BTHX-1 nativas ou irradiadas). Em alguns poços, ao invés do antígeno, havia concanavalina A, um estimulante da proliferação celular, que foi utilizada como controle positivo. Então, as placas foram incubadas em estufa de CO₂, a 37° C por 48 horas. Após esse período, foi aplicada às placas a timidina triciada (Amershan Pharmacia Biotech[®]) (1mCi/poço em 20μl de meio) e procedeu-se à incubação em estufa de CO₂, a 37° C por aproximadamente 18 horas. Após a incubação as células foram colhidas em aparelho Cell Harvester

(Skatron[®]), utilizando papel Filter MAT 11731 (Skatron). As amostras coletadas foram colocadas em tubos apropriados contendo 3 mL de líquido de cintilação (PPO 2,5 Diphenyloxazole [5,0g] + POPOP (1,4-Bis [2-(5Phenyl) Oxazolyl] Benzene [5,0g] + 1 litro de Tolueno p.a). A radioatividade incorporada pelas células foi determinada em Beta-Cintilador e a contagem, apresentada em c.p.m. (cintilações por minuto).

IV - RESULTADOS

4.1 Purificação da BTHX-1

A cromatografia do veneno total de *Bothrops jararacussu* apresentou três picos distintos (Figura 4). O primeiro eluiu antes do início do gradiente e constitui a fração não adsorvida. O segundo pico foi detectado com uma concentração de 420 mM de NaCl, e corresponde a BTHX-1 (SPENCER, 2000). Um terceiro pico foi observado eluindo com 560 mM de sal.

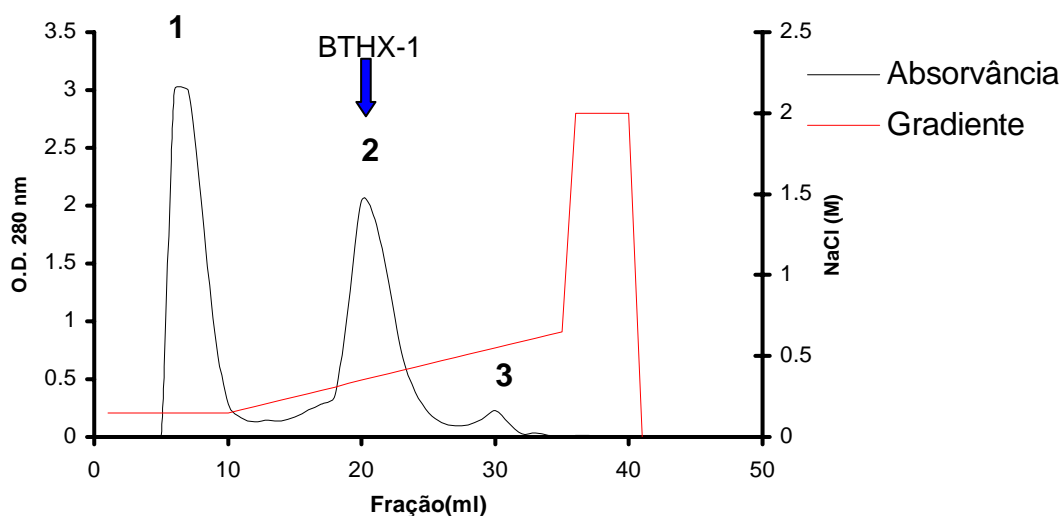


Figura 4 - Perfil cromatográfico de 25 mg de veneno total de *Bothrops jararacussu* em uma coluna Resource S (Amersham Pharmacia Biotech). Tampão A: fosfato de sódio 25 mM pH 7,8. Tampão B: fosfato de sódio 25 mM / NaCl 2 M pH 7,8. Fluxo: 2.5 mL/minuto. Volume coletado: 1 mL/tubo.

4.2 Eletroforese (SDS – PAGE)

Foi feita a eletroforese, em gel de poliacrilamida a 15%, das proteínas em estudo e, no caso da ovalbumina irradiada (Figura 5, linhas B e D), observou-se um arraste e o desaparecimento da banda correspondente a ovalbumina (44 kDa).

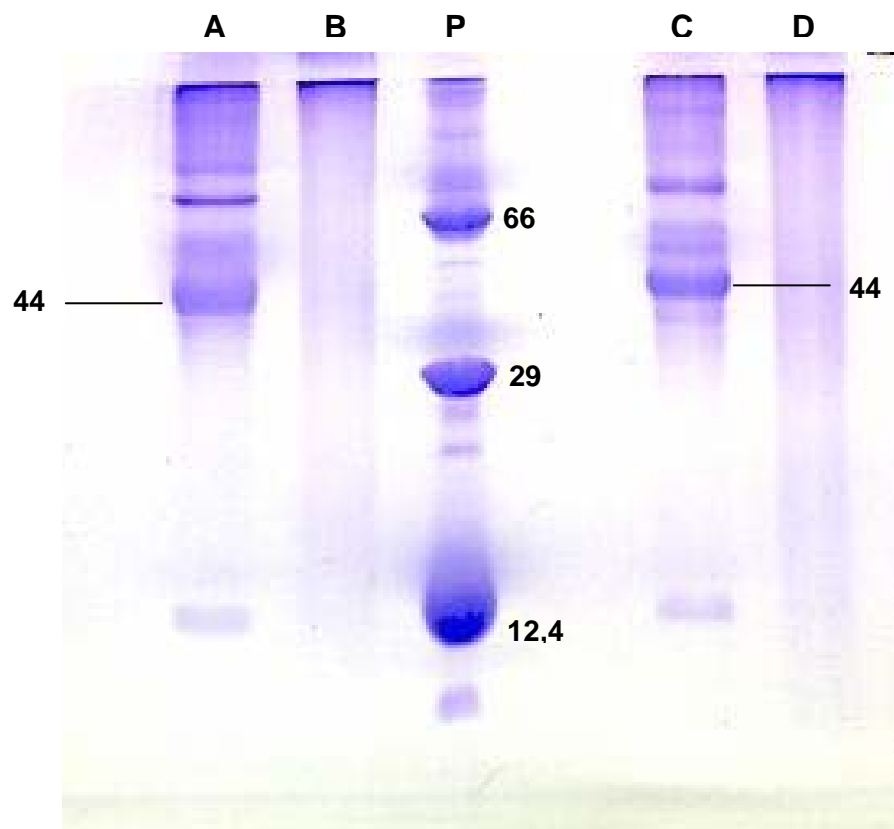


Figura 5 – Eletroforese em gel de poliacrilamida 15%. (A) Ovalbumina nativa não reduzida; (B) Ovalbumina irradiada não reduzida; (C) Ovalbumina nativa reduzida e (D) Ovalbumina irradiada reduzida. Padrão de peso molecular em KDa (P).

No caso da BTHX-1 irradiada (Figura 6, linhas B e D), observamos que houve a formação de bandas de maior peso molecular. E, com relação a BTHX-1 nativa bem como à irradiada, mesmo em presença do agente redutor, não houve a dissociação da subunidade que forma o dímero.

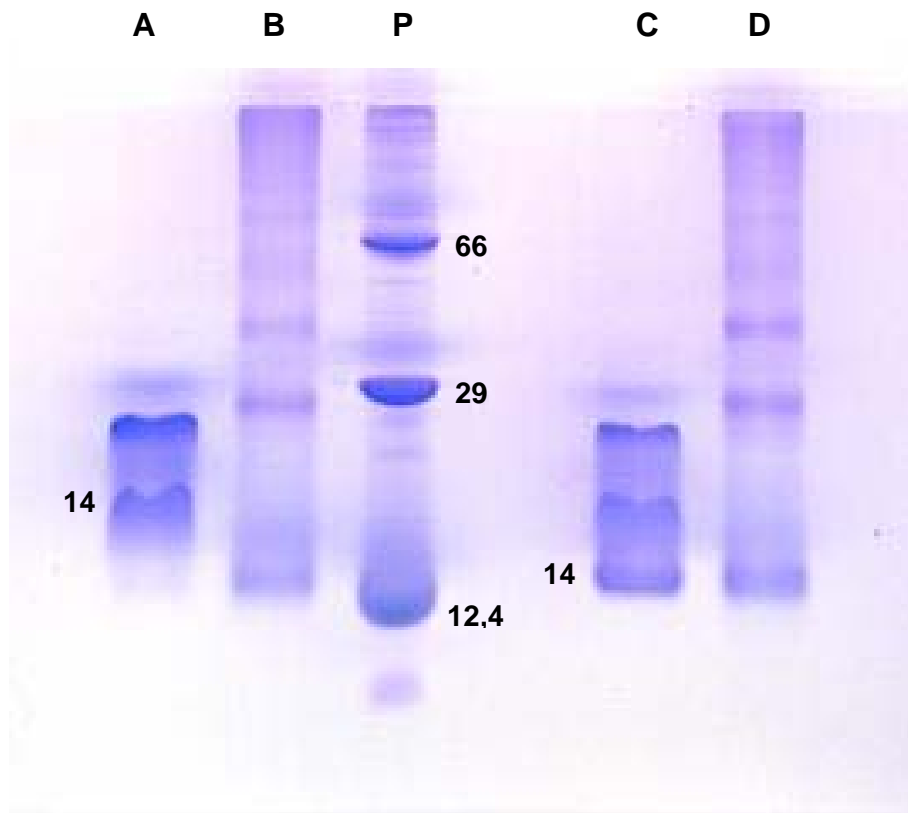


Figura 6 – Eletroforese em gel de poliacrilamida 15%. (A) BTHX-1 (14KDa) nativa não reduzida; (B) BTHX-1 irradiada não reduzida; (C) BTHX-1 (14KDa) nativa reduzida; (D) BTHX-1 irradiada reduzida. Padrão de peso molecular em KDa (P).

