

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

**AÇÃO DA BOTHROPSTOXINA-1 E DO VENENO  
TOTAL DE *Bothrops jararacussu* IRRADIADOS  
SOBRE O SISTEMA IMUNE**

**Priscila Caproni**

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

**Orientadora:**

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Nanci do Nascimento**

**São Paulo**

**2009**

## **Dedico este trabalho**

*Aos meus pais, Wagner e Margarida, e aos meus irmãos, Érica e Anderson, por sempre estarem ao meu lado e por todo apoio, compreensão e força que sempre me deram.*

*Ao meu amado Tiago Luiz de Almeida por percorrer esta estrada junto comigo e por ser essa pessoa maravilhosa que fez minha vida ser bem melhor.*

*Um filósofo, muito antigo por sinal,  
também lhe segredou:*

*“Executa cada ação como se fosse a  
última de tua vida”.*

*Marco Aurélio*

## AGRADECIMENTOS

À Deus, primeiramente, por me dar a vida.

Ao Instituto de Pesquisa Energéticas e Nucleares (IPEN) e ao Centro de Biotecnologia, onde este trabalho foi realizado, pelo suporte e estrutura que proporcionou.

À Dra. Nanci do Nascimento pela oportunidade, atenção e por me guiar no desenvolvimento deste trabalho.

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

Ao Conselho Nacional de Energia Nuclear (CNEN/IPEN) pela bolsa concedida durante o período em que este trabalho foi realizado.

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

Aos meus pais pelo apoio interminável, pela força e ensinamento que me deram. Por me guiarem pelos caminhos tortuosos da vida, por acreditarem em mim e pela dedicação e amor com que me criaram. Se sou o que sou hoje eu devo a vocês.

Aos meus queridos irmãos, Érica e Anderson, que sempre me ajudaram a crescer como pessoa, pela força e apoio na minha jornada. Por estarem sempre ao meu lado quando eu precisei e por tornarem a minha vida mais feliz e menos difícil, tornando-a mais divertida.

Ao meu amado, Tiago Luiz de Almeida, pelo amor, carinho, ajuda, compreensão, força, diversão e por sempre estar ao meu lado em todos os momentos e tornar as coisas mais fáceis de serem feitas.

Às minhas queridas avós por estarem sempre dispostas a me ajudar, pelo carinho e por darem o “colinho” que só as vovós possuem.

Aos meus tios, Sérgio e Vera, que estiveram comigo durante estes anos, pelas conversas e momentos de alegrias.

A toda minha família por me ajudar a crescer e por apoiar nas minhas decisões, além de claro, pelos momentos de descontração.

À Dra. Ruth Camargo Vassao por toda a sua atenção ao me ensinar como uma cultura de macrófagos funciona.

Ao Dr. Andrés Jimenez Galisteo Jr., primeiramente pela amizade, e por toda ajuda concedida ao meu trabalho, além de todas as sugestões dadas para com este.

À Dra, Monamaris M. Borges, pelas sugestões e orientação sobre a cultura de macrófagos.

À Dra. Olga Higa e à Andréa Rodas, pelo auxílio e orientação no ensaio de citotoxicidade.

À Dra. Ligia Morganti, por possibilitar a utilização de aparelhos e materiais de seu laboratório.

À Dra. Maria Aparecida Camilo, pelas sugestões dadas durante os seminários em grupo.

Ao Dr. Yamani, por permitir a utilização de seu laboratório e de seus equipamentos.

Ao Dr. Paolo Bartolini, por possibilitar a utilização de equipamentos dos laboratórios do Grupo de Hormônios Hipofisários.

Aos engenheiros Carlos e Elizabeth e ao Hélio, do Centro de Tecnologia das Radiações (CTR), por possibilitarem o tratamento com raios gama das proteínas utilizadas neste projeto.

As minhas grandes amigas Suzana e Jennifer pela amizade, compreensão, ajuda e apoio durante essa jornada. Agradeço á vocês pela força, pelo “ombro amigo” para me confortar e por me ouvirem e me ajudarem quando eu mais precisava. Obrigada por tornarem essa fase mais fácil e divertida.

Á grande amiga que fiz durante a minha jornada no IPEN: MSc. Janaina Baptista Alves, que me ensinou tudo o que aprendi e me ajudou, e muito, no desenvolvimento desta dissertação. Obrigada pela paciência, auxílio, dedicação e ensinamento e acima de tudo por ser minha grande amiga que eu sei que poderei contar pra sempre.

Às grandes amigas Cláudia Medeiros, Cláudia Mori, Sandra Tadokoro, Renata Ayres e Deiby Goveia, primeiro pela amizade eterna que temos e por proporcionarem momentos de diversão e lazer e por tornarem essa fase da minha vida mais divertida

e alegre. Obrigada também pelos momentos de reflexão e longas conversas durante nossas saídas.

Aos amigos da academia Lilian, Isley e Elisa pelo apoio e compreensão e por ajudarem na descontração e diversão. Obrigada também pela grande amizade.

À minha amiga do “7282”, Tatiana, por me ajudar e me apoiar com todos os afazeres da faculdade e da vida e por sempre acreditar e torcer por mim.

À Renata Damiani, uma grande amiga que fiz durante a minha dissertação. Que sempre esteve disposta a me ajudar, ouvir e alegrar meu dia. Obrigada pelos longos ensaios e coreografias que realizamos. Uma amiga que vou guardar sempre em meu coração.

À Jéssica Mirco pelo auxílio com os experimentos envolvendo macrófagos e por sempre estar disposta a ajudar.

Aos amigos que fiz durante a minha jornada no IPEN: Lucélia, Murilo, Júnior, Alberto, Solange, Daniele Borim, Rosa, ao Dr. Patrick, Natália, Karina, Kely, Antônio Jr., Daniele Yoshito, Stefany, Taís, Elisa, Claudinha, por me auxiliarem no desenvolvimento deste trabalho e por me ajudarem direta ou indiretamente nos experimentos, além de proporcionarem momentos de muita diversão e descontração. Ao amigo Dr. “Jéã”, por todas as dicas, ajudas para com a cultura de macrófagos, além de algumas técnicas anti-stress.

À Dra. Catarina de Fátima Pereira Teixeira e aos amigos que fiz no Laboratório de Farmacologia do Instituto Butantan, Polyana, Vanessa e Sérgio, que abriram suas portas para me acudir em um momento de desespero. Obrigada por todo auxílio com a cultura de macrófagos.

Aos técnicos e funcionários, Neide, Rute, Dona Genivalda, Sr. José Longino, Eduardo Moura e todas as outras pessoas do IPEN pela ajuda e compreensão no desenvolvimento deste trabalho.

Aos funcionários do Biotério, Antônio Calixto, Cícero, André e Marcos, pela manutenção dos materiais utilizados.

À Elizabeth, pela limpeza dos laboratórios e salas de estudo.

A todos que estiveram envolvidos na realização deste trabalho, direta ou indiretamente, OBRIGADA.

**Ação da Bothropstoxina-1 e do veneno total de *Bothrops jararacussu*  
irradiados sobre o sistema imune**

**Priscila Caproni**

**RESUMO**

A radiação ionizante tem sido empregada com sucesso na modificação das propriedades imunológicas das biomoléculas e tem se mostrado uma potente ferramenta para destoxicar venenos de serpentes sem afetar e, muitas vezes, melhorando suas propriedades imunogênicas. Resultados promissores foram obtidos com o tratamento, tanto de veneno total quanto de frações isoladas, com a radiação gama de  $^{60}\text{Co}$ . No presente trabalho, foram avaliados os efeitos da Bothropstoxina-1 (Bthx-1) e do veneno total de *Bothrops jararacussu* sobre o sistema imune de camundongos B10.PL e BALB/c, visando caracterizar a resposta imune contra proteínas irradiadas. Modificações estruturais foram observadas por meio de técnicas eletroforéticas - SDS-PAGE. Para os ensaios imunológicos, camundongos de diferentes linhagens foram imunizados com ambas as formas da Bthx-1 e os anticorpos circulantes foram isotipados e titulados pelo método de ELISA. Os resultados mostraram que tanto o veneno total como a toxina isolada, mesmo após o processo de irradiação, se mostraram imunogênicos e os anticorpos produzidos reconheciam as formas nativas. Para a caracterização antigênica a técnica de Western Blot permitiu demonstrar que a Bthx-1 irradiada induziu à produção de anticorpos responsivos para ambas as formas da toxina isolada e do veneno total. Os resultados do ensaio de citotoxicidade mostram que a viabilidade dos macrófagos ensaiados com a Bthx-1 ou com o veneno total irradiados foi maior quando comparada com os resultados obtidos para as formas nativas. Analisando-se o resultado do ensaio de LDH, observou-se que a Bthx-1 irradiada promoveu menor dano muscular que a toxina nativa. Conclui-se que a irradiação de proteínas promove modificações estruturais significativas, mantendo, contudo, suas propriedades imunológicas originais, representando uma potencial ferramenta na melhoria do processo de imunização.

## **Effects of irradiated Bothropstoxin-1 and *Bothrops jararacussu* crude venom on the immune system**

**Priscila Caproni**

### **ABSTRACT**

Ionizing radiation has been successfully employed to modify the immunological properties of biomolecules and has been proven to be a powerful tool to attenuate snake venoms toxicity without affecting and even increasing their immunogenic properties. Very promising results were obtained when crude animal venoms, as well as isolated toxins, were treated with  $^{60}\text{Co}$  gamma rays, yielding toxoids with good immunogenicity, however, little is known about the modifications that irradiated molecules undergo and even less about the immunological response that such antigens elicit. At the present work, we have evaluated the effects on immune system of B10.PL and BALB/c mice of *Bothrops jararacussu* crude venom and isolated bothropstoxin-1 (Bthx-1), before and after gamma radiation exposition. According to our data, irradiation process promoted structural modifications on both isolated toxin and crude venom, characterized by higher molecular weight protein (aggregates and oligomers) formation. Irradiated samples were immunogenic and the antibodies elicited by them were able to recognize the native toxin in ELISA. These results indicate that irradiation of toxic proteins can promote significant modifications in their structures, but still retain many of the original antigenic and immunological properties. Also, our data indicate that the irradiated protein induced higher titers of IgG2b, suggesting that Th1 cells were predominantly involved. Results from Western blot assay showed that antibodies raised against irradiated bothropstoxin-1 recognize both native isolated toxin or crude venom. Citotoxicity assay showed that irradiated toxin and crude venom were less toxic than their native counterpart. Thus, the viability of the macrophages cultured in the presence of irradiated Bthx-1 or crude venom was higher if compared with their native forms. LDH Assay showed that irradiated Bthx-1 promotes less muscular damage than the native form. Our data confirm a potential use of ionizing radiation for immunization process improvement.

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>10</b>
1.1 RADIAÇÃO IONIZANTE.....	11
1.2 VENENOS.....	13
1.3 IRRADIAÇÃO DE VENENOS.....	15
1.4 SISTEMA IMUNE.....	18
1.4.1 MACRÓFAGOS.....	21
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>23</b>
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>24</b>
3.1 DROGAS E REAGENTES.....	24
3.2 PURIFICAÇÃO DA BOTHROPSTOXINA-1.....	24
3.3 ANIMAIS.....	24
3.4 IRRADIAÇÃO DE PROTEÍNAS.....	25
3.5 CARACTERIZAÇÃO DAS FRAÇÕES PROTÉICAS UTILIZADAS (SDS-PAGE).....	25
3.6 PRODUÇÃO DE ANTICORPOS ESPECÍFICOS ANTIPROTEÍNAS NATIVAS OU IRRADIADAS.....	26
3.7 VERIFICAÇÃO DA REATIVIDADE DOS ANTICORPOS PRODUZIDOS CONTRA A Bthx-1 NATIVA E IRRADIADA - WESTERN BLOT.....	27
3.8 ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO (ELISA - ENZYME LINKED IMMUNO SORBENT ASSAY).....	27
3.9 AVALIAÇÃO DE DANO MUSCULAR – LDH (DESIDROGENASE LÁCTICA).....	28
3.10 MACRÓFAGOS PERITONEAIS DE CAMUNDONGOS.....	30
3.11 ANÁLISE DA VIABILIDADE DE MACRÓFAGOS PERITONEAIS DE CAMUNDONGOS INCUBADOS COM PROTEÍNAS NATIVAS OU IRRADIADAS (ENSAIO DE CITOTOXICIDADE - MTS).....	31
3.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	31
3.13 INFRA-ESTRUTURA.....	32
<b>4. RESULTADOS</b> .....	<b>33</b>
4.1 SDS-PAGE.....	33
4.2 PRODUÇÃO DE ANTICORPOS.....	34

4.3 WESTERN BLOT .....	37
4.4 AVALIAÇÃO DE DANO MUSCULAR – LDH.....	37
4.5 ENSAIO DE CITOTOXICIDADE – MTS .....	40
<b>5. DISCUSSÃO .....</b>	<b>42</b>
<b>6. CONCLUSÕES.....</b>	<b>48</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>49</b>

## **1. INTRODUÇÃO**

Inúmeros casos de acidentes ofídicos são registrados anualmente no Brasil, onde 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, 1982; AMARAL *et al.*, 1987; BJARNASON & FOX, 1989). Anualmente são registrados 28.597 casos de acidentes ofídicos, com 0,45% de índice de letalidade (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005; ARAUJO *et al.*, 2008) e, dentre estes casos, cerca de 90% envolvem serpentes do gênero *Bothrops*.

Procedimentos para minimizar os efeitos dos venenos de serpentes e suas toxinas incluem o uso de antivenenos (soroterapia), que pode ser muito útil no estudo da variabilidade do veneno dentre outras coisas (RANDAZZO-MOURA *et al.*, 2006).

A soroterapia é o único método de eficácia comprovada no tratamento dos acidentados, desde que administrada em tempo, dose e via adequados (CUPO *et al.*, 1991). Porém, apesar da eficiência na neutralização dos efeitos sistêmicos, este tratamento contribui pouco para a melhoria do quadro local, resultando no aparecimento de seqüelas graves e perda tecidual. A efetividade da soroterapia em prevenir o dano tecidual local é limitada, pelo menos em parte, pela rápida ação das toxinas comparada com a distribuição lenta de anticorpos (LOMONTE *et al.*, 1996)

Alguns gêneros de serpentes apresentam veneno com baixa capacidade imunogênica e alta toxicidade. Considerando-se que a produção de plasma ou de soro hiperimune depende da imunogenicidade de cada veneno, a alta toxicidade e a baixa capacidade imunogênica impedem a inoculação de doses capazes de estimular uma resposta imunológica adequada, tendo como conseqüência uma baixa produtividade de soro. Essas características causam dificuldades para a soroterapia, uma vez que a viabilidade dos anticorpos produzidos em cavalos é dependente da imunogenicidade de cada veneno (ABIB & LARABA-DJEBARI, 2003).

Devido a estes fatores, tornou-se necessário o desenvolvimento de técnicas que aumentem a resposta imunológica e reduzam a toxicidade do veneno

protegendo assim, os animais soroprodutores e reduzindo o custo na produção de soro antiofídico.

## 1.1 RADIAÇÃO IONIZANTE

No final do século 19, ocorreu a descoberta dos raios-X por Wilhelm Conrad Röntgen, em 1895, fato relevante para a história da radiação ionizante. O desenvolvimento tecnológico, decorrente desde então, ampliou o uso da radiação ionizante em áreas como a indústria e a medicina. Nesta última, a radiação é utilizada na pesquisa, diagnóstico e no tratamento de doenças. Assim, tornou-se cada vez mais importante o desenvolvimento de estudos para um melhor entendimento da radiação ionizante (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 resultantes de transições nucleares, tendo alta energia, ausência de massa (como é o caso da radiação gama), bem como a capacidade de promover a ionização e excitação nos meios, possuindo um alto poder de penetração (GROSH & HOOPYWOOD, 1979). A ionização é o principal meio pelo qual a energia da radiação ionizante é transferida para tecidos biológicos (BUTLER *et al.*, 1984).

