

INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES

Autarquia associada à Universidade de São Paulo INIS-BR--3961

**AVALIAÇÃO DO MECANISMO DE CAPTAÇÃO E ENDOCITOSE DE
CROTOXINA SUBMETIDA A AÇÃO DA RADIAÇÃO GAMA, POR
MACRÓFAGOS PERITONEAIS DE CAMUNDONGOS**

Bruno Andrade Cardi



**Tese apresentada como parte dos
requisitos para obtenção do grau de
Doutor em Ciências na Área de
Tecnologia Nuclear**

**Orientador:
Prof. Dr. Heitor Franco de Andrade Jr**

São Paulo

1999

O PORTAL DO DRAGÃO

Na China, há uma cachoeira chamada *Portal do Dragão*. Suas águas têm 100 pés de profundidade e são mais rápidas que uma flecha lançada por um forte arqueiro. Dizem que milhares de carpas reúnem-se na sua profunda bacia esperando subir suas águas e que aquela que conseguir se transformará em dragão. Entretanto, nem uma única carpa dentre cem, mil ou mesmo dez mil consegue, não antes de dez ou vinte anos. Algumas são carregadas pelas fortes correntes ou são predadas por águias, gaviões, corujas, e outras são presas em redes, caçambas ou mesmo atingidas por flechas de pescadores, alinhados nas margens das águas. Essas são as dificuldades que as carpas enfrentam para transformarem-se em dragões.

A vida é como a queda d'água, é sempre uma batalha e se você não continuar lutando, será dragado pelas correntes ou pego pelos pescadores. Cada um de nós tem a missão de alcançar a iluminação ou felicidade. As águias, gaviões, corujas e pescadores representam os desejos enganosos, avidez e demônios de nossa própria criação, que nos testam e tentam para além do nosso verdadeiro caminho. A morte é inevitável, mas a felicidade e a iluminação de alguém são eternas. Não há acidentes na vida. Tudo acontece por uma razão. Todo fato é uma dádiva para nos ensinar, e é com essa compreensão que devemos viver.

Daniel J. Coplan's The "Dragon gate"

**DEDICO ESTE TRABALHO AOS
MEUS PAIS, *ADOLFO E MARIA*
CANDIDA, SEM OS QUAIS,
NADA DISSO SERIA POSSÍVEL.**

**A NAUÍLA, MINHA
MARAVILHOSA E INSEPARÁVEL
COMPANHEIRA, QUE ME DEU A
OPORTUNIDADE DE SER EU
MESMO, E ME ENSINA SEMPRE A
ARTE DE SOBREVIVER NESSE
MUNDO QUE EU AINDA NÃO
COMPREENDO.**

Agradecimentos

Ao Dr. Heitor Franco de Andrade Jr, pelo constante apoio e amizade durante toda a nossa convivência científica, onde tive a oportunidade de presenciar o seu brilhantismo de idéias e a sua capacidade científica. Agradeço pela confiança e pela perfeita argumentação quando, muitas vezes, não consegui entender o que estava diante dos meus olhos.

À Dra. Nanci do Nascimento, pela amizade e pela concessão de amostras de crotoxina;

Ao Dr. José Roberto Rogero, que inicialmente acreditou na possibilidade de que eu poderia desenvolver um trabalho científico;

Ao amigo Patrick J. Spencer que, em inúmeras vezes, possibilitou-me discussões extremamente inteligentes e que me fez pensar sobre a minha própria ignorância;

Ao amigo Roberto M. Hiramoto, nosso "herói japonês", companheiro de "grandes batalhas" no laboratório;

À Regina A de Paula, por ceder os anticorpos anti-crotoxina, utilizados no decorrer deste projeto;

À Dra Monamaris M. Borges, pelas sugestões e orientação inicial sobre cultura de macrófagos; também, à Regina Leal pelo auxílio nas preparações de cultura de macrófagos;

Ao Dr. Cláudio Pannutti e à Dra Vanda AU Souza, por possibilitarem a utilização de aparelhos e materiais do Laboratório de Virologia, do IMT;

Ao Dr João Renato R. Pinho (Instituto A Lutz), por possibilitar o aumento dos meus conhecimentos na forma de trabalho publicado;

À Dra Eufrozina S. Umezawa, pelos muitos empréstimos de aparelhos e materiais utilizados neste projeto;

Ao Norival Kesper Jr que, mui pacientemente, me ensinou a arte do Western Blot;

A Marilda S. Nascimento, pelas aulas e constantes consultas sobre cultura de células;

À Carla Palhares (FMUSP) e Keiton Alves, pelas preparações histológicas;

À Tereza Ribello (TB), pelas orientações na marcação da crotoxina, bem como discussões a respeito de técnicas de marcação com isótopos radioativos;

Aos amigos da Protozoologia, que conviveram comigo durante estes 7 anos;

Aos amigos do IPEN, pelas sugestões e por "suportarem" a minha presença, mesmo que em pequenas taxas de dose;

Ao Carlos e a Beth do IPEN, por possibilitarem o tratamento com raios gama das proteínas utilizadas neste projeto;

Ao Almir Ferreira, pelas preparações fotográficas e diapositivos;

À todos aqueles que, direta ou indiretamente, conviveram comigo e puderam ser exemplo do certo ou do errado, e que externaram suas opiniões ou se mantiveram calados em momentos em que eu não fui o que deveria ter sido.

ABREVIATURAS

B2	BSA a 2% em PBST
B2S	BSA a 2% em PBST, contendo SNC
BSA	Albumina do soro bovino
CTX	Crotoxina
CTXI	Crotoxina irradiada
CTXN	Crotoxina nativa
DNP	2,4-Dinitrofenil
DNPH	2,4-Dinitrofenilhidrazina
e⁻aq	Elétron aquoso (espécie reativa produzida durante a radiólise da água)
FBS	Soro Fetal Bovino
L2	Leite desnatado Molico a 2% em PBST
L2S	Leite desnatado Molico a 2% em PBST contendo SNC
OH[·]	Radical hidroxil(espécie reativa produzida durante a radiólise da água)
OVA	Ovalbumina
OVAI	Ovalbumina irradiada
OVAN	Ovalbumina nativa
OxCTX	Crotoxina submetida a oxidação <i>in vitro</i> pelo método do cobre
PBC	Probucof
PBST	Tampão fosfato com Tween 20 a 0.05%
ScvR	Receptores "scavenger"
SD	Sulfato de dextrana
SNC	Soro normal de camundongo 1/100

Avaliação do mecanismo de captação e endocitose de crotoxina submetida a ação da radiação gama, por macrófagos peritoneais de camundongos

Bruno Andrade Cardi

RESUMO

Proposta: Investigar os mecanismos envolvidos na captação e endocitose de crotoxina irradiada com 2000Gy de radiação γ de ^{60}Co , por macrófagos peritoneais de camundongos, comparando com a proteína nativa e outra proteína não relacionada, a ovalbumina.

Materiais e Métodos: Crotoxina nativa (CTXN) ou irradiada (2000Gy ^{60}Co /taxa de dose 540Gy/hora) (CTXI) ou ovalbumina com igual processamento (OVAN – OVAI) foram oferecidas a macrófagos peritoneais de camundongos CBA/J e a sua captação foi avaliada por imunohistoquímica e pelo método quantitativo de ELISA *in situ*. A participação dos receptores "scavenger" (ScvR) no reconhecimento das proteínas foi avaliada pela utilização de bloqueadores (Soro Fetal Bovino-FBS; Probucol-PBC; Sulfato de Dextrana-SD).

Resultados: A morfologia e a viabilidade dos macrófagos estiveram preservadas, descartando-se a possibilidade de uma ação direta das toxinas sobre estas células. A CTXI apresentava agregados, além da evidência bioquímica de formação de radicais decorrentes da oxidação da proteína. À imunohistoquímica, houve forte marcação de vacúolos fagocíticos em macrófagos incubados com CTXI, quando comparado a proteína nativa. Quantitativamente, por ELISA *in situ*, o mesmo fato ocorreu, mostrando uma incorporação cerca de 2X maior da proteína irradiada. Na presença de PBC e SD, observou-se um decréscimo significativo na captação da CTXI, mas não da CTXN. Entretanto, a captação da CTXN foi diminuída pelo FBS, não sendo observado o mesmo para a CTXI. A OVA, após irradiação, sofreu intensa degradação, com um perfil de rápida internalização e degradação por macrófagos, com captação maior da forma irradiada evidenciada apenas em tempos mais longos (120 minutos).

Conclusões: Os raios γ (^{60}Co) induziram alterações oxidativas na molécula de CTX, possibilitando o seu reconhecimento preferencial por ScvR de macrófagos de camundongos. Esses achados sugerem fortemente que células apresentadoras de antígenos estejam participando na melhor resposta observada para antígenos irradiados.

Study of uptake and endocytosis of gamma rays-irradiated crotoxin by mice peritoneal macrophages

Bruno Andrade Cardi

ABSTRACT

Purpose: To investigate the uptake and endocytosis of 2000Gy ^{60}Co irradiated crotoxin through mouse peritoneal macrophages, correlating with native one and another non related protein, the ovalbumin.

Materials and Methods: Native (CTXN) or 2000Gy ^{60}Co γ -rays (dose rate 540 Gy/hour) irradiated crotoxin (CTXI) or ovalbumin processed of same manner (OVAN – OVAI) were offered to mouse peritoneal macrophages and their uptake was evaluated by immunohistochemistry and quantitative *in situ* ELISA. The involvement of scavenger receptors (ScvR) was evaluated by using blockers drugs (Probuco-PBC or Dextran Sulfate-SD) or with nonspecific blocking using fetal calf serum (FBS).

Results: The morphology and viability of macrophages were preserved during the experiments. CTXI showed irradiation-induced aggregates, and formation of oxidative changes were observed on this protein after gamma rays treatment. By immunohistochemistry, we could observe heavy stained phagocytic vacuole on macrophages incubated with CTXI, as compared with CTXN. Quantitatively by *in situ* ELISA, the same pattern was observed, displaying a 2-fold CTXI incorporation. In presence of PBC or SD, we could find a significant decrease of CTXI uptake, but not of CTXN. However, the CTXN uptake was depressed by FBS, not observed with CTXI. OVA, after gamma rays treatment, underwent a high degradation suffering a potent incorporation and metabolism by macrophages, with a major uptake of OVAI in longer incubation (120 minutes).

Conclusions: Gamma rays (^{60}Co) produced oxidative changes on CTX molecule, leading to a uptake by ScvR-mice peritoneal macrophages, suggesting that the relation antigen-presenting cells and gamma rays-modified proteins are responsible for the better immune response presented by irradiated antigens.

Sumário

	Páginas
Introdução	1
1- O Veneno Crotálico	1
2- A Crotoxina	5
3- A radiação Ionizante	10
4- Atenuação de Venenos Animais	13
5- Sistema imune, macrófagos e receptores "scavenger"	20
Objetivos	23
Materiais e Métodos	25
Crotoxina, Purificação e Irradiação	25
Ovalbumina, Purificação e Irradiação	26
Produção de anticorpos específicos anti-CTX e anti-OVA, nativas ou irradiadas	26
Especificidade dos anticorpos antiCTX e antiOVA frente a células em cultura	27
Caracterização das frações protéicas utilizadas e seus anticorpos específicos	28
Drogas e reagentes	29
Macrófagos peritoneais de camundongos	30
Análise da viabilidade de macrófagos peritoneais de camundongos incubados com CTX e OVA, nativas ou irradiadas	31
Ensaio imunohistoquímico	32
Determinação do "status" oxidativo das amostras de crotoxina, pela determinação de grupos carbonil	33
ELISA <i>in situ</i>	34
Ensaio de bloqueio de captação de crotoxina nativa ou irradiada	35

Probucol	35
Sulfato de dextrana	36
Ensaio de ligação de proteínas na presença de bloqueadores de ScvR (Probucol e Sulfato de dextrana)	36
Análise estatística	38
Resultados	39
Produção, purificação e análise de anticorpos antiCTX e antiOVA, nativas ou irradiadas	39
Caracterização das frações protéicas utilizadas e seus anticorpos específicos	41
Análise da viabilidade de macrófagos peritoneais de camundongos incubados com CTX e OVA, nativas ou irradiadas	45
Ensaio imunohistoquímico e de morfologia celular	45
Determinação do "status" oxidativo das amostras de crotoxina, pela determinação de grupos carbonil	48
Quantificação da captação das amostras de CTX e OVA por macrófagos, determinada por ELISA <i>in situ</i>	50
Crotoxina	50
Influência da concentração de proteínas no soro fetal bovino (FBS) no meio de ensaio de captação	51
Ensaio de ligação de proteínas na presença de bloqueadores de ScvR (Probucol e Sulfato de dextrana)	53
Ensaio de bloqueio do ScvR	55
Probucol	55
Sulfato de dextrana	56
Ovalbumina	57
Bloqueio da captação das amostras de OVA por Probucol e Sulfato de dextrana	58

Probucol	59
Sulfato de dextrana	59
Discussão	62
Conclusões	76
Referências Bibliográficas	79

Anexo I: Artigo I- CARDI et al, 1998, *Int.J.Radiat.Biol.*, **73**(5):557-564

Anexo II:Artigo II-CARDI et al, 1998, *Natural Toxins*, **6**:19-25

1- Introdução

1- O VENENO CROTÁLICO

As serpentes pertencem a subordem Serpentes, que está incluída na Ordem Squamata da "Classe" Reptília do Filo Chordata. Até o momento, conhece-se cerca de 3300 espécies em todo o mundo, distribuídas em 11 famílias, a maioria delas consideradas não peçonhentas, sendo que 5 (Elapidae, Hydrophiidae, Colubridae, Atractaspididae e Viperidae) concentram as serpentes produtoras de secreções tóxicas. Entre as famílias de serpentes observa-se uma variação na morfologia e na fisiologia do aparato de veneno, demonstrando diferenças evolutivas entre as mesmas. Independente disso, o objetivo final da existência desse aparato é a aquisição de alimento e defesa (MEIER, 1986).

Venenos de serpentes são considerados misturas complexas com altas concentrações de proteínas (STOCKER, 1990), muitas delas possuindo propriedades tóxicas diretas ou indiretas. Trabalhos envolvendo estas proteínas ou peptídeos têm conseguido a sua purificação, bem como a determinação de suas propriedades. Baseado na composição de aminoácidos e na estrutura primária de numerosas neurotoxinas, inibidores enzimáticos e outros (IWANAGA et al, 1976), observou-se que existem diferenças na composição dos venenos nas diferentes famílias de serpentes (STOCKER, 1990). Essas diferenças também são encontradas dentro de um mesmo gênero ou espécie de serpente, quando são levados em conta a distribuição geográfica, idade e hábitos alimentares dos animais (JAYANTHI et al, 1988; MEIER, 1986; MINTON & WEINSTEIN, 1986; STOCKER, 1990; TABORSKA, 1971).

No Brasil, as serpentes causadoras de acidentes importantes estão agrupadas, principalmente, na família Viperidae, sub-família Crotalinae, cujas espécies estão inclusas nos gêneros *Bothrops* (jararaca, jararacuçu, úrutu, etc), *Lachesis* (surucucus), *Crotalus* (cascavéis) e na família Elapidae, sub-família Elapinae, as corais verdadeiras (gênero *Micrurus*) (HOGE, & ROMANO-HOGE, 1978/79).

O gênero *Crotalus*, composto apenas por uma espécie, *Crotalus durissus*, é encontrado em quase todo o país, possuindo pouca ocorrência na região norte (AMARAL, 1977; HOGE, & ROMANO-HOGE, 1978/79). Esta espécie abriga 6 subespécies bem caracterizadas, a saber, *C.d.cumanensis*, *C.d.cascavella*, *C.d.ruruima*, *C.d.marajoensis*, *C.d.colillineatus* e *C.d.terrificus*. A subespécie *C.d.terrificus* distribui-se pela Bolívia, Uruguai, Paraguai, Argentina e Brasil (MG, SP, SC, PR, RS, MT e MS) (HOGE, & ROMANO-HOGE, 1978/79) e é responsável por cerca de 10% dos acidentes ofídicos do sudeste brasileiro, apresentando um alto índice de mortalidade humana (RESENDE et al, 1989; WHO, 1981; RIBEIRO, 1990).

O quadro clínico do acidente crotálico é predominantemente neurotóxico e miotóxico, seguido de sinais e sintomas atribuídos à atividade coagulante do veneno (AMARAL et al, 1987; JORGE & RIBEIRO, 1990). Os sinais neurotóxicos, geralmente evidentes nas primeiras horas, se caracterizam por *fascies miastenica*, sendo menos comuns a paralisia velatopalatina com dificuldade de deglutição e reflexo de vômito diminuído. O quadro miotóxico tem início, principalmente, com mialgia generalizada e em casos mais graves observa-se o escurecimento da urina (avermelhada ou marrom). Isto ocorre como uma consequência da

mioglobínúria (AZEVEDO-MARQUES et al, 1987), sendo esse efeito a maior evidência de rabdomiólise (AZEVEDO-MARQUES et al, 1986a; AZEVEDO-MARQUES et al, 1986b; BON et al, 1986; CUPO et al, 1988; CUPO et al, 1990; MAGALHÃES et al, 1986). CUPO e colaboradores (1990), baseados nos níveis séricos de isoenzimas de creatinaquinase e desidrogenase láctica, juntamente com alterações focais encontradas em biópsias de pacientes, propuseram a hipótese de uma ação preferencial do veneno de *C.d.terrificus* sobre fibras musculares do tipo I e/ou IIa. Essa hipótese reforçou os dados de JORGE e colaboradores (1986), que encontraram uma atrofia seletiva de fibras tipo I em histoquímica de biópsia de 2 pacientes acidentados por cascavel. A instalação do quadro de mioglobínúria pode levar a complicações renais, muitas vezes com instalação de uma insuficiência renal aguda (DANZIG & ABELS, 1961), principal causa de óbito em pacientes acidentados por *C.d.terrificus* (AMORIN & MELLO, 1954; AMORIN, 1971; AMARAL et al, 1986).

São descritos também quadros de sangramentos com incoagulabilidade do sangue (AMARAL et al, 1988) e alterações na coagulação sangüínea são observadas em 30 a 50% dos pacientes, por conseqüência da atividade trombina-símile do veneno, que leva ao consumo de fibrinogênio (RAW et al, 1986). Entretanto, na maioria das vezes o sangramento é leve e limitado à gengiva (KAMIGUTI & CARDOSO, 1989) o que, na ausência de sinais neurotóxicos, torna difícil o diagnóstico diferencial frente a acidentes botrópicos, principalmente quando espécimens jovens de *Bothrops jararaca* estão envolvidos, devido ao fato de seus venenos apresentarem atividade predominantemente coagulante (RIBEIRO & JORGE, 1989).

Alterações respiratórias são raramente observados, mas podem ocorrer durante a primeira hora ou primeiro dia, ou ainda secundariamente, 3 a 12 dias após a picada, em pacientes com insuficiência renal aguda (ALVARES, 1980; LOPEZ et al, 1972). Sinais no local da picada se resumem a edema, parestesia e eritema extremamente discretos.

A análise do veneno de *C.d.terrificus* revelou a existência de vários componentes fármaco-ativos importantes, como a crotamina, convulxina, giroxina, delta-toxina e crotoxina (CTX).

A crotamina (GONÇALVES & VIEIRA, 1950), um polipéptide fortemente básico (4880 Da), apresenta atividade miotóxica (VITAL-BRAZIL, 1980) devido, principalmente, à sua ação sobre canais de sódio voltagem-sensíveis do sarcolema, o que leva à indução do influxo de sódio, levando a uma despolarização e contração do músculo esquelético (CHEYMOL et al, 1971a; CHEYMOL et al, 1971b; GONÇALVEZ, 1956; PELLEGRINI FILHO et al, 1978; VITAL-BRAZIL et al, 1979). Neste, a crotamina produz necrose de fibras musculares com uma extensa vacuolização do retículo sarcoplasmático e ruptura dos filamentos de actina e miosina (CAMERON & TU, 1978; TU, 1983). Estudos sobre a seqüência primária da crotamina têm demonstrado o seu alto grau de homologia com outras toxinas mionecrosantes (BIEBER et al, 1987; FOX et al, 1979; MAEDA et al, 1978).

A convulxina é um polipéptide de alto peso molecular (72.000 Da), que produz uma rápida e profunda trombocitopenia quando inoculada intravenosamente em coelhos anestesiados, levando a uma agregação plaquetária por um mecanismo aparentemente independente da ciclo-oxigenase e

dependente de cálcio (VARGAFTIG et al, 1980). Isso leva a liberação de aminas bioativas, podendo produzir convulsões pela formação de microêmbolos, com uma isquemia transitória subsequente ou uma liberação maciça de ácidos (PRADO-FRANCESCH et al, 1981). Outros efeitos são descritos tais como: hipotensão, alterações agudas do padrão respiratório (VITAL-BRAZIL, 1972; VITAL-BRAZIL et al, 1986a), perda de equilíbrio, nistagmo e distúrbios gastrointestinais (PRADO-FRANCESCH & VITAL-BRAZIL, 1980; VITAL-BRAZIL, 1972).

A giroxina (34.000 Da) é uma toxina não letal que provoca, em camundongos, alterações no equilíbrio, na forma de movimentos giratórios em torno do eixo longitudinal corpóreo não estando, porém, presente o quadro de nistagmo. Os efeitos são rápidos podendo aparecer cerca de 3 minutos após a inoculação, com recuperação ao final de aproximadamente 60 minutos. A resposta parece ser do tipo "tudo-ou-nada", não sendo ser dependente da dose. Descreve-se, também, um quadro de taquifilaxia, que ocorre até 10 a 40 dias mais tarde (BARRABIN et al, 1978; SEKI et al, 1980).

A delta-toxina é um componente ainda pouco estudado, não se conhecendo bem os seus efeitos farmacológicos, sendo citada, apenas, a sua capacidade de provocar hemoconcentração em decorrência de alterações na permeabilidade vascular (VITAL-BRAZIL, 1980).

2- A CROTOXINA (CTX)

A CTX, peso molecular de cerca de 24.000 e ponto isoelétrico de 4.7, é o componente mais abundante e tóxico do veneno de *C.d.terrificus* (BON et al,

1986). Foi isolada pela primeira vez por SLOTTA e FRAENKEL-CONRAT em 1938, que demonstraram, a princípio, ser esta uma proteína homogênea (GRALÉN & SVEDBERG, 1938; LI & FRAENKEL-CONRAT, 1942). Entretanto, o tratamento do complexo com dinitrofluorobenzeno revelou dois derivados, um solúvel e outro insolúvel em água, que eram diferentes quanto à composição de aminoácidos (FRAENKEL-CONRAT & SINGER, 1956). Em seguida, HENDON e colaboradores (1979), utilizando agentes acilantes menos agressivos, confirmaram a presença de duas subunidades (A e B) e indicaram a necessidade de ambas para que a neurotoxicidade ocorresse (HENDON & FRAENKEL-CONRAT, 1971; RUBSAMEN et al, 1971).

A subunidade A (crotopotina, CTX A), provavelmente uma derivação genética de uma fosfolipase A_2 não tóxica e homodimérica (AIRD et al, 1986), é uma proteína ácida com ponto isoelétrico em torno de 3.8 e peso molecular 9.000 Da (RUBSAMEN et al, 1971). Composta de 3 cadeias, A, B e C, com 40, 34 e 14 aminoácidos, respectivamente, ligadas por pontes dissulfeto, esta proteína comporta-se como carreadora da subunidade B, evitando que esta última reaja inespecificamente nos vários tecidos, pelos quais possa ter afinidade. Isso aumenta a sua especificidade, dirigindo o complexo CTX para o seu sítio de ação (BON et al, 1986; BREITHAUPT et al, 1974; BREITHAUPT, 1976). Recentemente, observou-se que a crotopotina purificada pode inibir significativamente o edema em pata de camundongo induzido pela carraginitina e pelo componente 48/80, mas não pela 5-hidroxitriptamina. Além disso, observaram que a crotopotina foi incapaz de inibir a liberação de histamina, a agregação plaquetária, bem como a liberação

de tromboxana B2 induzida pela trombina em plaquetas humanas lavadas (LANDUCCI et al, 1995). Estes parecem ser uns dos primeiros efeitos descritos para esta subunidade da CTX que, até então era considerada não possuir qualquer atividade enzimática. Estruturalmente, a análise da seqüência de aminoácidos da cadeia C da crotapotina mostra uma estreita homologia desta subunidade com neurofisinas, que são aceitas como sendo moléculas com função carreadora ligadas a hormônios neuro-hipofisários (AIRD ET AL, 1985; STOCKER, 1990; MASCARENHAS et al, 1992).

A subunidade B (CTX B) é uma enzima fosfolipase A₂ (PLA₂ - E.C. 3.1.1.4) (STOCKER, 1990), dependente de cálcio (CHANG, 1985), fortemente básica com ponto isoelétrico em torno de 8.7 e peso molecular 15.000 (RUBSAMEN et al, 1971). Observou-se que esta possui grande homologia com outras PLA₂ não ofídicas, como determinado por cristalografia de raio X (BRUNIE et al, 1985; DIJKSTRA et al, 1981; DIJKSTRA et al, 1983), embora, na análise detalhada da estrutura das cadeias, existam diferenças que permitem a diferenciação entre elas (RENETSEDER et al, 1985). Esta PLA₂ possui alta afinidade por lípidos carregados negativamente, o que possibilita, quando esta se encontra isolada do complexo CTX, a sua interação inespecífica com membranas biológicas que os contenham (BON et al, 1979; HABERMANN & BREITHALPT, 1978; HABERMANN et al, 1972).

Além da miotoxicidade evidente (HARRIS et al, 1979; KOUYOUMDJIAN et al, 1985), a crotoxina apresenta uma ação pré-sináptica em junção neuromuscular de musculatura estriada esquelética. Neste local, quando em grandes

quantidades, pode levar a uma ação caracteristicamente pós-sináptica, mantendo os receptores de acetilcolina inativos conformacionalmente (BON et al, 1986; BON et al, 1979; HANLEY, 1987; VITAL-BRAZIL, 1966; VITAL-BRAZIL, 1972; VITAL-BRAZIL et al, 1973). Apesar da reversibilidade desses efeitos, a destruição de junções neuromusculares ocorre, decorrente da ação da PLA₂ sobre a camada lipídica da região pré-sináptica, como demonstrado por estudos morfológicos estruturais e ultra-estruturais (CARDI et al, 1992; GOPALAKRISHNAKONE & HAWGOOD, 1984; GOPALAKRISHNAKONE et al, 1984).