4.3 Cromatografia de Exclusão Molecular

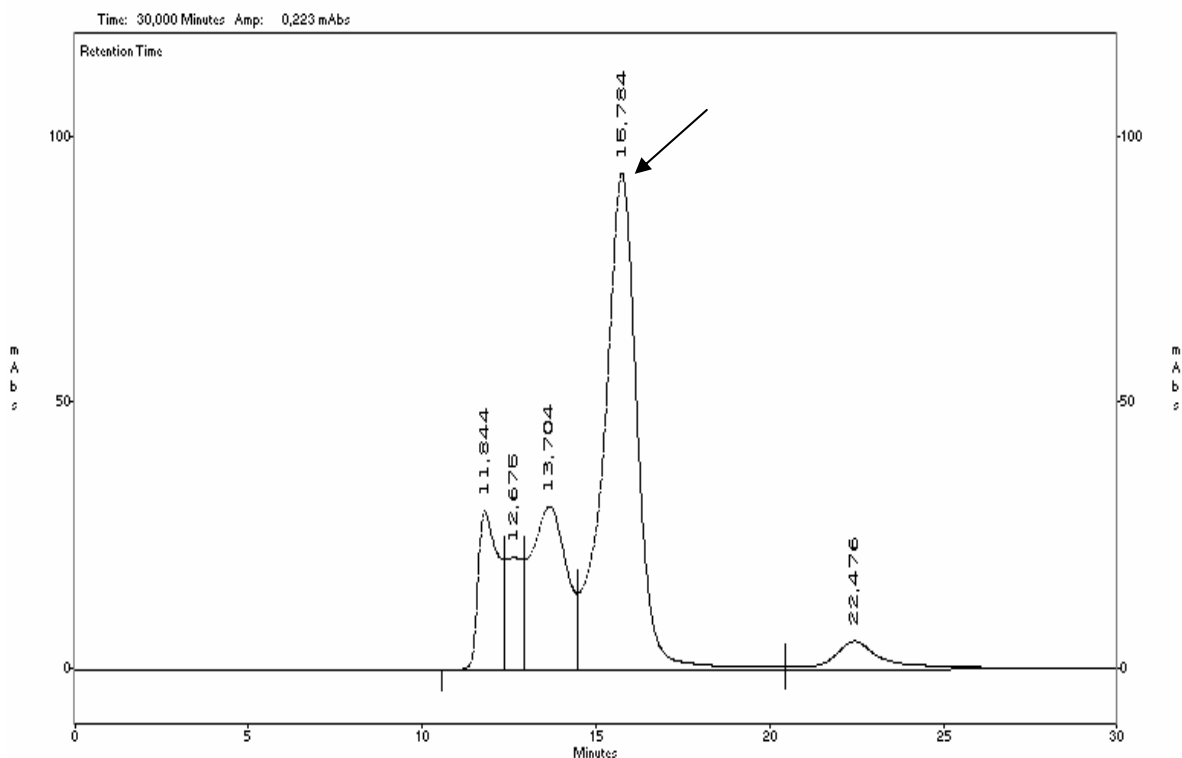


Figura 7 – Cromatografia de exclusão molecular da ovalbumina nativa em coluna TSK 2000 – marca TOSOHAAS (60 cm x 7,5 mm de diâmetro interno, poros de 125 Å e partículas de 10 µm), previamente equilibrada com tampão fosfato de sódio (Na_2HPO_4) 0,02 M, em pH 7,0 e NaCl 0,15 M. Fluxo: 1mL/minuto.

Na Figura 7, observa-se o perfil cromatográfico da ovalbumina na sua forma nativa, indicada pela seta. A Figura 8 apresenta o perfil cromatográfico da proteína na sua forma irradiada. Foi possível observar que a irradiação da ovalbumina resultou na formação de produtos de maior peso molecular, decorrente da agregação causada pela radiação γ na molécula da proteína.

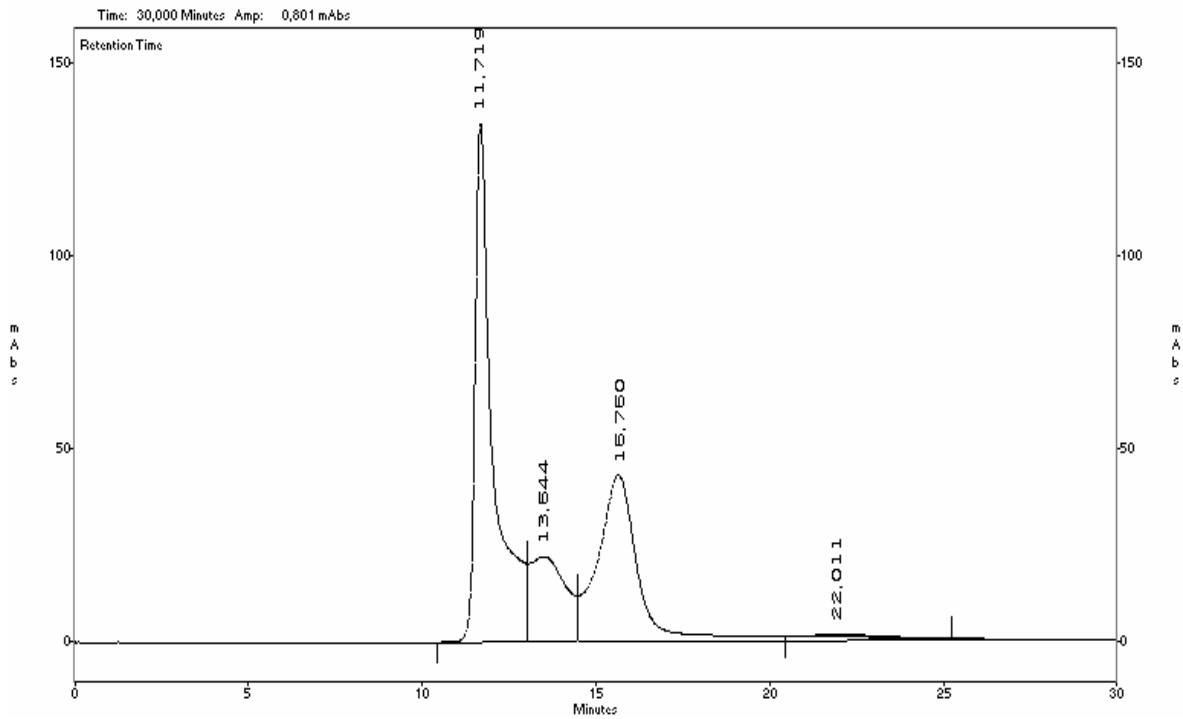


Figura 8 – Cromatografia de exclusão molecular da ovalbumina irradiada em coluna TSK 2000 – marca TOSHAAS (60 cm x 7,5 mm de diâmetro interno, poros de 125 Å e partículas de 10 µm), previamente equilibrada com tampão fosfato de sódio (Na_2HPO_4) 0,02 M, em pH 7,0 e NaCl 0,15 M. Fluxo 1mL/minuto.