A radiação ionizante pode interagir com a matéria de duas maneiras: diretamente ou indiretamente. A primeira é uma consequência da interação imediata da energia com o alvo molecular, como por exemplo, DNA, proteínas e lipídeos causando alterações estruturais nestas moléculas. A segunda maneira resulta da interação indireta de espécies reativas produzidas pela radiação, com outras moléculas do meio, principalmente quando há interação da radiação com a água, produzindo os chamados produtos da radiólise da água: H·, OH· e o elétron aquoso. O efeito indireto é responsável por cerca de 70% do efeito biológico produzido pelas radiações (ROOTS *et al.*, 1975; MICHAELS *et al.*, 1978).

A presença de oxigênio induz a formação de radicais livres oxidativos que não permitem a recombinação com a molécula original, levando a um aumento de

radicais livres no meio e maior potencial lesivo (FRIDOVICH, 1978). Assim, em células ou tecidos, a radiação produz alterações que podem variar desde excitações até a morte celular ou tissular, e esses danos dependem, entre outros fatores, da dose, taxa de dose, tempo de irradiação e do tipo de célula ou tecido atingido.

As proteínas, carboidratos e lipídeos podem sofrer a ação da radiação ionizante, principalmente devido à interação dos produtos da radiólise da água com aminoácidos das cadeias protéicas promovendo desaminação (BUTLER *et al.*, 1987; GARRISON, 1987). A destruição de aminoácidos, rompimento das 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, promovendo mudanças nas propriedades biológicas (enzimáticas, farmacológicas e imunológicas) das proteínas (DERTINGER & JUNG, 1970; ADAMS *et al.*, 1972; GARRISON, 1987). Existem indicações de uma diferença quanto à radiosensibilidade dessas várias funções biológicas, sendo as propriedades imunológicas as mais radorresistentes.

As proteínas são macromoléculas presentes em todas as células dos organismos vivos e são compostas de carbono, hidrogênio, oxigênio e nitrogênio, contendo um número variável de aminoácidos unidos por ligações peptídicas, denominadas de cadeias polipeptídicas. O número destas cadeias e a seqüência de aminoácidos estão relacionados à forma tridimensional da molécula de uma proteína, determinando as estruturas primária, secundária, terciária ou quaternária (LOURENZONI *et al.*, 2007).

A irradiação de proteínas, tanto no estado seco como em solução aquosa, promove várias mudanças químicas, alterações nas propriedades físico-químicas e na estrutura secundária e terciária destes polímeros (ALEXANDER & HAMILTON, 1961). A irradiação de proteínas em solução aquosa promove como principais alterações, a fragmentação, *cross-linking*, agregação e oxidação. Tais efeitos da radiação gama na conformação das proteínas dependem de fatores como a concentração, pH, a presença de oxigênio, a estrutura das proteínas, entre outros (MOON & SONG, 2001).

## 1.2 VENENOS

Venenos ofídicos são misturas complexas constituídas principalmente por proteínas (STOCKER, 1990), em sua maioria toxinas ou enzimas com atividade tóxica, carboidratos, lipídios, aminas biogênicas, nucleotídeos, aminoácidos, peptídeos e componentes inorgânicos.

Os venenos de serpentes apresentam diferentes composições químicas, o que reflete em variações das propriedades biológicas, toxicidade e características farmacocinéticas e farmacodinâmicas (CRUZ *et al.*, 2005). Venenos em geral têm baixa imunogenicidade e por outro lado, alta toxicidade (MAGALHÃES, 1986). Assim, a radiação ionizante vem sendo empregada para diminuir a toxicidade destes venenos, mantendo ou até mesmo aumentando sua imunogenicidade.

O único tratamento eficaz no caso de acidentes com serpentes é o soro “antiofídico” monovalente, por ser a opção mais segura, seja em neutralizar mais eficazmente os venenos, ou por minimizar os efeitos colaterais advindos da administração de soros heterólogos (MEYER *et al.*, 1997; OTERO-PATIÑO *et al.*, 1998).

As serpentes do gênero *Bothrops* são as responsáveis pela maior parte da mortalidade humana (cerca de 70%) relacionada a acidentes ofídicos quando comparadas às de outros grupos de serpentes venenosas (CAMEY *et al.*, 2001).

Os venenos botrópicos apresentam grande variedade de atividades biológicas (miotóxica, coagulante, edemaciante) além de possuírem inúmeras enzimas, como a fosfolipase A<sub>2</sub> e a L-aminoácido oxidase. Apesar da complexidade de componentes presentes nestes venenos, seus efeitos estão relacionados às suas propriedades proteolíticas, coagulantes e hemorrágicas (CARDOSO, 1999).

Nos acidentes causados por serpentes do gênero *Bothrops sp.*, as lesões locais podem ser atribuídas às atividades de proteases, fosfolipases e fatores hemorrágicos destes venenos, seguidas por liberação de agentes vasoativos causando hemorragias em diversos órgãos e tecidos (GUARNIERI, 1992; CARDOSO, 1999). Outras patologias causadas por esse tipo de veneno são: lesão local tecidual, mionecrose, edema, alterações cardiovasculares, choque hipovolêmico, alterações de coagulação (desfibrinação, etc.) e alterações renais.

Esses complexos fenômenos patológicos são devido aos efeitos aditivos ou sinérgicos da atividade enzimática e tóxica presentes nesse veneno (OWNBY, 1990; STOCKER, 1990; BJARNASON AND FOX, 1994; GUTIERREZ, 1995).

Dentre as serpentes pertencentes ao gênero *Bothrops*, a *Bothrops jararacussu* se destaca pela baixa imunogenicidade de seu veneno (DOS-SANTOS *et al.*, 1992). A atividade local deste veneno não é eficientemente neutralizada pelo anti-soro específico, como também por anti-soros produzidos contra outros venenos botrópicos (DIAS DA SILVA *et al.*, 1989). O veneno desta serpente é miotóxico, causa necrose de fibras musculares estriadas e retarda sua regeneração (QUEIROZ *et al.*, 1984), além de ser hemorrágico.

A Bothropstoxina-1 (Bthx-1), uma miotoxina de 13.700 Da presente no veneno de *Bothrops jararacussu*, tem uma ação predominantemente pós-sináptica que é responsável pela miotoxicidade desta toxina (RANDAZZO-MOURA *et al.*, 2006). Embora não apresente atividade catalítica, a Bthx-1 pode ser considerada uma fosfolipase A<sub>2</sub>, por apresentar semelhanças (estruturais e moleculares) com as fosfolipases A<sub>2</sub> de venenos de serpentes da família *Crotalidae* (SPENCER, 2000). Essas enzimas possuem propriedades tóxicas e digestivas, neurotóxicas, miotóxicas, cardiotoxicas ou anticoagulantes. Isso representa um problema na clínica e terapia, uma vez que nos acidentes com serpentes, cujo veneno encerra miotoxinas, a ação destes componentes não é de todo neutralizada pelo soro específico (antibotrópico).

Conforme mencionado acima, o anti-soro é o único tratamento para acidentes ofídicos e sua composição encerra imunoglobulinas específicas purificadas, geralmente, a partir do plasma de equídeos hiperimunizados com venenos de animais peçonhentos. Após o processo de purificação e de concentração, são feitas as adequações necessárias para que o produto final atenda às exigências de potência e segurança estabelecidas pela Organização Mundial de Saúde (SOERENSEN, 1990). Ensaio baseado em ligação enzimática por imunoadsorvância (ELISA) foram desenvolvidos para testar a potencialidade dos venenos antibotrópicos e os níveis de anticorpos (MARIA *et al.*, 1998).

### 1.3 IRRADIAÇÃO DE VENENOS

Os procedimentos para a produção de antivenenos, pelos métodos convencionais, são complicados pela toxicidade inerente ao veneno, e assim, qualquer método que reduza a toxicidade sem alterar as propriedades imunológicas do veneno, exerce papel significativo na produção dos antivenenos (NASCIMENTO *et al.*, 1996).

O tratamento de materiais biológicos (proteínas, enzimas, etc.) utilizando a radiação, vem sendo aplicado em vários campos. Quando esses materiais biológicos são irradiados ocorrem várias mudanças em suas estruturas. O que é um fato 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).

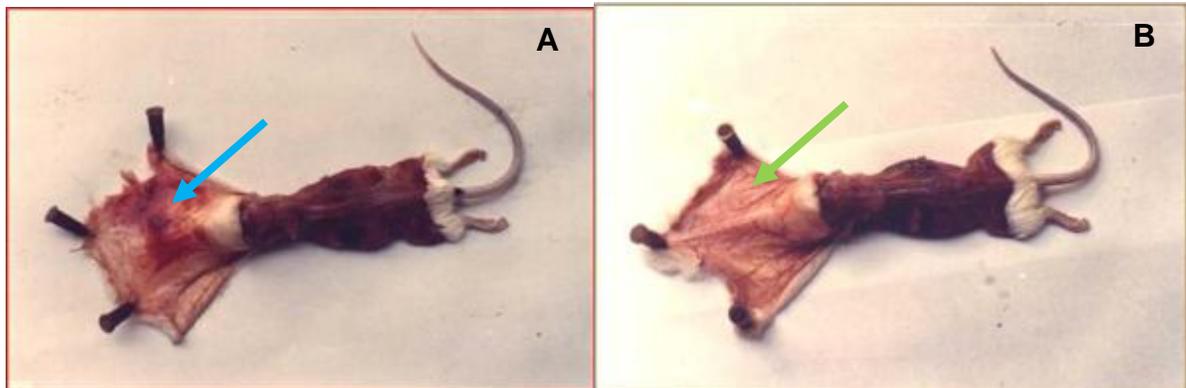
A despeito das inúmeras alterações que promove na proteína, a radiação ionizante vem sendo empregada, com sucesso, para modificar biomoléculas, reduzindo ou abolindo suas atividades biológicas, melhorando, por vezes, suas propriedades imunológicas (NASCIMENTO *et al.*, 1996).

Uma vez que os venenos de serpentes são constituídos basicamente por proteínas, vislumbrou-se a possibilidade de utilizar a radiação ionizante como ferramenta para alterar algumas das propriedades dos mesmos, buscando diminuir a sua toxicidade sem abolir as propriedades imunológicas (NASCIMENTO *et al.*, 1996; CARDI *et al.*, 1998).

No Brasil, na década de 80, a falta de soro antiofídico desencadeou, em vários Institutos de Pesquisa e Universidades, a busca de alternativas para melhorar a produção de soro no país. O IPEN, liderança na área nuclear, lançou mão dos conhecimentos sobre os efeitos biológicos da radiação e usou este tipo de energia como ferramenta para destoxicar venenos de serpentes brasileiras.

A despeito das inúmeras alterações que promove na proteína, a radiação ionizante vem sendo empregada, com sucesso, para modificar biomoléculas, reduzindo ou abolindo suas atividades biológicas, mantendo ou melhorando, por vezes, suas propriedades imunológicas (NASCIMENTO *et al.*, 1996).

Dentre os trabalhos realizados, especificamente com venenos botrópicos está o de GUARNIERI (1992) que, ao avaliar os efeitos da radiação gama no veneno de *Bothrops jararaca*, observou foco de hemorragia pronunciado no animal que recebeu o veneno de *Bothrops jararaca* nativo, enquanto que o veneno irradiado não promoveu qualquer sinal hemorrágico (**Figura 1**).



**Figura 1** – Efeito do veneno de *Bothrops jararaca* nativo (A) ou irradiado (B) injetado via intradérmica em camundongos. A seta azul ( → ) indica foco hemorrágico pronunciado e a seta verde ( → ) ausência de foco hemorrágico. (GUARNIERI, 1992).

OLIVEIRA (2003), trabalhando com caprinos, realizou um estudo comparativo entre o veneno de *Bothrops jararaca* nativo e irradiado com radiação gama de  $^{60}\text{Co}$ . O autor observou que o animal imunizado com o veneno de *Bothrops jararaca* nativo apresentou formação de edema no local do inóculo, enquanto que o animal inoculado com o veneno irradiado não apresentou qualquer sinal de inchaço (**Figura 2**).



**Figura 2 – Inóculo do veneno de *Bothrops jararaca* nativo (A) e irradiado (B) em caprinos. A seta vermelha (→) indica formação de edema no local do inóculo e a seta verde (→) ausência de inchaço no local do inóculo. (OLIVEIRA, 2003).**

Assim, a radiação gama de  $^{60}\text{Co}$  vem se mostrando um método eficaz na destoxicação de venenos totais ou frações isoladas dos mesmos. O tratamento do veneno total de *Bothrops jararaca* com várias doses de radiação gama (500 a 4000 Gy), feito por GUARNIERI-CRUZ e colaboradores (1990), mostrou que este veneno sofria alterações em suas propriedades bioquímicas, imunológicas e tóxicas, e estas alterações eram dependentes da dose total de radiação. Doses iguais ou acima de 2 kGy mostraram reduzir as atividades específicas de venenos e toxinas, sendo que doses maiores levavam a um prejuízo da propriedade imunogênica do mesmo (NASCIMENTO *et al.*, 1996).

Estudos realizados com proteínas submetidas à radiação gama têm demonstrado a sua eficiência na produção de melhores imunógenos, pois associa diminuição da toxicidade com manutenção das propriedades imunológicas sem adicionar, contudo, qualquer substância à amostra (OKONOGI *et al.*, 1979; PINHO *et al.*, 1995).

## 1.4 SISTEMA IMUNE

O sistema imune é um sistema de defesa constituído por células e moléculas especializadas no combate aos agentes infecciosos, possuindo inúmeras funções, sendo elas: imunidade (proteção contra agentes agressores tais como, microrganismos e/ou toxinas), imunotolerância (ou seja, não reagir contra os próprios tecidos normais e/ou substâncias inócuas; insuficiência adquirida ou específica do mecanismo imunológico para reagir ante a exposição a determinado antígeno), vigilância imunológica (teoria segundo a qual as células T monitoram a superfície das células, detectando alterações estruturais na membrana plasmática e/ou nos antígenos de superfície das células transformadas por vírus ou por neoplasia; reação contra o próprio tecido e/ou células alteradas) e imunorregulação (controle adequado da resposta imune).

Há dois tipos fundamentais de resposta imune: a inata (ou natural) e a adaptativa. A resposta inata ocorre sem existir uma prévia exposição ao agente infeccioso, enquanto que 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). Os dois tipos de imunidade (adaptativa e inata) dependem da atividade dos leucócitos, que são as células brancas do sangue. A imunidade inata é mediada, principalmente, por granulócitos, células Natural Killer (NK) e macrófagos (AUGER & ROSS, 1992; JANEWAY *et al.*, 2002), onde estes últimos são responsáveis pela fagocitose de patógenos que iniciam a resposta inata que, em termos, orquestram a resposta adaptativa (ADEREM & UNDERHILL, 1999). Já as respostas adaptativas são mediadas por linfócitos (T e B), que proporcionam a imunidade duradoura (AUGER & ROSS, 1992; JANEWAY *et al.*, 2002).