Farmacologicamente, a crotoxina bloqueia a transmissão do impulso nervoso pré-sináptico e a neurotoxicidade foi acreditada ser um fenômeno puramente periférico. Trabalhos utilizando cães como modelo, não conseguiram evidenciar a presença de CTX nos centros respiratórios centrais, na vigência de paralisia respiratória (VITAL-BRAZIL, 1966). Estes achados são corroborados pelo uso de ¹³¹I-CTX, onde foi mostrado que esta não ultrapassava a barreira hematoencefálica ou o fazia em quantidades desprezíveis (LOMBA et al, 1966; LOMBA 1969; CARDI et al, 1998). Em estudo utilizando junções neuromusculares de rãs, foi observado que a CTX agia de forma trifásica típica (depressão, facilitação e bloqueio final da liberação de neurotransmissor) (RODRIGUES-SIMIONI et al, 1990), sendo que os efeitos mais tardios já haviam sido citados, por outros autores, como uma ação fosfolipásica da crotoxina (HAWGOOD & SMITH, 1989; HAWGOOD et al, 1988; STRONG, 1987).

Estudos sobre as alterações morfológicas ocorridas no envenenamento crotálico são, na maioria das vezes, restritos a espécies do gênero *Crotalus* da

América do Norte, cujo veneno apresenta um perfil de atividade semelhante ao do grupo botrópico encontrado no Brasil. Exceção é feita para *Crotalus scutulatus scutulatus* (Mojave Rattlesnake), que apresenta toxinas homólogas às da *C.d.terrificus* do Brasil. STRINGER e colaboradores (1972), utilizando veneno total de *C.viridis viridis* e OWNBY e colaboradores (1976), utilizando toxina purificada do mesmo veneno observaram, em camundongos, alterações no sistema tubular sarcoplasmático, ruptura de bandas Z, com conseqüente desorganização miofibrilar. O mesmo grupo de autores, agora utilizando veneno total ou toxina purificada (Hta) de *C.atrox*, detectaram dilatação do espaço perinuclear e do retículo endoplasmático das células endoteliais, com subsequente ruptura das mesmas. Como conseqüência, evidenciaram extravazamento de sangue e agregação plaquetária no local (OWNBY et al, 1974; OWNBY, 1978; OWNBY, 1982).

O veneno de *C.d.terrificus* causa necrose mista (miolítica e coagulativa), de acordo com HOMMA & TU (1971), que estudaram 28 venenos de serpentes crotalídeas, e atribuíram este quadro à presença da CTX no veneno.

Por meio de inoculação de CTX em músculo estriado esquelético, foi demonstrado, ultra-estruturalmente, uma degeneração das fibras musculares, que teve início 6 horas após a inoculação, culminando em necrose completa após 25 horas. Os autores sugerem que a necrose foi decorrente do aumento da concentração de cálcio intracelular, baseado no encontro de grânulos de cálcio nas mitocôndrias de fibras degeneradas (GOPALAKRISHNAKONE & HAWGOOD, 1984). Esta hipótese é corroborada por DUNCAN (1978) e SCHANNE e

colaboradores (1979), que propuseram o aumento de cálcio intracelular como um fator necrosante celular.

Analisando material biopsiado do membro contralateral de indivíduos picados por *C.d.terrificus*, ROSSI e colaboradores (1989) sugeriram que a miotoxicidade ocorria, tanto por uma ação direta do veneno sobre as células, quanto pela instalação de um quadro isquêmico da microvasculatura.

Utilizando CTX purificada ou a mesma toxina complexada ao ^{125}I , observamos que esta sofria um clareamento renal a partir de 30 minutos após inóculo, sendo que a análise do tecido renal por imunohistoquímica revelou que este sofria leves alterações, além de apresentar marcações na borda em escova, nos tempos analisados. Evidenciamos, também, junções neuromusculares marcadas aos 30 minutos, onde se apresentavam íntegras, e 60 minutos após inoculação, onde apareciam como estruturas desorganizadas, sugerindo uma ação da toxina neste local (CARDI et al, 1992; CARDI et al, 1998).

3- A RADIAÇÃO IONIZANTE

A radiação ionizante consiste de ondas eletromagnéticas formadas a partir de transições nucleares, tendo alta energia, ausência de massa, bem como a capacidade de promover ionização e excitação nos meios, possuindo um alto poder de penetração (GROSH & HOOPYWOOD, 1979). Seus efeitos podem ser diretos ou indiretos, sendo o primeiro uma consequência da interação imediata da energia com o alvo molecular e o segundo, o resultado da interação secundária de espécies reativas produzidas pela radiação em outras moléculas do meio, principalmente quando da interação desta com a água. Assim, em células ou

tecidos, a radiação produz danos que podem variar desde excitações até a morte celular ou tissular, sendo que o tipo de dano depende, principalmente, da dose, da taxa de dose e do tipo de célula ou tecido. Assim, foi mostrado que certas linhagens celulares apresentavam maior radiosensibilidade que outras (RADFORD, 1994), e que a morte dessas células geralmente ocorria por apoptose (RADFORD et al, 1994). Nos tecidos, o DNA é o alvo crítico da radiação, podendo ser fragmentado por esta, o que consiste num pródromo da morte apoptótica ou necrótica (RADFORD & MURPHY, 1994; SZUMIEL, 1994). As células germinativas também consistem num alvo importante da ação da radiação, levando à produção de aberrações cromossômicas e mutações letais dominantes em ovócitos de mamíferos. Existem, também, diferenças entre essas células, quanto à sensibilidade, que pode variar com a espécie, fase meiótica e estágio do desenvolvimento folicular (JACQUET et al, 1994).

Carboidratos, lípides e proteínas também podem sofrer ação da radiação. As alterações são oriundas, principalmente, da interação dos produtos da radiólise da água com aminoácidos das cadeias protéicas promovendo desaminação, seja em aminoácidos aromáticos ou não aromáticos (BUTLER et al, 1987; GARRISON, 1987). Em proteínas, apesar desses efeitos ocorrerem ao acaso, alguns sítios podem ser mais favoráveis, devido à transmissão de energia intramolecular (FARRAGI et al, 1978). Destruição de aminoácidos e rompimento de cadeias peptídicas, alterações de ligações (H-H e S-S) intramoleculares e reorganização da molécula protéica por agregação, são algumas das alterações estruturais que podem ocorrer, levando a mudanças nas propriedades biológicas (enzimáticas, farmacológicas e imunológicas) das proteínas (ADAMS et al, 1972; DERTINGER,

& JUNG, 1970; GARRISON, 1987). Existem indicações de uma diferença quanto a radiosensibilidade dessas várias funções biológicas, sendo as propriedades imunológicas as mais radioresistentes.

Baseado nesses fatos, vários trabalhos vêm sendo desenvolvidos no sentido de utilizar a radiação ionizante na produção de vacinas contra várias doenças causadas por parasitas (WALES & KUSEL, 1992). Utilizando esporozoítos de *Plasmodium* spp. irradiados, bem como mosquitos vetores infectados submetidos a radiação, CLYDE (1990), HERRINGTON e colaboradores (1990) e RIECKMANN (1990) mostraram que a imunização de animais e humanos com a forma esporozoítica irradiada tem a capacidade de proteger esse indivíduos, quando estes são desafiados com esporozoítos normais (não irradiados). Entretanto, esta imunização não protege os indivíduos quando estes são desafiados com as formas merozoíticas ou eritrocitárias dos plasmódios (NUSSENZWEIG et al, 1969).

Outros trabalhos também são dignos de nota como o de ANTUNES e colaboradores (1971). Estes autores trataram com raios γ (^{60}Co – 5 a 200 Gy) ovos e miracídios de *Shistosoma mansoni* oriundos de fezes humanas e, posteriormente, desafiaram o molusco *Biomphalaria glabrata* com essas formas irradiadas. Foi observada a penetração dos miracídios, mas estes não se desenvolveram no interior dos caramujos. Entretanto, em doses mais baixas (5 Gy), foi observada uma infecção da ordem de 3.2% dos caramujos. Utilizando ensaios de infecção/reinfecção com miracídios irradiados ou não irradiados, os mesmos autores observaram que a infecção prévia dos caramujos com formas

irradiadas não protegia os animais da infecção subsequente com forma nativas do *S. mansoni*.

Ainda utilizando parasitas, SALATA e colaboradores (1973) estudaram os efeitos dos raios γ (600-900 Gy) sobre forma em cultura de *Trypanosoma cruzi* (cepa Y), avaliando alterações na morfologia, motilidade, virulência e capacidade protetora em animais imunizados. Os autores observaram alterações na capacidade reprodutiva do parasita, a despeito da ausência de alterações na morfologia e motilidade dos mesmos. Observaram, também, que a virulência estava diminuída em parasitas tratados com doses de 600 Gy e era abolida quando o tratamento era feito com doses de 900 Gy. A análise da capacidade protetora em camundongos mostrou que o tratamento prévio destes animais com parasitas irradiados (900 Gy) não conferia proteção aos mesmos frente ao desafio utilizando formas sangüíneas virulentas.

4- ATENUAÇÃO DE VENENOS ANIMAIS

Atualmente, o único tratamento eficaz nos casos de acidentes com serpentes é o soro "anti-ofídico". Em décadas passadas, devido à dificuldade de identificação da serpente causadora dos acidentes, baseado em sinais e sintomas apresentados no quadro clínico dos indivíduos picados, optava-se pela utilização de soro "anti-ofídicos" polivalentes, que podiam ser administrados em acidentados por um ou dois tipos de serpentes (p.ex., soro anti-botrópico-crotálico, para "jararacas" e cascavéis). Entretanto, após observação de efeitos colaterais ligados ao excesso de imunoglobulinas presentes no soro, bem como a relativa

ineficiência da capacidade neutralizante deste tipo de soro, passou-se a optar pelos soros monovalentes. Estes últimos são a opção mais utilizada atualmente e mais segura, seja em neutralizar mais eficazmente os venenos (MEYER et al, 1997), ou por minimizar os efeitos colaterais advindos da administração de soros heterólogos (OTERO-PATIÑO et al, 1998).

Assim chamados, os soros “anti-ofídicos” são produzidos em cavalos normais hiperimunizados, nos quais é administrada uma mistura de venenos de mesmo gênero (p.ex., para o soro antibotrópico, utiliza-se venenos de serpentes do gênero *Bothrops*). Rotineiramente, esses venenos são oferecidos aos animais sem nenhum tratamento prévio, sendo apenas emulsionados em adjuvantes (REF).

A toxicidade dos venenos de serpentes brasileiras varia, dentre outros fatores, com o gênero em que se inclui a serpente. Assim, serpentes do gênero *Bothrops* (p.ex., jararaca e urutu) normalmente desencadeiam efeitos locais, tais como hemorragia, isquemia e necrose, bem como sistêmicos, que vão desde alterações na coagulação do sangue até quadros de insuficiência renal aguda (IRA). Os venenos crotálicos (*Crotalus durissus* - cascavéis), apesar de não provocarem efeitos locais importantes, levam a um quadro sistêmico, principalmente alterações no sistema nervoso periférico, rabdomiólise e IRA. Além disso, alguns autores sugerem que o veneno total de *C. durissus* (*C.d.terrificus*) bem como a crotoxina purificada tem um efeito inibitório sobre a resposta imune humoral, mas não sobre a resposta celular, como observado em camundongos (CARDOSO & MOTA, 1997).

Baseado nestes dados, várias tentativas vêm sendo feitas no sentido de diminuir a toxicidade destes venenos. Entretanto, muitos desses métodos, apesar de serem eficientes na destoxicação dos venenos, levam os mesmos a apresentar uma baixa imunogenicidade, não se prestando assim como bons imunógenos para aplicação em animais soroprodutores. Dentre os métodos pouco satisfatórios, podemos citar o calor (COSTA et al, 1985), a formalina (MARTIN, 1925; GRILLO-RODRIGUES & SCANNANE, 1976), o glutaraldeído (GUIDOLIN et al, 1989), a foto-oxidação na presença de azul de metileno (SHORT & MALLICK, 1935) e o raio X (FLOWERS, 1966).

Por outro lado, alguns métodos vêm apresentando bons resultados como é o caso da utilização do iodo estável (haptenização/iodação) no tratamento de venenos ofídicos e aracnídeos. Utilizando a fração T₂ do veneno de *Tityus serrulatus* (escorpião amarelo) tratada com iodo, HENEINE e colaboradores (1986) observaram que a toxicidade desta fração era abolida pelo tratamento e que camundongos inoculados com esta fração modificada, sobreviviam a doses 30 vezes maior que a sua DL₅₀. Além disso, foi observada a manutenção das propriedades imunológicas desta fração modificada, quando comparada com a forma intacta. Trabalho do mesmo grupo demonstrou que animais imunizados com veneno de *C.d.terrificus* tratado pelo iodo desenvolvem títulos de anticorpos satisfatórios, quando comparado a animais imunizados com o mesmo veneno não tratado (DANIEL et al, 1987). Apesar destes resultados, observa-se que o tratamento com iodo consiste em método aditivo, ou seja, incorpora na molécula original partículas de iodo que irão saturar drasticamente as tirosinas e histidinas presentes nas moléculas de toxinas ou enzimas. Este fenômeno pode ser

prejudicial a propriedades dos venenos e toxinas e, preocupados com tais efeitos, pesquisadores do mesmo grupo utilizaram uma técnica de iodação consistindo de um único passo de exposição. Os resultados demonstraram que algumas atividades do veneno de *Bothrops jararaca* eram grandemente reduzidas após o tratamento (atividade proteolítica, fosfolipásica e estereolítica), mas os próprios autores admitiram que parte destas atividades estavam presentes em amostras do veneno tratado seja por este novo método, ou mesmo pelo método mais drástico de iodação (BICALHO et al, 1990).

Métodos utilizando radiações já se mostravam eficazes, como se pode observar no trabalho de TEJASEN & OTTOLENGHI (1970), que submeteram o veneno *Agkistrodon piscivorus* ao tratamento com raios ultravioleta e observaram uma significativa redução da toxicidade, bem como das atividades enzimáticas deste veneno e também a manutenção das propriedades imunológicas após tratamento.

A radiação γ (^{60}Co) vem se mostrando um método extremamente eficaz em destoxicar venenos totais ou frações isoladas dos venenos de serpentes. O tratamento de veneno total de *Bothrops jararaca* com várias doses de raios γ (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 igual ou acima de 2000 Gy mostraram reduzir drasticamente as atividades específicas deste veneno (hemorrágica e edemaciante), sendo que doses maiores levaram a um prejuízo da propriedade imunogênica do mesmo.

MURATA et al (1990) utilizando veneno total de *C.d.terrificus*, mostrou que a dose de 2000Gy era a melhor dose para se obter a atenuação desse veneno, bem como manter a sua imunogenicidade, como foi observado utilizando camundongos, coelhos e cavalos. Baseado nestes dados, passou-se adotar a dose total de 2000 Gy como referência no tratamento de venenos com raios γ .

Vários autores também se dedicaram ao estudo dos efeitos da radiação γ sobre toxinas isoladas dos venenos de serpentes. SOUZA-FILHO e colaboradores (1992), utilizando CTXI em várias doses (250 a 2000 Gy), analisaram parâmetros bioquímicos e imunológicos. Os autores observaram alterações na letalidade da toxina que diminuiu de acordo com o aumento da taxa de dose utilizada no tratamento, sendo de 3.5 vezes, na dose de 1500 Gy. Apesar disso, não foram observadas mudanças na imunogenicidade da toxina. Alterações bioquímicas residiram no aumento do número de clivagens de pontes dissulfeto de acordo com o aumento da dose, sendo da ordem de 1.42 pontes clivadas/mol de crotoxina numa dose de 1500 Gy.

A análise da biodistribuição, em camundongos, da CTX foi avaliada por CARDI e colaboradores (1998). Estes autores, utilizando CTXN ou CTXI marcadas com ^{125}I ou detectadas por imunohistoquímica, demonstraram não ter ocorrido qualquer tipo de retenção de CTXI em órgãos de clareamento, verificando uma localização precoce desta em tecido renal. Os órgãos do sistema fagocítico mononuclear se mostraram importantes para ambas as formas, onde foi observada marcação nas primeiras horas. Com relação aos órgãos ricos em tecido nervoso (cérebro e músculo estriado esquelético), foi observada uma menor

concentração das toxinas, mas uma maior retenção das mesmas a esses níveis, chegando a 3 horas após a inoculação. Os métodos imunohistoquímicos não foram capazes de detectar a CTXI em junção neuromuscular, sugerindo que o tratamento com raios γ poderia ter alterado o sítio de reconhecimento da mesma presente na região pré-sináptica das junções. Os autores propõe que o clareamento renal, por filtração simples, ocorre para ambas as formas da toxina. Por fim, a CTXI teria uma maior afinidade, tanto por órgãos do sistema fagocítico mononuclear, através dos quais seria clareada conjugada a células, como por órgãos de clareamento clássicos.

Alterações comportamentais têm sido observadas em ratos inculados com CTX, onde a toxina aumenta o estado emocional, bem como leva a uma diminuição do comportamento exploratório dos animais (MOREIRA et al, 1996). O mesmo grupo, trabalhando com a CTXI, observou que o tratamento com raios γ inibia as alterações de comportamento dos animais inoculados (MOREIRA et al, 1997).

Dessa forma, a análise desta e de outras proteínas submetidas à ação da radiação γ , demonstra a sua eficiência como ferramenta na produção de melhores imunógenos, pois esta não adiciona novas moléculas à amostra protéica, como no caso do uso de agentes físicos ou químicos (GRASSET, 1945; GUIDOLIN et al, 1989), bem como aumenta a antigenicidade de muitas proteínas (OKONOGI et al, 1979; PINHO et al, 1995).

Apesar da importância desses achados, alguns pontos permaneciam não esclarecidos. Além de uma análise acurada da estrutura primária das proteínas

após o tratamento com radiação γ , persiste a questão de quais seriam modificações destas proteínas que confeririam as mesmas uma maior antigenicidade. Quando vista por este prisma, a radiação ionizante pode induzir inúmeras alterações à estrutura protéica, indo desde simples ionizações, até alterações drásticas na sua estrutura primária.

Alterações oxidativas são citadas na literatura como comuns, ocorrendo após o tratamento de proteínas com raios γ . Esses efeitos oxidativos podem decorrer da interação dos radicais livres primários produzidos após a radiólise da água, com a molécula de proteína e irão, conseqüentemente, alterar a estrutura protéica, conferindo a mesma, muitas vezes, cargas negativas (WALES & KUSEL, 1992). A ação de espécies reativas produzidas durante a radiólise da água, portanto, se torna primordial nesses casos e observa-se que o elétron aquoso (e^-_{aq}) e o radical hidroxil ($OH^\cdot$), que são produzidos em grandes quantidades quando da radiólise da água, produzem alterações distintas na moléculas protéicas onde agem. Utilizando CTXI (2kGy), na presença de aceptores específicos para os referidos radicais livres, ANDRIANI (1995) mostrou que a abstração de $OH^\cdot$ do sistema levava a alterações estruturais na molécula de CTX, e atribuiu esses efeitos a ação do e^-_{aq} . Quando este último era retirado, os efeitos eram principalmente sobre os sítios catalíticos da toxina, sugerindo ser este um efeito causado pelo $OH^\cdot$. Apesar desses resultados, acredita-se que outros radicais primários, ou mesmo outros oriundos da combinação destes, possam estar contribuindo para as alterações encontradas.

5- SISTEMA IMUNE, MACRÓFAGOS E RECEPTORES "SCAVENGER"

O sistema imune funciona lançando mão de mecanismos complexos de reconhecimento, internalização e apresentação de antígenos, por parte de células imuno-competentes. Macrófagos são células importantes nestes eventos, participando como células apresentadoras de antígeno, muitas vezes utilizando-se de receptores presentes na superfície de sua membrana para interagir com antígenos, microrganismos ou outras células (AUGER & ROSS, 1992). Dentre estes, uma série de glicoproteínas de superfície (SR-BI, CD36, CD68, MARCO e SR-A) de macrófagos e algumas outras células do sistema imune, denominadas conjuntamente de receptores "scavenger" (ScvR), tem demonstrado a sua contribuição na captação de macromoléculas modificadas, tais como lipoproteínas de baixa densidade (LBD) (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, que incluem lipoproteínas ou proteínas, bem como alguns polissacárides polianiônicos (como por exemplo, sulfato de dextrana e ácido poliinosínico). Além disso, alguns desses podem interagir *in vitro* com células oxidadas ou senescentes, fosfolípidos polianiônicos e componentes bacterianos (KRIEGER & HERTZ, 1994).

Os ScvR classe A presentes em macrófagos (SR-A) são glicoproteínas integrais de membrana que mostram um espectro incomum de propriedades de ligação (GOLDSTEIN et al, 1979; BROWN & GOLDSTEIN, 1983; KODAMA et al, 1988; KODAMA et al, 1990; ROHRER et al, 1990; PENMAN et al, 1991). Estes receptores, como alguns dos acima citados, se ligam a diversas macromoléculas,

incluindo lipoproteínas modificadas (LBD acetiladas ou oxidadas), lípidos de superfície bacteriana (endotoxina e ácido lipoteicoico), proteínas modificadas por glicação avançada (AGE- produtos finais de glicação avançada) e fibrilas β -amilóide (KRIEGER & HERZ, 1994; PARESCE et al, 1996; EL-KHOURY et al, 1996; SUZUKI et al, 1997). Duas isoformas já foram encontradas e são geradas por "splicing" alternativo de um único gene (FREEMAN et al, 1990; EMI et al, 1993). Ambas as isoformas tem 6 domínios propostos: citoplasmático, transmembrana, espaçador, domínio α -helicoidal, colagenoso e um carboxiterminal específico de cada isoforma (KODAMA et al, 1990; ROHRER et al, 1990; ASHKENAS et al, 1993). O largo espectro de interação dos ScvR com diversas moléculas modificadas foi atribuído por DUNNE e colaboradores (1994) a presença do domínio colagenoso, carregado positivamente, presente na região extracelular dos receptores. O ScvR-A tipo I tem um domínio rico em cisteína na porção carboxiterminal com 110 aminoácidos, o qual é um *motif* protéico altamente conservado em muitas outras proteínas importantes para o sistema imune. O tipo II tem um domínio curto, que é relativamente pouco conservado entre as várias espécies. As duas isoformas são capazes de mediar a ligação e a captação de LBD acetilada com eficiência semelhante quando foram transfectados em células CHO-K1, e ambas já foram detectadas em macrófagos de tecido murino (ASHKENAS et al, 1993; HUGHES et al, 1995). Recentemente, uma terceira isoforma foi descrita em macrófagos humanos (SR-AIII), que foi encontrada em linhagem celular THP-1 oriunda de leucemia monocítica humana e também em macrófagos derivados de monócitos humanos. Observou-se que esta

isoforma era incapaz de internalizar a LBD acetilada, apesar de possuir o domínio responsável por este reconhecimento, semelhantes as outras isoformas. Baseado em ensaios utilizando células CHO-K1 transfectadas, os autores observaram que esta isoforma se comporta como controlador negativo da internalização da LBD acetilada, desenvolvida pelas outras duas isoformas, sugerindo um novo mecanismo de regulação da atividade de receptores "scavenger" (ScvR) em macrófagos (GOUGH et al, 1998).

Estudos *in vitro* e *in vivo* têm demonstrado a presença de ScvR na superfície da membrana celular e em vesículas fagocíticas citoplasmáticas, sugerindo que ambos os tipos de ScvR, possuem atividade *in vivo* (NAITO et al, 1992). Esses dados foram corroborados pelo encontro de proteínas dos ScvR tipo I e II sendo co-expressas em macrófagos de várias espécies animais, em órgãos humanos e em células espumosas, durante os vários estágios da aterosclerose.

Considerando os efeitos da irradiação γ sobre proteínas e a capacidade do sistema imune de reconhecer macromoléculas modificadas, decidimos avaliar o comportamento de macrófagos peritoneais de camundongos frente a CTXN e CTXI, e a participação de ScvR no processamento de ambas as formas da CTX, numa tentativa de explicar a sua maior imunogenicidade.

Objetivos

Geral

A proposta do presente estudo foi a de investigar os mecanismos envolvidos na captação da CTXN e da sua forma irradiada (raios γ - ^{60}Co), por parte de macrófagos peritoneais de camundongos não estimulados, utilizando para tal, métodos morfológicos semi-quantitativos (imunohistoquímica), bem como métodos quantitativos (ELISA *in situ*), na presença ou não de bloqueadores específicos dos ScvR.

Específicos

Utilizando uma metodologia adequada, pretendemos:

1-Analisar as características bioquímicas e imunológicas da CTXI, com intuito de controlar a qualidade das amostras utilizadas nos ensaios;

2-Melhorar a padronização dos ensaios imunohistoquímicos anteriormente desenvolvidos por nós, objetivando analisar possíveis alterações na viabilidade e/ou morfologia dos macrófagos, submetidos a incubações com as amostras de proteínas e drogas;

3-Desenvolver e padronizar um método quantitativo (ELISA *in situ*), adaptado às nossas condições experimentais, com objetivo de comparar o grau de endocitose das amostras protéicas analisadas;

4-Investigar o mecanismo de endocitose da CTXN e CTXI por macrófagos peritoneais isolados, comparando com outras proteínas irradiadas e

5-Avaliar a participação de receptores "scavenger" no processo de reconhecimento e internalização das amostras de CTX e OVA.

2- Materiais e Métodos

Crotoxina, purificação e irradiação

Purificação

Veneno de *C. d. terrificus* (Instituto Butantan - São Paulo), na forma liofilizada e estocado a -20°C , foi utilizado para a obtenção de crotoxina nativa (CTXN), segundo a técnica descrita por NASCIMENTO e colaboradores (1996), com modificações baseadas em padronizações anteriores (ROGERO, 1978; NAKAZONE et al, 1984). Brevemente, utilizou-se uma solução contendo 150mg/ml de veneno total diluído em 4ml de ácido acético 0.1M pH 3.0, que após centrifugação a 1000rpm por 10 minutos, foi submetida a cromatografia em gel de exclusão molecular (Sephadex G-75). As frações provenientes desta purificação foram analisadas quanto ao conteúdo protéico, e os picos referentes a CTX foram reunidos, liofolizados e mantidos a -20°C . A seguir, nova cromatografia foi desenvolvida utilizando a fração CTX purificada anteriormente. Nesta, uma solução de CTX (40mg de crotoxina em 1ml) foi aplicada em coluna de Sephadex G-100 e os picos obtidos referentes a toxina foram tratados como na cromatografia anterior. A seguir, a CTX repurificada foi submetida a precipitação em seu ponto isoelétrico (4,7), sendo o material precipitado resultante considerado como CTX purificada, ressuspenso em salina acidificada e mantido em freezer a -20°C . Todo este processo de purificação foi desenvolvido na Supervisão de Radiobiologia do IPEN.