4.4 Espectrometria de Massa

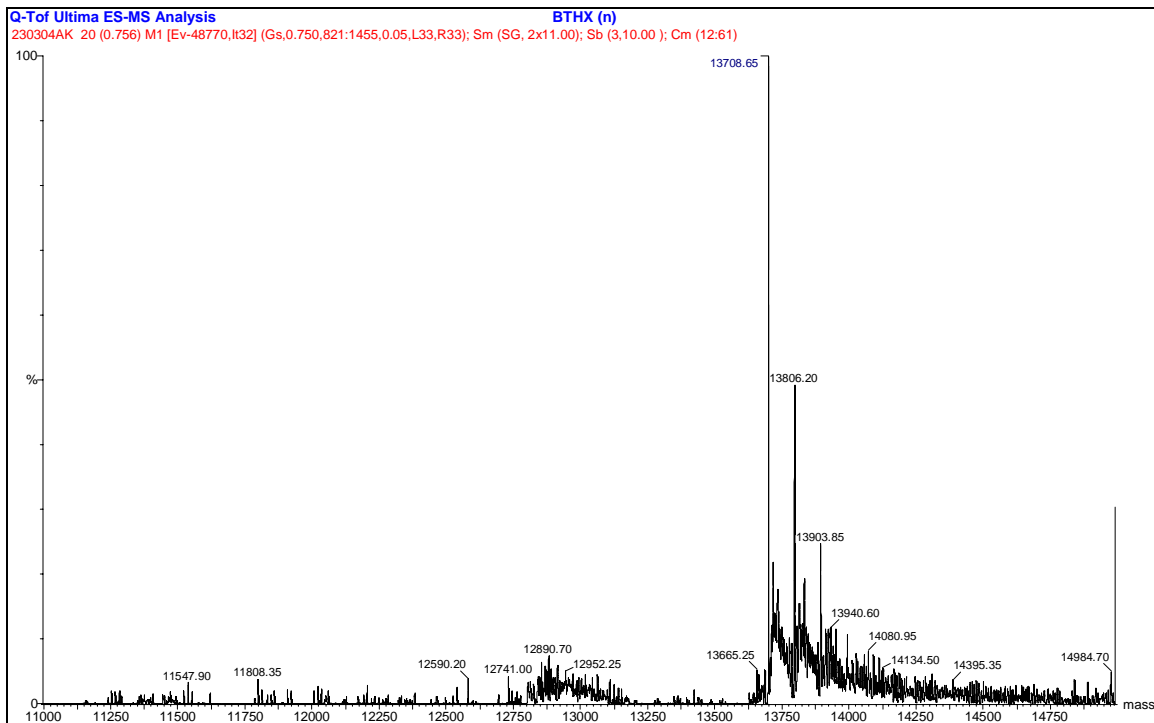


Figura 9 – Espectrometria de massa da BTHX-1 nativa em aparelho Q-ToF Ultima ES-MS Analysis.

Na Figura 9 observa-se um pico majoritário de 13708,65 Da, correspondente a BTHX-1 nativa, o qual, não aparece no espectro da proteína irradiada, representado na Figura 10. Em razão da complexidade do espectro da BTHX-1 irradiada, percebe-se que houve a formação de fragmentos de menor massa molecular, principalmente os de massa 11743 Da e 12084 Da.

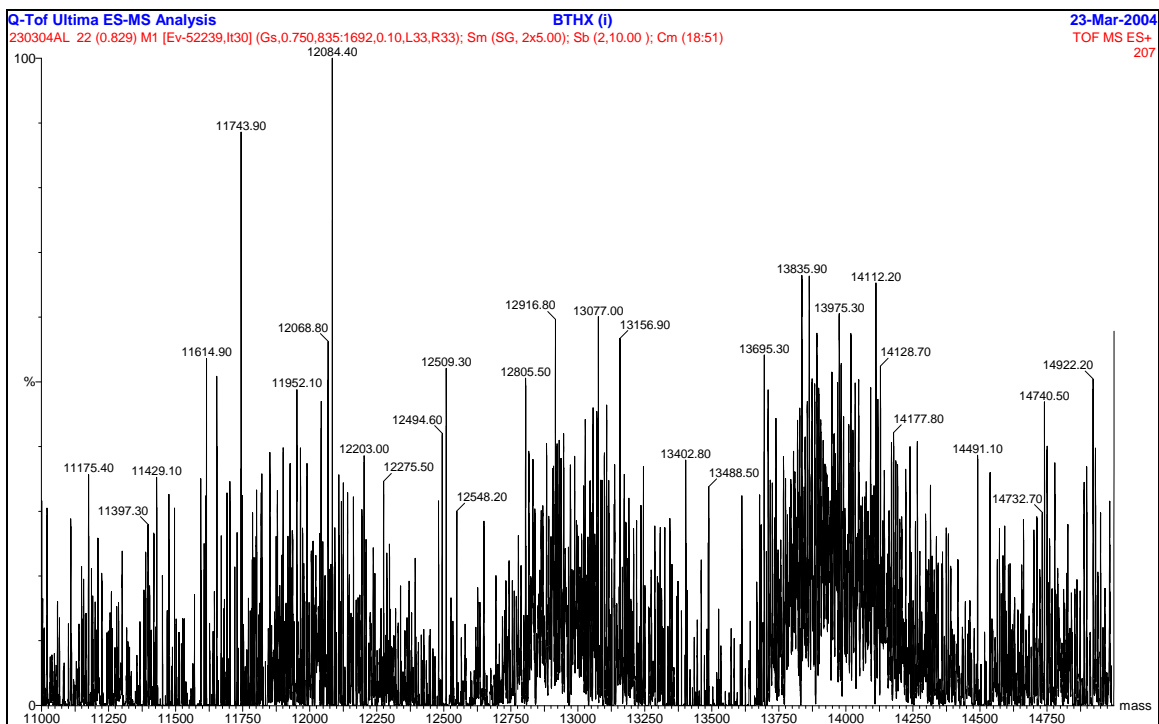


Figura 10 – Espectrometria de massa da bothropstoxina-1 irradiada em aparelho Q-ToF Ultima ES-MS Analysis.

4.5 Ensaio de Citotoxicidade

A Figura 11 mostra o resultado do teste de citotoxicidade da BTHX-1, nativa ou irradiada, em células CHO. Podemos observar que a EC50% (concentração tóxica 50%) da BTHX-1 nativa foi de aproximadamente 60 µg/mL, enquanto que a toxina irradiada apresentou uma EC50% de aproximadamente 345 µg/mL.

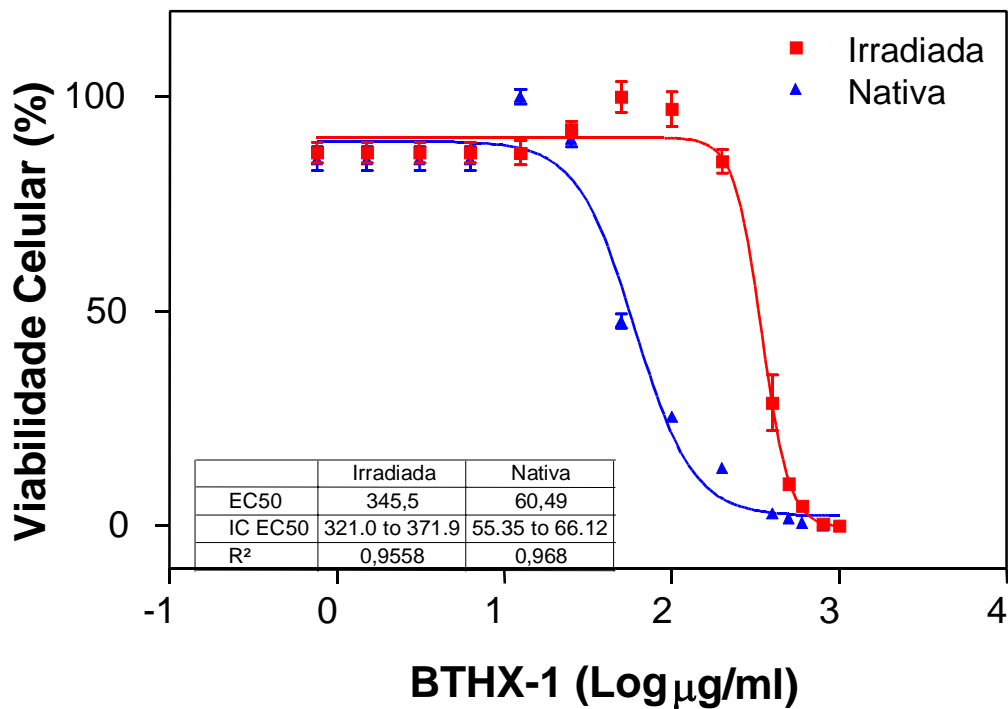


Figura 11 – Ensaio de citotoxicidade da BTHX-1, nativa ou irradiada, em células CHO. EC50% (concentração tóxica 50%).