Os componentes moleculares da resposta inata incluem sistema complemento, proteínas de fase aguda, citocinas e interferons ( $\alpha$ ,  $\beta$ ), enquanto a resposta adaptativa envolve a proliferação antígeno-específica de células B e T, envolvendo a interação receptor-membrana destas células com os antígenos e outras citocinas. Estas últimas são peptídeos solúveis secretados por uma variedade de células do sistema imune que possuem, dentre outras funções, a capacidade de

ativar a fagocitose nos macrófagos. Estas citocinas incluem interferons (INF- $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ ) e interleucinas (IL) e dentre as citocinas mais importantes na resposta inflamatória incluem-se IL-1, IL-6 e TNF- $\alpha$  (BELLINE, 2001).

Há dois caminhos pelos quais os antígenos podem interagir com o Complexo de Histocompatibilidade Principal (MHC). Antígenos endógenos como os vírus ou proteínas tumorais, se ligarão às moléculas MHC de classe I e serão processados por vias intercelulares, alternativamente, células especializadas na apresentação de antígenos, podem capturar antígenos exógenos por meio de endocitose. Dentre as células apresentadoras de antígenos incluem-se as células dendríticas, as células B e os macrófagos. Esses antígenos exógenos são processados de forma diferente daquela apresentada pelos endógenos, sendo reexpressados por moléculas MHC de classe II (PARKIN & COHEN, 2001).

Existem dois tipos principais de células T efetoras: linfócitos T auxiliares (Th) e os linfócitos T citotóxicos (Tc) ou CD8, que carregam em sua superfície moléculas CD8. As células T CD8 lisam as células alvo que apresentam fragmentos antigênicos, ligados às moléculas MHC de classe I (DELVES & ROITT, 2000). Já as células Th CD4+ reconhecem antígenos ligados às moléculas MHC de classe II. Quando os linfócitos Th se ligam ao macrófago (ligação CD4-MHCII) o antígeno ligado ao MHCII é apresentado pelo macrófago e reconhecido pelo receptor TCR dos linfócitos T. Este tem seu metabolismo aumentado e sofre expansão clonal e a partir daí, os linfócitos T irão desencadear a resposta imunológica específica celular ou humoral ou ambas dependendo do antígeno<sup>1</sup>.

As células Th CD4+ são as orquestrantes da resposta imune, pois reconhecem antígenos externos e são capazes de ativar outros caminhos da resposta imune mediada por células a fim de erradicar o patógeno (DELVES & ROITT, 2000). A ativação de células TCD4+ leva à secreção de IFN- $\gamma$ , que ativa os macrófagos levando à produção aumentada de óxido nítrico (NO) causando a destruição do patógeno (bactéria, por exemplo) (MACHADO *et al.*, 2004).

---

<sup>1</sup> <http://ioh.medstudents.com.br/ric2.htm>

As células T CD8 lisam as células alvo que apresentam fragmentos antigênicos, ligados às moléculas MHC de classe I (DELVES & ROITT, 2000). Já 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 e estas são diferenciadas de acordo com as citocinas que produzem, promovendo respostas diferentes (PARKIN & COHEN, 2001; CHANG *et al.*, 1990).

As células Th1 são as principais responsáveis pela indução da resposta inflamatória (PARKIN & COHEN, 2001; CHANG *et al.*, 1990). A resposta Th1 é essencial no controle da replicação de patógenos intracelulares, mas possivelmente contribui na patogênese de doenças auto-imunes como a artrite reumatóide e a esclerose múltipla (DELVES & ROITT, 2000; PARKIN & COHEN, 2001).

As células Th2 são responsáveis, por exemplo, pela eliminação de parasitas extracelulares devido à formação de anticorpos que atuam no controle de muitos patógenos (ALLEN & MAIZELS, 1997). Os anticorpos podem exercer suas ações de três maneiras: 1) opsonização, 2) ativando o sistema complemento, 3) promovendo a neutralização de patógenos extracelulares ou de seus produtos (substâncias com atividade antifagocítica). A opsonização, por sua vez, funciona potencializando o processo fagocitário, ou seja, os anticorpos dirigidos contra as substâncias com atividade antifagocítica não só impedem sua ação, mas facilitam a fagocitose, desde que neutrófilos e macrófagos possuam receptor para a porção Fc da imunoglobulina (MACHADO *et al.*, 2004)

As células B, por sua vez, secretam imunoglobulinas e anticorpos antígeno-específicos, responsáveis pela eliminação extracelular de patógenos. Estas células possuem um receptor de antígeno (molécula de imunoglobulina de superfície) e, quando ativadas pelo antígeno, 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 em humanos (DELVES & ROITT, 2000; PARKIN & COHEN).

Os plasmócitos, grandes células B que foram expostas ao antígeno, são células secretoras de moléculas de imunoglobulinas e especializadas na secreção de anticorpos. Os plasmócitos se originam da diferenciação dos linfócitos B ativados, o que envolve outro rearranjo de DNA promovendo a ocorrência de modificações

celulares que geram as características morfológicas e funcionais dessa célula especializada na secreção de anticorpos (plasmócitos) (CALICH & VAZ, 2001).

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 (PARKIN & COHEN, 2001; JANEWAY *et al.*, 2002). Assim, o antígeno reconhecido pela imunoglobulina de superfície da célula B é internalizado, processado e liga-se às moléculas MHC de classe II, formando um complexo MHC de classe II: antígeno. O antígeno é então exposto na superfície da célula B, onde poderá ser reconhecido por células T.

No que diz respeito à experimentação animal, algumas linhagens de camundongos apresentam diferentes padrões de resposta celular Th1 e Th2, como é o caso dos camundongos C57BL/6 e BALB/c. Relata-se que camundongos da linhagem C57BL/6 desenvolvem preferencialmente resposta celular do tipo Th1 enquanto que a linhagem BALB/c prima pela resposta celular do tipo Th2 (PINCHUK & FILIPOV, 2008).

#### **1.4.1 MACRÓFAGOS**

Os macrófagos atuam como elementos de defesa, fagocitando microorganismos, restos de células tumorais e senescentes, partículas inertes que penetram no organismo (TOPLEY *et al.*, 1988; VANHOLDER *et al.*, 1991; WALTER *et al.*, 1991), hemácias e glóbulos brancos. São também responsáveis pela produção de diversas substâncias com ações específicas, tais como: mediadores inflamatórios (citocinas), secretam compostos vasoconstritores (endotelinas, leucotrienos e tromboxanos), além de peptídeos, como o Fator de Necrose Tumoral (TNF). Estas células podem ainda produzir e liberar componentes do complemento, fatores quimiotáxicos, fatores de coagulação, fatores de crescimento, nitritos, nitratos e espécies reativas de oxigênio (EROs) (ADAMS & HAMILTON, 1984; NATHAN, 1987; BOYCE *et al.*, 1989; SUNDERKÖTTER *et al.*, 1991; FIGUEIREDO *et al.*, 1993; GERCKEN *et al.*, 1996)

Os macrófagos são largamente distribuídos nos órgãos linfo-hematopoiéticos onde eles têm papel na homeostase dos tecidos como células fagocíticas especializadas capazes de produzirem moléculas citotóxicas e reguladoras que participam da inflamação e do reparo. São responsáveis pela primeira linha de defesa contra invasores (PEISER *et al.*, 2002). Os macrófagos possuem muitas funções essenciais, tais como: receptores para fatores de crescimento e de diferenciação, reconhecimento de moléculas de adesão para ligantes celulares e microbiais e também como reguladores de expressão gênica (McKNIGHT & GORDON, 1998; ZHANG *et al.*, 2007).

Macrófagos humanos e de outros vertebrados atuam como células apresentadoras de antígeno, utilizando-se, muitas vezes, de receptores presentes em suas membranas para interagir com estes antígenos, microrganismos e outros. Dentre estes, uma série de glicoproteínas de superfície, denominadas conjuntamente de receptores "scavenger" (ScvR), têm demonstrado a sua contribuição na captação de macromoléculas modificadas (FREEMAN *et al.*, 1991; ENDEMANN *et al.*, 1993; ACTON *et al.*, 1994; ELOMAA *et al.*, 1995; RAMPRASAD *et al.*, 1995). Estes ScvR são caracterizados por sua capacidade de interagir com uma grande variedade de ligantes, além disso, alguns desses podem interagir *in vitro* com células ou macromoléculas oxidadas (KRIEGER & HERTZ, 1994). Estes receptores possuem um importante papel na captação e no "clearance" de moléculas modificadas e células apoptóticas.

A ativação de macrófagos pode ser induzida por muitos estímulos, tais como fatores quimiotáxicos, imunológicos e físicos (NATHAN, 1987; JOHNSTON Jr., 1988; ABBAS *et al.*, 1997). A liberação de EROs, como peróxido de hidrogênio e ânion superóxido, também são marcadores de ativação de macrófagos, contribuindo assim, em sua atividade bactericida e tumoricida (RUSSO *et al.*, 1989).

As considerações acima serviram de alicerce para o desenvolvimento desta pesquisa onde reúnem-se a eficácia da radiação em destoxicar venenos, a necessidade de aprimoramento de imunógenos, a busca por vacinas e a disponibilidade de utilização de modelos animais que apresentam diferenças quanto ao padrão de resposta imune.

## 2. OBJETIVOS

### Geral

Avaliar a ação do veneno total de *Bothrops jararacussu* e da bothropstoxina-1 irradiados com  $^{60}\text{Co}$ , sobre o sistema imune.

### Específicos

- Avaliar as possíveis modificações estruturais ocasionadas pela radiação gama de  $^{60}\text{Co}$  na molécula da Bothropstoxina-1(Bthx-1) e do veneno de *Bothrops jararacussu*;
- Avaliar a viabilidade de macrófagos peritoneais de camundongos B10.PL e BALB/c na presença da Bthx-1 e do veneno total de *Bothrops jararacussu*, nas formas nativa ou irradiada;
- Verificar a reatividade dos anticorpos produzidos contra a Bthx-1 nas formas nativa e irradiada;
- Verificar a especificidade dos anticorpos produzidos contra a Bthx-1 nativa ou irradiada;
- Verificar a predominância de resposta celular Th1 ou Th2 frente a Bthx-1 e ao veneno total de *Bothrops jararacussu*;
- Comparar a miotoxicidade da Bthx-1 nativa e irradiada.

### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1 DROGAS E REAGENTES**

Todas as drogas e reagentes utilizados neste projeto foram de qualidade pró-análise, obtidas comercialmente.

#### **3.2 PURIFICAÇÃO DA BOTHROPSTOXINA-1**

O veneno total de *Bothrops jararacussu* (Instituto Butantan) foi purificado através de sua passagem por uma coluna de troca catiônica (Resource-S). 60 mg do veneno total foram dissolvidas em 1 mL de tampão Fosfato de Sódio 25 mM, pH 7.8 e, após centrifugação, o sobrenadante foi injetado em uma coluna de troca catiônica de 1 mL conectada a um sistema FPLC (Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden). Ao término da corrida, os picos referentes à Bothropstoxina-1 foram reunidos, dialisados, congelados à -80°C e liofilizados (E-C Modulyo), para posterior utilização.

Os tampões utilizados nesta purificação foram:

A- 25 mM de Fosfato de Sódio, pH 7.8

B- 25 mM Fosfato de Sódio contendo NaCl a 2 M, pH 7,8.

A corrida foi de 2,5 mL/min. Depois de uma lavagem inicial de 10 mL com 7,5% de tampão B (25 mM de NaCl), a eluição do limite das frações foi apresentada usando um gradiente linear (slope=1%/mL) por 25 mL. A coluna foi então lavada com 10 mL do tampão B seguida por 10 mL do tampão A para lavar o NaCl presente na coluna (SPENCER *et al.*, 1998)

#### **3.3 ANIMAIS**

Foram utilizados camundongos isogênicos B10.PL e BALB/c, obtidos da colônia do Biotério do IPEN/CNEN/SP, 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 normas 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).

### **3.4 IRRADIAÇÃO DE PROTEÍNAS**

A Bothropstoxina-1 (2 mg/mL) e o veneno total de *Bothrops jararacussu* (2 mg/mL) foram diluídos em solução salina 0,9% e então submetidos à ação de raios gama de uma fonte de  $^{60}\text{Co}$  (Gamma Cell, Atomic Agency of Canada Ltd) a uma dose de 2 kGy (taxa de dose de 3,51 kGy/hora).

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 durante todo o processo de irradiação.

### **3.5 CARACTERIZAÇÃO DAS FRAÇÕES PROTÉICAS (SDS-PAGE)**

A eletroforese é 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 realizada, geralmente, em géis de agarose ou poliacrilamida com tamanho de poros característicos. Na eletroforese em gel de poliacrilamida, utiliza-se o dodecilsulfato de sódio (SDS) que é um detergente que vai conferir carga à proteína (expor a carga), rompendo as interações não-covalentes entre elas.

As amostras do veneno total de *Bothrops jararacussu* e da Bthx-1, nativos e irradiados, numa concentração de 40  $\mu\text{g}/\text{poço}$  cada, foram diluídas em tampão de amostra, com  $\beta$ -mercaptoetanol, e aquecidas a 95°C por 5 minutos. Em seguida, as amostras foram aplicadas em um gel de poliacrilamida a 15% em presença de dodecil sulfato de sódio (SDS), seguindo o protocolo descrito por LAEMMLI (1970). Também foi utilizada amostra de padrão de pesos moleculares conhecidos e a voltagem fixada foi em 90 v. Terminada a eletroforese, o gel foi corado com solução de nitrato de prata. Para essa coloração utilizam-se 3 soluções:

<b>Solução Fixadora</b>	<b>Solução de Prata</b>	<b>Solução Reveladora</b>
15 mL de etanol	0,3 g de nitrato de prata	4,5 g de NaOH
1,0 mL de ácido acético	q.s.p. para 150 mL de água destilada	2,0 mL de Formaldeído
q.s.p. para 150 mL de água destilada		q.s.p. para 150 mL de água destilada

### **3.6 PRODUÇÃO DE ANTICORPOS ESPECÍFICOS ANTIPROTEÍNAS NATIVAS OU IRRADIADAS**

Anticorpos específicos antiproteínas foram obtidos pela imunização de camundongos B10. PL e BALB/c com amostras de Bthx-1, nativas ou irradiadas, seguindo o método clássico de imunização preconizado por HARLOW & LANE (1988) com ligeiras modificações.

Os camundongos foram inoculados, via subcutânea, no dorso, com soluções de 4 µg/animal de cada amostra de proteína. Foram realizadas três imunizações, sendo que no primeiro inóculo utilizou-se adjuvante completo de Freund e coletaram-se duas amostras de sangue de dois camundongos antes da imunização que foram utilizados como controle negativo.

Após 15 dias, procedeu-se à coleta de sangue dos animais através do plexo retro-orbital com o auxílio de uma pipeta Pasteur, com o objetivo de pesquisar anticorpos específicos. No 2º inóculo, amostras de Bthx-1, nativa ou irradiada, foram diluídas em adjuvante incompleto de Freund e, passados 7 dias, procedeu-se nova sangria. No 3º inóculo as proteínas foram diluídas em PBS (Tampão Fosfato de Sódio) e a terceira coleta de sangue foi feita após 7 dias do 3º inóculo.

O sangue dos animais foi colhido em tubos cônicos do tipo eppendorf, contendo 5 µL 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 (-20°C).

### **3.7 VERIFICAÇÃO DA REATIVIDADE DOS ANTICORPOS PRODUZIDOS CONTRA A Bthx-1 NATIVA E IRRADIADA - WESTERN BLOT**

Após a realização do SDS-PAGE, sem coloração, as amostras de proteína contidas no gel foram transferidas eletroforéticamente para uma membrana de nitrocelulose (TOWBIN *et al.*, 1979; TOWBIN & GORDON, 1984). Para tanto, montou-se a pilha de transferência composta por três folhas de papel Whatman3MM, membrana de nitrocelulose, gel de poliacrilamida e, por último, mais três folhas do mesmo papel utilizado anteriormente saturado com tampão de transferência.