Irradiação

Uma solução contendo CTX purificada (2mg/ml) em solução salina acidificada foi submetida a ação de raios γ de uma fonte de ^{60}Co (GammaCell, Atomic Agency of Canada Ltd) numa taxa de dose de 540Gy/hora (dose total: 2000 Gy). 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 fora da fonte durante todo o tempo de tratamento.

Ovalbumina (OVA), purificação e irradiação

A OVA foi obtida comercialmente (Sigma Chemical Co-St. Louis, MO, USA) e sua pureza foi analisada por cromatografia líquida de alta pressão (HPLC). Após a verificação de sua pureza, alíquotas da proteína foram mantidas a -20°C até o momento do uso, ou submetida ao tratamento com raios γ , de forma semelhante ao adotado para a CTX. Este processo foi desenvolvido na Supervisão de Radiobiologia do IPEN.

Todo o processo de irradiação das amostras de CTX e de OVA foi desenvolvido no IPEN, em colaboração com a Supervisão de Radiobiologia.

Produção de anticorpos específicos anti-CTX e anti-OVA, nativas ou irradiadas

Anticorpos específicos antiCTX e antiOVA foram obtidos pela imunização de coelhos machos New Zealand (3-4 kg), com amostras de CTX e OVA, nativas ou irradiadas, seguindo o método clássico de imunização preconizado por HARLOW & LANE (1988) com ligeiras modificações.

Brevemente, coelhos previamente avaliados (ELISA) quanto a reatividade natural contra as amostras de CTX e OVA foram inoculados (via subcutânea do dorso) com soluções de 200µg/ml de cada amostra de proteína, diluídas em adjuvante completo de Freund. Após 30 dias, os animais receberam a mesma dose, pela mesma via, diluídas em adjuvante incompleto de Freund. Seguidos mais 30 dias, foi colhida amostra de sangue da veia marginal da orelha, com objetivo de avaliar a produção de anticorpos específicos. Em seguida, todos os animais receberam uma dose de reforço, nas mesmas condições do segundo inóculo. Decorridos 15 dias, foi feita nova sangria exploratória e a positividade dos testes de ELISA indicou a sangria definitiva, que ocorreu 2 dias após.

O sangue total dos animais imunizados foi colhido em recipiente de vidro e deixado em estufa a 37°C por 30 minutos, para acelerar o processo de coagulação, seguido de espera em geladeira (4°C, 30 minutos), para facilitar a retração do coágulo. O soro foi separado dos elementos figurados do sangue por centrifugação (2000 rpm, 20 minutos) a 4°C, imediatamente aliquotado e estocado (-20°C) para posterior purificação em coluna de afinidade e determinação de título específico.

Especificidade dos anticorpos antiCTX e antiOVA frente a células em cultura

Foi investigada a possibilidade de reação inespecífica entre os anticorpos produzidos e células em cultura. Para isso, os anticorpos foram diluídos em soluções bloqueadoras (albumina do soro bovino-BSA, leite desnatado-L e soro normal de camundongo-SNC) (L2, L a 2% em PBST; L2S, a 2% em PBST,

Brevemente, coelhos previamente avaliados (ELISA) quanto a reatividade natural contra as amostras de CTX e OVA foram inoculados (via subcutânea do dorso) com soluções de 200µg/ml de cada amostra de proteína, diluídas em adjuvante completo de Freund. Após 30 dias, os animais receberam a mesma dose, pela mesma via, diluídas em adjuvante incompleto de Freund. Seguidos mais 30 dias, foi colhida amostra de sangue da veia marginal da orelha, com objetivo de avaliar a produção de anticorpos específicos. Em seguida, todos os animais receberam uma dose de reforço, nas mesmas condições do segundo inóculo. Decorridos 15 dias, foi feita nova sangria exploratória e a positividade dos testes de ELISA indicou a sangria definitiva, que ocorreu 2 dias após.

O sangue total dos animais imunizados foi colhido em recipiente de vidro e deixado em estufa a 37°C por 30 minutos, para acelerar o processo de coagulação, seguido de espera em geladeira (4°C, 30 minutos), para facilitar a retração do coágulo. O soro foi separado dos elementos figurados do sangue por centrifugação (2000 rpm, 20 minutos) a 4°C, imediatamente aliquotado e estocado (-20°C) para posterior purificação em coluna de afinidade e determinação de título específico.

Especificidade dos anticorpos antiCTX e antiOVA frente a células em cultura

Foi investigada a possibilidade de reação inespecífica entre os anticorpos produzidos e células em cultura. Para isso, os anticorpos foram diluídos em soluções bloqueadoras (albumina do soro bovino-BSA, leite desnatado-L e soro normal de camundongo-SNC) (L2, L a 2% em PBST; L2S, a 2% em PBST,

contendo SNC 1/100; B2, BSA a 2% em PBST; B2S, BSA a 2% em PBST, contendo SVC 1/100) ou não, na ausência das proteínas específicas, e ensaiados com macrófagos peritoneais de camundongo (4×10^4 células/poço/100 μ l) ou células LLCMK2 (4×10^4 células/poço/100 μ l). Optou-se por uma titulação maior do anticorpos (1/1000) e variou-se os tempos de incubação, que foram de 0, 30, 60, 90, 120 minutos.

Objetivando minimizar tais reações, as IgG específicas foram purificadas por cromatografia de afinidade em coluna de proteína A Sepharose e posterior passagem em coluna de Sephadex G25 (Pharmacia) segundo HUDSON & HAY (1989). As frações foram selecionadas inicialmente pela técnica de BRADFORD (1976) e posteriormente tituladas por ELISA, mostrando títulos semelhantes aos encontrados para os soros totais hiperimunes.

Após isso, as amostras de CTX, OVA e de soros hiperimunes específicos foram ensaiadas por EGPA-SDS e Western Blot como será descrito a seguir, objetivando avaliar a reatividade específica e cruzada entre as amostras e os anticorpos específicos.

Caracterização das frações protéicas utilizadas e seus anticorpos específicos

As amostras de CTX e OVA, nativas ou irradiadas, numa concentração de 10 μ g/poço, foram submetidas a eletroforese em gel de poliacrilamida em presença de dodecil sulfato de sódio (SDS-EGPA) (LAEMMLI, 1970), num gel de 12.5% de acrilamida. O objetivo foi verificar possíveis alterações na composição da amostras protéicas. Juntamente com isso, as amostras contidas em um gel foram

submetidas à transferência para membrana de nitrocelulose (TOWBIN et al, 1979; TOWBIN & GORDON, 1984), com objetivo de verificar quaisquer alterações de antigenicidade das amostras após o tratamento com raios γ .

Drogas e reagentes

Todas as drogas utilizadas neste projeto foram de qualidade pró-análise, e obtidas comercialmente. Meios de cultura e outros reagentes e material plástico foram obtidos da Sigma Chemical Co (St. Louis, MO, USA).

Probucol (Merrel Leptit®) [4,4'-(isopropilideno-ditio)bis(2,6-di-butilfenol)] foi dissolvido em dimetilsulfóxido (DMSO) antes do uso devido a dificuldade de sua dissolução em solventes aquosos. Após a solubilização, controles das células a serem utilizadas foram feitas no sentido de se verificar uma possível toxicidade do DMSO para as mesmas. Os ensaios utilizando esta droga foram baseados em trabalho de YAMAMOTO e colaboradores (1986).

Sulfato de dextrana (Sigma Chemical Co (St. Louis, MO, USA), foi dissolvido em água bidestilada, numa concentração de 1mg/ml, sendo esta considerada como solução-mãe. As soluções de uso foram convenientemente diluídas antes do ensaio. Os ensaios utilizando esta droga foram baseados no trabalho de MATTANA e colaboradores (1995).

Macrófagos peritoneais de camundongos

Camundongos CBA/J, destinados a obtenção de macrófagos peritoneais, foram obtidos da colônia do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo e mantidos em gaiolas com meio absorvente esterilizado, recebendo água e alimento *ad libitum*. A manipulação desses animais, antes e durante os ensaios, sempre esteve de acordo com as regras de cuidados de animais de laboratório (NIH publ. N° 86-23, revisado em 1985) e com os princípios de ética em experimentação animal (COBEA - Colégio Brasileiro de Experimentação Animal).

Macrófagos peritoneais de camundongos não estimulados foram isolados de acordo com a técnica de MAHONEY e colaboradores (1977), com pequenas modificações. O lavado peritoneal foi obtido pela injeção de 5ml de PBS estéril contendo gentamicina (10µg/ml) e posterior aspiração. As células coletadas foram lavadas com meio RPMI 1640 sem soro fetal bovino (FBS) contendo antibiótico. Células foram distribuídas em lamínulas de vidro (2×10^4 células/ml) com 11mm de diâmetro, em placas de 24 poços para cultura ou em placas de poliestireno de 96 poços para cultura (4×10^4 células/100µl/poço) (Corning Lab.Sci.Co.-UK). Em ambos os ensaios, as células foram mantidas em meio RPMI 1640 com 10% de FBS, em estufa a 37°C, em ambiente com 5% de saturação de CO₂ (Forma Scientific, Inc, Marjetta, Ohio, USA) por 60 minutos, para que se processasse a aderência das células. Células não aderentes foram retiradas por lavagem com meio RPMI aquecido (37°C), e as células restantes foram incubadas por 24 horas, sob as mesmas condições. A viabilidade e a quantidade de células presentes nos sistemas foram avaliadas pelo teste de exclusão do corante (azul de tripano) e

coloração com cristal violeta a 2%, respectivamente. Sempre antes dos experimentos, as células eram analisadas e somente as lamínulas ou poços com macrófagos apresentando, no mínimo, 95% de viabilidade, eram utilizadas nos experimentos.

Análise da viabilidade de macrófagos peritoneais de camundongos incubados com CTX e OVA, nativas ou irradiadas

Para avaliar possíveis alterações na viabilidade de macrófagos incubados com as amostras de CTX e OVA, utilizamos a técnica do MTT [3-(4,5dimetiltiazol-2-il)-2,5-brometo de difeniltetrazol]] que mede, espectrofotometricamente, o produto da oxidação do MTT, o formazan (RABINOVITCH et al, 1987; ALFIERI et al, 1988; KIDERLEN & KAYE, 1990). Assim, assume-se que a quantidade de produto oxidado produzido (formazan) seja proporcional a atividade mitocondrial que, por sua vez, reflete a viabilidade das células.

Macrófagos peritoneais de camundongos (4×10^4 células/poço/100µl) foram ensaiados com amostras de CTXN ou CTXI (5µg/poço/100µl), em diferentes tempos (0, 15, 30, 60 e 120 minutos), diluídas em meio RPMI 1640 sem FBS. Após cada tempo, os poços foram lavados com PBST, para remoção do meio de cultura, e adicionou-se 100µl/poço de uma solução de MTT (1mg/ml em RPMI sem vermelho de fenol e sem soro fetal bovino), que permaneceu por 4 horas em estufa a 37°C, com 5% de CO₂. A seguir, processou-se a extração do produto da oxidação do MTT (formazan), pela adição de 100µl/poço de álcool isopropílico.

Após homogeneização por agitação, foi feita a leitura da placa em leitor de microplacas, num comprimento de onda de 620nm.

Ensaio imunohistoquímico

Lamínulas previamente selecionadas contendo macrófagos peritoneais (2×10^4 células/ml) foram ensaiadas com CTXN ou CTXI ($1 \mu\text{g}/100 \mu\text{l}$ /poço) dissolvidas em meio RPMI 1640 sem FBS. Após 15, 30 e 60 minutos para cada grupo, respectivamente, a captação das proteínas foi interrompida pela rápida lavagem com PBS estéril, seguida de fixação com paraformaldeído a 4% tamponado pH 7.2, preparado no momento do uso. Todos os procedimentos seguintes foram desenvolvidos à temperatura ambiente ($\pm 25^\circ\text{C}$). As células fixadas foram, então, lavadas e permeabilizadas com metanol:acetona (1:1) por 30 segundos, para permitir a internalização dos anticorpos. A atividade de peroxidase endógena foi bloqueada pela incubação das células com H_2O_2 a 1% por 10 minutos. Após lavagens com PBS, as células foram incubadas com IgG de coelho antiCTXN ou antiCTXI, diluída em PBS, contendo 2% de BSA e 0,05% de Tween 20 (PBST), por 60 minutos. Após isso, novas lavagens foram feitas, seguidas de incubação com IgG de cabra anti-IgG de coelho, ligada à peroxidase (Sigma), nas mesmas condições utilizadas para o anticorpo primário. As áreas positivas foram reveladas pela adição de solução cromogênica [PBS contendo 1mg/ml de 3, 3'-diaminobenzidina-HCl (Sigma, St.Louis, MO, USA) e 0,03% de H_2O_2 (Merck, Darmstadt, Germany)], sob observação ao microscópio, até que um leve ruído de fundo (*background*) fosse formado. Após isso, as lamínulas foram desidratadas

por meio de 2 passagens em metanol:acetona (1:1) por 5 minutos e contracorados com hematoxilina de Harris por 3 minutos, seguido da montagem definitiva com resina artificial (Harleco-Hatman Leddin Co., PA, USA). A análise morfológica foi feita utilizando-se microscópio Axiophot Zeiss com lentes planapocromáticas e os campos significativos foram fotografados.

Determinação do "status oxidativo" das amostras de CTX, pela determinação de grupos carbonil

O estado oxidativo das amostras de CTX foi avaliado utilizando-se a determinação da presença de grupos carbonil como marcador de alterações oxidativas de moléculas protéicas. Utilizamos kit comercial OxyBlot™, que determina a presença de grupos carbonil na cadeia lateral das proteínas sendo estes derivatizados para DNP-hidrazona(2,4-dinitrofenilhidrazona), após reagirem com DNPH (2,4-dinitrofenilhidrazina). Para os nossos ensaios, objetivando uma melhor adaptação, modificamos a metodologia utilizada pelo kit, substituindo o revelador original (luminol) pelo cromógeno 4-cloro-naftol.

As amostras de CTX foram ensaiadas, utilizando se como controle positivo a oxCTXN, que consiste da CTXN oxidada *in vitro* pela incubação com 5µM de sulfato de cobre , por 12 horas, de acordo com o técnica de LOUGHEED & STEINBRECHER (1996). Assim, CTXN e CTXI (5-10µg/100µl) e oxCTXN (10-20µg/100µl) em volumes corrigidos, foram adicionadas de 5µl de SDS 12%, para obter uma concentração final de 6%. Após isso, adicionou-se 10µl de DNPH. Como controle de derivatização, adicionou-se a solução de derivatização 1X, ao

invés da solução de DNPH. Após repouso em temperatura ambiente ($\pm 27^{\circ}\text{C}$) por 15 minutos, adicionou-se 7.5 μl de solução de neutralização. Em seguida, as amostras foram aplicadas em aparelho para Dot (DotBlot™ -BioRad), num volume de 100 μl , com subsequente lavagem com PBST para a retirada do excesso de proteínas. A membrana sofreu bloqueio com BSA 2% em PBST (solução de bloqueio) por 60 minutos, seguido da incubação da mesma com solução de anticorpo primário (anti-DNP) em solução de bloqueio por 60 minutos a 18-25°C, com agitação leve e constante. Após lavagem da membrana 2X por 15 minutos e 2X de 5 minutos com PBST, a 18-25°C, a membrana foi incubada com conjugado (IgG de cabra anti-IgG de coelho/ peroxidase) em solução de bloqueio por 60 hora a 18-25°C com agitação branda. A revelação se deu pela adição de solução cromogênica como descrito para as reações de Western Blot. Após a reação, a membrana foi lavada com PBST e mantida a 4°C por 30 dias, objetivando aumentar o sinal da reação por meio de oxidação espontânea dos possíveis radicais derivatizados que não puderam ser detectados pelo anticorpo específico.

ELISA in situ

CTX e OVA, nas formas nativa ou irradiada (0,5 μg /poço/100 μl), foram incubadas com macrófagos peritoneais de camundongos CBA/J (4x10⁴/poço), previamente semeados em placa de polietileno (96 poços) para cultura de células, diluídas em meio RPMI sem FBS. As células foram ensaiadas em quadruplicata e em diferentes tempos. Após a incubação, as células foram lavadas rapidamente com PBS, fixadas com paraformaldeído a 4% tamponado pH 7.2, por 10 minutos,

permeabilizadas com metanol:acetona (1:1) por 30 segundos e a atividade de peroxidase endógena bloqueada pela incubação com H_2O_2 a 1% por 10 minutos. Após novas lavagens com PBS, as células foram incubadas com os anticorpos específicos diluídos em PBST (IgG de coelho antiCTX ou antiOVA, nativas ou irradiadas) por 60 minutos à temperatura ambiente ($\pm 25^\circ C$) em câmara úmida. Após novas lavagens com PBS, as células foram incubadas com IgG de cabra anti-IgG de coelho, ligada à peroxidase (Sigma, St.Louis, Missouri, USA) sob as mesmas condições. A revelação foi feita pela adição de solução cromogênica (1mg/ml de o-fenilenodiamina e 0.03% de H_2O_2 em 0.05M de tampão citrato de sódio pH 5.6) por 10 minutos ao abrigo da luz, seguido de leitura espectrofotométrica em leitor de microplacas num comprimento de onda de 492nm. A concentração de células presentes no sistema foi monitorada pela coloração das mesmas com solução aquosa a 1% de cristal violeta com subsequente extração do corante com ácido acético glacial a 33%. A densidade óptica a 575nm foi determinada em leitor de microplacas (HARLOW & LANE, 1988).

Ensaio de bloqueio de captação de crotoxina nativa ou irradiada

Probucol

Macrófagos peritoneais de camundongos foram ensaiados com amostras de CTX e OVA (0.5 μ g/poço) na presença de Probucol (0-20 μ g/poço) em meio RPMI sem FBS como descrito para os ensaios de ELISA *in situ*, utilizando concentração do bloqueador já descrito por YAMAMOTO e colaboradores (1986).

Sulfato de dextrana

As células foram, também, ensaiadas com amostras de CTX e OVA (0.5µg/poço) e outro bloqueador específico dos ScvR, o sulfato de dextrana (50µg/poço), baseado nas concentrações utilizadas por MATTANA e colaboradores (1995).

Em ambos os casos, as células foram expostas aos bloqueadores, diluídos em meio RPMI sem FBS, 15 minutos a 37°C em estufa contendo 5% de CO₂ antes da adição das amostras protéicas. A seguir, as monocamadas de células foram lavadas e adicionou-se amostras de CTX e OVA, diluídas no meio anteriormente descrito, que permaneceram em contato com as células por 60 minutos a 37°C em estufa com 5% de CO₂. Finalmente, após desprezar o sobrenadante, as células foram lavadas uma vez com PBST, fixadas e processadas como para ELISA *in situ*.

Ensaio de ligação de proteínas na presença de bloqueadores de receptores "scavenger" (Probucol e Sulfato de dextrana)

Macrófagos peritoneais de camundongos (4×10^4 células/poço/100µl) distribuídos em placas de 96 poços para cultura de células, mantido nas condições de cultura ideais anteriormente descritas, foram lavados uma vez com PBS aquecido (37°C), para a retirada de resíduos de FBS presentes no meio de cultura. Em seguida, as células foram incubadas em meio RPMI sem FBS e colocadas a 4°C (geladeira) por 15 minutos. Após isso, amostras de CTX ou OVA

(0.5µg/poço/100µl) foram adicionadas diluídas no mesmo meio anteriormente descrito, sendo as células mantidas na mesma temperatura por 60 minutos. Após este tempo, as células foram lavadas uma vez com PBS e processou-se a fixação imediata com paraformaldeído a 4% tamponado pH 7.4, como descrito para ELISA *in situ*.

Quando da utilização de bloqueadores de ScvR, os mesmos foram adicionado às células durante os 15 minutos iniciais, nas mesmas condições descritas para o ensaio de ELISA *in situ*.

Os resultados deste ensaio representam a capacidade de reconhecimento, por parte dos ScvR expressos na superfície dos macrófagos, das amostras das proteínas analisadas.

3- Análise estatística

Os dados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão, baseados em cinco determinações. Após testar a homogeneidade das variâncias, os dados foram comparados utilizando-se o teste *t* de *Student*, e considerados significativos quando a probabilidade de igualdade (*P*) era < 0.05 . A captação progressiva das toxinas pelos macrófagos foi estimada por regressão linear padrão dos dados, com determinação do *slope*, r^2 , e intervalos de confiança de 95%.

4- Resultados

Produção, purificação e análise de anticorpos antiCTX e antiOVA, nativas ou irradiadas

Crotoxina

Com objetivo de produzir anticorpos específicos contra as formas nativa e irradiada de CTX, imunizamos coelhos New Zealand, utilizando a forma clássica de imunização, com descrito em Métodos. Nossos resultados mostraram que os títulos de anticorpos nos soros de coelhos imunizados com as amostras de CTX foram de 1/60.000 para a CTXI e 1/40.000 para a CTXN, como determinado por ELISA, utilizando-se as formas nativa e irradiada como âncora à fase móvel. Como mostrado na figura 2B, o padrão de agregados da CTXI pode ser facilmente visto em fitas incubadas com os anticorpos específicos utilizados. A CTXI induziu uma alta resposta imune, apresentando anticorpos fortemente reativos, para ambas as formas da CTX. Esses resultados mostram claramente que os anticorpos produzidos contra a CTXI podem reconhecer satisfatoriamente a forma nativa da toxina. Quando se observa os anticorpos contra a CTXN, vê-se que estes reconhecem também a CTXI, não somente a sua fração padrão, mas também os agregados de alto peso molecular produzidos após irradiação.

Ovalbumina (OVA)

Após imunização de coelhos com OVA nativa ou irradiada (200mg/inóculo, utilizando método clássico de imunização (Ver Métodos) analisamos, por ELISA, os soros dos animais e observamos que estes apresentavam títulos de anticorpos

extremamente satisfatórios, excedendo a 1/40.000, para ambas as amostras de OVA, como testado por ELISA convencional.

Testes de ELISA *in situ* utilizando macrófagos, mostraram que o soro desses animais imunizados com as amostras de OVA, reagiam inespecificamente, apesar dos bloqueios utilizados (leite, BSA e/ou soro normal de coelho) (Figura 1A).

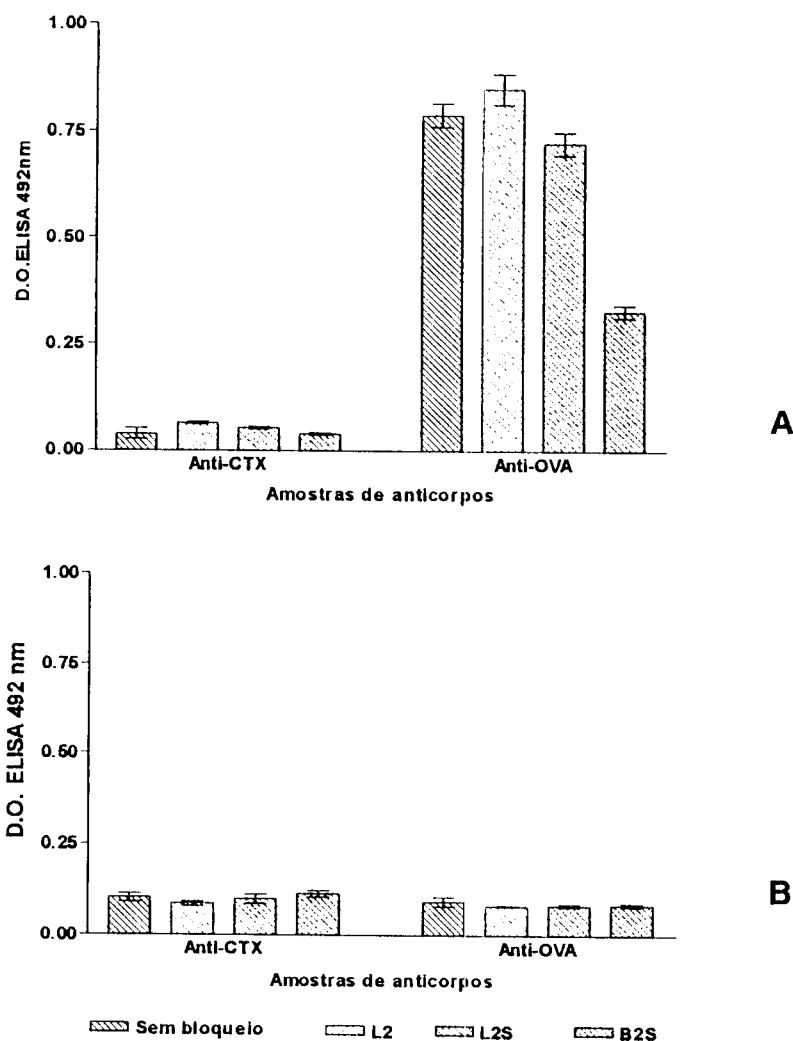


Figura 1-Avaliação da presença de reatividade inespecífica entre os soros anti-OVA e anti-CTX na presença ou não de bloqueio. L2- Leite desnatado a 2% em PBST; L2S- Leite desnatado a 2% em PBST + soro normal camundongo (SNC) 1/1000; B2-BSA a 2% em PBST; B2S- BSA a 2% + SNC 1/1000. **A**-Perfil da reatividade dos anticorpos antes da purificação por afinidade. **B**-Perfil de reatividade dos anticorpos após a purificação por afinidade, seguido de dessalinização em coluna Sephadex G 25.

Este fato nos levou a acrescentar um passo de purificação, que consistiu em separação de IgG anti-OVA em coluna cromatográfica de afinidade Sepharose CL4B, com posterior dessalinização em Sephadex G 25. Essa purificação levou à eliminação das reações inespecíficas apresentadas pelo soro total hiperimune, como pode ser observado na figura 1B. Estes resultados mostram que o tratamento da OVA com raios γ (^{60}Co), nas condições utilizadas, não foi capaz de alterar o seu reconhecimento pelos anticorpos específicos.

Caracterização das frações protéicas utilizadas e seus anticorpos específicos

As amostras de CTX e OVA foram mantidas nativas ou submetidas ao tratamento com raios γ (dose total 2000 Gy – ^{60}Co). Após esse tratamento, submeteu-se as amostras a eletroforese em gel de poliacrilamida (15% e 12.5%, respectivamente), com o objetivo de avaliar quaisquer alterações estruturais induzidas pelo tratamento com a irradiação.

Observou-se, também, a pureza da forma nativa da CTX, antes da irradiação. Como pode ser observado na figura 2A, a radiação (2kGy) induziu uma quantidade significativa de agregados de alto peso molecular na CTX, presente na região superior do gel. Apesar da formação destes agregados, grande parte da proteína original se comportou como a sua contraparte nativa. A formação desses agregados pareceu obedecer a um padrão de formação oligomérica, com bandas bem evidenciadas, reconhecidas pelos anticorpos específicos (Figura 2B).