4.6 ELISA

Na Figura 12 pode ser observado que a ovalbumina e a BTHX-1, nas formas nativa e irradiada, foram capazes de induzir a formação de anticorpos nos animais utilizados; e que, os anticorpos formados contra as proteínas irradiadas foram capazes de reconhecer as proteínas na forma nativa.

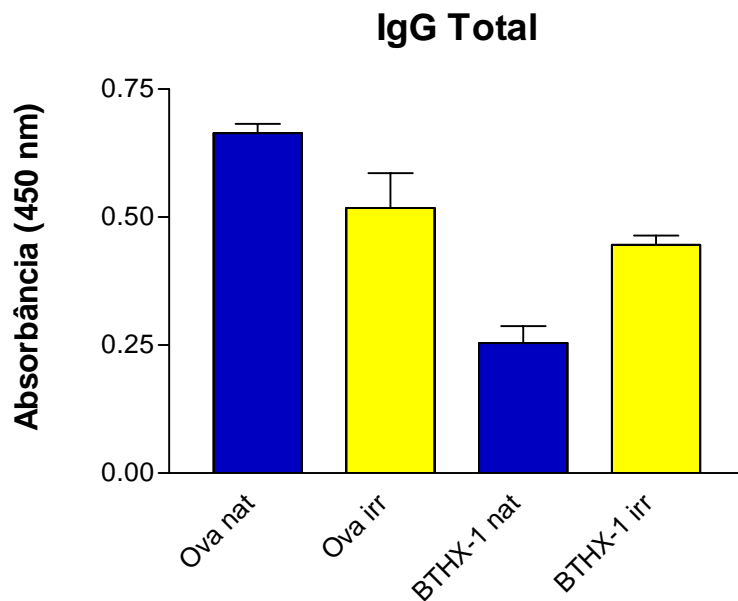


Figura 12 – Ensaio imunoenzimático para a avaliação da produção de anticorpos específicos (IgG total). Diluição do plasma: 1/20000.

Na Figura 13 observa-se que a ovalbumina, na forma nativa, apresentou títulos de anticorpos maiores que a proteína na forma irradiada para a dosagem de IgG1. Observou-se o mesmo com a BTHX-1. Nas Figuras 14 e 15, observa-se que as formas irradiadas de ambas as proteínas, mostraram títulos superiores às apresentadas pelas proteínas na forma nativa para a dosagem de IgG2a e IgG2b.

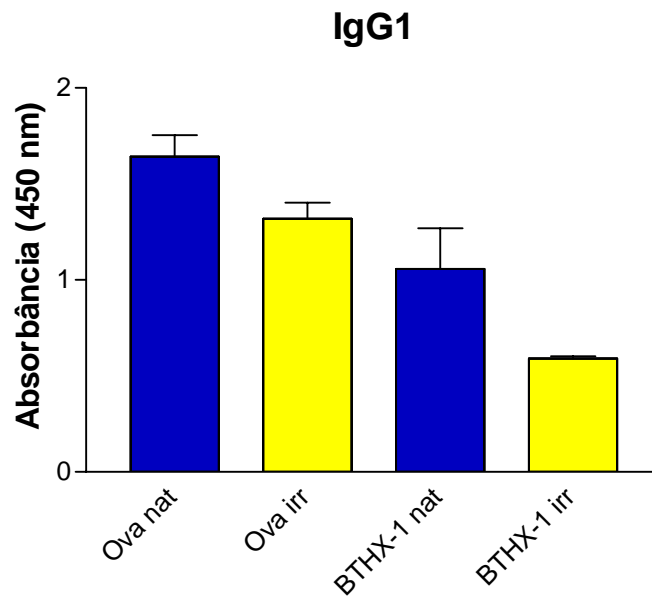


Figura 13 – Ensaio imunoenzimático para a avaliação da produção de anticorpos específicos (IgG1). Diluição do plasma: 1/20000.

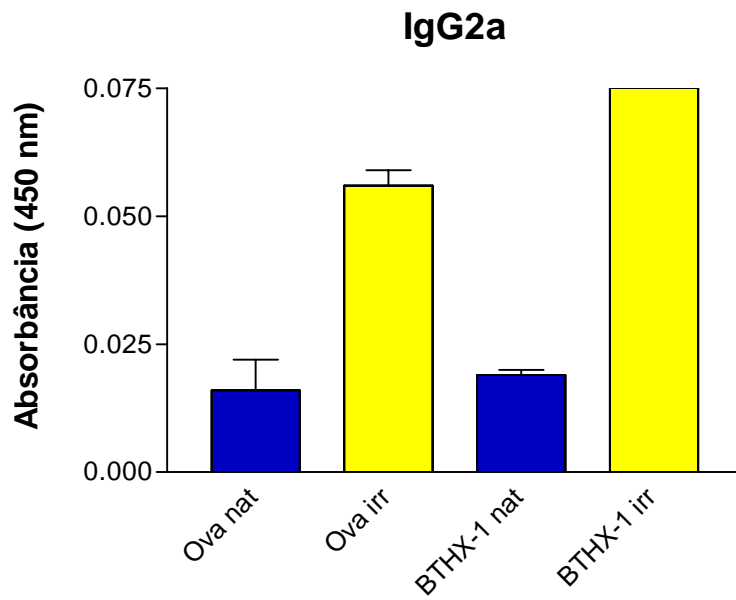


Figura 14 – Ensaio imunoenzimático para a avaliação da produção de anticorpos específicos (IgG2a). Diluição do plasma: 1/20000.

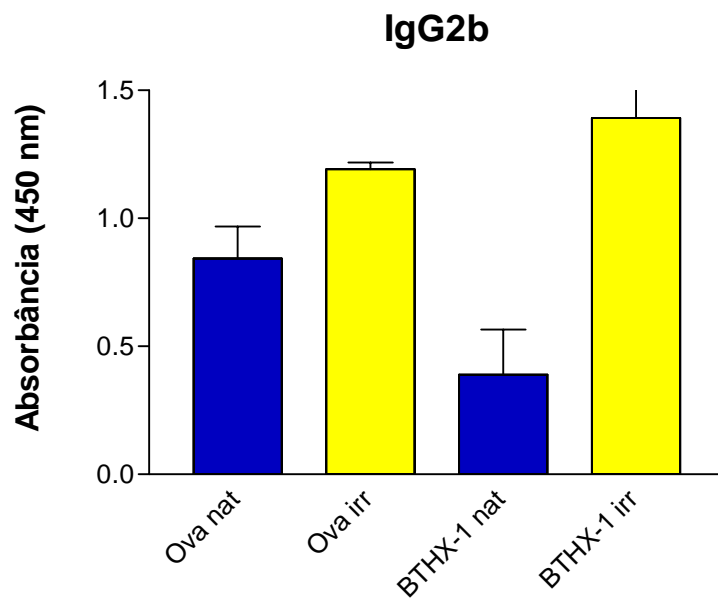


Figura 15 – Ensaio imunoenzimático para a avaliação da produção de anticorpos específicos (IgG2b). Diluição do plasma: 1/20000.

4.7 Proliferação Celular

A Figura 16 mostra o resultado da padronização da concentração de concanavalina A para a proliferação de esplenócitos de camundongos B10.PL não imunizados. Podemos observar que as células apresentaram um maior crescimento quando estimuladas com uma concentração de 0,25 µg de concanavalina A.