Após a eletrotransferência (10 v / 40 min.), realizou-se o bloqueio com PBS-Leite (Tampão Fosfato de Sódio + leite Molico desnatado) 5%, pH 7.2, por 1 h a temperatura ambiente. Em seguida, plasma contendo anticorpos específicos contra a Bthx-1, nativa ou irradiada, foi adicionado à membrana, numa diluição de 1/1000 em PBS-Leite. A membrana foi mantida à 4°C, "over night", sob agitação constante. Após 4 lavagens, de 10 minutos cada, com PBST (Tampão Fosfato de Sódio Tween), a membrana foi incubada por 1 h com conjugado IgG anti-camundongo (Vector Laboratories), marcado com peroxidase diluído em PBS-Leite 1/2000; após lavagens com PBST, adicionou-se a solução cromogênica (10 mg de 3,3'-diamino-benzidine; 15 µL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30%; pH 7,2) à fim de revelar a reação (1 a 3 min.). A mesma foi interrompida através de sucessivas lavagens com água destilada.

### **3.8 ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO (ELISA - ENZYME LINKED IMMUNO SORBENT ASSAY)**

A presença de anticorpos específicos pode ser detectada pela ligação direta do anticorpo ao seu antígeno, sendo este um ensaio baseado em interações primárias, como é o caso do ELISA.

O plasma obtido dos animais imunizados com a Bthx-1, nas formas nativa ou irradiada, foi submetido ao ensaio de ELISA a fim de pesquisar a presença de

anticorpos decorrente do processo de imunização e a reatividade das proteínas na forma nativa.

Para tanto, o ELISA foi feito em micro placas de polietileno com 96 poços, às quais eram adsorvidas a proteína purificadas (Bthx-1 nativa), em tampão carbonato/bicarbonato pH 9,6 em uma concentração de (1,0µg/poço/100µL), “over night” a 4°C (sensibilização das placas).

Após sucessivas lavagens com PBS contendo 0,5% de Tween 20 (PBST), eventuais sítios de ligação foram bloqueados com solução de bloqueio (PBST + Leite Mólico desnatado – 4 g/100 mL) por 1 hora, em estufa a 37°C. Após novas lavagens, o plasma foi diluído na solução de bloqueio em concentrações pré-determinadas, adicionado às placas e incubado por 1 hora em estufa a 37°C. Seguindo a fase de lavagem acima descrita, os anticorpos anti-camundongo IgG Total, IGg1 e IGg2b (BD Pharmingen™) conjugados com peroxidase, diluídos a 1/10000 em solução de bloqueio, foram adicionados nos poços predeterminados e incubados por 1 hora à 37°C em estufa.

As últimas lavagens foram seguidas pela adição de cromógeno OPD (o-fenil-n-diamine), 0,5 mg/mL de tampão citrato de sódio/ácido cítrico (0,05 M e pH 5,0), contendo 10 µL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> adicionado no momento do uso. A reação foi interrompida pela adição de 50 µL de ácido cítrico 0,2 M/poço e a absorvância, lida a 450 nm, foi determinada em leitor de micro placas (Dynatech MR4000).

Os resultados do ensaio imunoenzimático foram expressos arbitrariamente em Índice de Reatividade (IR). O cálculo do IR foi realizado através da média dos valores de DO obtidos para as amostras dos animais imunizados dividida pela média dos valores de DO das amostras do grupo controle (não imunizado) (VITALIANO *et al.*,2002).

### **3.9 AVALIAÇÃO DE DANO MUSCULAR – LDH (DESIDROGENASE LÁCTICA)**

A LDH está presente praticamente em todos os órgãos e tecidos do organismo, inclusive no tecido muscular, e sua atividade catalítica no soro é devido à

presença de várias isoenzimas. A atividade da LDH é determinada de acordo com a seguinte reação (READ, 2001):



Uma vez que a Bthx-1 é uma miotoxina, resolvemos utilizar o ensaio de LDH para quantificar o dano muscular ocasionado pela toxina em ambas as formas. Para tanto, utilizou-se o *kit* LDH Liquiform da Labtest. Camundongos B10.PL e BALB/c foram inoculados intraperitonealmente com a Bthx-1 nativa ou irradiada diluída em solução salina 0,9%. Após um período de 3 horas, realizou-se a coleta de sangue, via plexo retro-orbital e posterior separação do plasma.

Para verificar a presença de LDH no plasma coletado utilizou-se um reagente denominado Reagente de Trabalho, preparado da seguinte maneira:

$$\text{Reagente de Trabalho} = \text{Reagente 1} + \text{Reagente 2} \quad \text{onde}$$

- **Reagente 1:** contém NADH 360  $\mu\text{mol/L}$  e azida sódica 15  $\text{mmol/L}$
- **Reagente 2:** contém tampão 250  $\text{mmol/L}$ , piruvato de sódio 6  $\text{mmol/L}$  e azida sódica 15  $\text{mmol/L}$

Com o reagente de trabalho pronto, adicionou-se 2  $\mu\text{L}$  da amostra de plasma a cada 100  $\mu\text{L}$  do reagente em poços predeterminados e procedeu-se as leituras (Spectra Max190) após 1 min. ( $A_1$ ) e 2 min. ( $A_2$ ) a 340 nm. Ao término das leituras foi realizado o cálculo da Atividade.

Para o cálculo da Atividade, utilizou-se a seguinte fórmula:

$$A = \frac{A_1 - A_2}{2} \times 8095 \quad (2)$$

### 3.10 MACRÓFAGOS PERITONEAIS DE CAMUNDONGOS

Macrófagos peritoneais de camundongos B10.PL e BALB/c, não estimulados, foram isolados de acordo com a técnica de MAHONEY *et al.*, (1977), com pequenas modificações.

Antes de proceder-se a coleta dos macrófagos, primeiramente foi adicionado as placas 50  $\mu$ L da Bthx-1 ou do veneno total *Bothrops jararacussu*, nativos ou irradiados, em concentrações decrescentes, iniciando-se pela máxima concentração de 2 mg/poço. Após a aplicação das proteínas, as placas foram levadas a estufa 37°C até o plaqueamento dos macrófagos.

O lavado peritoneal foi obtido da seguinte maneira: os animais foram sacrificados seguindo as princípios de ética e experimentação animal e, posteriormente injetou-se, intraperitonealmente, aproximadamente 5 mL/animal de PBS contendo 1% de antibiótico e foram feitas leves massagens no peritônio. Coletou-se então o lavado peritoneal, com pipeta Pasteur, e este foi então transferido para um tubo cônico de 15 mL que foi acondicionado em leite de gelo. Após a coleta, o lavado peritoneal foi centrifugado por 10 minutos a 200 *g*. Em seguida, o *pellet* de células foi ressuspendido em meio de cultura RPMI com 10% de soro fetal bovino e procedeu-se a contagem das células em Câmara de Neubauer.

Após a contagem das células, foi feito o ajuste para as seguintes concentrações/poço:

- **Bthx-1**: aproximadamente  $2 \times 10^4$  células/poço.
- **Veneno total de *Bothrops jararacussu***: aproximadamente  $10 \times 10^4$  células/poço.

Com as concentrações ajustadas para cada proteína, aplicou-se 100  $\mu$ L/poço da suspensão celular e as placas foram levadas a estufa 37°C por 24 h. No dia seguinte, foi realizado o ensaio de citotoxicidade – MTS.

### 3.11 ANÁLISE DA VIABILIDADE DE MACRÓFAGOS PERITONEAIS DE CAMUNDONGOS INCUBADOS COM PROTEÍNAS NATIVAS OU IRRADIADAS (ENSAIO DE CITOTOXICIDADE - MTS)

Para avaliar possíveis alterações na viabilidade de macrófagos incubados com amostras de proteínas, utilizou-se a técnica do MTS, um composto tetrazólico 3-(4,5 dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximethoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-(2H-tetrazólio) que juntamente com um reagente acoplador de elétrons (PMS - fenazina methosulfato) mede, através de um espectrofotômetro, o produto da oxidação do MTS, o formazan (RABINOTCH *et al.*, 1987; ALFIERI *et al.*, 1988; KIDERLEN & KAYE, 1990).

O veneno total de *Bothrops jararacussu* ou a Bthx-1, nas formas nativa ou irradiada, numa concentração inicial de 2 mg/mL (razão 2) para cada um, foi adicionado (50 µL/poço) em microplacas de 96 poços em diluições decrescentes. Em seguida, as placas foram transferidas para estufa de CO<sub>2</sub> a 37°C até que o lavado peritoneal fosse coletado, centrifugado, contado e ressuspensionado nas concentrações acima descritas. Posteriormente, as células foram plaqueadas num volume de 100 µL /poço.

Os controles utilizados foram os seguintes:

- 12 poços contendo apenas meio de cultura (branco);
- 12 poços contendo meio de cultura mais células (controle negativo de dano, ou seja, 100% de viabilidade celular) e
- 12 poços contendo Triton X 100 0,1% (controle positivo de dano, ou seja, 0% de viabilidade celular).

Após as 24 h do plaqueamento das células, as placas foram incubadas com 20 µL de MTS+PMS (20:1) em estufa de CO<sub>2</sub> a 37°C por 2 horas para que se pudessem fazer as leituras no espectrofotômetro (Dynatech MR4000) a 490 nm.

### 3.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística consistiu na determinação das médias aritméticas (ma) com 95% de intervalo de confiança (95% IC) dos índices de reatividade ELISA

(IE) e as diferenças entre as médias foram analisadas pelo software Prisma 3.0 e o teste utilizado foi o ANOVA (dados não-paramétricos).

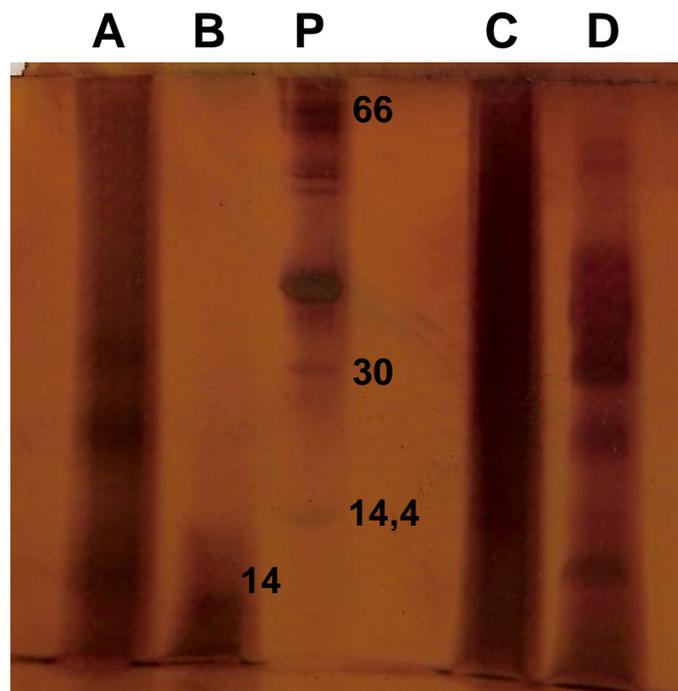
### **3.13 INFRA-ESTRUTURA**

Os experimentos envolvendo animais, bem como os ensaios bioquímicos e celulares foram desenvolvidos no Laboratório de Biofármacos, pertencente ao Centro de Biotecnologia do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – IPEN, em colaboração com o Instituto de Medicina Tropical de São Paulo – FMUSP.

## 4. RESULTADOS

### 4.1 SDS-PAGE

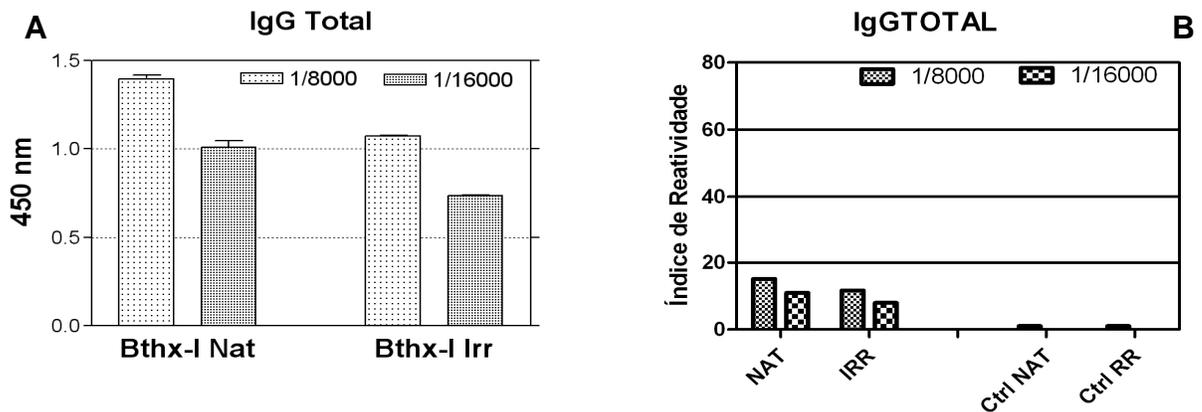
Foi feita a eletroforese, em gel de poliacrilamida a 15%, da Bthx-1 e do veneno total de *Bothrops jararacussu*, nas formas nativa e irradiada (**Figura 3**) para verificar as possíveis modificações devido ao processo de irradiação. Observando os perfis das proteínas irradiadas, verificamos que houve a formação de bandas de maior peso molecular. Para a Bthx-1 nativa, mesmo em presença do agente redutor, não houve a dissociação da subunidade que forma o dímero. No caso do veneno total de *Bothrops jararacussu* irradiado, observou-se a formação de um arraste, indicando a fragmentação da proteína após o processo de irradiação.



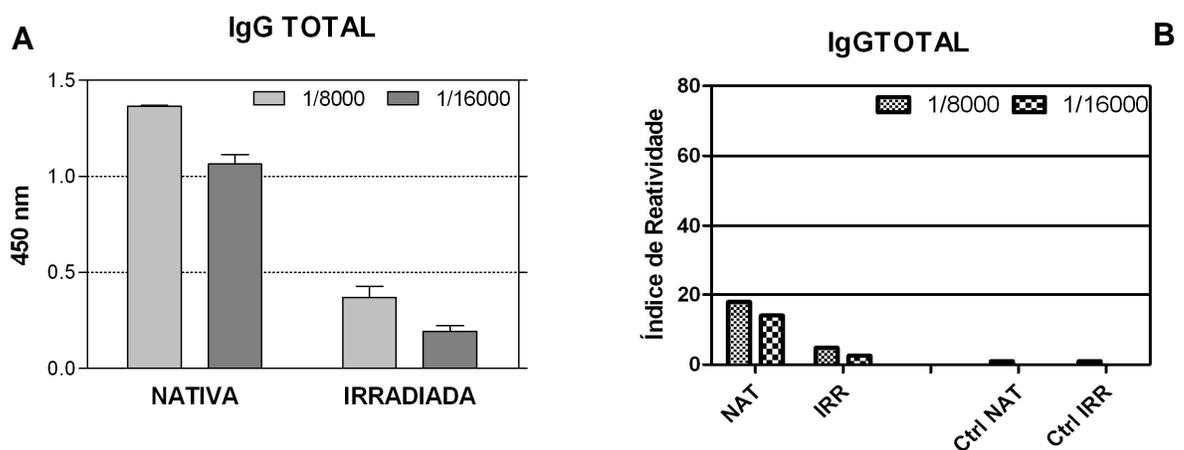
**Figura 3:** Eletroforese em gel de poliacrilamida 15% em condições redutora. (A) Bthx-1 irradiada; (B) Bthx-1 nativa; (C) *Bothrops jararacussu* irradiado; (D) *Bothrops jararacussu* nativo. Padrão de peso molecular (P).