A análise das amostras de OVA por eletroforese demonstrou, da mesma forma que a CTX, a sua pureza antes da irradiação, bem como a indução de

agregados, sendo que neste caso, estes se mostraram dispersos na região central do gel, sugerindo que a maior parte dos agregados formados não são de alto peso molecular. (Figuras 3A e 3B). Outro fenômeno bastante significativo foi a presença de uma grande quantidade de produtos de degradação de peso molecular inferior ao da proteína nativa, detectados por Western Blot, fato que não ocorreu quando da irradiação da CTX (Figura 2B).

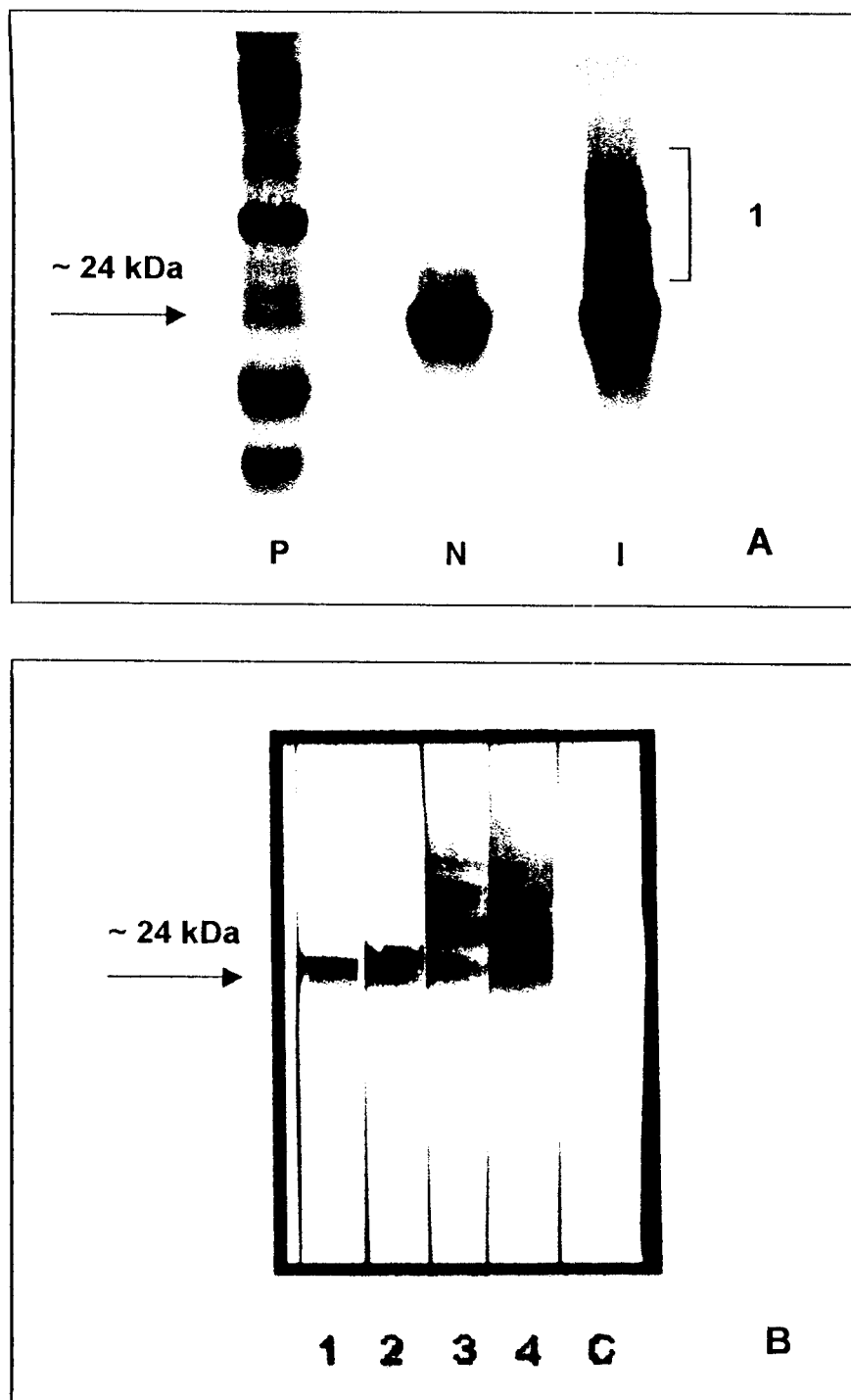


Figura 2- Avaliação do grau de pureza, imunogenicidade e integridade das amostras de CTXN e CTXI, frente a anticorpos específicos:

A- EGPA-SDS (12.5%), em condições desnaturantes, onde se pode observar a integridade da CTXN (N), bem como a formação de agregados (←) de alto peso molecular na amostra de CTX tratada com raios γ (2kGy – ^{60}Co) (I). Coloração pela Prata amoniacal.

B- Ensaio de Western blot mostrando reatividade cruzada entre os anticorpos antiCTXN ou antiCTXI, que reconheceram ambas as formas da CTX

1- CTXN vs antiCTXN; 2- CTXN vs antiCTXI; 3- CTXI vs antiCTXN; 4- CTXI vs antiCTXI; C- Controle – CTXI vs soro normal de coelho. Revelação por 4-cloro-naftol.

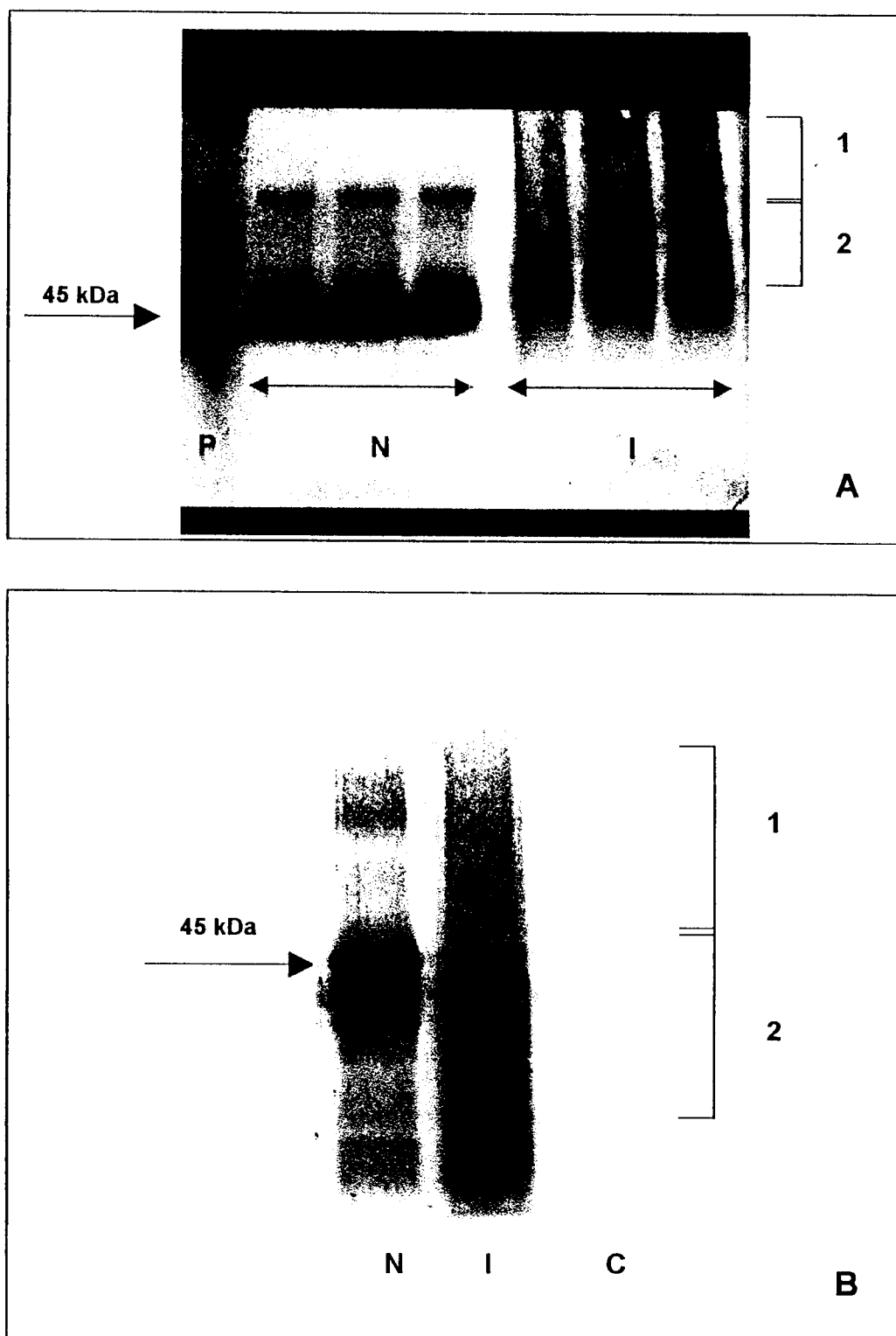


Figura 3- Avaliação do grau de pureza, imunogenicidade e integridade das amostras de OVAN e OVAI, frente a anticorpo específico (anti-OVAN):

A- EGPA-SDS (12.5%), em condições desnaturantes, onde se observa a integridade da OVAN (N), bem como a formação de agregados de alto (1) e médio (2) peso molecular na amostra de OVA tratada com raios γ (2kGy – ^{60}Co) (I);

B- Ensaio de Western blot mostrando reatividade específica e cruzada entre o anticorpo antiOVAN, frente as amostras de OVAN e OVAI, respectivamente; controle (C).

Análise da viabilidade de macrófagos peritoneais de camundongos incubados com CTX e OVA, nativas ou irradiadas

Amostras nativas ou irradiadas de CTX e OVA (5µg/100µl/poço) foram ensaiados macrófagos peritoneais de camundongos em tempos variados (0 a 120 minutos). Após o término de cada tempo, as preparações eram lavadas e adicionava-se solução de MTT por 4 horas com posterior extração do produto oxidado formado, o formazan. Esse teste teve como objetivo avaliar a viabilidade destas células, pela determinação do padrão respiratório das mitocôndrias.

Nossos resultados mostraram que a viabilidade das células incubadas com as proteínas esteve mantida até o tempo máximo de 120 minutos de incubação, não havendo diferenças significativas quando comparado com os controles. (Figura 4).

Ensaio imunohistoquímico e de morfologia celular

A análise das células controle revelou ausência de marcações inespecíficas, como marcação de fundo com anticorpos ou procedentes de atividade de peroxidase endógena. Macrófagos ensaiados com CTXN mostraram marcações restritas aos vacúolos endocíticos conspícuos na periferia celular interna e, mínimas alterações na estrutura dessas células foram sugestivas de danos celulares leves após 30 minutos de incubação com a toxina. Para estas células, observou-se uma maior perda celular, quando comparado aos ensaios utilizando CTXI (Figura 5A).

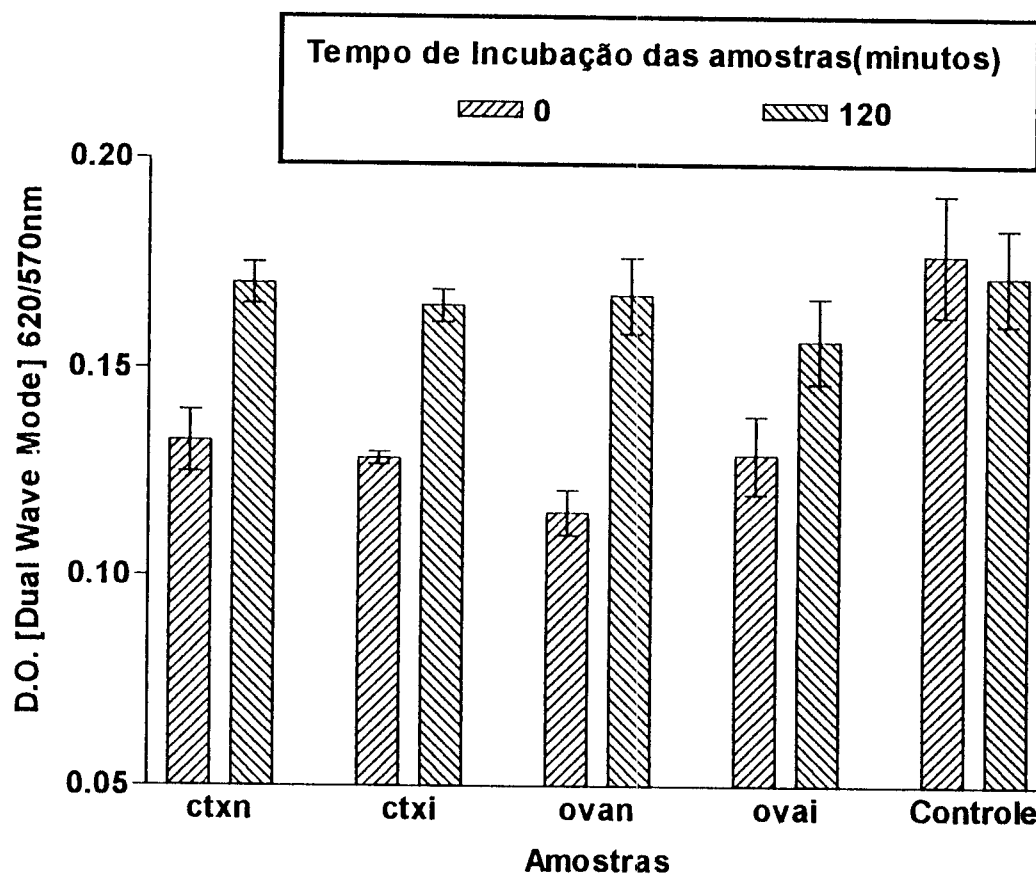


Figura 4- Análise da viabilidade (método do MTT) de macrófagos peritoneais de camundongos incubados, em diferentes tempos, com amostras de CTX ou OVA. Observa-se que as células apresentam uma viabilidade mantida ao longo do tempo de ensaio e que, mesmo tempos longos de incubação (60 e 120 minutos) na presença das proteínas, não reduziram a viabilidade das mesmas.

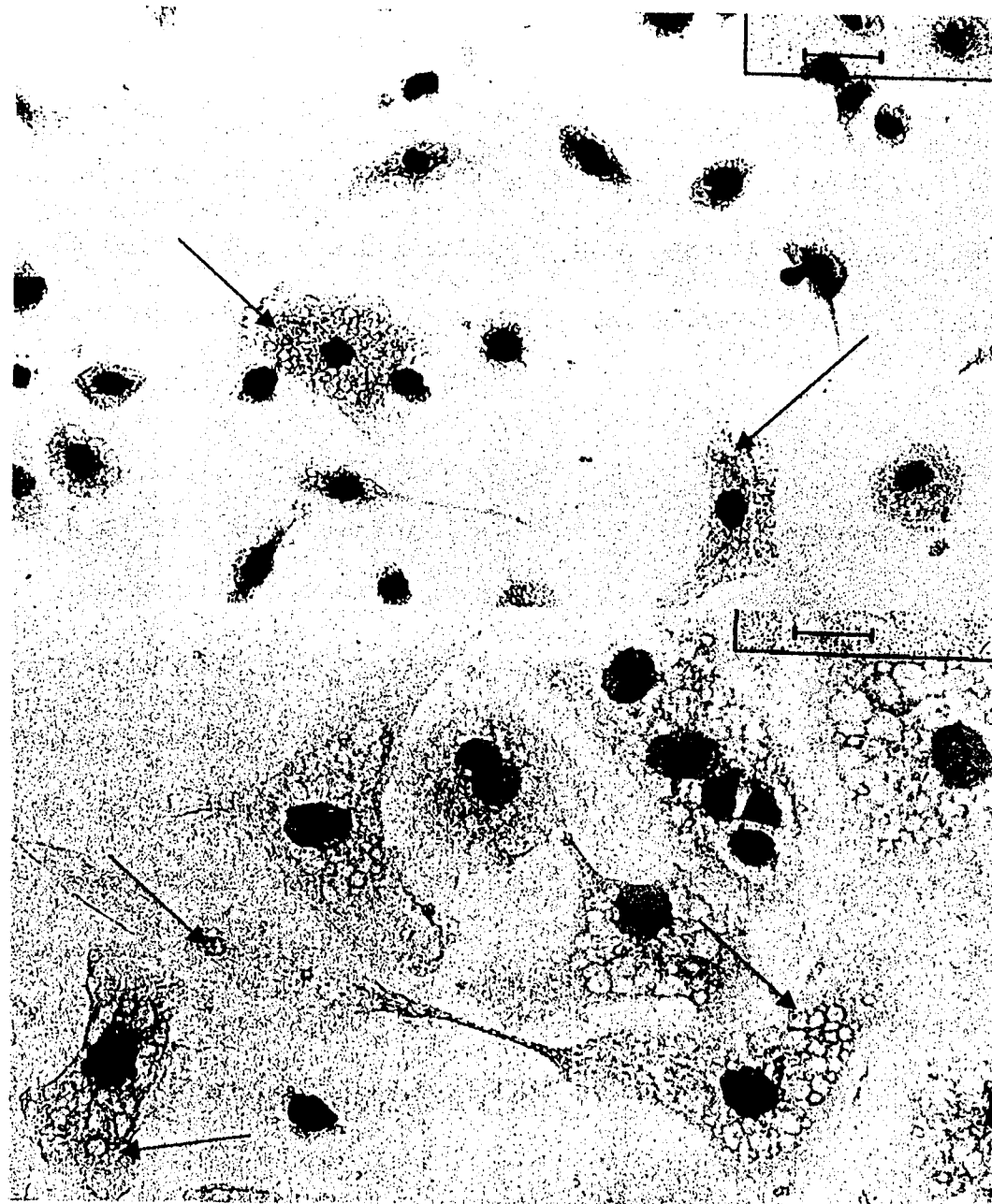


Figura 5. Macrófagos peritoneais de camundongos CBA/J foram incubados com CTXN ou CTXI (100 μ g/500 μ l) por 30 minutos e ensaiados por imunoperoxidase indireta (Complexo Avidina-Peroxidase), utilizando anticorpo antiCTXN biotinilado e conjugado comercial (Sigma).

A- CTXN. Vacúolos endocíticos apresentavam marcações imunohistoquímicas na periferia celular, evidenciando a internalização da toxina, mas com poucas marcações na região perinuclear (→) (40X)

B- CTXI. Manutenção do padrão apresentado na figura 5A, mostrando células mais intensamente marcadas, com vacúolos endocíticos corados presentes na região perinuclear. (→) (63X).

Quando a CTXI foi utilizada, macrófagos mostraram marcações citoplasmáticas mais conspícuas, apresentando vacúolos fagocíticos fortemente corados dispersos pelo citoplasma celular ou distribuídos em torno do núcleo. A viabilidade das células esteve preservada, bem como a sua morfologia, sem apresentar indícios de deterioração celular, apesar do longo período de incubação desta com a toxina irradiada (Figura 5B).

Determinação do "status oxidativo" das amostras de CTX, pela determinação de grupos carbonil

As amostras de CTX foram avaliadas quanto ao seu grau de oxidação, utilizando kit comercial OxyBlot™, que determina a presença de grupos carbonil como marcadores de alterações oxidativas nas moléculas protéicas. Para nossos ensaios, adaptamos a metodologia do kit no sentido de permitir que visualizássemos a reação utilizando 4-cloro-naftol como cromógeno. Nossos resultados evidenciaram a presença de alterações oxidativas significativas na amostras de CTXI, em comparação a CTXN, ligeiramente menos intensas que as da amostra controle (CTXN oxidada *in vitro* pelo cobre) (Figura 6). A positividade da reação foi alcançada, além da utilização de anticorpo específico, pela incubação a 4°C, que permitiu uma melhor visualização dos resultados.

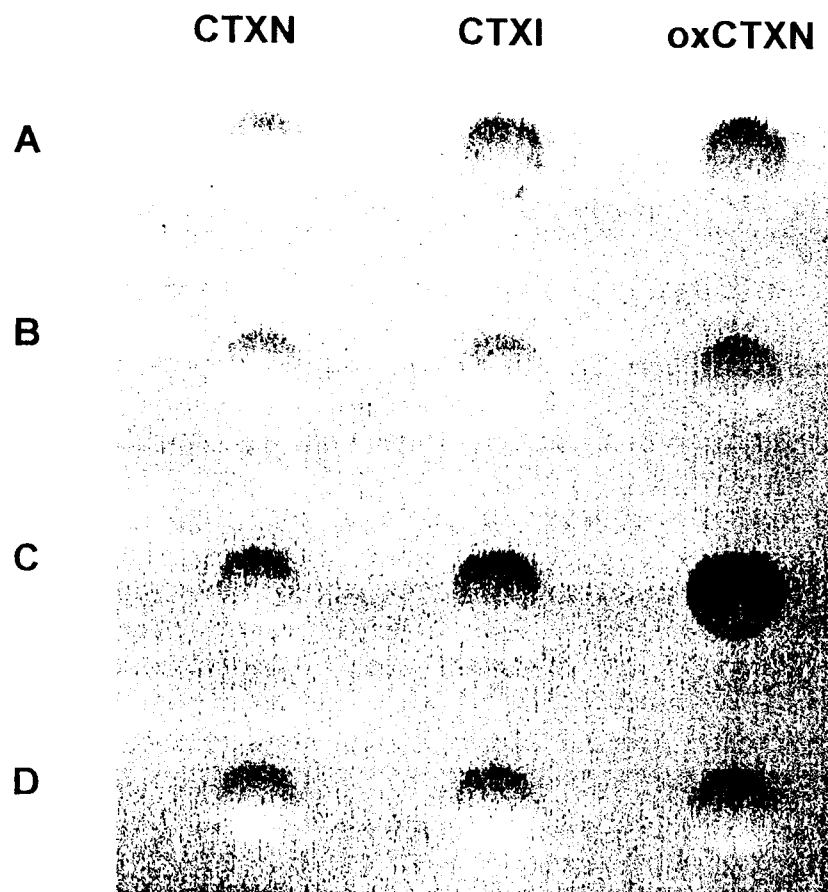


Figura 6- Reação de Dot Blot representando a determinação do estado oxidativo de amostras de CTX, pela determinação da presença de grupos carbonil. Observa-se que a CTXI apresenta um perfil oxidativo significativo, quando comparada a CTXN e ao controle-oxCTXNC (CTXN oxidada *in vitro*, pelo método do cobre). **CTXN:** A-5 μ g/100 μ l; B-Controle; C-10 μ g/100 μ l; D-controle; **CTXI-A-**5 μ g/100 μ l; B-controle; C- 10 μ g/100 μ l; D-controle; **oxCTXN A-**10 μ g/100 μ l; B-controle; C-20 μ g/100 μ l D-controle. Os controles referidos são oriundos da substituição da solução de DNPH pela solução de controle de derivatização, para cada uma das amostras de proteínas utilizadas.

Quantificação da captação das amostras de CTX e OVA por macrófagos, determinada por ELISA in situ

Crotoxina

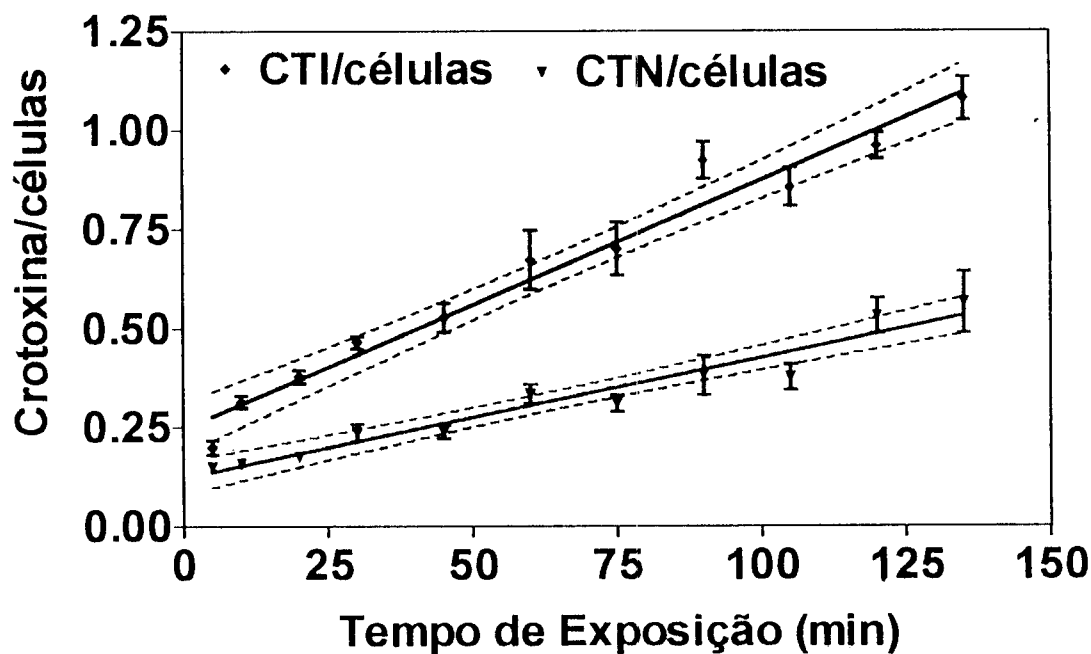
Padronizamos um método quantitativo, ELISA *in situ*, no qual macrófagos peritoneais de camundongos (4×10^4 células/100µl/poço), previamente avaliados quanto a viabilidade, eram desafiados com as diferentes amostras de CTX e OVA (5µg de proteína/100µl/poço). Este teste mede a quantidade de proteína específica reconhecida e/ou incorporada pelas células, nos diferentes momentos de análise. A quantificação se deu após reação imunoenzimática utilizando anticorpos específicos, com posterior leitura da densidade óptica, que mostrou uma intensidade diretamente proporcional a quantidade de CTX ou OVA internalizada pelos macrófagos. Como mostrado na figura 7, macrófagos incubados com CTXI apresentaram uma captação 2 vezes maior (0.032 ± 0.0027 unidades de DO/minuto) que os macrófagos incubados com a CTXN (0.015 ± 0.0014 unidades de DO/minuto).