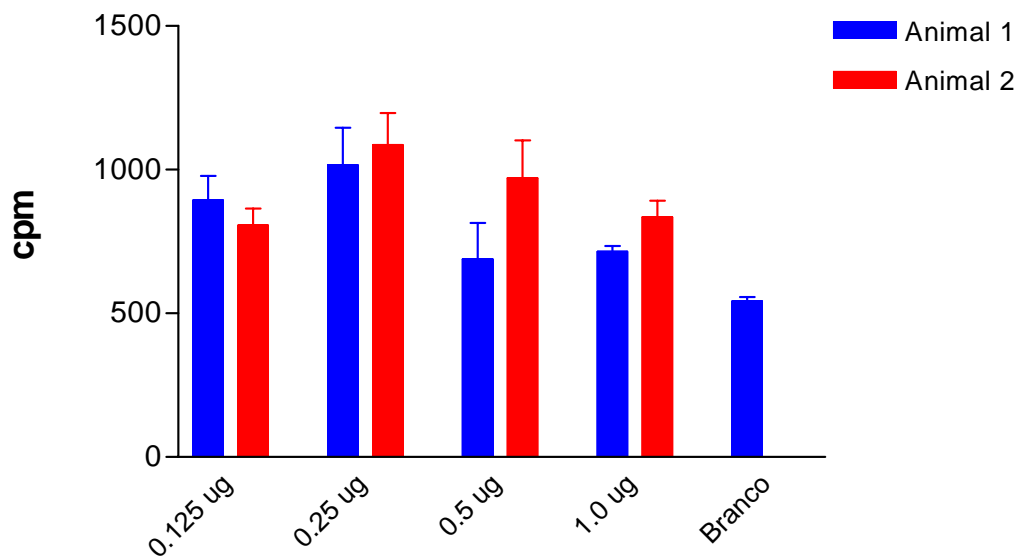


Figura 16 - Proliferação celular de esplenócitos de camundongos B10.PL não imunizados, estimulados com diferentes concentrações de concanavalina A. Branco (células e meio de cultura).

A Figura 17 mostra o resultado da proliferação de esplenócitos de camundongos B10.PL imunizados com ovalbumina nativa ou irradiada e estimulados com a proteína na forma nativa. Por outro lado, a Figura 18 apresenta o resultado da mesma proliferação anteriormente descrita, porém as células foram estimuladas com ovalbumina irradiada. Os resultados mostram que tanto as células dos animais imunizados com a ovalbumina nativa como aquelas dos animais imunizados com a proteína na sua forma irradiada, apresentaram crescimento semelhante quando estimuladas com ambas as formas da proteína.

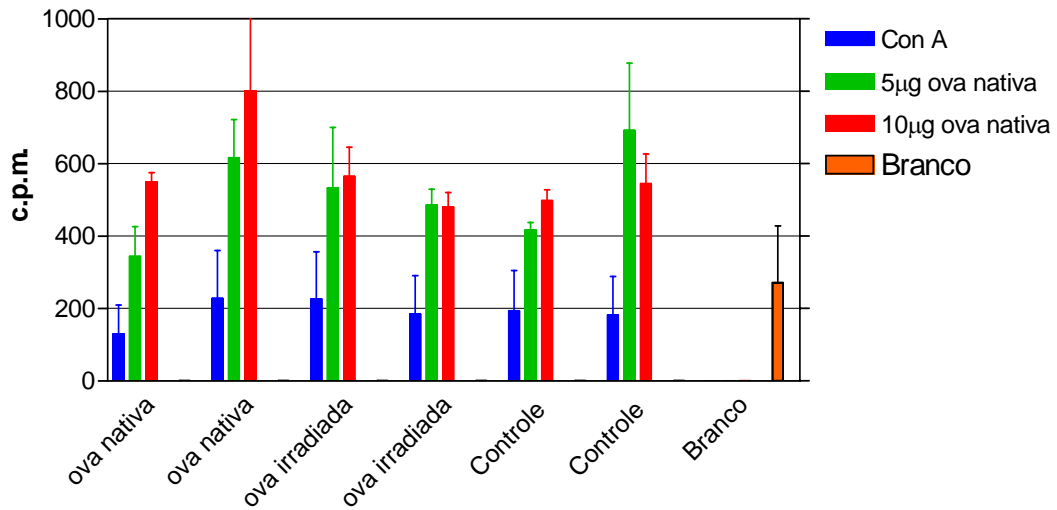


Figura 17 - Proliferação celular de esplenócitos de camundongos B10- PL imunizados com ovalbumina nativa (ova nativa) ou ovalbumina irradiada (ova irradiada), estimulados com ovalbumina nativa. Controles (animais não imunizados). Branco (células e meio de cultura). Concanavalina A (Con A): controle positivo.

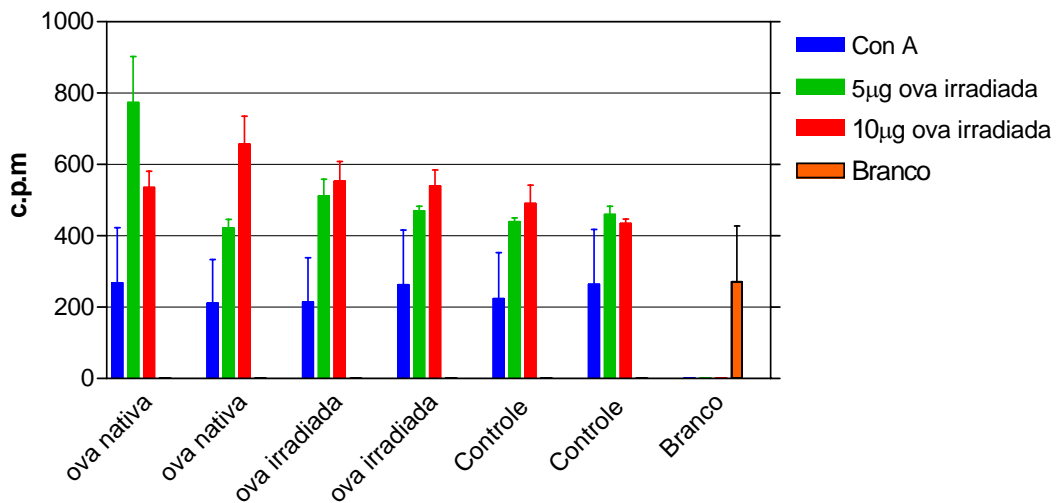


Figura 18 - Proliferação celular de esplenócitos de camundongos B10.PL imunizados com ovalbumina nativa (ova nativa) ou ovalbumina irradiada (ova irradiada), estimulados com ovalbumina irradiada. Controles (animais não imunizados). Branco (células e meio de cultura). Concanavalina A (Con A): controle positivo.

As Figuras 19 e 20 mostram os resultados da proliferação de esplenócitos de camundongos B10.PL imunizados com BTHX-1 nativa ou irradiada e estimulados com a toxina na forma nativa e na forma irradiada, respectivamente. Na Figura 19 podemos observar que as células do animal imunizado com a BTHX-1 na forma irradiada apresentaram crescimento em presença da toxina na forma nativa, crescimento este, semelhante ao das células do animal imunizado com a BTHX-1 nativa. Enquanto na Figura 20 os resultados mostram que tanto as células dos animais imunizados com a BTHX-1 nativa como aquelas dos animais imunizados com a toxina na sua forma irradiada, apresentaram um maior crescimento quando estimuladas com a toxina na forma irradiada.

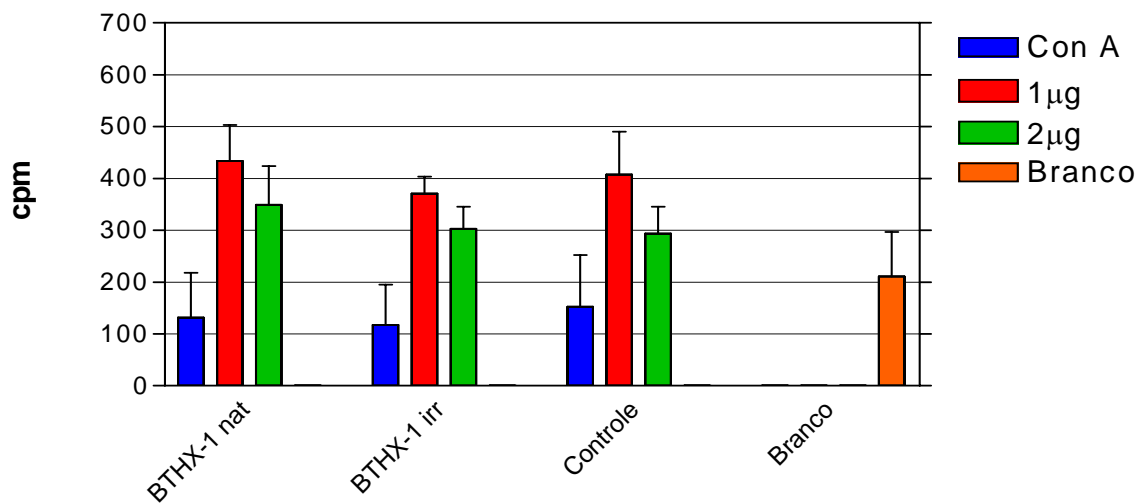


Figura 19 - Proliferação celular de esplenócitos de camundongos B10.PL imunizados com BTHX-1 nativa (BTHX-1 nat) ou irradiada (BTHX-1 irr), estimulados com a toxina nativa. Controle (animal não imunizado). Branco (células e meio de cultura). Concanavalina A (Con A): controle positivo.