## 4.2 PRODUÇÃO DE ANTICORPOS

Em relação à produção de anticorpos contra a Bthx-1, nativa ou irradiada, tanto em camundongos B10.PL bem como nos BALB/c, podemos observar nas **Figuras 4A e 5A**, que os anticorpos produzidos contra a Bthx-1 irradiada, foram capazes de reconhecer ambas as formas da toxina.

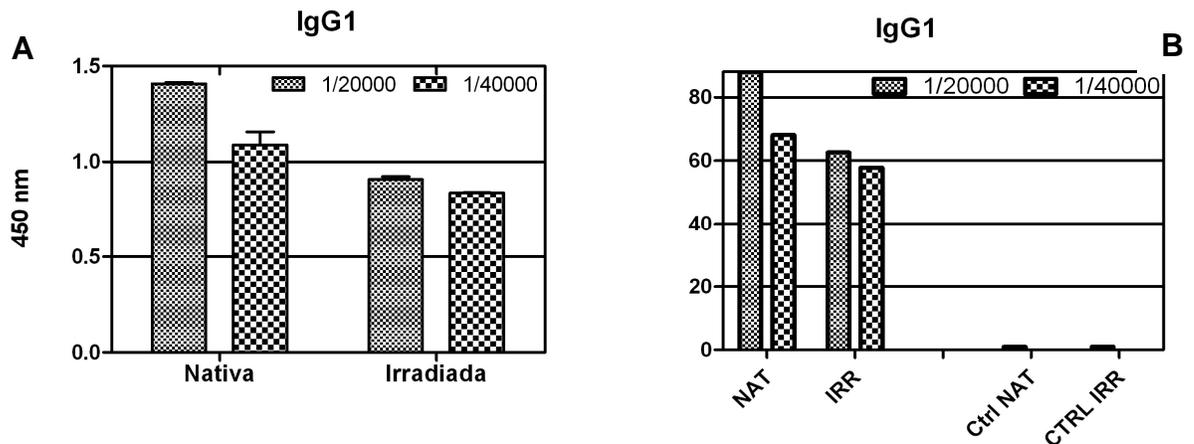


**Figura 4: Ensaio imunoenzimático para a avaliação da produção de anticorpos específicos contra Bthx-1 nativa ou irradiada em camundongos B10.PL (A) e Índice de Reatividade para o mesmo (B).**

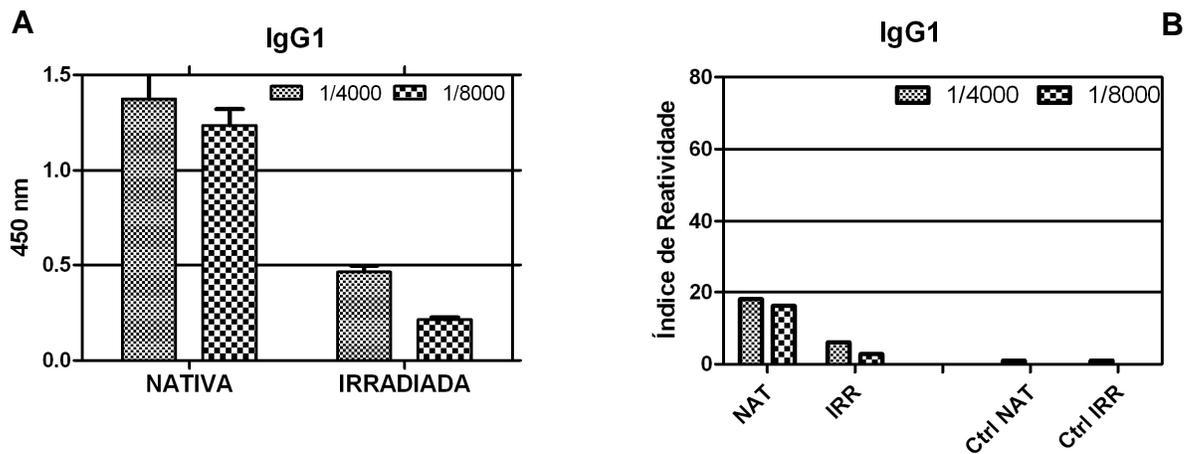


**Figura 5: Ensaio imunoenzimático para a avaliação da produção de anticorpos específicos contra Bthx-1 nativa ou irradiada em camundongos BALB/c (A) e Índice de Reatividade para a mesma (B).**

Na avaliação das subclasses de IgG observou-se que, para ambas as linhagens de camundongos utilizadas, a Bthx-1 nativa induziu títulos superiores para IgG1 (**Figuras 6A e 7A**). No caso dos camundongos B10.PL, a produção de IgG1 contra a toxina nativa, foi cerca de 35% maior em relação aos títulos obtidos contra a Bthx-1 irradiada (**Figura 6B**). Para os camundongos BALB/c a produção da subclasse em questão foi cerca de 75% superior contra a toxina nativa em relação à irradiada (**Figura 7B**).

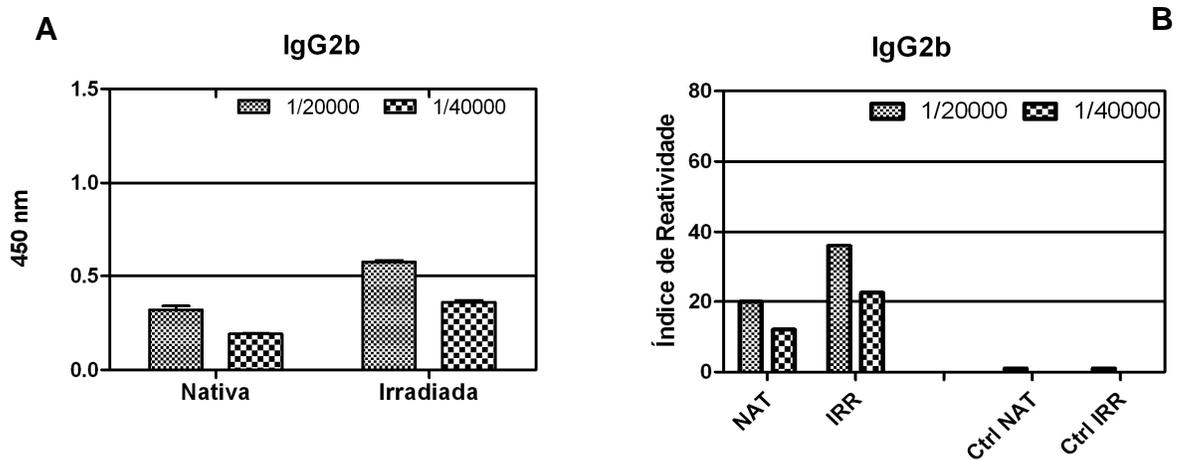


**Figura 6: Ensaio imunoenzimático para a avaliação da produção de anticorpos específicos (IgG1) contra Bthx-1 nativa ou irradiada em camundongos B10.PL (A) e Índice de Reatividade para a mesma (B).**

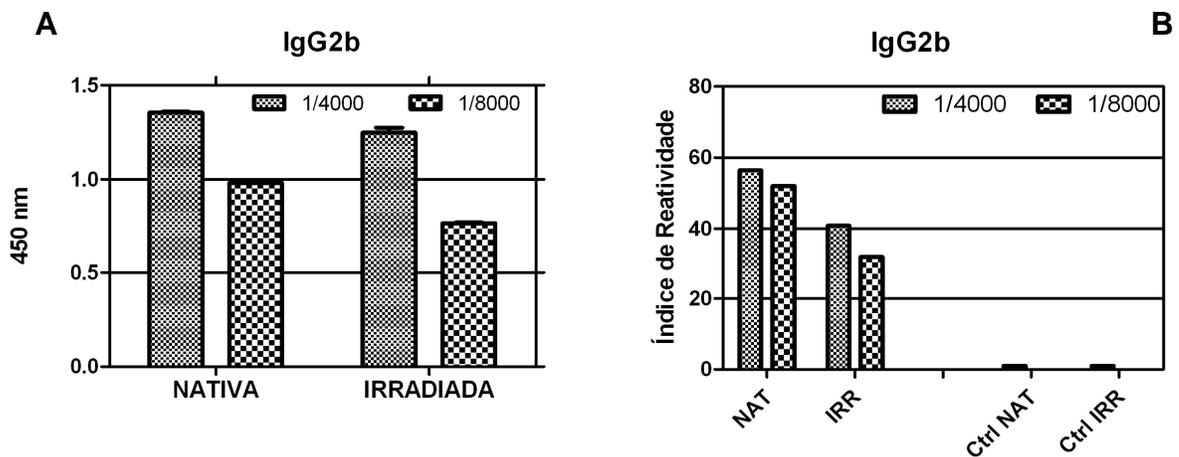


**Figura 7: Ensaio imunoenzimático para a avaliação da produção de anticorpos específicos (IgG1) contra Bthx-1 nativa ou irradiada em camundongos BALB/c (A) e Índice de Reatividade para a mesma (B).**

Na **Figura 8B** podemos observar que a Bthx-1 irradiada induziu uma produção de IgG2b cerca de 50% superior em relação a produção induzida pela toxina nativa. A **Figura 9A**, referente aos camundongos BALB/c, mostra que a produção de imunoglobulina 2b foi bastante semelhante tanto para a toxina nativa como para a irradiada.



**Figura 8: Ensaio imunoenzimático para a avaliação da produção de anticorpos específicos (IgG2b) contra Bthx-1 nativa ou irradiada em camundongos B10.PL (A) e Índice de Reatividade para a mesma (B).**

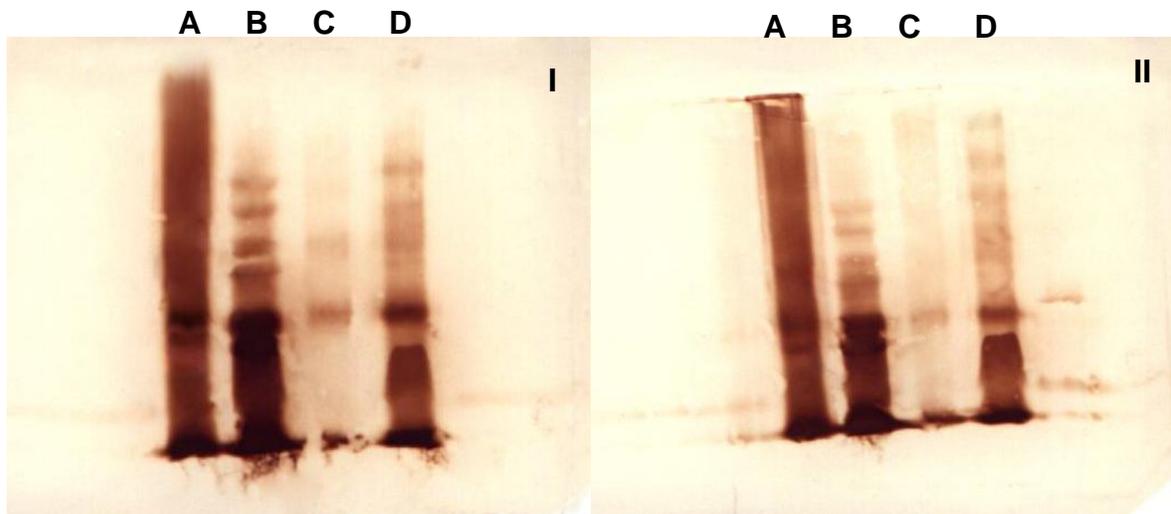


**Figura 9: Ensaio imunoenzimático para a avaliação da produção de anticorpos específicos (IgG2b) contra Bthx-1 nativa ou irradiada em camundongos BALB/c (A) e Índice de Reatividade para a mesma (B).**

### 4.3 WESTERN BLOT

Para verificar a reatividade da Bthx-1 e do veneno total de *Bothrops jararacussu*, ambos nas formas nativa e irradiada, com os soros obtidos da imunização dos camundongos com a Bthx-1 nativa e irradiada, empregou-se a técnica de Western Blot. Os resultados podem ser vistos na **Figura 10**.

Nota-se que tanto a toxina isolada quanto o veneno total, nas formas nativa ou irradiada, foram reconhecidos pelos anticorpos presentes no plasma obtido da imunização com a Bthx-1 nativa ou irradiada.



**Figura 10:** Western Blot utilizando o Veneno Total de *Bothrops jararacussu* irradiado (A) e nativo (B), bem como a Bthx-1 irradiada (C) e nativa (D), em condições redutoras. Os anticorpos primários de camundongos utilizados foram: anti-Bthx-1 nativo (I) ou Bthx-1 irradiado (II).

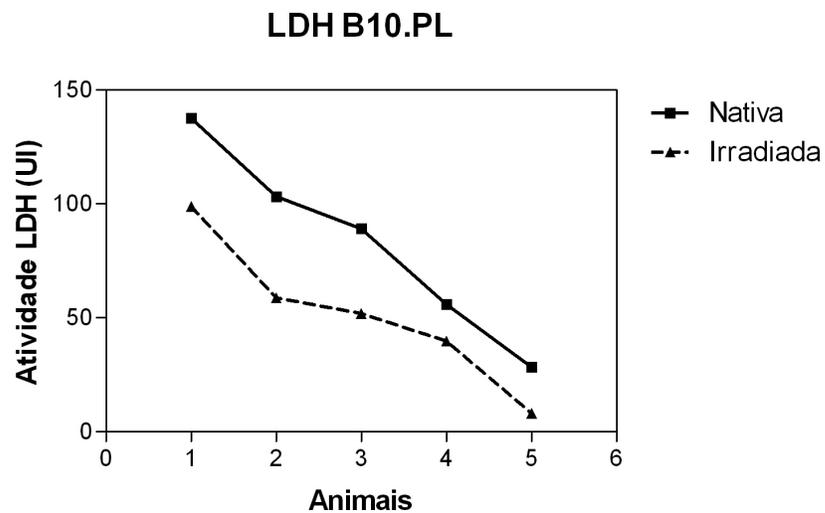
### 4.4 AVALIAÇÃO DE DANO MUSCULAR – LDH

Para o ensaio de dano muscular (LDH), em ambos os camundongos, pode-se ver nitidamente, tanto na **Figura 11** como na **Figura 12**, que o maior dano muscular ocorreu quando a Bthx-1 nativa foi utilizada, contrastando com a toxina irradiada, onde o dano muscular foi menor.

A **Tabela 1** mostra os dados obtidos com as leituras do ensaio de LDH no espectrofotômetro a 340 nm. (Spectra Max 190) para os camundongos B10.PL. A **Tabela 2** mostra os dados do mesmo ensaio, porém os valores são para os camundongos BALB/c.