Essa captação favorecida da CTXI, que pareceu ser constante aos ensaios imunohistoquímicos, foi também observada por ELISA *in situ*, mostrando que esta endocitose, nas concentrações de toxinas utilizadas, não era restrita a poucas células da monocamada, mas sim compartilhada pela maioria das células no poço. Não foram observadas quaisquer alterações quantitativas nas células sugestivas

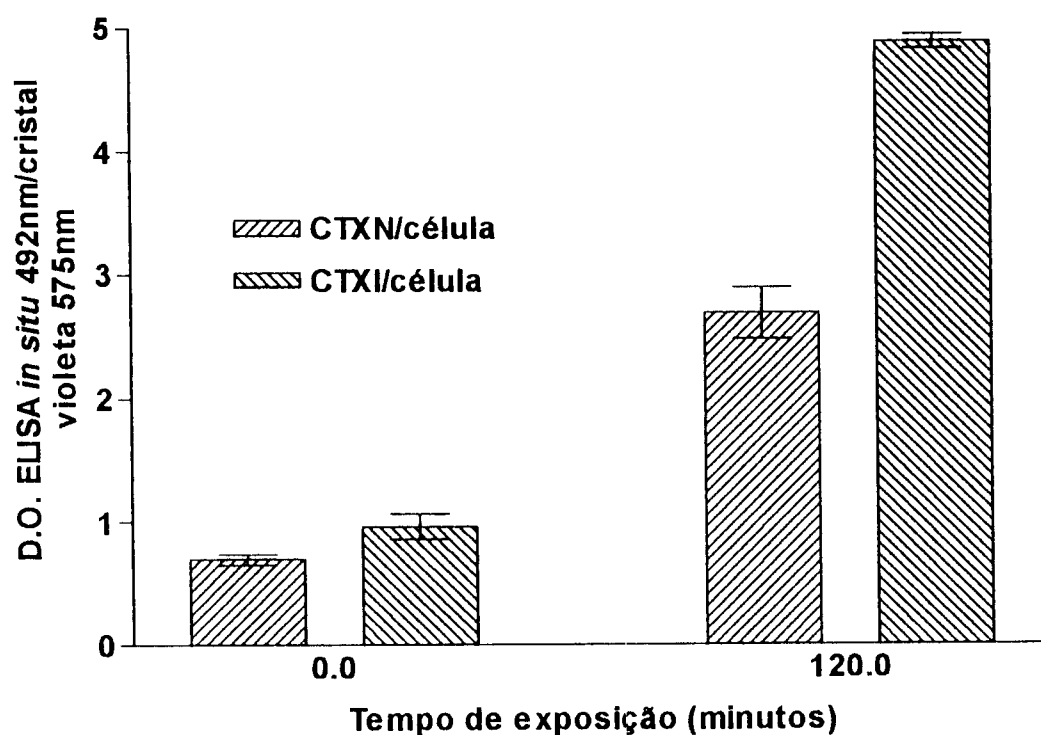
de ação das proteínas, quando se utilizou o método da coloração pelo cristal violeta (Figura 7).

Influência da concentração de proteínas no soro fetal bovino (FBS) no meio de ensaio de captação

Para analisarmos a influência da concentração de proteínas presentes no FBS sobre o ensaio de captação seguido de ELISA *in situ*, promovemos os ensaios utilizando meio RPMI 1640, contendo concentrações crescentes de FBS. A seguir, os macrófagos foram desafiados com CTXN ou CTXI diluídas no meio, por um período de 60 minutos, com posterior processamento para ELISA *in situ*. Como pode ser observado na figura 8, houve uma diminuição significativa da captação da CTXN (cerca de 50%), ao passo que a CTXI apresentou pouca alteração, não chegando a 10% do encontrado na ausência de FBS.



A



B

Figura 7. A- Captação da CTXN ou CTXI por macrófagos peritoneais de camundongos, determinada pelo método de ELISA *in situ*. Curva de regressão linear, com os intervalos estimados. B- Ponto correspondente ao tempo de 120 minutos, extrapolado do gráfico em A. Os dados foram corrigidos pela concentração de células nos testes e são expressos como densidade óptica (DO) no teste de ELISA *in situ* dividido pela DO obtida pelo método do crista violeta (Ver Métodos).

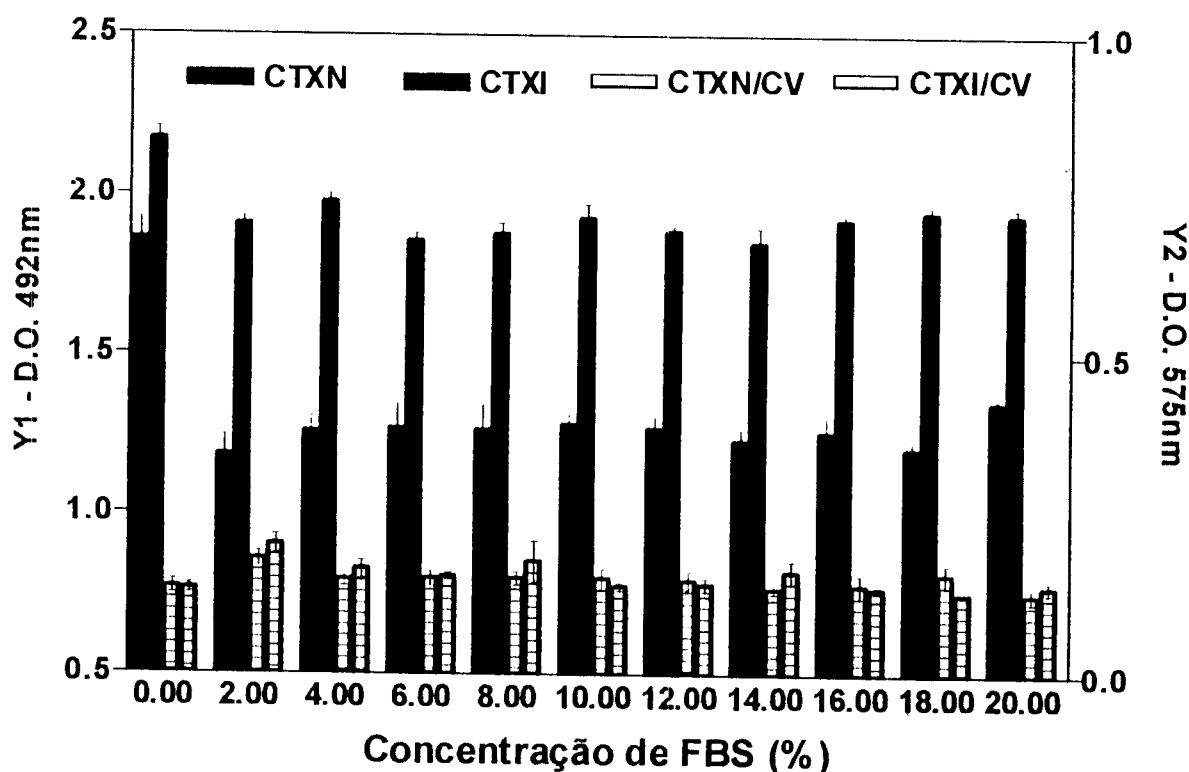


Figure 8. Influência da presença de proteínas do soro fetal bovino (FBS) na captação de CTXN ou CTXI por macrófagos peritoneais de camundongos. Y1 – Índice de captação de CTXN ou CTXI medido por ELISA *in situ*; Y2 – Determinação da concentração de células, pela técnica do cristal violeta.

Ensaio de ligação de proteínas na presença de bloqueadores de ScvR (Probucol e Sulfato de dextrana)

Para investigar o envolvimento dos ScvR no reconhecimento das amostras de CTX, utilizamos o método de ELISA *in situ*, numa temperatura de 4°C, permitindo a interação das proteínas com o receptor, sem que as mesmas fossem internalizadas. Para isso, amostras protéicas (5µg/100µl/poço) foram oferecidas aos macrófagos, após bloqueio prévio dos receptores, como descrito em Métodos.

Pudemos observar na figura 9 que, tanto Probucol quanto o Sulfato de dextrana foram capazes de interferir na ligação da CTXI com as células, apresentando um perfil

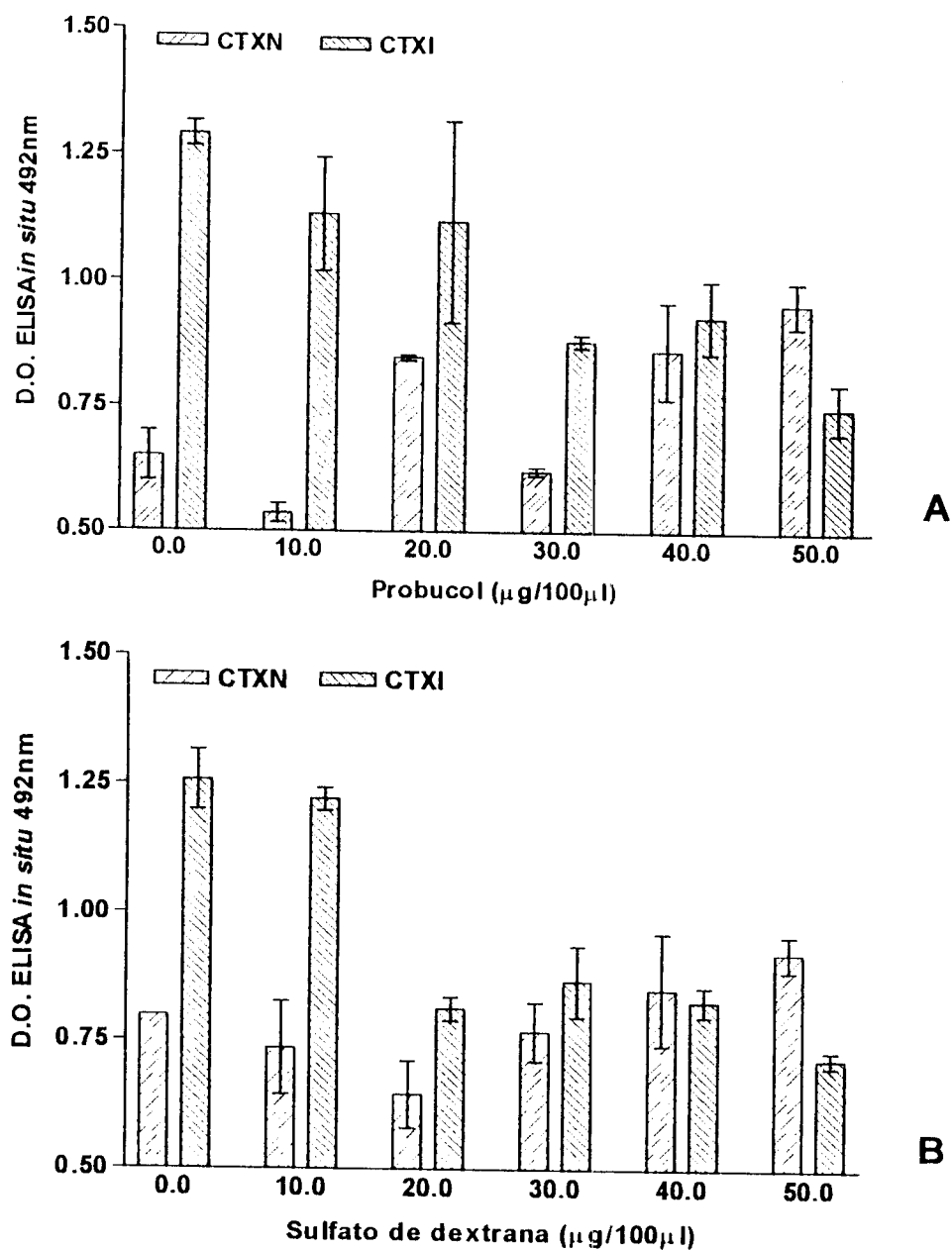


Figura 9- Ensaio de ligação a frio (4°C) de CTXN e CTXI, com macrófagos peritoneais de camundongos na ausência ou na presença de Probucol ou Sulfato de dextrana, num período de incubação de 60 minutos. A- Ensaio de ligação na presença de Probucol, mostrando um declínio da captação da CTXI, de forma concentração dependente; B-Ensaio na presença de Sulfato de dextrana, onde se observa o mesmo perfil encontrado em A.

dependente da concentração das drogas oferecidas. Entretanto, o Probucol pareceu interferir, também, na captação da CTXN, perfil este pouco evidente para o sulfato de dextrana. É interessante notar, também, que nos ensaios de ELISA *in situ*, onde o tempo de oferta do bloqueador é maior, doses menores de Probucol (em torno de 12µg/100µl/poço), foram suficientes para diminuir a captação da CTXI (Figura 10).

Ensaio de bloqueio

Probucol

Objetivando avaliar a participação dos ScvR no processo de reconhecimento e internalização de CTX e OVA, nas formas nativa ou irradiada, ensaiamos os mesmos na presença de bloqueadores deste receptor (Probucol e Sulfato de dextrana) (ver Métodos).

Quando macrófagos foram ensaiados com as toxinas juntamente com quantidades crescentes de Probucol, observou-se que a captação aumentada da CTXI tendia a diminuir sem que, entretanto, a CTXN fosse afetada. Este fenômeno mostrou um perfil dependente da concentração e uma tendência a decrescer a captação dependente de ScvR. Analisando células incubadas com diferentes concentrações de Probucol, não observamos alterações na viabilidade das mesmas, como analisado pelo teste de exclusão do corante (azul de tripano). Por outro lado, as células incubadas com a droga, juntamente com a CTXN, não apresentaram uma captação diminuída, sugerindo que esta forma da toxina não é reconhecida ou internalizada via ScvR (Figura 10).

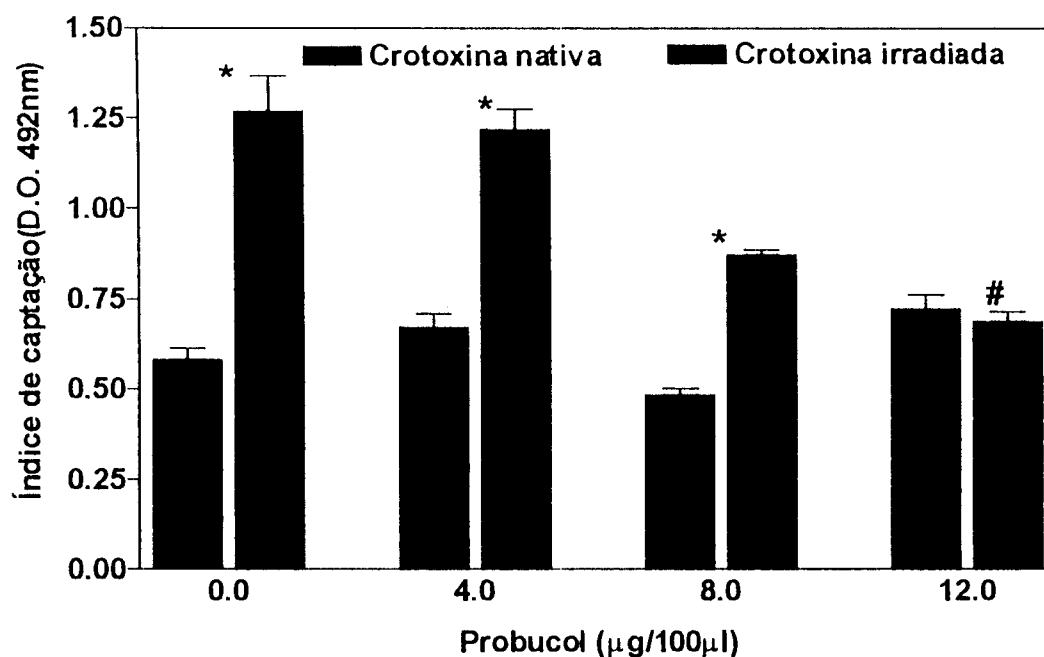


Figura 10. Inibição da captação de CTXI por parte de macrófagos peritoneais de camundongos na presença de diferentes concentrações de Probucol, com subsequente incubação com CTXN ou CTXI por 60 minutos. * significativo, quando comparando CTXN e CTXI; # significativo quando comparando dados obtidos com ou sem Probucol.

Sulfato de dextrana

Macrófagos peritoneais foram incubados com amostras de CTX e OVA, na presença de sulfato de dextrana (50µg/100µl/poço) durante 60 minutos. Quando a captação da CTXI foi determinada na presença da droga, um decréscimo significativo foi observado, diferente do observado para a CTXN, que não sofreu alterações significativas. Esses resultados não foram tão intensos como os observados com o Probucol, mas também confirmam o envolvimento dos ScvR no processo de reconhecimento e internalização da CTXI pelos macrófagos. Os resultados obtidos para a CTXN mostraram que o sulfato de dextrana não

produziu qualquer alteração na sua captação, também mostrando que a endocitose da CTXN não é bloqueada pela adição de sulfato de dextrana (Figura 11).

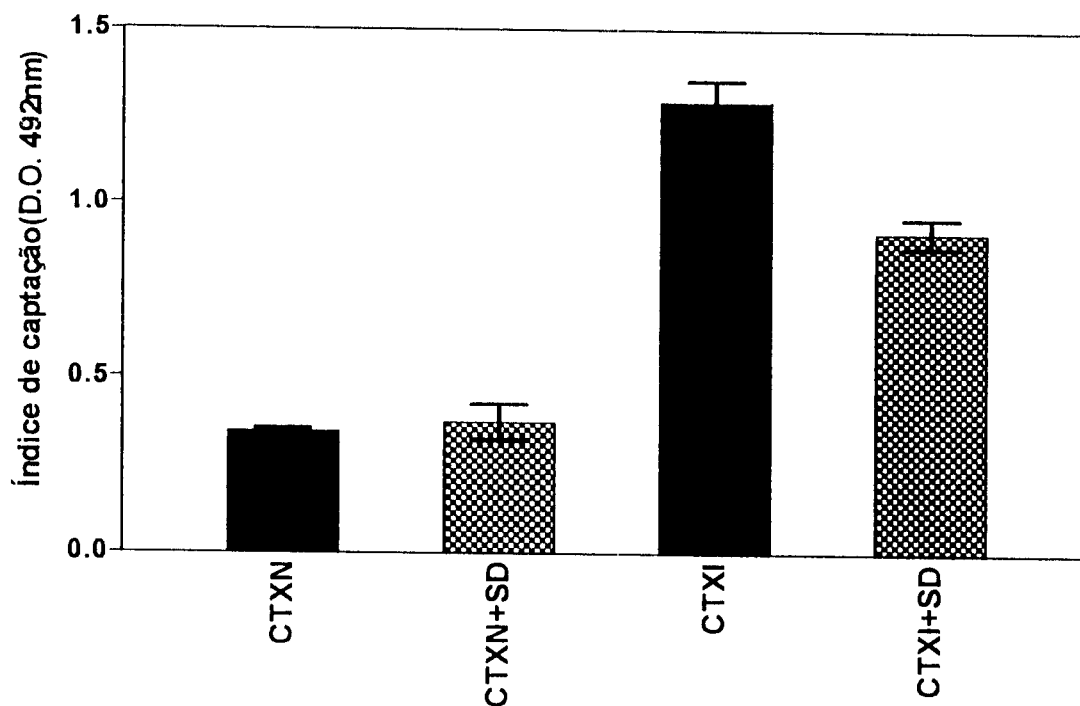


Figura 11- Inibição da captação de CTXI por parte de macrófagos peritoneais de camundongos na presença de diferentes concentrações de sulfato de dextrana, com subsequente incubação com CTXN ou CTXI por 60 minutos.

Ovalbumina

Com o objetivo de quantificar a captação da OVA nas formas nativa e irradiada, utilizamos o ensaio de ELISA *in situ*, da mesma forma que para a CTX. Macrófagos (4×10^4 células/100 μ l/poço) foram incubados com OVAN ou OVAI (5 μ g/100 μ l/poço) em diferentes tempos (ver Métodos).

Observamos que a captação das amostras de OVA foi semelhante em todos os tempos analisados, não mostrando o padrão de captação preferencial demonstrado para a CTX. Observamos, também, que a captação das duas amostras de OVA diminuía com o tempo de ensaio, sugerindo uma degradação

das proteínas no sistema analisado, ou mesmo uma endocitose e metabolismo rápidos das proteínas por parte dos macrófagos (Figura 12).

Foram testadas várias concentrações das amostras de OVA no sistema e a que nos pareceu mais reprodutível foi a de $5\mu\text{g}/100\mu\text{l}/\text{poço}$ (dados não mostrados).

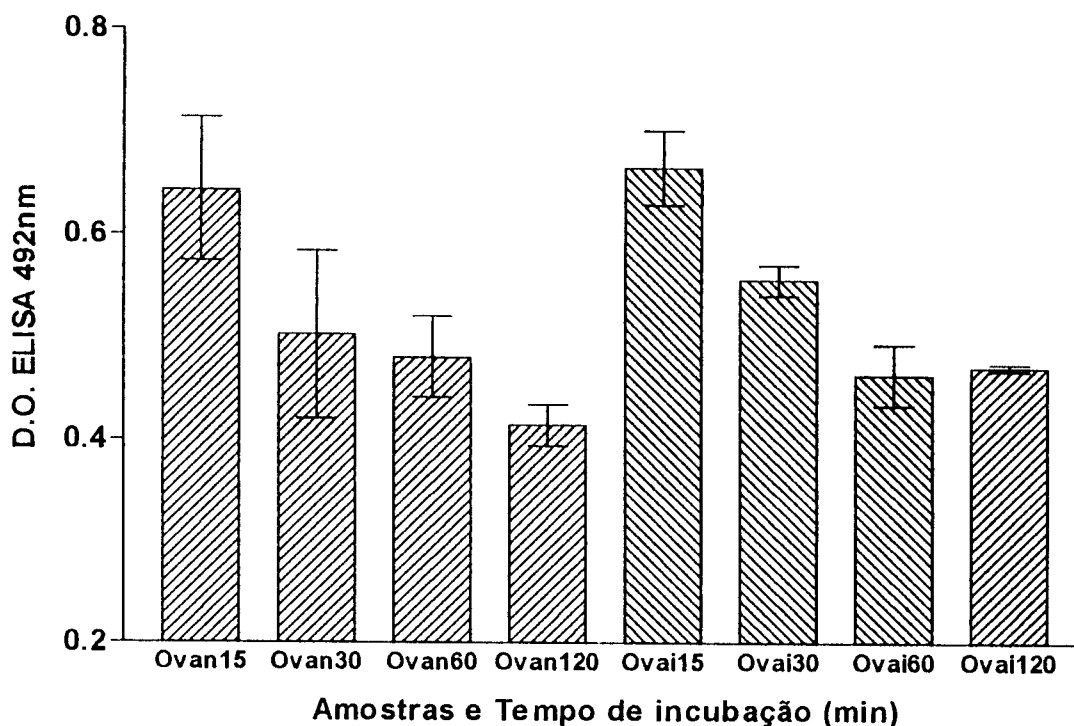


Figura 12- ELISA *in situ*, mostrando a captação das amostras de OVAN e OVAI, por macrófagos peritoneais de camundongos, em diferentes tempos.

Bloqueio da captação das amostras de OVA por ProbucoI e Sulfato de dextrana

Objetivando avaliar a participação dos ScvR no reconhecimento e internalização da OVAN e OVAI, utilizamos o mesmo ensaio de ELISA *in situ*, incubando os macrófagos, em diferentes tempos (0 a 120 minutos) com as amostras de OVA ($5\mu\text{g}/100\mu\text{l}/\text{poço}$), juntamente com ProbucoI ($20\mu\text{g}/100\mu\text{l}/\text{poço}$) ou Sulfato de dextrana ($50\mu\text{g}/100\mu\text{l}/\text{poço}$) (ver Métodos).

Probucol

A análise dos resultados da incubação das amostras de OVA com Probucol, nas condições utilizadas, não mostrou diferenças significativas entre a captação nos diferentes tempos analisados (Figura 13A). Entretanto, um leve declínio na captação da OVAI foi observado aos 120 minutos, quando comparado com o células incubadas com as proteínas na ausência da droga (controle) no mesmo tempo de ensaio (Figura 13B).

Sulfato de dextrana

Quando da utilização do Sulfato de dextrana, observamos um perfil semelhante ao encontrado nos ensaios utilizando Probucol. Neste caso, também não observamos diferenças significativas entre as amostras de OVA incubadas em diferentes tempos na presença da droga (Figura 14A). Da mesma forma que o ensaio anterior, neste também observamos que no tempo de 120 minutos, uma queda leve da captação da OVAI foi observada, quando se compara com os resultados obtidos com macrófagos na ausência da droga (controle) (Figura 14B).