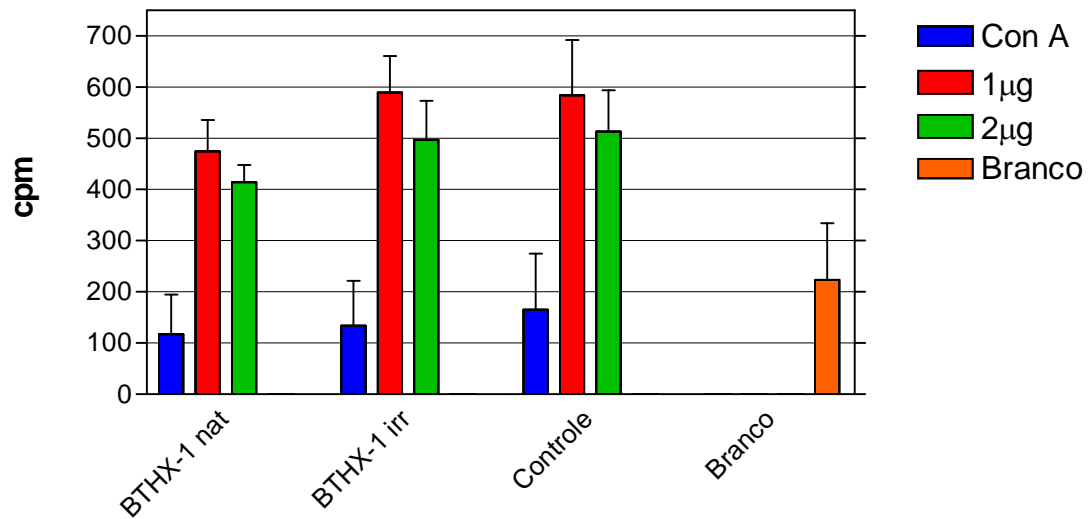


Figura 20 - Proliferação celular de esplenócitos de camundongos B10.PL imunizados com BTHX-1 nativa (BTHX-1 nat) ou irradiada (BTHX-1 irr), estimulados com a toxina irradiada. Controles (animal não imunizado). Branco (células e meio de cultura). Concanavalina A (Con A): controle positivo.

V – DISCUSSÃO

A cromatografia de troca catiônica se mostrou eficiente para isolar, com uso de gradiente salino, a Bothropstoxina -1 do veneno total de *Bothrops jararacussu*.

A eletroforese em gel de poliacrilamida, a 15%, das proteínas em estudo, permitiu identificar modificações estruturais após o processo de irradiação (radiação γ de ^{60}Co). As alterações observadas no perfil eletroforético da ovalbumina irradiada sugerem a ocorrência de quebras nas cadeias polipeptídicas, em consequência da ruptura de pontes covalentes, conforme observado por MOON & SONG (2001), que verificaram que as proteínas podem ser convertidas em agregados de alto peso molecular devido à geração de reações de “cross-linking” interproteínas, interações hidrofóbicas e eletrostáticas e, formação de pontes dissulfeto. Trabalhando com ovalbumina e ovomucóide, os autores observaram que a radiação γ promoveu a ruptura da estrutura ordenada das proteínas em questão, bem como a degradação e agregação das cadeias polipeptídicas, devido aos radicais oxigênio, formados durante a irradiação, e às alterações nas estruturas secundária, terciária e no perfil de massa molecular das proteínas.

A BTHX-1 irradiada, mesmo em presença do agente redutor, não apresentou dissociação das subunidades, sugerindo que a irradiação levou a formação de ligações covalentes resistentes ao agente redutor (β -mercaptoetanol).

A ovalbumina, na forma nativa e irradiada, foi submetida à cromatografia de exclusão molecular, a fim de melhor avaliar as prováveis modificações estruturais provocadas pelo processo de irradiação. O processo cromatográfico demonstrou que a irradiação da ovalbumina resultou na formação de produtos de maior peso molecular, decorrente da agregação causada pela radiação γ na molécula da proteína, corroborando os resultados observados na eletroforese. Tais efeitos, provocados pela radiação γ em proteínas, também foram observados por NASCIMENTO (1995) para a crotoxina (proteína majoritária do veneno de *Crotalus durissus terrificus*).

A espectrometria de massa da BTHX-1 irradiada indicou que houve incorporação de adutos de oxigênio na molécula, resultando em oxidação da toxina. Esses dados corroboram aqueles obtidos por CARDI (1999) que avaliou os mecanismos envolvidos na captação da crotoxina, nas suas formas nativa ou irradiada, por macrófagos peritoniais de camundongos, analisando para tanto, as características bioquímicas e imunológicas da crotoxina irradiada. O autor observou que a crotoxina irradiada, quando comparada à nativa, era melhor fagocitada pelos macrófagos, o que poderia ser explicado pela propriedade que a radiação tem de oxidar moléculas.

O ensaio de citotoxicidade celular da BTHX-1, nativa ou irradiada, realizado em células CHO, mostrou que a toxina na sua forma irradiada apresentou uma diminuição de toxicidade de cerca de cinco vezes, quando comparada à forma nativa. Ou seja, foi necessária uma quantidade muito maior da BTHX-1 irradiada para atingir a concentração capaz de eliminar 50% da população celular exposta à toxina. OLIVEIRA e col. (2001), que realizaram ensaios de citotoxicidade celular para venenos de serpentes Sul Americanas de importância médica, sugerem a existência de uma correlação entre a EC50% destes venenos e suas atividades biológicas.

Com relação aos aspectos imunológicos, analisando os dados obtidos para a produção de anticorpos contra ovalbumina e BTHX-1, nas formas nativa ou irradiada, observa-se que os anticorpos formados contra as proteínas na forma irradiada foram capazes de reconhecer as proteínas na forma nativa. Os dados observados para BTHX-1 irradiada corroboram os dados obtidos por CARDI (1999) que observou que os animais imunizados com a crotoxina irradiada apresentaram títulos de anticorpos maiores que aqueles imunizados com crotoxina nativa.

A ovalbumina e a BTHX-1, na forma nativa, induziram títulos de anticorpos superiores para a imunoglobulina 1 (IgG1), o que indica a predominância de uma resposta imunológica do tipo Th2. BREWER e cols. (1994) observaram esta relação em experimentos de depleção de macrófagos. Eles verificaram um aumento nos níveis séricos de IgG1, que tem sua produção influenciada por

células Th2, as quais participam da imunidade humoral, auxiliando a produção de anticorpos por linfócitos B (SPRENT & SURH, 2002).

Contudo, os animais imunizados com a ovalbumina ou BTHX-1, na forma irradiada, responderam com títulos de anticorpos, para IgG2a e IgG2b, superiores àqueles apresentados pelos animais imunizados com as proteínas na forma nativa. Este fato indica a predominância de uma resposta de células Th1 para proteínas irradiadas. Estas células influenciam a produção de IgG2a como foi observado por BREWER e cols. (1994) e estão envolvidas na imunidade celular, mais especificamente, na ativação de macrófagos (DELVES & ROITT, 2000).

A ativação diferencial de células T (Th1 ou Th2) poderia ser explicada pelo fato de que elas respondem seletivamente a antígenos apresentados por diferentes células apresentadoras de antígenos (APC). Ou seja, as células Th2 proliferam muito bem em resposta a antígenos apresentados por linfócitos B, pela cooperação celular com células dendríticas CD11c+CD11b+. Por sua vez, a proliferação de células Th1 é estimulada por antígenos apresentados por macrófagos (CHANG *et al*, 1990).

Os resultados para a avaliação da produção de anticorpos indicam que houve a predominância de uma resposta de células Th1 frente às proteínas irradiadas. BOONSTRA e cols. (2000) observaram que os efeitos da radiação ultravioleta, em células T, promovem modificações na apresentação de antígenos, havendo uma diminuição na produção de células Th1 e, em contrapartida, um acréscimo na produção de células Th2. No presente trabalho, os animais imunizados com ovalbumina e BTHX-1 na forma nativa, apresentaram maior produção de IgG1, imunoglobulina que está associada a células Th2. Utilizando a radiação gama (de ⁶⁰Co), observou-se um aumento na produção de IgG2a e IgG2b no plasma dos animais imunizados com ovalbumina e BTHX-1 na forma irradiada, imunoglobulinas estas, associadas às células Th1.