**Tabela 1: Dados obtidos com as leituras do ensaio de Liberação de LDH a 340 nm após 1 e 2 minutos da aplicação do reagente de trabalho em camundongos B10.PL.**

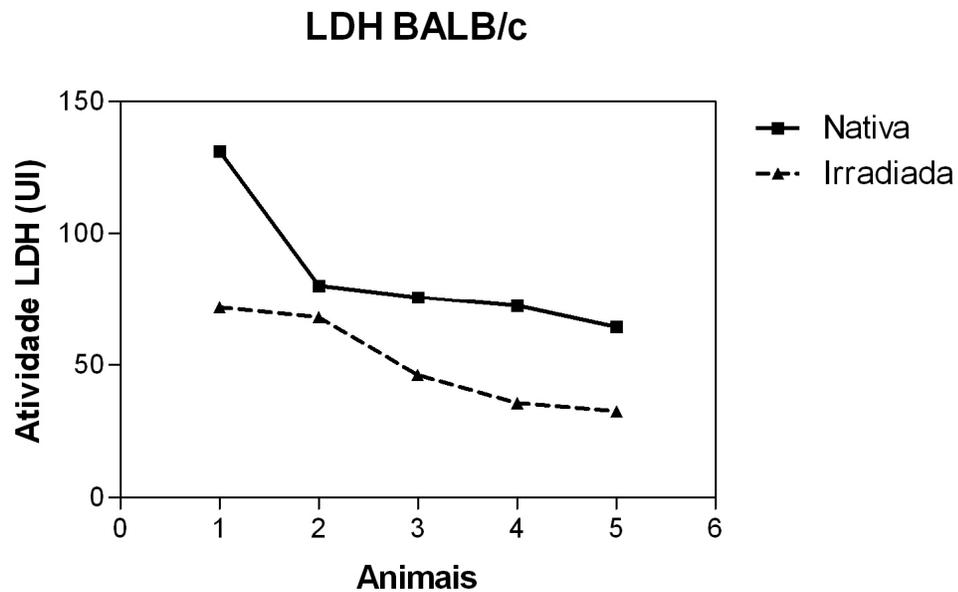
	<b>AMOSTRAS (Bthx-1)</b>	<b>Abs. 1 (após 1 min.)</b>	<b>Abs. 2 (após 2 min.)</b>	<b>ATIVIDADE</b>
<b>NATIVA</b>	1	0,6327	0,5987	<b>137,61</b>
	2	0,6021	0,5766	<b>103,21</b>
	3	0,6298	0,6078	<b>89,045</b>
	4	0,6245	0,6107	<b>55,855</b>
	5	0,205	0,198	<b>28,3325</b>
<b>IRRADIADA</b>	1	0,6393	0,6149	<b>98,759</b>
	2	0,6234	0,6089	<b>58,688</b>
	3	0,6278	0,615	<b>51,808</b>
	4	0,658	0,6482	<b>39,665</b>
	5	0,254	0,252	<b>8,095</b>



**Figura 11: Ensaio de liberação de LDH (Desidrogenase Láctica) para verificação de dano muscular provocado pela Bthx-1, nativa ou irradiada, inoculada em camundongos B10.PL.**

**Tabela 2: Dados obtidos com as leituras do ensaio de Liberação de LDH a 340 nm após 1 e 2 minutos da aplicação do reagente de trabalho em camundongos BALB/c.**

	AMOSTRAS (Bthx-1)	Abs. 1 (após 1 min)	Abs. 2 (após 2 min)	ATIVIDADE
<b>NATIVA</b>	1	0,5319	0,514	<b>72,45</b>
	2	0,5532	0,5373	<b>64,35</b>
	3	0,5529	0,5342	<b>75,68</b>
	4	0,5151	0,4953	<b>80,1405</b>
	5	0,5951	0,5627	<b>131,14</b>
<b>IRRADIADA</b>	1	0,5903	0,5726	<b>71,6407</b>
	2	0,6234	0,6146	<b>35,62</b>
	3	0,6229	0,6115	<b>46,14</b>
	4	0,5904	0,5736	<b>67,9980</b>
	5	0,6297	0,6217	<b>32,38</b>

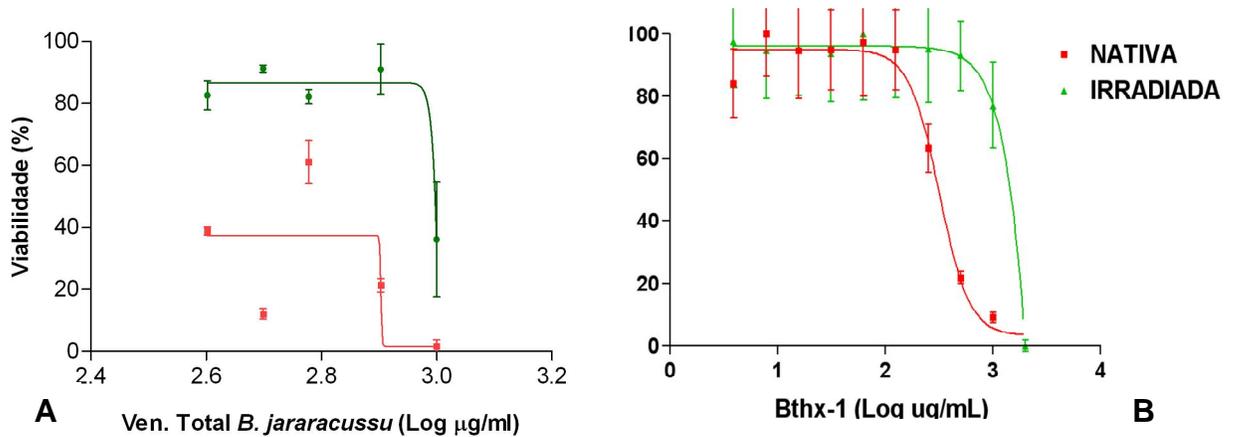


**Figura 12: Ensaio de liberação de LDH (Desidrogenase Láctica) para verificação de dano muscular provocado pela Bthx-1, nativa ou irradiada, inoculada em camundongos BALB/c.**

#### 4.5 ENSAIO DE CITOTOXICIDADE – MTS

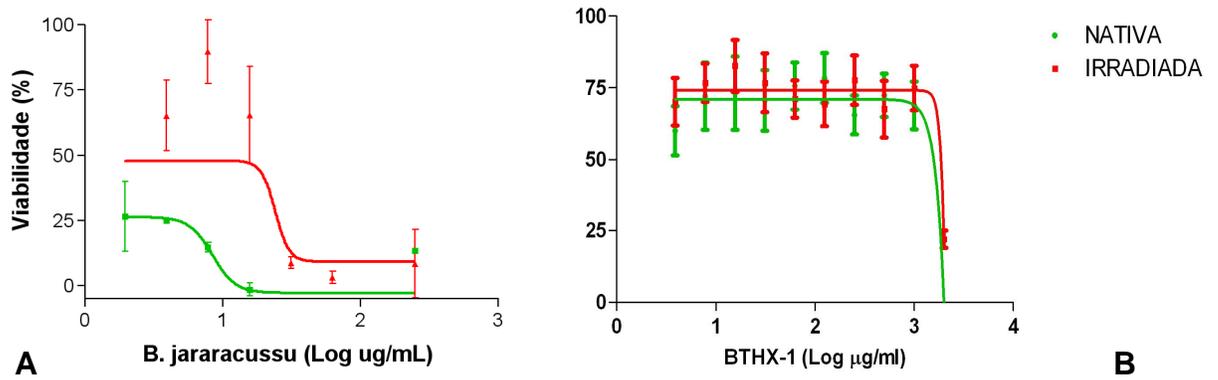
Analisando-se o gráfico da **Figura 13A**, pode-se ver que a viabilidade dos macrófagos peritoneais, quando incubados com o veneno total de *Bothrops jararacussu* nativo, foi menor quando comparado com sua forma irradiada. Mesmo nas maiores concentrações do veneno irradiado, a viabilidade dos macrófagos não chegou à zero, demonstrando a menor toxicidade do mesmo, ao passo que com o veneno nativo a viabilidade ficou bem próxima a este.

Na **Figura 13B**, podemos observar que a viabilidade dos macrófagos foi maior quando incubados com a Bthx-1 irradiada, em comparação com a toxina na forma nativa.



**Figura 13: Ensaio de citotoxicidade (MTS) para verificação da viabilidade dos macrófagos peritoneais de camundongos B10.PL incubados com o veneno de *Bothrops jararacussu* (A) ou com a Bthx-1 (B), na forma nativa ou irradiada.**

Na **Figura 14A** podemos observar que a viabilidade dos macrófagos incubados com o veneno total de *Bothrops jararacussu* nativo foi menor quando comparada com sua forma irradiada, fato este que pode ser analisado pela diferença entre as duas curvas que representam à viabilidade de ambas as formas do veneno. No caso da Bthx-1, **Figura 14B**, essa diferença na viabilidade entre as formas nativa e irradiada foi menos acentuada.



**Figura 14: Ensaio de citotoxicidade (MTS) para verificação da viabilidade dos macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c incubados com o veneno de *Bothrops jararacussu* (A) ou com a Bthx-1 (B), na forma nativa ou irradiada.**

## 5. DISCUSSÃO

Considerando-se que inúmeras pesquisas têm revelado o poder da radiação em modificar proteínas, melhorando seu potencial imunológico, um estudo mais detalhado sobre as possíveis alterações estruturais promovidas pelo processo de irradiação e sobre o tipo de resposta imunológica gerada contra proteínas irradiadas foi realizado.

A eletroforese em gel de poliacrilamida a 15%, do veneno total de *Bothrops jararacussu* e da Bothropstoxina-1 permitiu identificar modificações estruturais após o processo de irradiação (radiação  $\gamma$  de  $^{60}\text{Co}$ ). A análise do perfil eletroforético, na presença do agente redutor, da Bthx-1 irradiada não mostrou dissociação das subunidades, sugerindo que a irradiação levou a formação de ligações intermoleculares resistentes ao agente redutor ( $\beta$ -mercaptoetanol). No caso do veneno total de *Bothrops jararacussu*, o que pôde ser visto é que a irradiação do veneno promoveu um arraste devido à fragmentação da proteína.

Esses resultados sugerem que o processo de radiação promoveu quebra das cadeias polipeptídicas, em consequência da ruptura de pontes covalentes, corroborando os achados de MOON & SONG (2001) que verificaram a conversão das proteínas em agregados de alto peso molecular devido às reações de "cross-linking" inter-proteínas, interações hidrofóbicas e eletrostáticas e, formação de pontes dissulfeto.

Os resultados obtidos com o Western Blot demonstraram que os anticorpos obtidos contra a Bthx-1 irradiada foram capazes de reconhecer a toxina isolada e o veneno total de *B. jararacussu*. Estes resultados indicaram que, apesar das modificações estruturais provocadas pelo processo de irradiação, a toxina ainda conserva suas propriedades imunogênicas.

Analisando os dados obtidos para a produção de anticorpos, tanto em camundongos B10.PL como em camundongos BALB/c, contra Bthx-1 nas formas nativa ou irradiada, observou-se que os anticorpos formados contra a proteína na forma irradiada foram capazes de reconhecer a proteína na forma nativa. O mesmo fato foi observado por BAPTISTA (2004), que também trabalhou com a Bthx-1 e por

CARDI (1999) que observou que os animais imunizados com a crotoxina irradiada apresentaram títulos de anticorpos maiores que aqueles imunizados com a crotoxina nativa.

Foi observado ainda que a imunização dos animais com a Bthx-1, na forma nativa, apresentou títulos superiores para a imunoglobulina 1 (IgG1), sendo que no caso dos camundongos BALB/c os níveis de anticorpos produzidos foram cerca de 75% maiores que aqueles produzidos contra a toxina irradiada. Para os camundongos B10.PL esta diferença entre a produção da imunoglobulina em questão foi de aproximadamente 35%.

Esses dados indicam a predominância de uma resposta imunológica do tipo Th2. BREWER e colaboradores (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). Vale lembrar que os camundongos B10.PL são originados do cruzamento de camundongos C57BL/6 X DBA/2 e possivelmente apresentem uma tendência para a resposta celular do tipo Th1.

Contudo, a Bthx-1, na forma irradiada, mostrou títulos superiores aos apresentados pela proteína na forma nativa para IgG2b no caso dos camundongos B10.PL. Tal fato indica a predominância de uma resposta de células Th1 para as proteínas irradiadas, uma vez que estas células estão envolvidas na imunidade celular, mais especificamente, na ativação de macrófagos (DELVES & ROITT, 2000). Estes resultados corroboram os relatos de PINCHUK & FILIPOV (2008) quando afirmaram que camundongos B10.PL apresentam uma tendência para resposta celular do tipo Th1.

Para os camundongos BALB/c, comparando a produção de IgG1 e de IgG2b contra a Bthx-1 irradiada, observamos que os títulos obtidos foram aproximadamente 60% superiores para a imunoglobulina 2b, mostrando assim uma tendência para resposta de células Th1. MARTINS e colaboradores (2007), trabalhando com camundongos BALB/c imunizados e desafiados com *Paracoccidioides brasiliensis*, observaram que os referidos camundongos apresentaram a predominância de uma resposta de células Th1.

A ativação diferencial de células Th1 e Th2 pode ser explicada pelo fato de que elas respondem seletivamente a antígenos apresentados por diferentes células apresentadoras de antígenos, ou seja, as células Th2 proliferam muito bem em resposta a antígenos apresentados por linfócitos B. Já a proliferação de células Th1 é estimulada por antígenos apresentados por macrófagos (CHANG *et al.*, 1990; TADA *et al.*, 2005). Sendo assim, mesmo com uma determinada predominância de resposta celular, como é o caso dos modelos animais utilizados neste trabalho, esta pode mudar de acordo com o antígeno utilizado (nativo ou irradiado).

O trabalho realizado por BAPTISTA e colaboradores (2009), que relatou as propriedades imunológicas da Bthx-1 irradiada com raios gama de  $^{60}\text{Co}$ , demonstrou a ativação preferencial de células Th1 ou Th2 através de um estudo realizado com PCR real time onde avaliou a expressão das citocinas IL2 e IL-4 quando da imunização com as formas nativa ou irradiada da Bthx-1. IL2 é uma citocina imunorregulatória produzida pelas células Th1. Esta citocina estimula o crescimento das células T e hematopoiéticas. Já a citocina IL-4, produzida pelas células Th2, age na ativação e crescimento das células B e na produção de anticorpos IgG1, além de ser capaz de inibir a ativação de macrófagos (ANSEL *et al.*, 2006; MALIK *et al.*, 2007).

De acordo com CARDI (1999) o tratamento da crotoxina com raios  $\gamma$  ( $^{60}\text{Co}$ ) induziu a um aumento da sua captação por macrófagos peritoneais de camundongos, quando comparado com a forma nativa. Isso pode ser uma explicação do porque dos maiores títulos de anticorpos apresentados quando a Bthx-1 irradiada foi utilizada, já que os macrófagos fazem parte da resposta celular do tipo Th1.

A avaliação de dano muscular (LDH) permitiu verificar que um menor dano foi ocasionado quando a Bthx-1 irradiada foi utilizada em ambas as linhagens de camundongos. Diferente do que foi observado para a toxina na forma nativa. A Bthx-1 é uma miotóxina e, na forma nativa, esta ação miotóxica está mais acentuada, acarretando uma maior liberação de LDH no sangue coletado. Por outro lado, a forma irradiada, que teve a sua toxicidade atenuada após o processo de irradiação, promoveu menor liberação de LDH.

A LDH catalisa a conversão do piruvato a lactato na presença de NADH. O decréscimo da absorvância em 340 nm devido à oxidação do NADH é proporcional à atividade da LDH na amostra. Portanto, quanto maior a liberação de LDH maior será o dano provocado no tecido (READ, 2001). Nosso trabalho apontou significativo decréscimo da absorvância quando a Bthx-1 nativa foi utilizada, apontando para uma maior liberação de LDH (encontrada no plasma estudado) e, portanto para uma maior conversão de piruvato a lactato, comprovando o maior dano muscular provocado por esta toxina.