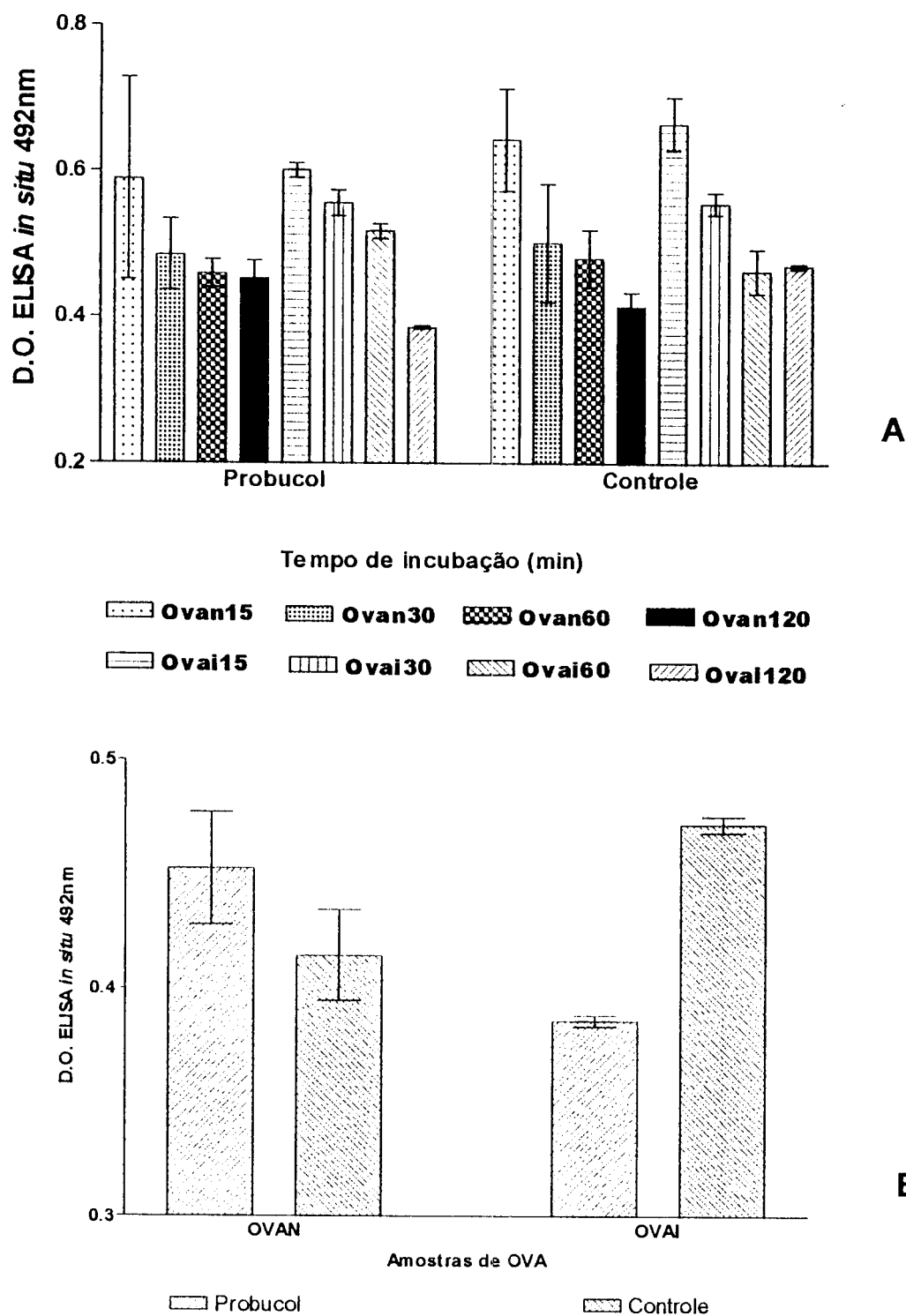
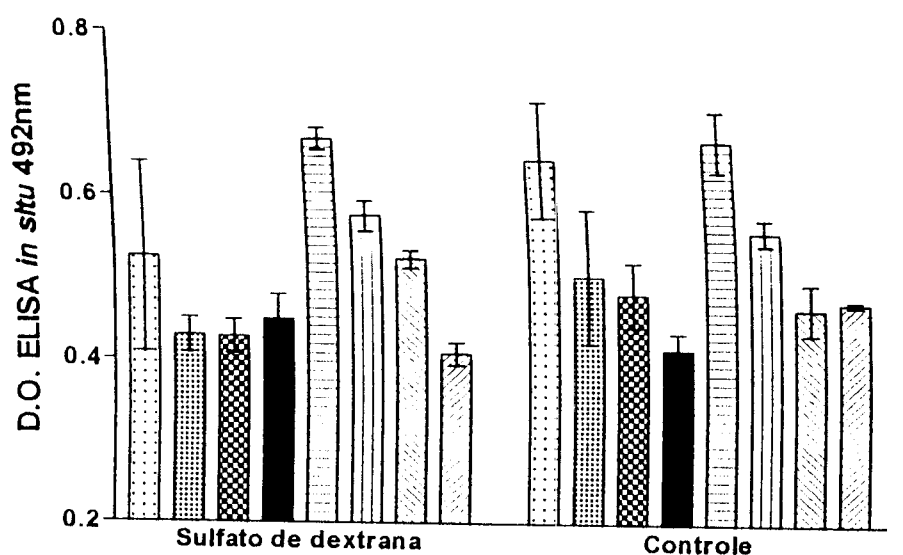
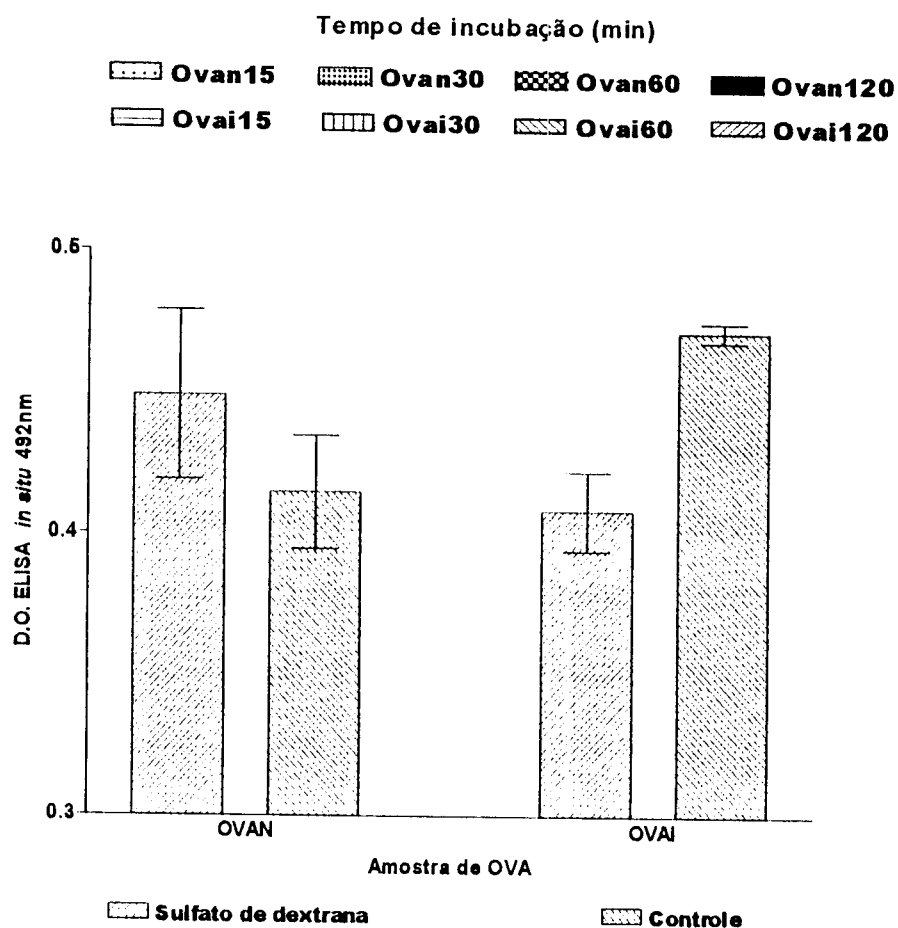


Figura 13- ELISA *in situ* com macrófagos incubados com Ovan e Ovai, na presença de Probuco. A-A observação em diferentes dos tempos, não evidenciou diferenças significativas entre as amostras. B-A análise do tempo de 120 minutos, mostrou uma pequena diferença na captação da Ovai em comparação com o controle.



A



B

Figura 14- ELISA *in situ* com macrófagos incubados com OVAN e OVAI, na presença de Sulfato de dextrana. A-A observação em diferentes dos tempos, não evidenciou diferenças significativas entre as amostras. B-A análise do tempo de 120 minutos, mostrou uma pequena diferença na captação da OVAI em comparação com o controle.

Discussão

Nossos resultados indicam que o tratamento da CTX com raios γ (^{60}Co) (CTXI) induz um aumento da sua captação por macrófagos peritoneais de camundongos, quando comparado com a forma nativa (CTXN). A análise da morfologia das células revelou ausência de alterações importantes e dados sobre a viabilidade, determinada pela análise do perfil respiratório das células (MTT-formazan), afastaram a possibilidade de uma ação deletéria das amostras de CTX sobre as células. A observação de que havia um aumento crescente de vacúolos fagocíticos marcados nos levou a crer que a captação da CTXI ocorria sem a interferência de mecanismos do tipo retroalimentação, *feed-back*, sem inibição do processo e apontando para uma captação regular da CTXI. Esta captação foi dependente apenas da disponibilidade da toxina no meio, tendo sido progressiva e linear, obedecendo um modelo simples de incorporação.

A análise imunohistoquímica dos macrófagos peritoneais ensaiados com as amostras de CTX, apesar de não ser quantitativa, se mostrou extremamente útil, pois permitiu visualizar o perfil morfológico nos tempos determinados, bem como avaliar a distribuição celular dos vacúolos fagocíticos contendo a toxina internalizada. Observamos uma tendência desses vacúolos em migrar para a periferia nuclear, de acordo com o tempo de incubação. Assim, quanto maior o tempo de exposição dos macrófagos à CTXI, mais periféricos ao núcleo os vacúolos se encontravam. Esses dados sugerem um processo de franco metabolismo do conteúdo vacuolar, o que provavelmente culminaria com a

apresentação subsequente de fragmentos de CTX por parte destas células, na forma de antígenos.

Com o objetivo de quantificar essa captação favorecida, desenvolvemos um ensaio *in vitro* (ELISA *in situ*), onde após a exposição de proteínas (nativas ou irradiadas) a macrófagos peritoneais de camundongos não estimulados, em diferentes tempos, as células eram incubadas com anticorpos específicos, revelados por conjugados enzimáticos, com a determinação espectrofotométrica (densidade óptica) da cor desenvolvida, que era diretamente proporcional a quantidade de proteínas internalizadas pelas células. Este modelo já havia sido utilizado com sucesso para a determinação quantitativa de parasitas intramacrofágicos (PIAZZA et al, 1994), com excelentes resultados, o mesmo ocorrendo com nosso ensaio. Ao analisarmos os dados, observamos que a CTXI era aproximadamente duas vezes mais captada pelas células do que a CTXN, seja em tempos mais curtos (15 minutos) ou mais longos (120 minutos), num modelo aparentemente dependente de maior número de receptores para a CTXI. Isto pode ser melhor comprovado quando analisamos a capacidade de reconhecimento das amostras de CTX por macrófagos, utilizando ensaio de ligação a frio. Neste ensaio, apenas o reconhecimento (ligação) das proteínas foi avaliada e, novamente, observamos que a quantidade de CTXI ligada às células era maior que a encontrada para CTXN, mostrando a maior ligação da proteína irradiada aos receptores de membrana dos macrófagos.

Ensaando as amostras de CTX na presença de meio contendo FBS, observamos que a captação da forma nativa da CTX era prejudicada pela adição de proteína exógena, mesmo em baixas concentrações e de forma independente

de concentrações de soro superiores a 2% no meio. Por outro lado, evidenciamos que a CTXI não sofria qualquer alteração significativa na sua captação, na presença do soro, o que revela um tipo de receptor que reconhece de forma preferencial a proteína irradiada, não afetado pelo aumento de proteínas no meio.

Analisando os efeitos da radiação γ sobre proteínas, observa-se a presença de fenômenos oxidativos importantes, que ocorrem principalmente pela ação de radicais livres primários ou seus produtos (BOGUTA & DANCEWICZ, 1983). Os princípios básicos que determinam a oxidação de proteínas foram estabelecidos por SWALLOW (1960), GARRISON (1962) e SCHUESSLER & SCHILLING (1984). Esses autores determinaram os produtos da reação oriundos do tratamento de proteínas com radiação ionizante, quando as mesmas eram ensaiadas de forma controlada permitindo apenas a ação de radicais hidroxil ($\text{OH}^\cdot$) e superóxido ($\text{O}_2^\cdot$), ou a mistura de ambos. Os resultados obtidos apontaram para uma ação inicial do $\text{OH}^\cdot$ sobre as proteínas, e a presença do O_2 e $\text{O}_2^\cdot$ ou $\text{HO}_2^\cdot$ se mostrou importante para que o processo oxidativo tivesse continuidade. À análise da estrutura protéica oxidada, observou-se a oxidação de aminoácidos da cadeia lateral, formação de ligações cruzadas entre moléculas da proteína e oxidação da "backbone" protéica, muitas vezes levando à fragmentação da proteína (GARRISON, 1987).

O ataque oxidativo da cadeia protéica está descrito minuciosamente na revisão de BERLETT & STADTMAN (1997). Observa-se que o início do processo ocorre pela ação do $\text{OH}^\cdot$, que abstrai átomos de hidrogênio de resíduos de aminoácidos, formando os assim chamados "radicais centrados no carbono". Este

processo também ocorre quando da irradiação de proteínas em meio aquoso, pois a radiólise da água, responsável pela produção de radicais livres, provê a quantidade necessária de $\text{OH}^\cdot$ para desencadear o processo oxidativo.

Podem ocorrer, também, quebras de ligações peptídicas ou devido a ação das espécies reativas sobre resíduos de aminoácidos das cadeias laterais. Observa-se que todos os aminoácidos são passíveis de sofrer ação oxidativa pelo $\text{OH}^\cdot$, sendo que alguns são mais sensíveis, como é o caso da cisteína (ALTHANNON et al, 1974) e da metionina. Quando oxidados, esses aminoácidos são convertidos a dissulfetos e metionina sulfóxido, respectivamente. É interessante notar que a maioria dos sistemas biológicos possui enzimas reparadoras para esses aminoácidos, sendo essas modificações oxidativas as únicas que podem ser revertidas. Em alguns casos, observou-se que uma oxidação preferencial das metioninas expostas numa determinada proteína, em locais de pouco significado funcional, protegia a mesma de ser alvo de processos oxidativos irreversíveis em outros locais vitais. Esse fenômeno levou a hipótese de que determinadas estruturas protéicas são concebidas para que possa haver uma forma da proteína escapar a estes processos deletérios (LEVINE et al, 1996). Observa-se, também, que a formação de agregados após tratamento com raios γ pode ocorrer após a redução de ligações dissulfídicas intramoleculares (SCHUESSLER & DAVIS, 1983), com formação de radicais tiol, os quais parcialmente combinam intramolecularmente formando, assim, materiais protéicos de alto peso molecular (SCHUESSLER & FREUNDL, 1983).

Procuramos analisar o “status” oxidativo da CTXI, utilizando um método (OxyBlot®) que se baseia na detecção de grupos carbonil introduzidos na cadeia lateral das proteínas, num mecanismo sítio-específico, determinando o grau de oxidação das proteínas (BARLETT & STADTMAN, 1997). Na reação, estes grupos carbonil são derivatizados para DNP-hidrazona (2,4-dinitrofenilhidrazona), por reagir com DNPH (2,4-dinitrofenilhidrazina). As amostras de proteínas/DNP derivatizadas podem ser ensaiadas diretamente em membranas de nitrocelulose (DOT-Blot) ou separadas por SDS-PAGE e transferidas a membranas, seguidos de imunomarcacão com anticorpos específicos anti-DNP. Nossos dados mostraram que a CTXI apresentava um maior grau de oxidação, quando comparada com a CTXN, e menor que o controle positivo, obtido quimicamente pela ação do cobre. A CTXN apresentou uma leve resposta, possivelmente sinal de fundo, não dependente de grupos oxidados na proteína. É interessante notar que, quando do ensaio utilizando anticorpo específico para o grupos derivatizados, não obtivemos reação nítida documentável; entretanto, após manutenção da membrana a 4°C por 30 dias, a reação foi perfeitamente visualizada, sugerindo que, possivelmente, grupos derivatizados que antes não puderam ser documentados, agora se tornaram visíveis devido a oxidação espontânea do complexo grupamento carbonil/DNP. Esses dados mostram que a irradiação induziu alterações oxidativas na molécula de CTX, provavelmente devido a presença de radicais hidroxil produzidos em grande quantidade quando da radiólise da água [$G(\text{rendimento}) = 0,032$ moles/ml, para cada 100 eV de energia

ionizante), como foi observado para a molécula de CTX irradiada a 2000Gy por ANDRIANI (1995).

Considerando que os dados imunohistoquímicos e os obtidos por ELISA *in situ* apontam para uma maior captação da CTXI em comparação a CTXN, e levando-se em conta a existência de modificações oxidativas na molécula de CTX produzida pela radiação γ , levantamos a hipótese de que esta captação poderia ser mediada por ScvR presentes nos macrófagos, que reconhecem macromoléculas oxidadas ou modificadas (GOLDSTEIN et al, 1979). Decidimos, então utilizar bloqueadores dos ScvR no modelo de ELISA *in situ*. Utilizamos, o Probucol, um potente anti-oxidante de estrutura complexa (ver figura 15A a seguir) que impede a adesão de monócitos a células endoteliais via LDL oxidada devido a sua ação anti-oxidante, não possuindo um efeito hipolipidêmico, como as de mais drogas antiaterogênicas (LI et al, 1998). Entretanto, existem evidências da participação desta droga no bloqueio direto dos ScvR, impedindo que a LDL, uma vez oxidada, seja internalizada por estes receptores, o que levaria a formação de "células espumosas", precursoras das placas de ateroma (YAMAMOTO et al, 1986). Outra droga que utilizamos é o sulfato de dextrana (Figura 15B), um sal polianiónico considerado como ligante específico dos ScvR e encontrado ser um estimulador da síntese de DNA por macrófagos via ScvR (SASAKI et al, 1996).

Nossos dados utilizando esses bloqueadores mostraram que a CTXI sofria uma queda significativa na sua captação, chegando aos níveis encontrados para a CTXN, sendo que esta última não sofreu qualquer alteração significativa na sua captação pelos macrófagos, na presença destes inibidores. A análise da

capacidade de ligação ("binding") a frio das amostras de CTX na presença de bloqueadores de ScvR revelou o mesmo padrão obtido na internalização das proteínas, confirmando a importância destes receptores no fenômeno de maior captação da CTXI por macrófagos. A utilização de Probucol ou Sulfato de dextrana foi capaz de inibir parte substancial da captação aumentada da CTXI. Pelo fato deste ensaio medir apenas o reconhecimento e não a subsequente internalização das amostras de CTX pelos macrófagos, acreditamos ser evidente a participação dos ScvR no evento inicial de captação de CTXI por estas células, já que a presença aumentada da proteína irradiada poderia ser atribuída a uma menor degradação pelas proteases no citoplasma, resultando em acúmulo da proteína irradiada em vacúolos celulares, com conseqüente maior detecção nos ensaios de internalização em células perfeitamente funcionais. Nenhuma abordagem semelhante já havia sido realizada com proteínas irradiadas na literatura por nós revisada.

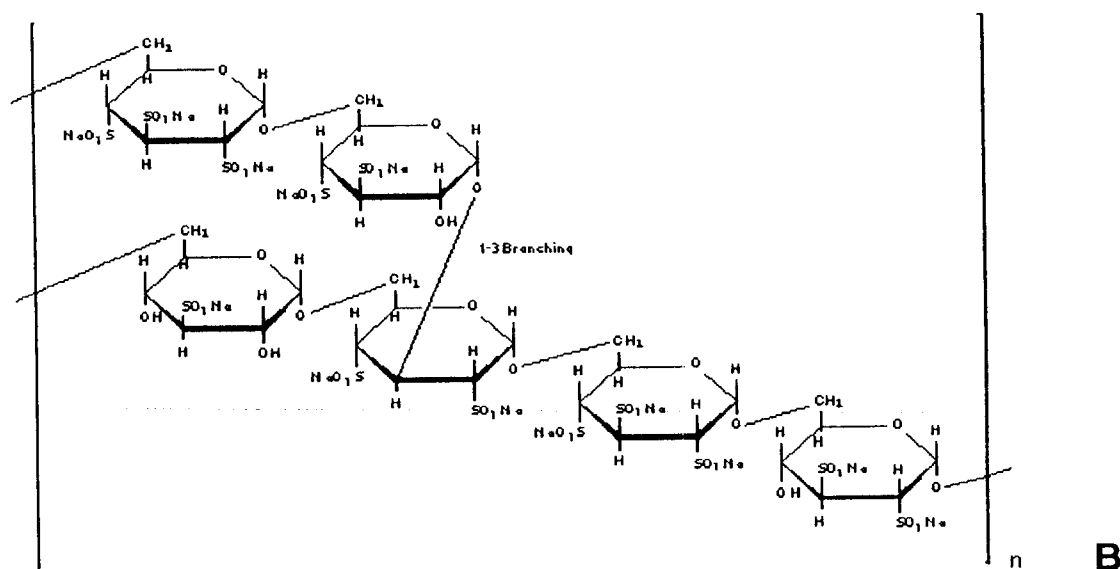
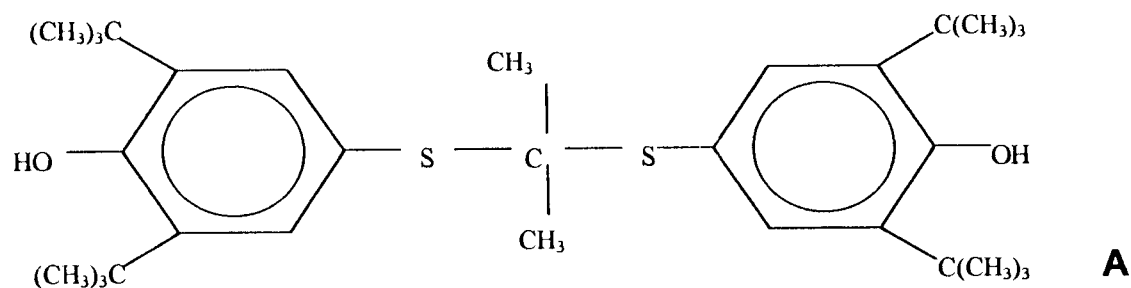


Figura 15- Estrutura química dos bloqueadores de ScvR utilizados. **A**-Probucol (4, 4'-(isopropilidenedi-2,6-di-1-butilfenol), anti-oxidante usado como droga hipocolesterolêmica no tratamento de indivíduos portadores de hipercolesteremia familiar; **B**-Sulfato de dextrana, ligante específico de ScvRs

Assim, nossos dados confirmam a participação dos ScvR na captação inicial e tardia processo e sugerem a existência de duas vias de captação da CTXI. Uma, específica, mediada por ScvR e dependente da existência de epítomos oxidados na molécula, que obedeceria a uma forma de captação regular, não sendo regulada negativamente pelo excesso de ligantes e outra, compartilhada com a CTXN, que poderia não envolver a participação de receptores e também não dependeria de alterações oxidativas da toxina, produzidas pelo tratamento com radiação γ .

Esses dados explicam, pelo menos em parte, a maior imunogenicidade da CTXI encontrada por outros autores, que não determinaram o mecanismo envolvido neste fenômeno. NASCIMENTO e colaboradores (1996), estudando a CTXI, mostraram a existência de 2 frações, uma composta de agregados e a outra não agregada. A imunização de camundongos com ambas as frações mostrou serem estas semelhantes no que se referia aos títulos de anticorpos específicos produzidos. O fenômeno de agregação protéica após tratamento com raios γ , já foi citado por outros autores (BARIDE et al, 1980) e, recentemente, analisando a relação entre a dose total de radiação γ e a quantidade de agregados produzidos, CLISSA e colaboradores (1994) observaram que a concentração de agregados era dependente da dose total de radiação utilizada, sendo de cerca de 50-60% quando a dose de 2000Gy era utilizada. Em estudos prévios, utilizando proteína recombinante de *Mycobacterium leprae* (p18) na forma nativa ou irradiada (2kGy) como modelo de imunização, observamos que a proteína irradiada apresentava uma maior imunogenicidade, apesar da ausência de agregados produzidos após

tratamento por raios γ (PINHO *et al*, 1995). Esses resultados poderiam ser explicados, pelo menos em parte, pela existência de epítomos oxidados presentes nas moléculas dos agregados e da proteína recombinante, o que facilitou o reconhecimento pelo sistema imune dos camundongos imunizados.

Temos estudado a biodistribuição da CTX em órgãos de camundongos, por imunohistoquímica ou utilizando CTXN ou CTXI marcadas com ^{125}I , e observamos que ambas as formas da CTX eram prontamente clareadas pelo rim, não se evidenciando retenção ou quaisquer alterações morfológicas sugestivas da ação das toxinas nesses órgãos. Apesar de aparentemente semelhante, o clareamento da CTXI pareceu ser mais precoce e também se observou uma participação hepática (células de Kupffer de animais inoculados com CTXI marcadas por imunohistoquímica) no processo (CARDI *et al*, 1998). À análise da musculatura estriada esquelética dos animais inoculados, obtivemos marcação de junções neuromusculares contendo CTXN (CARDI *et al*, 1992), mas não conseguimos observar estas mesmas estruturas marcadas quando a CTXI foi utilizada. Os dados sugerem que o tratamento com raios γ poderia ter induzido alterações na molécula de CTX, impossibilitando que a mesma reconhecesse o receptor específico em junções neuromusculares (KINI & EVANS, 1989). Outra possibilidade seria a modificação da ligação entre as duas subunidades da CTX, tornando-as indissociáveis o que levaria ao bloqueio da ação neurotóxica, uma vez que esta ação depende da dissociação das duas subunidades no sítio específico para que a mesma exerça sua ação tóxica (LENNON *et al*, 1990). Observamos, também, uma tendência da CTXI em se concentrar em órgãos

contendo células do sistema fagocítico mononuclear (fígado, p.ex.), fato que amparou nossa proposta original e que foi confirmado por nossos dados obtidos com macrófagos *in vitro*, sugerindo fortemente a participação destas células no clareamento desta forma da CTX (CARDI, 1997; CARDI *et al*, 1998).

Analisando os dados obtidos quando da utilização de OVA, nas formas nativa ou irradiada, não observamos claramente este perfil de captação preferencial, sendo este detectável apenas aos 120 minutos de ensaio. Um dos fatores que poderia ser responsável por estes resultados seria o fato de a OVA, após o tratamento com raios γ , ter sofrido uma importante degradação como pudemos constatar na análise do perfil eletroforético e no Western Blot. Por ser uma proteína nutricional, a OVA seria passível de fácil clivagem, seja por proteases ou por alterações drásticas de cargas oriundas da ação de radicais livres, fato este que poderia explicar a degradação encontrada na amostra irradiada. Outra explicação poderia ser o seu rápido processamento intracelular, que pudemos observar quando ensaiamos as amostras de OVA em diferentes tempos. Possivelmente, a sua internalização seria facilitada pela sua própria constituição, pois esta é uma glicoproteína rica em manose e N-acetil glicosamina. Assim, a radiação poderia ter produzido alterações oxidativas na molécula de OVA, mas sem possibilitar a interferência dos ScvR na endocitose, sendo esta última feita preferencialmente via receptores de manose presentes de forma constitutiva nos macrófagos (VOET & VOET, 1995). Dessa forma, o perfil aparentemente preferencial observado tardiamente seria devido a presença de algumas moléculas de OVAI que, uma vez alteradas de forma mais drástica pela

irradiação e contendo epítomos oxidados, não podendo ser satisfatoriamente reconhecidas pelo receptores de manose, agora seriam reconhecidas pelos ScvR.

Baseado nos dados obtidos até o momento com as amostras de OVA, acreditamos que protocolos envolvendo várias taxas de dose de radiação, bem como um sistema de bloqueio específico para os receptores de manose, poderiam clarificar os resultados por nós obtidos. Entretanto, devido a esses resultados obtidos com a OVA, acreditamos que esta não tenha sido uma boa escolha, visto que mais etapas seriam necessárias para estabelecer, com certeza, a participação dos ScvR na sua captação após irradiação, fato este que não pode ser descartado baseado apenas nos dados obtidos. Cogitamos a necessidade da utilização de bloqueios adicionais, como o dos receptores de manose presentes nos macrófagos, bem como ensaios envolvendo competição, ou até mesmo a utilização de anticorpos específicos para ScvR. Entretanto, a disponibilidade de material, bem como de tecnologia apropriada e o tempo disponível, nos levou a manter estes dados em um nível preliminar.

Apesar disso, acreditamos que os dados obtidos até o momento levantam uma questão interessante no que se refere a utilização do ensaio de ELISA *in situ* na mensuração da endocitose de proteínas irradiadas por macrófagos. Este método nos possibilita analisar o reconhecimento, bem como a internalização de proteínas, seja via receptores ou mesmo por mecanismos inespecíficos. Talvez, proteínas passíveis de fácil degradação ou mesmo que sofram rápido metabolismo, como o sugerido no caso da OVA, sejam mais difíceis de ser analisadas, pois apresentariam uma velocidade de degradação intracelular maior que a velocidade de captação, necessitando, assim, serem mensuradas mais

precocemente, ou utilizando isótopos radioativos (^{125}I). Assim, decidimos discutir mais especificamente os dados obtidos utilizando amostras de CTX.