Ainda tratando do aspecto imunológico, o ensaio de proliferação celular de esplenócitos, retirados do baço de camundongos B10.PL imunizados com ovalbumina e BTHX-1, nativas ou irradiadas, teve início com a padronização da concentração de concanavalina A. Esta última, uma proteína de ligação a

carboidrato de considerável interesse biológico, pois essa interação com carboidratos serve de modelo para o sistema antígeno-anticorpo. A concanavalina A é, ainda, classificada como um mitógeno por induzir mitose em linfócitos de diferentes especificidades (BESSLER *et al*, 1974; JANEWAY *et al*, 2002). Após este primeiro passo, as células dos animais imunizados com a ovalbumina e BTHX-1 nas formas nativa ou irradiada, tiveram seu crescimento estimulado, *in vitro*, em presença de ambas as formas das proteínas. Em relação a ovalbumina, os resultados mostraram que tanto as células dos animais imunizados com a ovalbumina nativa como aquelas dos animais imunizados com a proteína na sua forma irradiada apresentaram crescimento semelhante, quando estimuladas com ambas as formas da proteína. No caso da BTHX-1, os resultados mostraram que as células dos animais imunizados com a toxina irradiada foram capazes de reconhecer a forma nativa da toxina (Figura 19), pois apresentaram crescimento semelhante ao das células dos animais imunizados com a BTHX-1 nativa. Podemos observar também, que as células dos animais imunizados com a toxina nativa bem como as células dos animais imunizados com a toxina irradiada apresentaram crescimento maior quando estimuladas com a BTHX-1 irradiada, o que nos sugere que a forma irradiada da BTHX-1 apresentou menor toxicidade em relação à sua forma nativa. CARDI (1999) trabalhando com crotoxina observou que a viabilidade de macrófagos peritoneais de camundongos era maior em presença da crotoxina irradiada.

É relativamente difícil detectar a proliferação de linfócitos normais em resposta a um antígeno específico, pois apenas uma pequena quantidade de células será estimulada a se dividir. Porém, este é o ensaio mais freqüentemente utilizado para avaliar a resposta dessas células após a imunização com um determinado antígeno, mas obtêm-se poucas informações sobre a capacidade funcional de resposta dos linfócitos (JANEWAY *et al*, 2002).

A radiação gama apresenta grande eficiência na atenuação de venenos de serpentes e toxinas isoladas, como a BTHX-1, pois apesar de promover alterações físico-químicas na molécula destas proteínas, não interfere na capacidade de induzir uma resposta imunológica (NASCIMENTO *et al*, 1996; SPENCER, 2000).

O mesmo ocorre com a ovalbumina, proteína não tóxica encontrada em maior quantidade em ovos brancos, que apesar de ser termo e quimicamente estável também sofre modificações em sua atividade biológica devido à ação da radiação, mas, continua capaz de induzir resposta imunológica (YANG *et al*, 1996). Estes dados corroboram os resultados obtidos em nossas pesquisas que vão um pouco além e comprovam que proteínas irradiadas induzem resposta preferencialmente do tipo Th1, sugerindo uma maior participação das células do sistema retículo endotelial na apresentação de antígeno.

VI - CONCLUSÕES

- A radiação γ de ^{60}Co , na dose de 2000 Gy causou alterações nas moléculas de ovalbumina e BTHX-1.
- A espectrometria de massa da BTHX-1 irradiada indicou que a radiação γ de ^{60}Co promoveu a oxidação da toxina.
- O ensaio de citotoxicidade celular da BTHX-1, realizado em células CHO, mostrou que a toxina irradiada é cerca de cinco vezes menos tóxica que a forma nativa.
- Ovalbumina e BTHX-1, na forma irradiada, foram capazes de induzir resposta do sistema imune nos animais utilizados e os anticorpos formados reconheceram a proteína na forma nativa.
- A ativação preferencial de células Th1 ou Th2 depende, dentre outros fatores, se o antígeno está na forma nativa ou irradiada, sendo que a resposta imunológica produzida contra as proteínas irradiadas foi, predominantemente, do tipo Th1.
- Esplenócitos retirados dos animais imunizados com ovalbumina na forma nativa, bem como aqueles obtidos dos animais imunizados com a proteína na sua forma irradiada, foram capazes de responder ao estímulo com ambas às formas da proteína.
- O ensaio de proliferação celular para a BTHX-1, nativa ou irradiada, mostrou que as células dos animais imunizados com a toxina irradiada apresentaram crescimento semelhante ao das células dos animais imunizados com a BTHX-1 nativa.

VII – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS, GE; ALDRICH, JE; BISBY, RH; CUNDALL, RB; REDPATH, JL & WILLSON, RL, (1972), Selective free radical reactions with proteins and enzymes: reactions inorganic radical anions with amino acids. *Radiat. Res.*, **49**:278-289.
- AEBERSOLD, R & MANN, M, (2003), Mass spectrometry-based proteomics. *Nature*, **422**:198-207.
- ALEXANDER, P & HAMILTON, LDG, (1960), Irradiation of proteins in the solid state.2.Chemical changes produced in bovine serum albumin. *Radiat. Res.*, **13**:214-233.
- AMARAL, CFS; DOURADO, HV; KOOYOUMDJIAN, LA; CARDOSO, JC; CAMPOS, JÁ; AZEVEDO-MARQUES, M & LOPES, PFA, (1987), Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes ofídicos. Brasília, Centro de Documentação do Ministério da Saúde, 53 pp.
- AUGER, MJ & ROSS, JA, (1992), The Biology of Macrophage IN: Lewis, C.E. & McGee, J.O'D., (eds), *The Natural Immune System - The Macrophage* - IRL Press, Oxford Univ.Press, 1992, p.3-74.
- BARLTROP, JA; Owen, TC; Cory, AH; Cory, JG, (1991), 5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4,5-dimethylthiazolyl)-3-(4-sulfophenyl)tetrazolium, inner salt (MTS) and related analogs of 3-(4,5-dimethylthiazolyl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reducing to purple water-soluble formazans as cell-viability indicators. *Bioorg. & Med. Chem. Lett.* **1**:611-614.
- BESSLER, W; SHAFER, JA; GOLDSTEIN, IJ, (1974), A spectrophotometric study of the carbohydrate binding site of concanavalin A. *The Journal of Biological Chemistry*, **249(9)**:2819-2822
- BJARDSON, JB & FOX, JW, (1988/1989), Hemorrhagic toxins from snake venoms. **J. Toxicol-Toxin reviews**, **7(2)**: 121-209.

- BOONSTRA, A; van OUDENAREN, A; BARENDREGT, B; AN, L; LEENEN, PJM; SAVELKOUL, HFJ, (2000), UVB irradiation modulates systemic immune responses by affecting cytokine production of antigen-presenting cells. *International Immunology*. **12(11)**:1531-1538.
- BOREFREUND, E & PUERNER, JA, (1984), A simple quantitative procedure using monolayer cultures for cytotoxicity assay (HTD/NR-90). *J. Tissue Culture Meth.* **9**:7-9.
- BREWER, JM; RICHMOND, J; ALEXANDER, J, (1994), The demonstration of an essential role for macrophages in the *in vivo* generation of IgG2a antibodies. *Clin. Exp. Immunol.***97**:164-171.
- BUTLER, J; LAND, EJ & SWALLOW, AJ, (1984), Chemical mechanisms of the effects of high energy radiation on biological systems. *Radiat. Phys. Chem.* **24**:273-282.
- BUTLER, J; HOEY, BM & SWALLOW, AJ, (1987), Radiation chemistry. *Annu.Rep.Prog.Chem.*, **83**:129-175.
- CARDI, BA; NASCIMENTO, N; ANDRADE-JR, HF, (1998), Irradiation of *Crotalus durissus terrificus* crotoxin with ⁶⁰Co gamma-rays induces its uptake by macrophages through scavenger receptors. *Int. J. Radiat. Biol.*, **73(5)**:557-564.
- CARDI, BA, (1999), Avaliação do mecanismo de captação e endocitose de crotoxina submetida à ação da radiação gama, por macrófagos peritoniais de camundongos. São Paulo, 97p. (Tese de Doutorado- IPEN- CNEN/SP).
- CARDOSO, JLC & BRANDO, RV, (1982), **Acidentes por animais peçonhentos: clínica e tratamento**. São Paulo, Editora Santos.
- CARDOSO, AGT, (1999), Ação do veneno de *Bothrops moojeni* e sua fração L-aminoácido oxidase, submetida ao tratamento com raios gama de ⁶⁰Co, em *Leishmania spp.* São Paulo, 68 p. (Dissertação de Mestrado - IPEN- CNEN/SP).
- CHANG, T; SHEA, CM; URIOSTE, S; THOMPSON, RC; BOOM, WR; ABBAS, AK, (1990), Heterogeneity of helper/inducer T lymphocytes-Responses of IL-2 and IL-4-producing (Th1 and Th2) clones to antigens presented by different accessory cells. *The Journal of Immunology*, **145** (9):2803-2808.