A rápida disruptura focal da membrana muscular é seguida por uma série de eventos degenerativos que são similares a várias fosfolipases  $A_2$  (PLA<sub>2</sub>s) miotóxicas (como por exemplo, a Bthx-1), independente da sua fonte e da presença ou ausência de atividade enzimática. Um rápido efluxo de moléculas citosólicas, como a creatina quinase (CK), LDH, aminotransferase aspartato, mioglobulina e creatina, ocorre junto com a despolarização da membrana da célula muscular concomitantemente com o início da contração. A consequência mais relevante do efluxo da membrana é o rápido influxo de cálcio que é responsável pela hipercontração do aparato miofibrilar, que é a maior consequência da ação miotóxica da PLA<sub>2</sub> nas células musculares (GUTIÉRREZ & OWNBY, 2003)

O ensaio de citotoxicidade seguiu o procedimento originalmente descrito por BOREFREUND & 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 colaboradores (1991). A quantidade de MTS incorporado pela população celular é diretamente proporcional a atividade mitocondrial desta e, portanto ao número de células viáveis em cultura.

Os dados obtidos com o ensaio de citotoxicidade celular do veneno total de *B. jararacussu*, nativo ou irradiado, utilizando macrófagos peritoneais de camundongos B10.PL, mostraram que o veneno irradiado apresentou menor toxicidade, cerca de 40%, quando comparado com a forma nativa. Sendo assim, os

macrófagos ensaiados com o veneno irradiado tiveram sua viabilidade em torno de 85% a 20%, sendo esta última referente à maior concentração do veneno o que mostra que mesmo na maior concentração utilizada ainda existiam macrófagos viáveis, ao passo que a viabilidade destas células com o veneno nativo foi de aproximadamente 40% a 0% nas mesmas concentrações.

A viabilidade dos macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c, quando na presença do veneno total de *B. jararacussu* irradiado, foi aproximadamente 25% maior em relação a sua forma nativa, mostrando que houve uma diminuição na toxicidade do veneno irradiado. A viabilidade dos macrófagos peritoneais na presença do veneno irradiado ficou em torno de 50% a 10% o que mostra que mesmo na maior concentração do veneno a viabilidade não chegou ao 0%. Já para o veneno nativo, a viabilidade dos macrófagos peritoneais ficou em torno de 25% a 0%, mostrando que na maior concentração do veneno já não havia mais células viáveis.

No caso da Bthx-1, nas maiores concentrações utilizadas, as células em estudo apresentaram maior viabilidade em presença da toxina irradiada, em relação à sua forma nativa. Nas menores concentrações da toxina não se observou efeito significativo da radiação sobre a viabilidade das células.

Pôde-se observar que os macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c incubados com a toxina irradiada apresentaram uma viabilidade maior do que com sua forma nativa, uma vez que esta viabilidade não chegou a 0%, ficando em torno de 10%, mesmo na maior concentração da toxina, contrastando com sua forma nativa que alcançou este valor.

O aumento observado na viabilidade dos macrófagos, tanto para o veneno total de *Bothrops jararacussu* quanto para a Bthx-1 isolada, se deve a irradiação do veneno e da toxina, uma vez que a irradiação gama de  $^{60}\text{Co}$  na dose de 2 kGy é capaz de atenuar sua toxicidade. CARDI (1999), que trabalhou com a crotoxina (componente mais abundante e tóxico de veneno de *Crotalus durissus terrificus*) e macrófagos peritoneais de camundongos, também observou um aumento na viabilidade destes quando ensaiados com a crotoxina irradiada. OLIVEIRA e colaboradores (2001), que realizaram ensaios de citotoxicidade celular para venenos de serpentes Sul Americanas de importância médica, sugerem a existência de uma

correlação entre a toxicidade destes venenos e suas atividades biológicas. BAPTISTA (2004), que trabalhou com a Bthx-1 e células CHO, também observou um aumento da viabilidade das células quando estas foram ensaiadas com a toxina irradiada.

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

A vantagem de utilização de proteínas irradiadas reside no fato de que, além da esterilidade conferida ao material após o tratamento com raios  $\gamma$ , uma maior quantidade de epítomos protéicos modificados poderiam ser reconhecidos mais prontamente por células apresentadoras de antígenos, resultando em uma melhor imunogenicidade (CARDI, 1999).

## 6. CONCLUSÕES

- A radiação  $\gamma$  de  $^{60}\text{Co}$ , na dose de 2 kGy causou alterações na molécula de Bthx-1 e do veneno total de *Bothrops jararacussu*, além de uma diminuição no dano muscular quando a Bthx-1 irradiada foi utilizada em comparação com a sua forma nativa.
- O Western Blot demonstrou que os anticorpos obtidos contra a Bthx-1 irradiada foram capazes de reconhecer a toxina e o veneno total de *B. jararacussu*.
- A resposta imunológica produzida contra a Bthx-1 irradiada foi predominantemente do tipo Th1.
- A ativação preferencial de células Th1 ou Th2 depende, dentre outros fatores, se o antígeno está na forma nativa ou irradiada.
- A viabilidade dos macrófagos, oriundos das duas linhagens de camundongos, quando o veneno total de *B. jararacussu* e a Bthx-1 irradiados foram utilizados, foi maior nas maiores concentrações do veneno e da toxina, mostrando uma atenuação de sua toxicidade quando irradiado.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H.; POBER, J.S., **Cellular and molecular Immunology**. 3.ed. USA, W.B. Saunders Company, 1997. 494p.
- ABIB, H. & LARABA-DJEBARI, F., Effects of  $^{60}\text{Co}$  gamma radiation on toxicity and hemorrhagic, myonecrotic, and edema-forming activities of *Cerastes cerastes* venom. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, **81**: 1125-1130, 2003.
- ACTON, S.L.; SCHERER, P.E.; LODISH, H.F. & KRIEGER, M., Expression cloning of SR-BI, a CD36-related class B scavenger receptor. *J.Biol.Chem.*, **269**:21003-21009, 1994.
- ADAMS, D.O. & HAMILTON, T.A., The cell biology of macrophage activation. *Ann. Rev. Immunol.* **2**: 283-318, 1984.
- ADAMS, G.E.; ALDRICH, J.E.; BISBY, R.H.; CUNDALL, R.B.; REDPATH, J.L. & WILLSON, R.L., Selective free radical reactions with proteins and enzymes: reactions inorganic radical anions with amino acids. *Radiat. Res.*, **49**:278-289, 1972.
- ADEREM, A. & UNDERHILL, D.M., Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annu. Rev. Immunol.*, **17**: 593-623, 1999.
- ALEXANDER, P. & HAMILTON, L.D.G., Irradiation of proteins in the solid state. Chemical changes produced in bovine serum albumin. *Radiat. Res.*, **13**:214-233, 1961.
- ALFIERI, S.C.; RAMAZEILLES, C.; ZILBERFARB, V.; GALPIN, I.; NORMAN, S.E. & RABINOVITCH, M., Proteinase inhibitors protect *Leishmania amazonensis* amastigotes from destruction by amino acid esters. *Mol.Biochem.Parasitol.*, **29**:191-201, 1988.
- ALLEN, J.E. & MAIZELS, Th1-Th2: Reliable paradigm or dangerous dogma?. *View. Immunol. Today*, **18**(8):387-391, 1997.
- AMARAL, C.F.S.; DOURADO, H.V.; KOOYOUMDJIAN, L.A.; CARDOSO, J.C.; CAMPOS, J.A.; AZEVEDO-MARQUES, M. & LOPES, P.F.A., Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes ofídicos. Brasília, Centro de Documentação do Ministério da Saúde, 1987. 53p.

- ANSEL, K.M.; DJURETIC, I.; TANASA, B.; RAO, A., Regulation of Th2, differentiation and IL4: Locus Accessibility. *Ann. Ver. Immunol.*, **24**:607-656, 2006.
- ARAUJO, H.P; BOURGUIGNON, S.C., BOLLER, M.A.A., DIAS, A.A.S.O., LUCAS, E.P.R., SANTOSAND, I.C.; DELGADO, I.F., Potency evaluation of antivenoms in Brazil: The national control laboratory experience between 2000 and 2006. *Toxicon*, **51**: 502-14, 2008.
- AUGER, M.J. & ROSS, J.A., 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, 3-74p.
- BAPTISTA, J.A., ***Aspectos da Resposta Imune Frente a Antígenos Protéicos Irradiados com <sup>60</sup>Co***. 2004. 47p. Dissertação (Mestrado em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear – Aplicações) – IPEN-CNEN/SP, São Paulo.
- BAPTISTA, J.A.; SPENCER, P.J.; OLIVEIRA, M.S.; NASCIMENTO, N., Immune response against antigens irradiated with <sup>60</sup>Co gamma-rays. *J. Radioanal. Nucl. Chem.*, **269**(3):565-569, 2006.
- BAPTISTA, J.A.; VIEIRA, D.P.; GALISTEO-JÚNIOR, A.J.; CAPRONI, P.; CASARE, M.; ANDRADE-JÚNIOR, H.F.; SPENCER, P.J.; NASCIMENTO, N., Immunological properties of <sup>60</sup>Co gamma-rays irradiated bothropstoxin-I. *J. Radioanal. Nuclear Chem.*, **279**(3):817-821, 2009.
- BARLTROP, J.A.; OWEN, T.C.; CORY, A.H.; CORY, J.G., 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, 1991.
- BELLINE, P. ***Ação da angiotensina II sobre macrófagos peritoneais de camundongos normais e diabéticos***. 2001 93p. Tese (Doutorado em Biologia Funcional e Molecular, na Área de Bioquímica) – Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas, São Paulo.
- BJARDSON, J.B. & FOX, J.W., Hemorrhagic toxins from snake venoms. *J. Toxicol-Toxin. Rev.*, **7**(2): 121-209, 1989.
- BJARDSON, J.B. & FOX, J.W., Hemorrhagic metalloproteinases from snake venoms. *Pharmacol. Ther.* **62**:325-372, 1994.

- BOREFREUND, E. & PUERNER, J.A., A simple quantitative procedure using monolayer cultures for cytotoxicity assay (HTD/NR-90). *J. Tissue Culture Meth.*, **9**:7-9, 1984.
- BOYCE, N.; TIPPING, P.G.; HOLDSWORTH, S.R., Glomerular macrophages produce reactive oxygen species in experimental glomerulonephritis. *Kidney Int.*, **35**: 778-782, 1989.
- BREWER, J.M.; RICHMOND, J.; ALEXANDER, J., The demonstration of an essential role for macrophages in the *in vivo* generation of IgG2a antibodies. *Clin. Exp. Immunol.*, **97**:164-171, 1994.
- BUTLER, J.; HOEY, B.M. & SWALLOW, A.J., Radiation chemistry. *Annu.Rep.Prog.Chem.*, **83**:129-175, 1987.
- BUTLER, J.; LAND, E.J. & SWALLOW, A.J., Chemical mechanisms of the effects of high energy radiation on biological systems. *Radiat. Phys. Chem.* **24**:273-282, 1984.
- CALICH, V.; VAZ, C., **Imunologia**. Rio de Janeiro: *Revinte R Editora*, 2001. 260p.
- CAMEY, K.U.; VELARDE, D.T & SANCHEZ, E.F., Pharmacological characterization and neutralization of venoms used in production of Bothropic antivenom in Brazil. *Toxicon*, **40** (2002):501-509, 2001.
- CAMPOS, L.A., **Isolamento e caracterização da Delta toxina do veneno de *Crotalus durissus terrificus***. 2006. 57p. Dissertação (Mestrado em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear – Aplicações) – IPEN-CNEN/SP, São Paulo.
- CARDI, B.A., **Avaliação do mecanismo de captação e endocitose de crotoxina submetida à ação da radiação gama, por macrófagos peritoneais de camundongos**. 1999. 97p. Tese (Doutorado em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear – Aplicações) - IPEN- CNEN/SP, São Paulo.
- CARDI, B.A; NASCIMENTO, N.; ANDRADE Jr., H.F., Irradiation of *Crotalus durissus terrificus* crotoxin with  $^{60}\text{Co}$   $\gamma$ -rays induces its uptake by macrophages through scavenger receptors. *Int. J. Radiat. Biol.* , **73**(5): 557 564, 1998.
- CARDOSO, A.G.T., **Ação do veneno de *Bothrops moojeni* e sua fração L-aminoácido oxidase, submetida ao tratamento com raios gama de  $^{60}\text{CO}$ , em *Leishmania spp***.1999. 68p. Tese (Mestrado em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear – Aplicações) – IPEN - CNEN/SP, São Paulo.

- CARDOSO, J.L.C. & BRANDO, R.V., **Acidentes por animais peçonhentos: clínica e tratamento**. São Paulo, Editora Santos, 1982.
- CHANG, T.; SHEA, C.M.; URIOSTE, S.; THOMPSON, R.C.; BOOM, W.R.; ABBAS, A.K., 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 J. of Immunol.*, **145** (9): 2803-2808, 1990.
- CRUZ, A.H.; MENDONÇA, R.Z.; PETRICEVICH, V.L., *Crotalus durissus terrificus* venom interferes with morphological, functional, and biochemical changes in murine macrophage. *Mediat. Inflamm*, **2005**(6): 349-359, 2005.
- CUPO, P.; AZEVEDO-MARQUES, M.M.; MENEZES, J.B. & HERING, S.E., Reações de hipersensibilidade imediata após uso intravenoso de soros antivenenos: valor prognóstico dos testes de sensibilidade intradérmicos. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, **33**(2):115-122, 1991.
- DELVES, P.J. & ROITT, I.M., The immune System – First of two parts. *Adv. in Immunol.*, **343**:37-49, 2000.
- DETINGER, H. & JUNG, H., The action of radiation on enzymes. The example of ribonuclease. IN: Dertiger, H. & Jung, H, (eds), *Molecular Radiation Biology*. Ch.9, 115-133 p. Berlin, Springer-Verberg, 1970.
- DIAS DA SILVA, W.; GUIDOLIN R.; RAW, I.; HIGASHI, H.G.; CARICATTI, C.P.; MORAIS, I.F.; LIMA, M.L.S.R.; YAMAGUCHI, I.K.; NISHIKAWA, A.K.; STEPHANO, M.A.; MARCELINO, J.R.; PINTO, J.R. & SANTOS, M.J., Cross-reactivity of horse monovalent antivenoms to venoms of ten *Bothrops* species. *Mem. Inst. Butantan*, **51**: 153-168, 1989.
- DOS-SANTOS, M.C.; GONÇALVES, L.R.C.; FORTES-DIAS, C.L.; CURY, Y.; GUTIÉRREZ, J.M. & FURTADO, M.F., A eficácia do antiveneno botrópico-crotálico na neutralização das principais atividades do veneno de *Bothrops jararacussu*. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, **34**(2):77-83, 1992.
- ELOMAA, O.; KANGAS, M.; SAHLBERG, C.; TUUKANEN, J.; SORMUNEN, R.; LIAKKA, A., THESLEFF, I.; KRAAL, G. & TRYGGVAN, K., Cloning of a novel-bacterial-binding receptor structurally related to scavenger receptors expressed in a subset of macrophages. *Cell.*, **80**:603-609, 1995.
- ENDEMANN, G.; STATON, L.W.; MADDEN, K.S.; BRYANT, C.M.; WHITE, R.T. & PROTTER, A.A., CD36 is a receptor for oxidized low density protein. *J. Biol. Chem.*, **268**:11811-11816, 1993.