A vantagem de utilização de proteínas irradiadas reside no fato de que, além da esterilidade conferida ao material após o tratamento com raios γ , uma maior quantidade de epítomos protéicos modificados poderiam ser reconhecidos mais prontamente por células apresentadoras de antígenos, resultando em uma melhor imunogenicidade. ABRAHAM e colaboradores (1995), trabalhando com proteínas nativas e submetidas ao tratamento químico das proteínas com aldeído maléico, mostraram uma modulação da imunogenicidade e antigenicidade após drásticas modificações na estrutura desses antígenos, induzidas pelo tratamento químico. Apesar disso, os autores sugeriram que as proteínas modificadas eram reconhecidas pelos ScvR. Contudo, ensaios de reatividade cruzada não mostraram qualquer reconhecimento entre soros específicos e antígenos modificados. No nosso estudo, mostramos que os anticorpos antiCTXI podem reconhecer satisfatoriamente, tanto a CTXI quanto a forma nativa desta toxina. Esses resultados mostram que as alterações produzidas pela irradiação γ na CTX são leves, levando a poucas alterações na sua estrutura, provavelmente produzindo epítomos oxidados e/ou carregados negativamente, mas mantendo preservada grande parte dos epítomos naturais. Isto foi também observado em nossos ensaios de detecção de radicais oxidados na CTXI, quando apenas uma menor reação da proteína irradiada foi demonstrada, ao contrário do evidenciado pelo tratamento químico da CTXN, de alta eficiência de oxidação. Este fato pode representar uma forma de direcionar o antígeno para células apresentadoras de

antígenos, que o reconheceria como uma molécula modificada, mas ainda capaz de induzir um reconhecimento específico, sendo assim, a resposta mais eficaz, quando comparado a sua forma intacta. A capacidade destas células em reconhecer moléculas modificadas já vem sendo descrita em vários processos patológicos, onde observa-se células polimorfonucleares ou outras células fagocíticas produzindo radicais livres que, por sua vez vão atuar como modificadores ou destruidores de antígenos. Esses antígenos assim modificados, sofrem um clareamento mais eficiente e mais rápido, que pode ser mediado por células possuidoras de ScvR (DUNNE *et al*, 1994). Isso poderia resultar em uma rede alternativa e econômica para apresentação de antígenos, maximizando a resposta a antígenos processados por essas células de defesa, em contraste as proteínas não modificadas que seriam reconhecidas e internalizadas por vias regulares de menor eficiência imunológica. Isto foi sugerido recentemente por outros autores trabalhando com proteínas oxidadas por métodos químicos (NICOLETTI *et al*, 1999), mas a oxidação mediada pela radiação poderá ter uma eficiência maior no processo, conforme demonstrado por nossos resultados aqui apresentados e em outros modelos semelhantes (PINHO *et al*, 1995; CARDI *et al*, 1998), representando um uso possível da radiação na produção de imunógenos e vacinas mais eficientes, faceta pouco explorada dos usos pacíficos da radiação ionizante.

Conclusões

Geral

Nossos dados indicam que a captação da CTXI, por parte de macrófagos, é favorecida, devido a alterações oxidativas produzidas pelo tratamento com raios γ na molécula, e que este processo é mediado, na sua maioria, por receptores “scavenger” presentes em macrófagos.

Específicas

Nossos dados nos levam a concluir que:

1-O tratamento da CTX com raios γ (2kGy- ^{60}Co) induziu alterações na molécula, provavelmente se resumindo a oxidação de epítomos na estrutura terciária da toxina;

2-Os anticorpos policlonais (coelhos imunizados) produzidos contra a CTXI reconheceram perfeitamente a CTXN, e vice-versa, mostrando que as alterações da molécula de CTX após tratamento com raios γ , não foram suficientes para impedir o seu reconhecimento pelo anti-CTXN.

3-Macrófagos peritoneais de camundongos, quando ensaiados com as amostras de CTX, mostraram um perfil de captação preferencial da CTXI; por imunohistoquímica, a viabilidade das células esteve preservada, sugerindo ausência de agressão da toxina sobre as células.

4-A observação de vacúolos fagocíticos dos macrófagos residindo na periferia nuclear sugere fortemente o franco metabolismo do produto endocitado (CTXI), padrão esse que foi encontrado de forma pouco evidente para a CTXN.

5-Por ELISA *in situ*, observa-se que a captação da CTXI é cerca de 2 vezes maior que a CTXN, mostrando um aumento com o tempo de ensaio. Esse fato sugere que os macrófagos captam a CTXI de forma constante, não sendo esta captação regulada por sistemas do tipo "feed-back".

6-A presença de proteínas do soro fetal bovino foi capaz de interferir com a captação da CTXN, mas não da CTXI, levando a crer que, pelo menos grande parte da CTXI é captada por uma via não compartilhada com a forma nativa da CTX.

7-A incubação a frio das amostras de CTX com macrófagos(ensaio de ligação a 4°C), mostrou o mesmo perfil encontrado para o ELISA *in situ*, sugerindo que a CTXI poderia estar sendo reconhecida por receptores de superfície presentes nos macrófagos.

8-Quando incubada juntamente com bloqueadores de ScvR, a CTXI apresentou uma captação significativamente diminuída, o que não ocorreu com a CTXN; esses resultados nos levam a crer que a CTXI é endocitada pelos macrófagos, na sua maioria, via ScvR presentes nessas células.

9-Provavelmente, existem duas vias de captação da CTXI. Uma delas, mais rápida, envolveria a presença de ScvR, e seria dependente de alterações oxidativas induzidas na molécula pelo tratamento com raios γ . A outra, mais lenta, não envolveria aqueles receptores e não dependeria de alterações da molécula, e seria compartilhada com a CTXN.

10-O método imunohistoquímico (imunoperoxidase indireta – Sistema ABC), se mostrou eficiente em determinar a localização celular das amostras de

CTX, bem como possibilitou avaliar a viabilidade e a integridade das mesmas durante o tempo de ensaio.

11-O método de ELISA *in situ* demonstrou alta reprodutibilidade e sensibilidade, sendo extremamente útil na quantificação de proteínas endocitadas por macrófagos.

12-A CTXI consiste em um imunógeno eficiente pois, além da sua baixa toxicidade e alta imunogenicidade, apresenta a propriedade de interagir prontamente com fagócitos.

13-O tratamento de proteínas com raios γ tem se mostrado um método extremamente eficiente no que se refere a produção de imunógenos menos tóxicos e mais prontamente reconhecíveis pelo sistema imune.

Referências Bibliográficas

- ABRAHAM, R; SINGH, N; MUKHOPADHYAY, A; BASU, SK; BAL, V; RATH, S, (1995), Modulation of Immunogenicity and Antigenicity of Proteins by Maleylation to Target Scavenger Receptors on Macrophages. *J.Immunol.*, **154**:1-8.
- ACTON, SL; SCHERER, PE; LODISH, HF & KRIEGER, M, (1994), Expression cloning of SR-BI, a CD36-related class B scavenger receptor. *J.Biol.Chem.*, **269**:21003-21009.
- ADAMS, GE; ALDRICH, JE; BISBY, RH; CUNDALL, RB; REDPATH, JL & WILLSON, RL, (1972), Selective free radical reactions with proteins and enzymes: reactions inorganic radical anions with amino acids. *Radiat.Res.*, **49**:278-289.
- AIRD, SD; KAISER, II; LEWIS, RV & KRUGGEL, WG, (1986), A complete amino acid sequence for the basic subunit of crotoxin. *Archs. Of Biochem.Biophys*, **249**:296-300.
- ALFIERI, SC; RAMAZEILLES, C; ZILBERFARB, V; GALPIN, I; NORMAN, SE & RABINOVITCH, M, (1988), Proteinase inhibitors protect *Leishmania amazonensis* amastigotes from destruction by amino acid esters. *Mol.Biochem.Parasitol.*, **29**:191-201.
- AL-THANNON, AA; BARTON, JF; PACKER, JE; SIMS, RJ; TRUMBORE, CN & WINCHESTER, RV, (1974) The radiolysis of aqueous solutions of cysteine in the presence of oxygen. *Int.J.Radiat.Phys.Chem.*, **6**:233-248.
- ALVARES, JM, (1980), *Tratamento intensivo da paralisia respiratória no acidente crotálico*. Belo Horizonte, 54p. (Dissertação de Mestrado- Faculdade de Medicina - UFMG).
- AMARAL, A, (1977), *Serpentes do Brasil - Iconografia Colorida*. São Paulo. Melhoramentos.
- AMARAL, CFS; DOURADO, HV; KOUYOUMDJIAN, LA; CARDOSO, JLC; CAMPOS, JA; AZEVEDO-MARQUES, MM & LOPES, PFA, (1987), *Manual de*

- diagnóstico e tratamento de acidentes ofídicos*. Brasília, Centro de Documentação do Ministério da Saúde.
- AMARAL, CFS; RESENDE, NA; PEDROSA, TMG; DA SILVA, OA & PEDROSO, ERP, (1988), Afibrinogenemia secundária a acidente ofídico crotálico (*Crotalus durissus terrificus*). *Rev.Inst.Med.Trop.S.Paulo*, **30**:288-292.
- AMARAL, CFS; REZENDE, NA; SILVA, OA; RIBEIRO, MMF; MAGALHÃES, RA; REIS, RJ; CARNEIRO, JG & CASTRO, JRS, (1986), Insuficiência renal aguda secundária a acidentes ofídicos botrópico e crotálico. Análise de 63 casos. *Rev.Inst.Med.trop.São Paulo*, **28**(4):220-227.
- AMORIM, MF & MELLO, O, (1954), Intermediate nephron nephrosis from snake poisoning in man. *Am.J.Path.*, **3**:479-499.
- AMORIM, MF, (1971), Intermediate nephron nephrosis in humans and experimental crotalic poisoning IN: Bucherl, W & Buckley, E., (eds), *Venomous Animals and Their Venoms*. Vol II, pp 319-343 Academic Press, N.Y.
- ANDRIANI, EP, (1995), *Irradiação da crotoxina em solução aquosa: Influência das principais espécies reativas nas alterações estruturais, biológicas e imunológicas*. (Dissertação de Mestrado - IPEN/CNEN/SP).
- ANTUNES, CMF; KATZ, N; MILWARD DE ANDRADE, R; NETO, EM & LIMA, JM, (1971), Study of the effects of gamma-radiation on eggs and miracidia of *Shistosoma mansoni*. *Rev.Inst.Med.Trop.São Paulo*, **13**:383-386.
- ASHKENAS, J; PENMAN, M; VASILE, E; ACTON, S; FREEMAN, M & KRIEGER, M, (1993), Structure and high and low affinity ligand-binding properties of murine type-I and type-II macrophage scavenger receptors. *J.Lipid Res.*, **34**:983-1000.
- AUGER,MJ & ROSS, JA, (1992), The Biology of Macrophage IN: Lewis, C.E. & McGee, J.O'D., (eds), *The Natural Immune System - The Macrophage*_- IRL Press, Oxford Univ.Press, 1992, p.3-74.
- AZEVEDO-MARQUES, MM; COIMBRA, TM; LAURE, CJ; LACHAT, J & FUJII, AA, (1986a), Ação miotóxica sistêmica do veneno crotálico total crotamina positivo (VCTM+) e crotamina negativo (VCTM-). *Rev.Soc.bras.Med.Trop.*, **19S**:abs 012.

- AZEVEDO-MARQUES, MM; CUPO, P & HERING, SE, (1986b), Detecção precoce da mioglobina em acidente crotálico humano. *Rev.Soc.bras.Med.Trop.*, **19S**:abs 010.
- AZEVEDO-MARQUES, MM; HERING, HE & CUPO, P, (1987), Evidence that *Crotalus durissus terrificus* (South american rattlesnake) envenomation in humans causes myolysis rather than hemolysis. *Toxicon*, **25**(11):1163-1168.
- BARIDE, RM; JAIN, SD & GAITONDE, BB, (1980), Biochemical studies on the toxoids of venoms of poisonous Indian snakes. *Indian J.Med.Res.*, **72**:571-576.
- BARRABIN, H; MARTIARENA, JL; VIDAL, JC & BARRIO, A, (1978), Isolation and characterization of gyroxin from *Crotalus durissus terrificus* venom. IN: Rosemberg, P, (ed.), *Animal, Plant and Microbial Toxins*, pp.113-133, Pergamon Press, Oxford.
- BERLETT, BS & STADTMAN, ER, (1997), Protein oxidation in Aging, disease, and oxidative stress. *J.Biol.Chem.*, **272**:20313-20316.
- BICALHO, RX; ROCHA, OA; HENEINE, LGD; MAGALHÃES, A & HENEINE, IF, (1990), The effect of stepwise iodination on biological properties of *Bothrops jararaca* venom. *Toxicon*, **28**(2):171-179.
- BIEBER, AL; McPARLAND, RH & BECKER, RR, (1987), Amino acid sequences of myotoxins from *Crotalus viridis concolor*. *Toxicon*, **25**:677-680.
- BOGUTA, G & DANCEWICZ, AM, (1983), Radiolytic and enzymatic dimerization of tyrosine residues in insulin, ribonuclease, papain and collagen. *Int.J.Radiat.Biol.* **43**:249-265.
- BON, C, CHANGEUX, JF; JENG, TW & FRAENKEL-CONRAT, H, (1979), Postsynaptic effects of crotoxin and its isolated subunits. *Eur.J.Biochem.*, **99**:471-481.
- BON, C; RADVANYI, F; SALIOU, B & FAURE, G, (1986), Crotoxin: A biochemical analysis of its mode of action. *J.Toxicol.-Toxin Reviews*, **5**(2):125-138.
- BRADFORD, MM, (1976), A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, **72**: 248-254.

- BREITHAUPT, H, (1976), Neurotoxic and myotoxic effects of *Crotalus* phospholipase A and its complex with crotapotin. *Naunyn Schmiedeberg's Arch.Pharmacol.*, **292**:271-278.
- BREITHAUPT, H; RÚBSAMEN, K & HABERMANN, E, (1974), Biochemistry and pharmacology of the crotoxin complex – Biochemical analysis of crotapotin and the basic *Crotalus* Phospholipase A. *Eur.J.Biochem.*, **49**:333-345.
- BROWN, MS & GOLDSTEIN, JL, (1983), Lipoprotein metabolism in the macrophage-implications for cholesterol deposition in atherosclerosis. *Annu Rev Biochem.*, **52**:223-261.
- BRUNIE, S; BOLIN, J; GEWIRTH, D & SIGLER, PB, (1985), The refined crystal structure of dimeric phospholipase A₂ at 2.5Å. Access to a shielded catalytic center. *J.Biol.Chem.*, **260**:9742-9749.
- BUTLER, J; HOEY, BM & SWALLOW, AJ, (1987), Radiation chemistry. *Annu.Rep.Prog.Chem.*, **83**:129-175.
- CAMERON, DL & TU, AT, (1978), Chemical and functional homology of myotoxin a from Prairie Rattlesnake venom and crotoxin from South american rattlesnake venom. *Biochem.biophys.Acta*, **532**:147-154.
- CARDI, BA, (1997), Elicited endocytosis of irradiated crotoxin by macrophages. *J.Venom.Anim.Toxins.*, **3**(1):107.
- CARDI, BA; ANDRADE JR, HF; ROGERO, JR & NASCIMENTO, N, (1998), Differential biodistribution of native and 2kGy ⁶⁰Co irradiated crotoxin in tissues of CBA/J mice. *Natural Toxins*, **6**:19-25.
- CARDI, BA; NASCIMENTO, N & ANDRADE Jr, HF, (1998b), Irradiation of *Crotalus durissus terrificus* crotoxin with ⁶⁰Co gamma rays induces its uptake by macrophages through scavenger receptors. *Int. J. Radiat. Biol.*, **73**:557-564.
- CARDI, BA; NASCIMENTO, N; ROGERO, JR & ANDRADE Jr, HF, (1992), Immunochemical detection of purified crotoxin from *Crotalus durissus terrificus* venom in motor end plate of striated muscle in CBA/J mice. *Braz.J.Med.Biol.Res.*, **25**:905-908.
- CARDOSO, DF & MOTA, I, (1997), Effect of *Crotalus* venom on the humoral and cellular immune response. *Toxicon*, **35**:607-612.

- CHANG, CC, (1985), Neurotoxins and phospholipase activity in snake venoms. *Proc.Natl.Sci.Counc.B.ROC.*, **9**:126-142.
- CHEYMOL, J; GONÇALVES, JM; BOURILLET, F & ROCH-ARVEILLER, M, (1971a), Action neuromusculaire comparée de la crotamine et du venin de *Crotalus durissus terrificus* var. *Crotaminicus* -I- *Toxicon*, **9**:279-286.
- CHEYMOL, J; GONÇALVES, JM; BOURILLET, F & ROCH-ARVEILLER, M, (1971b), Action neuromusculaire comparée de la crotamine et du venin de *Crotalus durissus terrificus* var. *Crotaminicus* -II- *Toxicon*, **9**:286-289.
- CLISSA, PB; NASCIMENTO, N; ANDRIANI, EP; SANALIOS, RB & ROGERO, JR, (1994), Análise cromatográfica e biológica dos produtos oriundos da irradiação do veneno crotálico, IX Reunião Anual da FESBE, 25.3ABS:403, Caxambu, MG, 1994.
- CLYDE, DF, (1990), Immunity to falciparum and vivax malaria induced by irradiated sporozoites: a review of the University of Maryland studies, 1971-75. *Bull.W.H.O.*, **68**(suppl.):9-12.
- COSTA, LM; TAKEDA, AK; BARBOSA, SFC; BERRA, JAP; ADELINO, MGF; SOERENSEN, B; PINTO, JR & VANCETTO, MDC, (1985), Estudo comparativo da resposta imune de cavalos ao veneno de *Crotalus durissus terrificus* in natura, tratado com formaldeído e submetido a ação térmica. *Vac.Soros*, **1**:24-29.
- COSTA, TA, (1988), *Efeitos da Radiação ionizante na crotamina do veneno de Crotalus durissus terrificus*. São Paulo, SP. (Dissertação de Mestrado - IPEN-USP).
- CUPO, P; AZEVEDO-MARQUES, MM & HERING, SE, (1988), Clinical and laboratory fatures of South american rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*) envenomation in children. *Trans. Royal Soc.trop.Med.Hyg.*, **82**:924-929.
- CUPO, P; AZEVEDO-MARQUES, MM & HERING, SE, (1990), Acute myocardial infarction-like enzyme profile in humans victims of *Crotalus durissus terrificus* envenoming. *Trans. Royal Soc.trop.Med.Hyg.*, **84**:447-451.

- DANIEL, JP; HENEINE, LG; TAVARES, CA; NASCIMENTO, MC & HENEINE, IF, (1987), Generation of protective immune sera by *Crotalus durissus terrificus* venom detoxified by controlled iodination. *Braz.J.Med.Biol.Res.*, **20**:713-720.
- DANZIG, LE & ABELS, GH, (1961), Haemodialysis of acute renal failure following rattlesnake bite, with recovery. *J.Am.Med.Ass.*, **175**:136-137.
- DETINGER, H & JUNG, H, (1970), The action of radiation on enzymes. The example of ribonuclease. IN: Dertiger, H. & Jung, H, (eds), *Molecular Radiation Biology*. Ch.9, p.115-133. Berlin, Springer-Verberg, 1970.
- DIJKSTRA, BW; KALK, KH; HOL, WGJ & DRENT, J, (1981), Structure of bovine pancreatic phospholipase A₂ at 1.7Å resolution. *J.Mol.Biol.*, **147**:97-123.
- DIJKSTRA, BW; RENETSEDER, R; KALK, KH; HOL, WGJ & DRENT, J, (1983), Structure of porcine pancreatic phospholipase A₂ at 2.6Å resolution and comparison with bovine pancreatic phospholipase A₂. *J.Mol.Biol.*, **168**:163-179.
- DUNCAN, CJ, (1978), Role of intracellular calcium in promoting muscle damage: A strategy for controlling the dystrophic condition. *Experientia*, **34**:1531-1535.
- DUNNE, DW; RESNIK, D; GREENBERG, J; KRIEGER, M; JOINER, KA, (1994), The type I macrophage scavenger receptor binds to Gram-positive bacteria and recognizes lipoteichoic acid. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, **91**:1863-1867.
- EL-KHOURY, J; HICKMAN, SE; THOMAS, CA; CAO, L; SILVERSTEIN, SC & LOIKE, JD, (1996), Scavenger receptor-mediated adhesion of microglia to beta-amyloid fibrils. *Nature*, **382**:716-719.
- ELOMAA, O; KANGAS, M; SAHLBERG, C; TUUKANEN, J; SORMUNEN, R; LIAKKA, A; THESLEFF, I; KRAAL, G & TRYGGVAN, K, (1995), Cloning of a novel-bacterial-binding receptor structurally related to scavenger receptors expressed in a subset of macrophages. *Cell.*, **80**:603-609.
- EMI, M; ASAOKA, H; MATSUMOTO, A; ITAKURA, H; KURIHARA, Y; WADA, Y; KANAMORI, H; YAKAZI, Y; TAKAHASHI, E; LEPERT, M; LALOUEL, JM; KODAMA, T & MUKAI, T, (1993), Structure, organization, and chromosomal mapping of the human macrophage scavenger receptor gene. *J.Biol.Chem.*, **268**:2120-2125.

- ENDEMANN, G; STANTON, LW; MADDEN, KS; BRYANT, CM; WHITE, RT & PROTTER, AA, (1993), CD36 is a receptor for oxidized low density liprotein. *J.Biol.Chem.*, **268**:11811-11816.
- FARRAGI, M; KLAPPER, MH & DORFMAN, LM, (1978), Fast reaction kinetics of one-electron transfer in proteins. The histidyl radical mode of electron migration. *J.Phys.Chem.*, **82**(5):508-512.
- FLOWERS, HH, (1966), Effects of X-irradiation on the antigenic character of *Agkistrodon piscivorus* (Cottonmouth Moccasin) venom. *Toxicon*, **3**:301-304.
- FOX, JW; ELZINGA, M & TU, AT, (1979), Amino acid sequence and disulfide bond assignment of myotoxin a isolated from the venom of Prairie Rattlesnake (*Crotalus viridis viridis*). *Biochemistry*, **18**:678-684.
- FRAENKEL-CONRAT, H & SINGER, B, (1956), Fractionation and composition of crotoxin. *Archs.Biochem.*, **60**:64-73.
- FREEMAN, M; ASHKENAS, J; REES, DJG; KINSLEY, DM; COPELAND, NG; JENKINS, NA & KRIEGER, M, (1990), An ancient, highly conserved family of cysteine-rich protein domains revealed by cloning type-I and type-II murine macrophage scavenger receptors. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, **87**:8810-8814.
- FREEMAN, M; EKKELE, Y; ROHRER, L; PENMAN, M; FREEDMAN, NJ; CHISOLM, GM & KRIEGER, M, (1991), Expression of type I and type II bovine scavenger receptors in Chinese hamster ovary cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, **88**:4931-4935.
- GARRISON, WM, (1987), Reaction mechanisms in the radiolysis of peptides, polypeptides, and proteins. *Chem.Rev.*, **87**:381-398.
- GARRISON, WM; JAYKO, ME & BENNETT, W, (1962), *Radiat.Res.*, **16**:487-502.
- GOLDSTEIN, JL; HO, YK; BASU, SK & BROWN, MS, (1979), Binding site on macrophages that mediates uptake and degradation of acetylated low density lipoprotein, producing massive cholesterol deposition. *Proc.Nat.Acad.Sci.USA*, **76**:333-337.
- GONÇALVES, JM & VIEIRA, LG, (1950), Estudos sobre venenos de serpentes brasileiras -I- Análise eletroforética. *An.Acad.bras.Cienc.*, **22**:141-149.

- GONÇALVES, JM, (1956), Purification and properties of crotoxin. IN: Buckley, E.E. & Porges, N., (eds), *Venoms*, 44:261-273, Washington: Am.Assoc.Adv.Sci.
- GOPALAKRISHNAKONE, P & HAWGOOD, BJ, (1984), Morfological changes induced by crotoxin in murine nerve and neuromuscular junction, *Toxicon*, **22**(5):791-804.
- GOPALAKRISHNAKONE, P; DEMPSTER, DW; HAWGOOD, BJ & ELDER, HY, (1984), Cellular and mitochondrial changes induced in the structure of murine skeletal muscle by crotoxin, a neurotoxic phospholipase A₂ complex. *Toxicon*, **22**:85-98.
- GOUGH, PJ; GREAVES, DR & GORDON, S, (1998), A naturally occurring isoform of the human scavenger receptor (SR-A) gene generated by alternative splicing blocks modified LDL uptake. *J.Lipid Res.*, **39**:531-543.
- GRALÉN, N & SVEDBERG, T, (1938), The molecular weight of crotoxin. *Biochem.J.*, **32**:1375.
- GRASSET, E, (1945), Anavenoms and their use in the preparation of antivenoms sera. *Trans.Royal Soc.trop.Med.Hyg.*, **38**:463-488.
- GRILLO-RODRIGUES, O & SCANNANE, HR, (1976), Detoxification of fraction of *Crotalus durissus cumanensis* venom. *Toxicon*, **14**:400-401.
- GROSH, DS & HOOPYWOOD, LE, (1979), *Biological effects of radiation*, 2nd ed., New York, Academic Press.
- GUARNIERI-CRUZ, MC; MURATA, Y; SOUZA Fo, JM; NASCIMENTO, N & ROGERO, JR, (1990), Attenuation of *Bothrops jararaca* venom by ionizing radiation IN: Int.Soc.Toxinol. Pan American Section III. Symp. Animal, Plant and Microbial Toxins. Mexico, 1990, p.32.
- GUIDOLIN, R; DIAS DA SILVA, W; HIGASHI, HG; CARICATI, CP; LIMA, MLRS; MORAIS, JF; PINTO, JR & MARCELINO, JR, (1989), Hiperimunização de cavalos soroprodutores com venenos borópicos e crotálicos tratados com glutaraldeído. *Mem.Inst.Butantan*, **51**:85-90.
- HABERMANN, E & BREITHALPT, H, (1978), The crotoxin-complex - An example of biochemical and pharmacological protein complementation. *Toxicon*, **16**:19-30.