- CHO, W; MARKOWITZ, MA & KÉZDY, FJ, (1988), A New Class of Phospholipase A2 Substrates: Kinetics of the Phospholipase A2 Catalyzed Hydrolysis of 3 – (Acyloxy)-4-nitrobenzoic Acids. *J.Am.Chem.Soc.*, **110**:5166-5171.
- DANIEL, JP; HENEINE, LGD; TAVARES, CPA; NASCIMENTO, NCS; HENEINE, IF, (1987). Generation of protective immune sera by *Crotalus durissus terrificus* venom detoxified by controlled iodination. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, 20: 713-72
- DELVES, PJ & ROITT, IM, (2000), The immune System – First of two parts. *Advances in Immunology*, **343**:37-49.
- DETINGER, H & JUNG, H, (1970), The action of radiation on enzymes. The example of ribonuclease. IN: Dertiger, H. & Jung, H, (eds), *Molecular Radiation Biology*. Ch.9, p.115-133. Berlin, Springer-Verberg, 1970.
- FARRAGI, M; KLAPPER, MH & DORFMAN, LM, (1978), Fast reaction kinetics of one-electron transfer in proteins. The histidyl radical mode of electron migration. *J.Phys.Chem.*, **82**(5):508-512.
- GARRISON, WM, (1987), Reaction mechanisms in the radiolysis of peptides, polypeptides, and proteins. *Chem.Rev.*, **87**:381-398.
- GRASSET, E, (1945), Anavenoms and their use in the preparation of antivenoms sera. *Trans.Royal Soc.trop.Med.Hyg.*, **38**:463-488.
- GROSH, DS & HOOPYWOOD, LE, (1979), *Biological effects of radiation*, 2nd ed., New York, Academic Press.
- GUARNIERI, MC, (1992), Estudo dos efeitos da radiação gama de ⁶⁰CO nas propriedades bioquímicas, biológicas e imunológicas do veneno de *Bothrops jararaca*. São Paulo, 159p. (Tese de Doutorado- IPEN- CNEN/SP).
- GUIDOLIN, R; DIAS DA SILVA, W; HIGASHI, HG; CARICATI, CP; LIMA, MLSR; MORAIS, JF; PINTO, JR & MARCELINO, JR, (1989), Hiperimunização de cavalos soroprodutores com venenos botrópicos e crotálicos tratados com glutaraldeído. *Mem.Inst.Butantan*, **51**:85-90.

- GUILLEMIN, I; BOUCHIERT, C; GARRIGUES, T; WISNER, A & CHOUMET, V, (2003), Sequences and structural organization of phospholipase A2 genes from *Vipera aspis aspis*, *V. aspis zinnikeri* and *Vipera berus berus* venom – Identification of the origin of population based on ammodytin I 1 heterogeneity. *Eur. J. Biochem.*, **270**: 2697-2706.
- HARLOW, E & LANE, D, (1988), *Antibodies. A Laboratory Manual*. Ed. Cold Spring Harbor Lab, N.Y.
- HAWKINS, AL & DAVIES, MJ, (2001), Generation and propagation of radical reactions on proteins. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1504**:196-219.
- JANEWAY, CA; TRAVERS, MW; SHLOMCHIK, M, (2002), **Imunobiologia – O Sistema imune na Saúde e na Doença**. Artmed Editora, 767p.
- KUME, T & MATSUDA, T, (1995), Changes in structural and antigenic properties of proteins by radiation. *Radiat. Phys. Chem.*, **46**(2):225-231.
- LAEMMLI, UK, (1970), Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**:680-685.
- LAUHATIRANANANDA, P; GAUTHAVORN, S; HAYADOM, V, (1969), Radiation effects on Cobra venom. In: International Atomic Energy Agency. *Proceedings of Viena*, 107-112.
- LIZANO, S; DOMONT, G & PERALES, J, (2003), Natural phospholipase A(2) myotoxin inhibitor proteins from snakes, mammals and plants. *Toxicon*, **42**(8):963-977.
- MICHAELS, HB; HUNT, JW, (1978), A model for radiation damage in cells by direct effect and by indirect effect: a radiation chemistry approach. *Radiat. Res.*, **74**:23-34.
- MOON, S & SONG, KB, (2001), Effect of γ -irradiation on the molecular properties of ovalbumin and ovomucoid and protection by ascorbic acid. *Food Chemistry*, **74**:479-483.
- NASCIMENTO, N, (1995), *Caracterização bioquímica e imunológica dos principais produtos gerados pela irradiação de crotoxina*. São Paulo, 77p. (Tese de Doutorado- IPEN- CNEN/SP).

- NASCIMENTO, N; SEEBART, CS; FRANCIS, B; ROGERO, JR; KAISER, II, (1996), Influence of ionizing radiation on crotoxin: biochemical and immunological aspects. *Toxicon*, **34**(1):123-131.
- OKONOJI, T; HATTORI, Z; OGIJO, A & MITSUI, S, (1979), Detoxification by persimmon tannin of snake venoms and bacterial toxins. *Toxicon*, **17**:524-527.
- OLIVEIRA, JCR; de OCA, M; DUARTE, MM; DINIZ, CR; FORTES-DIAS, CL, (2001), Toxicity of South American snake venoms measured by an *in vitro* cell culture assay. *Toxicon*, **40**:321-325.
- OLIVEIRA, PCL, (2003), *Estudo Comparativo do Veneno Botrópico (Bothrops jararaca) Nativo e Irradiado com ⁶⁰Co em Caprinos. Aspectos clínicos e laboratoriais*. São Paulo, 98p. (Tese de Doutorado – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Botucatu).
- PARKIN, J; COHEN, B, (2001), An overview of the immune system. *Lancet*, **357**:1777-89.
- PINHO, JRR; CARDI, BA; ANDRADE Jr, HF; BARR, PJ; BATHURST, IC; VICENTE, EJ; SCHENBERG, AC, (1995), Immunogenic properties of the *M. leprae* recombinant 18-Kda antigen purified from *Saccharomyces cerevisiae*; Enhancement of delayed-type hypersensitivity after gamma-irradiation. *Int.J.Leprosy* , **63**(3):381-390.
- SALAFRANCA, ES, (1973), Irradiated Cobra (*Naja naja philippinensis*) venom. *Inf. J. Appl. Radiat. Isot.*, **24**(1):60.
- SEGRETO, RA & SEGRETO, HRC, (1997), Radiação Ionizante e resposta celular – atualidades. *Radiol. Bras.*, **30**:301-307.
- SPENCER, PJ, (2000), *Efeitos da radiação na estrutura da Bothropstoxina-I*. São Paulo, 88p. (Tese de Doutorado- IPEN- CNEN/SP).
- SOERENSEN, B, (1990), **Animais Peçonhentos – Reconhecimento, distribuição geográfica. Produção de soros, clínica e tratamento dos envenenamentos**. Livraria Atheneu Editora. RJ. , SP. , 138 pp.
- SPRENT, J & SURH, CD, (2002), T Cell Memory. *Annu. Rev. Immunol.* **20**:551-79.

- TURNER, JE, (2004), Interaction of ionizing radiation with matter. *Health Physics*, **86**(3):228-252.
- VENKATESAN, P & WAKELIN, D, (1993), ELISAs for Parasitologists: or Lies, Damned Lies and ELISAs. *Parasitology Today*. **9**(6)
- VOET, D, VOET, JG, PRATT, CW, (2000), **Fundamentos de Bioquímica**. *Artmed Editora*, 931p.
- WALES, A & KUSEL, JR, (1992), Biochemistry of irradiated parasite vaccines: Suggested models for their mode of action. *Parasitology Today*, **8**(11):358-363.
- WANDY, SM; CAMBUY, MO; COSTA, JO; VELARDE, DT; CHÁVEZ-OLÓRTEGUI, C, (1998), Neutralizing potency of horse antitoxic antivenom. Correlation between *in vivo* and *in vitro* methods. *Toxicon*, **36**(10):1433-1439.
- YANG, J; KIM, J; MATSUHASHI, S; KUME, T, (1996), Changes in biochemical properties of ovomucoid by radiation. *Radial. Phys. Chem.*, **48**(6):731-735.