- FIGUEIREDO, J.F., Atividade fagocitária de macrófagos em cultura. Simpósio sobre a diversidade de ações da angiotensina. In: resumos VIII Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental (FESBE), Caxambú, 1993. P. 377. (Abstract).
- FREEMAN, M.; EKKEKEL, Y.; ROHRER, L.; PENMAN, M; FREEDMAN, N.J.; CHISOLM, G.M. & KRIEGER, M., Expression of type I and type II bovine scavenger receptors in Chinese hamster ovary cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**:4931-4935, 1991.
- FRIDOVICH, I., The biology of oxygen radicals. *Science*, **201**:875-9, 1978.
- GARRISON, W.M., Reaction mechanisms in the radiolysis of peptides, polypeptides, and proteins. *Chem. Rev.*, **87**:381-398, 1987.
- GERCKEN, G.; BERG, I.; DÖRGER, M.; SCHLÜTER, T., Mechanisms of particle-induced activation of alveolar macrophages. *Toxicol. Let.*, **88**: 121-129, 1996.
- GROSH, D.S. & HOOPYWOOD, L.E., **Biological effects of radiation**, 2<sup>nd</sup> ed., New York: Academic Press, 1979.
- GUARNIERE, M.C., (1992), **Estudo dos efeitos da radiação gama de <sup>60</sup>Co nas propriedades bioquímicas, biológicas e imunológicas do veneno de *Bothrops jararaca***.1992. 159p. Tese (Doutorado em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear – Aplicações) - IPEN-CNEN/SP, São Paulo, 1992.
- GUARNIERI-CRUZ, M.C.; MURATA, Y.; SOUZA F<sup>o</sup>, J.M.; NASCIMENTO, N. & ROGERO, J.R. Attenuation of *Bothrops jararaca* venom by ionizing radiation In: INT. SOC. TOXINOL. PAN AMERICAN SECTION III. SYMP. ANIMAL, PLANT AND MICROBIAL TOXINS., 1990. México, 1990, p.32.
- GUTIÉRREZ, J.M., Clinical Toxicology of snakebites in Central American. In: Mier, J., White, J. (Eds). *Handbook of clinical Toxicology of Animal Venoms and Poisons*. CRC Press, Boca Raton, FL, 1995. 645-665p.
- GUTIÉRREZ, J.M. & OWNBY, C.L., Skeletal muscle degeneration induced by venom phospholipases A<sub>2</sub> :insights into the mechanisms of local and systemic myotoxicity. *Toxicon*. **42**:915-931, 2003.
- HARLOW, E. & LANE, D., (1988), **Antibodies. A Laboratory Manual**. Ed. Cold Spring Harbor Lab, N.Y, 1988.

- JANEWAY, C.A.; TRAVERS, M.W.; SHLOMCHIK, M., **Imunobiologia – O Sistema imune na Saúde e na Doença**. Porto Alegre: *Artmed Editora*, 2002. 767p.
- JOHNSTON Jr., R., Currents Concepts: Immunology. Monocytes and macrophages. *The New Engl. J. Med.* **318**(12): 747-752, 1988.
- KIDERLEN, AP. & KAYE, P.M., A modified colorimetric assay of macrophage activation for intracellular cytotoxicity against *Leishmania* parasites. *J.Immunol.Methods*, **127**:11-18, 1990.
- KRIEGER, M. & HERTZ, J., Structures and functions of multiligand lipoprotein receptors: macrophage scavenger receptors and LDL receptor-related protein (LRP). *Annu.Ver.Biochem.*, **63**:601-603, 1994.
- KUME, T. & MATSUDA, T., Changes in structural and antigenic properties of proteins by radiation. *Radiat. Phys. Chem.*, **46**(2):225-231, 1995.
- LAEMMLI, U.K., Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**:680-685, 1970.
- LOURENZONI, F.O.; SPERIDIÃO, P.G.L.; FAGUNDES NETO, U. Metabolismo de Proteínas. *Elec. J. Pediat. Gastroent. Nutrit. Liver Diseases*, **11**(11), 2007.
- LOMONTE, B.; LEON, G.; HANSON, L.A., Similar effectiveness of Fab and F(ab')<sub>2</sub> antivenoms in the neutralization of hemorrhagic activity of *Vipera berus* snake venom in mice. *Toxicon*, **34**: 1197-1202, 1996.
- MACHADO, P.R.L.; ARAÚJO, M.I.A.S.; CARVALHO, L.; CARVALHO, E.M., Mecanismos de resposta imune às infecções. *An. Bras. Dermatol.*, Rio de Janeiro, **79**(6):647-664, 2004.
- MAGALHÃES, R. A.; RIBEIRO, M. M. F.; REZENDE, N. A. and AMARAL, C. F. S., Rabdomiólise secundária a acidente crotálico (*Crotalus durissus terrificus*). *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, **28**:228-233, 1986.
- MAHONEY, E.M.; HAMILL, A.L.; SCOTT, W.A. & COHN, Z.A., Response of endocytosis altered fatty acyl composition of macrophages phospholipids. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, **74**:4895-4899, 1977.

- MALIK, F.; SINGH, J.; KHAJURIA, A.; BHATIA, A.; QAZI, G.N., A standardized root extract of *Withania somnifera* and its major constituent withanolide-A elicit humoral and cell-mediated immune responses by up regulation of Th1-dominant polarization in BALB/c mice. *Life Sci.*, **80**:1525, 2007.
- MARIA, W.S.; CAMBUY, M.O.; COSTA, J.O.; VELARDE, D.T. and CHÁVEZ-OLÓRTEGUI, C., Neutralizing potency of horse antiothropic antivenom. Correlation between *in vivo* and *in vitro* methods. *Toxicon*. **36**:1433-1439, 1998.
- MARTINS, E.M.N.; REIS, B.S.; FERNANDES, V.C.; COSTA, M.M.S.; GOES, A.M.; ANDRADE, A.S.R., Immunization with radioattenuated yeast cells of *Paracoccidioides brasiliensis* induces a long lasting protection in BALB/c mice. *Vaccine*, **25**:7893-7899, 2007.
- McKNIGHT, A.J. & GORDON, S., Membrane molecules as differentiation antigens of murine macrophages. *Adv. Immunol.*, **68**: 271, 1998
- MEYER, W.P., HABIB, A.G., ONAYADE, A.A., YAKUBU, A., SMITH, D.C., NASIDI, A., DAUDU, I.J., WARRELL, D.A. & THEAKSTON, R.D.G., First clinical experiences with a new ovine Fab *Echis ocellatus* snake bite antivenom in Nigeria: randomised comparative trial with Institute Pasteur serum (Ipser) Africa antivenom. *Am.J.Trop.Med.Hyg.*, **56**:291-300, 1997.
- MICHAELS, H.B.; HUNT, J.W., A model for radiation damage in cells by direct effect and by indirect effect: a radiation chemistry approach. *Radiat. Res.* **74**:23-34, 1978.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE DO BRASIL, Brasília: *Secretaria Nacional das Ações Básicas de Saúde*. Acidentes ofídicos: Contribuição ao estudo da morbidade, 2005.
- MOON, S. & SONG, K.B., Effect of  $\gamma$ -irradiation on the molecular properties of ovalbumin and ovomucoid and protection by ascorbic acid. *Food Chem.*, **74**:479-483, 2001.
- NASCIMENTO, N., **Caracterização bioquímica e imunológica dos principais produtos gerados pela irradiação de crotoxina**. 1995. 77p. Tese (Doutorado em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear – Aplicações) - IPEN- CNEN/SP, São Paulo, 1995.
- NASCIMENTO, N.; SEEBART, C.S.; FRANCIS, B.; ROGERO, J.R.; KAISER, II, Influence of ionizing radiation on crotoxin: biochemical and immunological aspects. *Toxicon*, **34**(1):123-131, 1996.

- NATHAN, C.F., Secretory products of macrophages. *J. Clin. Inv.* **79**: 319-326, 1987.
- OKONOGI, T.; HATTORI, Z.; OGIJO, A. & MITSUI, S., Detoxification by persimmon tannin of snake venoms and bacterial toxins. *Toxicon*, **17**:524-527, 1979.
- OLIVEIRA, P.C.L., ***Estudo Comparativo do Veneno Botrópico (Bothrops jararaca) Nativo e Irradiado com <sup>60</sup>Co em Caprinos. Aspectos clínicos e laboratoriais.*** 2003. 98p. Tese de Doutorado– Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Botucatu, São Paulo.
- OLIVEIRA, J.C.R.; de OCA, M.; DUARTE, M.M.; DINIZ, C.R.; FORTES-DIAS, C.L., Toxicity of South American snake venoms measured by an *in vitro* cell culture assay. *Toxicon*, **40**:321-325, 2001.
- OTERO-PATIÑO, R.; CARDOSO, J.L.; HIGASHI, H.G.; NUNEZ, V.; DIAZ, A.; TORO, M.F.; GARCIA, M.E.; SIERRA, A.; GARCIA, L.F.; MORENO, A.M.; MEDINA, M.C.; CASTANEDA, N.; SILVA-DIAZ, J.F.; MURCIA, M.; CARDENA, S.Y. & DIAS DA SILVA, W., A randomized, blinded, comparative trial of one pepsin-digested and two whole IgG antivenoms for *Bothrops* snake bites in Uraba, Colombia. The Regional Group on Antivenom Therapy Research (REGATHER). *Am.J.Trop.Med.Hyg.*, **58**:183-189, 1998.
- OWNBY, C.L. (1990), Locally acting agents: myotoxins, hemorrhagic toxins and dermonecrotic factors. In: Shier, W.T., Mebs, D. (Eds). *Handbook of Toxicology*. Marcel Decker, New York, 1990. 601-654p.
- PARKIN, J.; COHEN, B., An overview of immune system. *Lancet*, **357**:1777-89, 2001.
- PEISER, L.; MUKHOPADHYAY, S.; GORDON, S., Scavenger receptors in innate immunity. *Curr. Opin. Immunol.*, **14**: 123-128, 2002.
- PINCHUK L.M. & FILIPOV N.M., Differential effects of age on circulating and splenic leukocyte populations in C57BL/6 and BALB/c male mice. *Immunity & Ageing*, **5**:1, 2008.
- PINHO, J.R.R.; CARDI, B.A.; ANDRADE Jr., H.F.; BARR, P.J.; BATHURST, I.C.; VICENTE, E.J.; SCHENBERG, A.C., 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, 1995.

- QUEIROZ, L.S.; SANTO-NETO, H.; RODRIGUES-SIMIONI, L. & PRADO-FRANCESCHI, J., Muscle necrosis and regeneration after envenomation by *Bothrops jararacussu* snake venoms. *Toxicon*, **22**:339-346, 1984.
- RABINOVITCH, M.; ZILBERFAB, V. & POUCHELET, M., *Leishmania mexicana*: destruction of isolated amastigotes by amino acid esters. *Am.J.Trop.Med.Hyg.*, **36**:288-293, 1987.
- RAMPRASAD, M.P.; FISHER, W.; WITZTUM, J.L.; SAMBRANO, G.R.; QUEHENBERGER, O. & STEINBERG, D., The 94- to 97-kDa mouse macrophage membrane protein that recognizes oxidized low density lipoprotein and phosphatidylserine-rich liposomes is identical to macrosilian, the mouse homologue of human CD68. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, **92**:9580-9584, 1995.
- RANDAZZO-MOURA, P.; LEITE, G.B.; SILVA, G.H.; PAFFARO Jr., V.A.; CINTRA, A.C.O., CRUZ-HÖFLING, M.A.; RODRIGUES-SIMIONI, L.; OSHIMA-FRANCO, Y., A study of the myotoxicity of Bothropstoxin-1 using manganese in mouse phrenic nerve-diaphragm and extensor *Digitorum Longus* preparations. *Braz. J. Morphol. Sci.* **23**(2): 237-246, 2006.
- READ, J.A., WINTER V.J.,ESZES C.M., SESSIONS R.B. and BRADY R.L., Structural Basis for Altered Activity of M-and H-Isozyme Forms of Human Lactate Dehydrogenase. *PROTEINS: Struct., Funct. and Gene*, **43**:175-185, 2001.
- ROOTS, R.; OKADA, S., Estimation of life times and diffusion distances of radicals involved in X-ray\_induced DNA strand breaks or killing of mammalian cells. *Radiat. Res.*, **64**:306-20, 1975.
- RUSSO, M.; TEIXEIRA, H.C.; MARCONDES, M.C.G.; BARBUTO, J.A.M., Superoxide-independent hydrogen peroxide release by activated macrophages. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, **22**: 1271-1273, 1989.
- SEGRETO, R.A. & SEGRETO, H.R.C., Radiação ionizante e resposta celular – atualidades. *Radiol. Bras.*, **30**:301-307, 1997.
- SOERENSEN, B., **Animais Peçonhentos – Reconhecimento, distribuição geográfica. Produção de soros, clínica e tratamento dos envenenamentos.** São Paulo: Livraria Atheneu Editora. RJ, 1990, 138p.
- SPENCER, P.J., **Efeitos da radiação na estrutura da Bothrops Toxina-I.** 2000. 88p. Tese (Doutorado em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear – Aplicações) - IPEN- CNEN/SP, São Paulo.

- SPENCER P.J., AIRD S.D., BONI-MITAKE M., NASCIMENTO N., ROGERO, J.R.. A single-step purification of bothropstoxin-1. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, **31**:1125-1127, 1998.
- SPRENT, J. & SURH, C.D., T Cell Memory. *Annu. Rev. Immunol.*, **20**:551-79, 2002.
- STOCKER, K., Snake venom proteins affecting hemostasis and fibrinolysis. In: Stocker, K. (Ed). *Medical use of Snakes Venom Proteins*. CRC Press Boca Raton, FL, 97-160p., 1990.
- STOCKER, K.F., Composition of snake venom IN: Stocker, K.F. (ed), *Medical Use of Snake Venom Proteins*, pp 33-57 CRC Press, Florida, 1990.
- SUNDERKÖTTER, C.; GOEBELER, M.; SCHULZE-OSTHOFF, K.; BHARDWAJ, R.; SORG, C., Macrophage-derived angiogenesis factors. *Pharmac. Ther.* **51**: 195-216, 1991.
- TADA, T.; TAKEMORI, T.; OKUMURA, K.; NONAKA, M.; TOKUHISA, T., Two distinct types of helper T cells involved in the secondary antibody response: Independent and synergistic effects of Ia<sup>-</sup> and Ia<sup>+</sup> helper T cells. *The J. Exp. Med.* **147**: 1978, 2005.
- TOPLEY, N.; ALOBAIDI, H.M.M.; DAVIES, M.; COLES, G.A., WILLIAMS, J.D.; LLOYD, D., The effect of dialysate on peritoneal phagocyte oxidative metabolism. *Kidney Int.* **34**: 404-411, 1988.
- TOWBIN, H. & GORDON, J. Immunoblotting and dot immunobinding: current status and outlook. *J. Immunol. Meth.*, **72**:313-340, 1984.
- TOWBIN, H., STAHELEIN, T. & GORDON, J. Electrophoretic transfer of protein from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**:4350-4354, 1979.
- VANHOLDER, R.; RINGOIR, S.; DHONDT, A.; HAKIM, R., Phagocytosis in uremic and hemodialysis patients: a prospective and cross sectional study. *Kidney Int.*, **39**: 320-327, 1991.
- VITALIANO, S.N.; SILVA, D.A.O.; FERREIRA, R.A.; BEVILACQUA, E.; MINEO, J.R.; Avaliação dos níveis de anticorpos IgG anti-*Toxoplasma gondii* em lobos-guará (*Chrysocyon brachyurus*) por meio de ensaios imunoenzimáticos utilizando conjugados homólogos, heterólogos e de afinidade.

WALTER, S.; GONNOVI, D.; BOTAZZI, B.; MANTOVANI, A., The role of macrophages in the regulation of primary tumor growth. *Pathobiol.* **59**: 239-242, 1991.

ZHANG, L.; LUN, Y.; YAN, D.; YU, L.; MA, W.; DU, B.; ZHU, X., Proteomic analysis of macrophages: A new way to identify novel cell-surface antigens. *J. Immunol. Meth.*, **231**: 80-85, 2007.

REFERÊNCIA ELETRÔNICA <sup>1</sup>: <http://ioh.medstudents.com.br/ric2.htm>