- HABERMANN, E; WALSH, P; BREITHALPT, H, (1972), Biochemistry and pharmacology of crotoxin complex. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch.Pharmacol.*, **273**:313-330.
- HANLEY, MR, (1987), Crotoxin effects on *Torpedo californica* cholinergic excitable vesicles and the role of its phospholipases A activity, *Bioch.Biophys.Res.Comm.*, **82**:392-401.
- HARLOW, E & LANE, D, (1988), *Antibodies. A Laboratory Manual*. Ed. Cold Spring Harbor Lab, N.Y.
- HARRIS, JB; JOHNSON, MA; MacDONELL, CA, (1979), Muscle necrosis induced by some presynaptically active neurotoxins. IN: Eaker, D & Wadström, t., (eds), *Natural Toxins. Pro. 6th Int.Symp. on Animal, Plant and Microbial Toxins*, p.569-578, Uppsala, Pergamon Press.
- HAWGOOD, BJ & SMITH, ICH, (1989), The importance of phospholipase A₂ in the early induction by crotoxin of biphasic changes in endplate potentials at frog neuromuscular junction. *Toxicon*, **27**:272-276.
- HAWGOOD, BJ; SMITH, ICH & STRONG, PN, (1988), Early induction by crotoxin of biphasic frequency changes and giant miniature endplate potentials in frog muscle. *Br.j.Pharmacol.*, **94**:765-772.
- HENDON, RA & FRAENKEL-CONRAT, H, (1971), Biological roles of the two components of crotoxin. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, **68**:1560-1567.
- HENDON, RA & TU, AT, (1979), The role of crotoxin subunits in Tropical Rattlesnake. *Biochem.Biophys.Acta*, **578**:243-252.
- HENEINE, LG; CARDOSO, VN; DANIEL, JP & HENEINE, IF, (1986), Detoxification of the T2 fraction from a scorpion (*Tityus serrulatus*, Lutz and Mello) venom by iodination and some immunogenic properties of the derivatives. *Toxicon*, **24**:501-505.
- HERRINGTON, DA; CLYDE, DF; DAVIS, JR; BAQAR, S; MURPHY, JR; CORTESE, JF; BANK, RS; NARDIN, E; DIJOHN, D; NUSSENZWEIG, RS; NUSSENZWEIG, V; TORRES, JR; MURILLO, J; CORTESIA, M; STURCHLER, D; HOLLINGDALE, MR & LEVINE, MM, (1990), Human studies with synthetic

- peptide sporozoite vaccine (NANP)₃-TT and immunization with irradiated sporozoites. *Bull.W.H.O.*, **68**(suppl.):33-37.
- HOGGE, AR & ROMANO-HOGGE, SARWL, (1978/79), Sinopse das serpentes peçonhentas do Brasil - 2ª ed - *Mem.Inst.Butantan*, **42/43**:373-499.
- HOMMA, M & TU, AT, (1971), Morphology of local tissue damage in experimental envenomation, *Br.J.Exp.Pathol.*, **52**:538-542.
- HUDSON, L & HAY, FC (1989) - *Practical immunology* 3rd ed. Blackwell Londres.
- HUGHES, DA; FRASER, IP & GORDON, S, (1995), Murine macrophage scavenger receptor-in vivo expression and function as receptor for macrophage adhesion in lymphoid and non-lymphoid organs. *Eu.J.Immunol.*, **25**:466-473.
- IWANAGA, S; TAKAHASHI, H & SUZUKI, T, (1976), Proteinase inhibitors from the venom of Russell's Viper. *Meth.Enzymol.*, **45**:874-881.
- JACQUET, P; VANKERKOM, J & LAMBIET-COLLIER, M, (1994), The female guinea pig, a useful model for the genetic hazard of radiation in man; preliminary results on germ cell radiosensitivity in foetal, neonatal and adult animals. *Int.J.Radiat.Biol.*, **65**(3):357-367.
- JAYANTHI, GP & VEERAKASAPPA GOWDA, T, (1988), Geographical variation in India in the composition and lethal potency of Russell's viper (*Vipera russelli*) venom. *Toxicon*, **26**:257-264.
- JORGE, MT & RIBEIRO, LA, (1990), Acidentes por serpentes peçonhentas do Brasil. *Rev.Ass.Med.Bras.*, **36**(2):66-77.
- JORGE, MT; PEREIRA, JR; BONFATI, JR; RIBEIRO, LA; AMATO NETO, V; RASSI, IE & BOUABCI, AS, (1986), Comportamento de enzimas e alterações anátomo-patológicas do músculo esquelético em pacientes picados por serpentes do gênero *Crotalus*. *Rev.Soc.bras.Med.Trop.*, **19**(suppl.):27.
- KAMIGUTI, AS & CARDOSO, JLC, (1989), Haemostatic changes caused by the venoms of South American snakes. *Toxicon*, **27**:955-963.
- KIDERLEN, AP & KAYE, PM, (1990), A modified colorimetric assay of macrophage activation for intracellular cytotoxicity against *Leishmania* parasites. *J.Immunol.Methods*, **127**:11-18.

- KINI, MR & EVANS, HJ, (1989), A model to explain the pharmacological effects of snake venom phospholipase A₂, *Toxicon*, **27**(6):613-635.
- KODAMA, T; FREEMAN, M; ROHRER, L; ZABRECKY, J; MATSUDAIRA, P & KRIEGER, M, (1990), Type-I macrophage scavenger receptor contains alpha-helical and collagen-like coiled coils. *Nature*, **343**:531-535.
- KODAMA, T; REDDY, P; KISHIMOTO, C & KRIEGER, M, (1988), Purification and characterization of a bovine acetyl low-density lipoprotein receptor. *Proc.Nat.Acad.Sci.USA*, **85**:9238-9242.
- KOUYOUMDJIAN, JA; HARRIS, JB & JOHNSON, MA, (1985), Muscle necrosis caused by subunits of crotoxin. *Toxicon*, **24**(6):575-583.
- KRIEGER, M & HERTZ, J, (1994), Structures and functions of multiligand lipoprotein receptors: macrophage scavenger receptors and LDL receptor-related protein (LRP). *Annu.Ver.Biochem.*, **63**:601-603.
- LAEMMLI, UK, (1970), Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature*, **227**:680-685.
- LANDUCCI, EC; ANTUNES, E; DONATO, JL; FARO, R; HYSLOP, S; MARANGONI, S; OLIVEIRA, B; CIRINO, G & de NUCCI, G, (1995), Inhibition of carrageenin-induced rat paw oedema by crotapotin, polypeptide complexed with phospholipase A₂. *Br.J.Pharmacol.*, **114**(3):578-583.
- LENNON, BW; PLUMMER, D & KAISER, II, (1990), Effects of subunit cross-linking on the properties of crotoxin. *Toxicon*, **28**(6):718-722.
- LI, C-H & FRAENKEL-CONRAT, H, (1942), Eletrophoresis of crotoxin. *J.Am.Chem.Soc.*, **64**:1586.
- LI, LX; CHEN, JX; LIAO, DF & YU, L, 1998, Probucol inhibits oxidized-low density lipoprotein-induced adhesion of monocytes to endothelial cells by reducing P-selectin synthesis in vitro. *Endothelium*, **6**:1-8.
- LOMBA, MG, (1969), *Estudos sobre a distribuição e excreção da crotoxina-¹³¹I em cães*. (Tese de Doutorado - Univesidade Estadual de Campinas, Campinas, SP).
- LOMBA, MG; KIEFFER, J; WAISBICH, E & VITAL BRAZIL, O, (1966), Preparation and properties of ¹³¹I-labelled crotoxin. *Mem.Inst.Buntantan*, **33**:921-928.

- LOPEZ, M; FOSCARINI, L; ALVARES, JM; DINIZ FILHO, I; MARSA, VD & PROCÓPIO, NPM, (1972), Tratamento intensivo das complicações do acidente ofídico. *Rev.Assoc.med.Minas Gerais*, **23**:107-112.
- LOUGHEED, M & STEINBRECHER, UP, 1996, Mechanism of uptake of copper-oxidized low density lipoprotein in macrophages is dependent on its extent of oxidation. *J.Biol.Chem.*, **271**:11798-11805.
- MAEDA, N; TAMIYA, N; PATTABHIRAMAN, TR & RUSSELL, FE, (1978), Some chemical properties of the venom of the rattlesnake *Crotalus viridis helleri*. *Toxicon*, **16**:431-441.
- MAGALHÃES, RA; RIBEIRO, MMF; REZENDE, NA & AMARAL, CFS, (1986), Rabdomiólise secundária a acidente ofídico crotálico (*Crotalus durissus terrificus*). *Rev.Inst.Med.Trop.S.Paulo*, **28**:228-233.
- MAHONEY, EM; HAMILL, AL; SCOTT, WA & COHN, ZA, (1977), Response of endocytosis altered fatty acyl composition of macrophages pospholipids. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, **74**:4895-4899.
- MARTIN, CC, (1925), The effect of formalin on snake venom -I- Diminution of toxicity of cobra venom. *Indian J.Med.Res.*, **12**:807-810.
- MASCARENHAS, YP; STOUTER, PF; BELTRAN, JR; LAURE, CJ & VRIEND, G, (1992), Structure-function relationship for the highly toxic crotoxin from *Crotalus durissus terrificus*. *Eur.Biophys.J.*, **21**(3):199-205.
- MATTANA, J; MARGILOFF, L & SINGHAL, PC, (1995), Oxidation of mesangial matrix using a mixed function oxidase system augments adhesion of macrophages: possible role of macrophage scavenger receptors. *Biochem.Biophys.Res.Comm.*, **212**(1):63-69.
- MEIER, J, (1986), Individual and age-depend variations in the venom of the Fer-de-Lance (*Bothrops atrox*). *Toxicon*, **24**:41-46.
- MEYER WP, HABIB AG, ONAYADE, AA, YAKUBU, A, SMITH, DC, NASIDI, A, DAUDU, IJ, WARRELL, DA & THEAKSTON, RDG, (1997), 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.

- MINTON, JA & WEINSTEIN, SA, (1986), Geographic and ontogenic variation in venom of the Diamondback rattlesnake (*Crotaus atrox*). *Toxicon*, **24**:71-80.
- MOREIRA, EG; NASCIMENTO, N; ROSA, GJ; ROGERO, JR & VASSILIEFF, VS, (1996), Crotoxin-induced behavior effects in rats. *Braz.J.Med.Biol.Res.*, **29**:629-632.
- MOREIRA, EG; NASCIMENTO, N; ROSA, GJ; ROGERO, JR & VASSILIEFF, VS, (1997), Effect of gamma irradiation on the behavior properties of crotoxin. *Braz.J.Med.Biol.Res.*, **30**:245-249.
- MURATA, Y; NISHIKAWA, AK; NASCIMENTO, N; HIGASHI, HG; SILVA, WD & ROGERO, JR, (1990), Gamma irradiation reduces the toxic activities of *Crotalus durissus terrificus* venom but does not affect their immunogenic activities IN: Int.Soc.Toxinol. Pan American Section III. Symp. Animal, Plant and Microbial Toxins, Mexico, 1990, p.32.
- NAITO, M.; SUZUKI, H.; MORI, T.; MATSUMOTO, A.; KODAMA, T.; TAKAHASHI, K., (1992), Coexpression of type I and type II human macrophage scavenger receptors in macrophages of various organs and foam cells in atherosclerotic lesions. *Am.J.Pathol.*, **141**(3):591-599.
- NAKAZONE, AK; ROGERO, JR & GONÇALVES, JJ, (1984), Crotoxin - I - Immunology and interaction of the subunits. *Braz.J.Med.Biol.Res.*, **17**:119-128.
- NASCIMENTO, N; SEEBART, CS; FRANCIS, B; ROGERO, JR & KAISER, II KAISER, (1996), Influence of ionizing radiation on crotoxin: biochemical and immunological aspects. *Toxicon*, **34**(1):123-131.
- NICOLETTI, A; CALIGIURI, G; TORNBERG, I; KODAMA, I;STEMME, S & HANSSON, GK, (1999), The macrophage scavenger receptor type A directs modified proteins to antigen presentation. *Eur.J.Immunol.*, **29**:512-521.
- NUSSENZWEIG, RS; VANDERBERG, JP; MOST, JP & ORTON, C, (1969), Specificity of protective immunity procedures by X-irradiated *Plasmodium berghei* sporozoites. *Nature*, **222**:488-489.
- OKONOGI, T; HATTORI, Z; OGIJO, A & MITSUI, S, (1979), Detoxification by persimmon tannin of snake venoms and bacterial toxins. *Toxicon*, **17**:524-527.

- OTERO-PATINO, R; CARDOSO, JL; HIGASHI, HG; NUNEZ, V; DIAZ, A; TORO, MF; GARCIA, ME; SIERRA, A; GARCIA, LF; MORENO, AM; MEDINA, MC; CASTANEDA, N; SILVA-DIAZ, JF; MURCIA, M; CARDENA, SY & DIAS DA SILVA, W, (1998), 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.
- OWNBY, CL, (1982), Pathology of rattlesnake envenomation IN: Tu, AT (ed), *Rattlesnake Venom*, pp 163-209 - Marcel Dekker, Inc., N.Y..
- OWNBY, CL; BJARNASON, J & TU, AT, (1978), Hemorrhagic toxins from rattlesnake (*Crotalus atrox*) venom. *Am.J.Pathol.*, **93**:201-218.
- OWNBY, CL; CAMERON, D & TU, AT, (1976), Isolation of myotoxic component from rattlesnake (*Crotalus viridis viridis*) venom. *Am.J.Pathol.*, **85**:149-166.
- OWNBY, CL; KAINER, RA & TU, AT, (1974), Pathogenesis of hemorrhage induced by rattlesnake venom, *Am.J.Pathol.*, **76**:401-414.
- PARESCCE, DM; GHOSH, RN & MAXFIELD, FR, (1996), Microglial cells internalize aggregates of the Alzheimer's-disease amyloid beta-protein via a scavenger receptor. *Neuron*, **17**:553-565.
- PELLEGRINI FILHO, A; VITAL BRAZIL, O; FONTANA, MD & LAURE, CJ, (1978), The action of crotoxin on skeletal muscle: an electrophysiological study. IN: Resenberg, P, ed., *Toxins: Animal, Plant and Microbial. Proc. 5th Int. Symp. Animal, Plant and Microbial Toxins*, pp.375-382. London, Pergamon Press.
- PENMAN, M; LUX, A; FREEDMAN, NJ; RHORER, L; EKKELE, Y; MCKINSTRY, H; RESNICK, D & KRIEGER, M, (1991), Type-I and type-II bovine scavenger receptors expressed in Chinese-Hamster Ovary cells are trimeric proteins with collagenous triple helical domains comprising non-covalently associated monomers and Cys83-disulfide-linked dimers. *J.Biol.Chem.*, **266**:23985-23993.
- PIAZZA RM, DE ANDRADE JUNIOR HF, UMEZAWA ES, KATZIN AM, STOLF AM, (1994), *In situ* immunoassay for the assessment of *Trypanosoma cruzi* interiorization and growth in cultured cells. *Acta Trop.*, **57**:301-6.

- PINHO, JRR; CARDI, BA; ANDRADE Jr, HF; BARR, PJ; BATHURST, IC; VICENTE, EJ; SCHENBERG, AC, (1995), Immunogenic properties of the *M. leprae* recombinant 18-Kda antigen purified from *Saccharomyces cerevisiae*; Enhancement of delayed-type hypersensitivity after gamma-irradiation. *Int.J.Leprosy* , **63**(3):381-390.
- PRADO-FRANCESCH, J & VITAL-BRAZIL, O,(1981), Convulxin, a new toxin from the South american rattlesnake *Crotalus durissus terrificus*. *Toxicon*, **19**(6):875-887.
- PRADO-FRANCESCH, J; TAVARES, BG; HERTEL, R & LOBO DE ARAÚJO, A, (1981), Effects of convulxin, a toxin from the rattlesnake venom, on platelets and leukocytes of anethetized rabbits. *Toxicon*, **19**:661-666.
- RABINOVITCH, M; ZILBERFAB, V & POUCHELET, M, (1987), *Leishmania mexicana*: destruction of isolated amastigotes by amino acid esters. *Am.J.Trop.Med.Hyg.*, **36**:288-293.
- RADFORD, IR & MURPHY, TK, (1994), Radiation response of mouse lymphoid and myeloid cell lines.Part III. Fifferent signals can lead to apoptosis and may influence sensitivity to killing by DNA double-strand breakage. *Int.J.Radiat.Biol.*, **65**(2):229-239.
- RADFORD, IR, (1994), Radiation response of mouse lymphoid and myeloid cell lines.Part I. Sensitivity to killing by ionizing radiation, rate of loss of viability, and cell type of origin. *Int.J.Radiat.Biol.*, **65**(2):203-215.
- RADFORD, IR; MURPHY, TK; RADLEY, JM & ELLIS, SL, (1994), Radiation response of mouse lymphoid and myeloid cell lines.Part II. Apoptotic death is shown by all lines examined. *Int.J.Radiat.Biol.*, **65**(2):217-227.
- RAMPRASAD, MP; FISHER, W; WITZTUM, JL; SAMBRANO, GR; QUEHENBERGER, O & STEINBERG, D, (1995), The 94- to 97-kDa mouse macrophage membrane protein that recognizes oxidized low density lipoprotein and phosphatidylserine-rich liposomes is identical to macrosialin, the mouse homologue of human CD68. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, **92**:9580-9584.

- RAW, I; ROCHA, MC; ESTEVES, MI & KAMIGUTI, AS, (1986), Isolation and characterization of a thrombin-like enzyme from the venom of *Crotalus durissus terrificus*. *Braz.J.Med.Biol.Res.*, **19**:333-338.
- RENETSEDER, R; BRUNIE, S; DIJKSTRA, BW; DRENT, J & SIGLER, PB, (1985), A comparison of the crystal structures of phospholipase A₂ from bovine pancreas and *Crotalus atrox* venom. *J.Biol.Chem.*, **260**:11627-11634.
- RESENDE, CC; ARAÚJO, FAA & SALLENAVE, RNUR, (1989), *Análise epidemiológica dos acidentes ofídicos*, p.37. Ministério da Saúde, Secretaria Nacional de Ações Básicas da Saúde.
- RIBEIRO, LA & JORGE, MT, (1989), Alteração do tempo de coagulação sanguínea em pacientes picados por serpente *Bothrops jararaca* adulta e filhote. *Rev.Hosp.Clín.Fac.Med.S.Paulo*, **44**(4):143-145.
- RIBEIRO, LA, (1990), Epidemiology of ophidic accidents. *Mem.Inst.Butantan*, **52**(suppl.):15-16.
- RIECKMANN, KH, (1990), Human immunization with attenuated sporozoites. *Bull.W.H.O.*, **68**(suppl.):13-16.
- RODRIGUES-SIMIONI, L; HAWGOOD, BJ & SMITH, ICH, (1990), Properties of the early phases of crotoxin poisoning at frog neuromuscular junctions. *Toxicon*, **28**(12):1479-1489.
- ROGERO, JR, (1978), *Toxinas do veneno de Crotalus durissus terrificus - Interação proteína-proteína e cinética da troca isotópica Hidrogênio-Trício*. (Tese Doutorado. Instituto de Química.USP).
- ROHRER, L; FREEMAN, M; KODAMA, T; PENMAN, N & KRIEGER, M, (1990), Coiled-coil fibrous domains mediate ligand-binding by macrophage scavenger receptor type II. *Nature*, **343**:570-572.
- ROSSI, MA; PERES, LS; DE PAOLA, F; CUPO, P; & HERING, SE & AZEVEDO-MARQUES, MM, (1989), Microscopic study of systemic myonecrosis due to poisoning by Tropical Rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*) in humans, *Arch.Pathol.Lab.Med.*, **113**:169-173.

- RUBSAMEN, K; BREITHALPT, H & HABERMANN, E, (1971), Biochemistry and Pharmacology of the crotoxin complex. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch.Pharmacol.*, **270**:274-288.
- SALATA, E; WIENDL, FM & CORRÊA, FMA, (1973), Efeitos de raios gama sobre o *Trypanosoma cruzi*. *Rev.Inst.Med.Trop.São Paulo*, **15**:66-71.
- SASAKI, T; HORIUUCH, S; YAMAZAKI, M & YUI, S, 1996, Stimulation of macrophage DNA synthesis by polyanionic substances through binding to the macrophage scavenger receptor. *Biol.Pharm.Bull.*, **19**:449-450.
- SCHANNE, FAX; KANE, AB; YOUNG, EE & FARBER, JL, (1979), Calcium dependence of toxic cell death: A final common pathway. *Science*, **206**:700.
- SCHUESSLER, H & DAVIES, JV, (1983), Radiation-induced reductions with bovine serum albumin. *Int.J.Radiat.Biol.*, **43**:291-301.
- SCHUESSLER, H & FREUNDL, K, (1983), Reactions of formate and ethanol radicals with bovine serum albumine studied by electrophoresis. *Int.J.Radiat.Biol.*, **44**:17-29.
- SCHUESSLER, H & SHILLING, H, (1984), Oxygen effect in the radiolysis of proteins. Part 2. Bovine serum albumin. *Int.J.Radiat.Biol.*, **45**:267-281.
- SEKI, C; VIDAL, JC & BARRIO, A, (1980), Purification of gyroxin from a South american rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*) venom. *Toxicon*, **18**:235-247.
- SHORT, HE & MALLICK, SMK, (1935), Detoxification of snake venoms by the photodynamic action of methylene blue. *Indian J.Med.Res.*, **22**:529-536.
- SLOTTA, CH & FRAENKEL-CONRAT, M, (1938), Purificação e cristalização do veneno da cobra cascavel. *Mem.Inst.Butantan*, **12**:505-513.
- SOUZA-FILHO, JN; GUARNIERI-CRUZ, MC; MURATA, Y & ROGERO, JR, (1992), Detoxification of the crotoxin complex by gamma radiation, *Braz.J.Med.Biol.Res.*, **25**:103-113.
- STOCKER, KF, (1990), Composition of snake venom IN: Stocker, K.F. (ed), *Medical Use of Snake Venom Proteins*, pp 33-57 CRC Press, Florida, 1990.
- STRINGER, JM; KAINER, RA & TU, AT, (1972), Myonecrosis induced by rattlesnake venom. *Am.J.Pathol.*, **67**:127-140.

- STRONG, PN, (1987), Presynaptic phospholipase A₂ neurotoxins: Relationship between biochemical and eletrophysiological approaches to the mechanism of toxin action IN: Dowdan, M.J. & Hawthorne, J.N., (eds), *The Cellular and Molecular Basis of Cholinergic Function*, pp.534-549 . Chichester, Ellis Horwood.
- SUZUKI, H; KURIHARA, Y; TAKEYA, M; KAMADA, N; KATAOKA, M; JISHAGE, K; UEDA, O; SAKAGUCHI, H; HIGASHI, T; SUZUKI, T; TAKASHIMA, Y; KAWABE, Y; CYN Shi, O; WADA, Y; HONDA, M; KURIHARA, H; ABURATANI, H; DOI, T; MATSUMOTO, A; AZUMA, S; NODA, T; TOYODA, Y; ITAKURA, H; YAZAKI, Y; HORIUCHI, S; TAKAHASHI, K; KRUIJT, JK; VAN BERKEL, TJC; STEINBRECHER, UP; ISHIBASHI, S; MAEDA, N; GORDON, S & KODAMA, T, (1997), A hole of macrophage scavenger receptors in atherosclerosis and susceptibility to infection. *Nature*, **386**:292-296.
- SWALLOW, AJ, (1960), *Radiation Chemistry of Organic Compounds* (Swallow, AJ ed,) pp 211-224. Pergamon Press, New York.
- SZUMIEL, I, (1994), Ionizing radiation-induced cell death. *Int.J.Radiat.Biol.*, **66**(4):329-341.
- TABORSKA, E, (1971), Intraspecies variability of the venom of *Echis carinatus*. *Physiol.Bohemoslov.*, **20**:307-318.
- TEJASEN, P & OTTOLENGHI, A, (1970), The effect of ultraviolet light on the toxicity and the enzymatic and antigenic activities of snake venom. *Toxicon*, **8**:225-233.
- TOWBIN, H & GORDON, J, (1984), Immunoblotting and dot immunobinding: current status and outlook. *J.Immunol.Meth.*, **72**:313-340.
- TOWBIN, H; STAHELEIN, T & GORDON, J, (1979), Electrophoretic transfer of protein from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 4350-4354.
- TU, AT, (1983), Local tissue damaging (hemorrhage and myonecrosis) toxins from rattlesnake and other Pit Viper venoms. *J.Toxicol.Toxins Rev.*, **2**:205-234.
- VARGAFTIG, BB; PRADO-FRANCESCH, J; CHIGNARD, M; LEFORT, J & MARLAS, G, (1980), Activation of guinea-pig platelets induced by convulxin, a

- substance extracted from the venom of *Crotalus durissus cacaavella*. *Eur.J.Pharmacol.*, **68**:451-464.
- VITAL-BRAZIL, O, (1966), Pharmacology of crystalline crotoxin -II- Neuromuscular blocking action. *Mem.Inst.Butantan*, **33**:991-992.
- VITAL-BRAZIL, O, (1972), Neurotoxins from the South american rattlesnake. *J.Formosan Med.Assoc.*, **71**:394-400.
- VITAL-BRAZIL, O, (1980), Venenos ofídicos neurotóxicos. *Rev.Ass.med.Bras.*, **26**:212-218.
- VITAL-BRAZIL, O; EUGÊNIO, AGB & LASZLO, GM, (1973), Origem da paralisia respiratória causada pela crotoxina. *Ciência e Cultura*, **25**:1165-1169.
- VITAL-BRAZIL, O; FARIÑA, R; YOSHIDA, L & OLIVEIRA, VA, (1986a), Pharmacology of cristalline crotoxin -III- Cardiovascular and respiratory effects of crotoxin and *Crotalus durissus terrificus* venom. *Mem.Inst.Butantan Int.Symp.*, **33**:993-1000.
- VITAL-BRAZIL, O; PRADO-FRANCESCHI, J & LAURE, CJ, (1979), Repetitive muscle responses induced by crotamine. *Toxicon*, **17**:61-67.
- VOET, D & VOET, JG, (1995), Sugars & Polysaccharides. IN: Voet, D & Voet, JG, 1995, Biochemistry, Capítulo 10. Pp 251-276. 2ª Edição, Editora John Wiley & Sons, New York.
- WALES, A & KUSEL, JR, (1992), Biochemistry of irradiated parasite vaccines: Suggested models for their mode of action. *Parasitology Today*, **8**(11):358-363.
- WHO, (1981), *Progress in the characterization of venoms and standardization of antivenoms*. WHO, offset Publication No 58, Geneva.
- YAMAMOTO, A; TAKAICHI, S; HARA, H; NISHIKAWA, O; YOKOYAMA, S; YAMAMURA, T & YAMAGUCHI, T, (1986), Probucol prevents lipid storage in macrophages. *Atherosclerosis*, **62**:209-217.