

**INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES**

**Autarquia Associada à Universidade de São Paulo**

**Resposta imune frente à Bothropstoxina-1  
irradiada com  $^{60}\text{Co}$ : identificação das principais  
citocinas envolvidas e a participação de  
substâncias *scavengers***

**Janaína Baptista Alves**

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

**Orientadora:**

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

**São Paulo**

**2009**

*Dedico este trabalho*

*A minha família: meus pais, Gení e Manoel, e meus irmãos, Líssandra e André. Por acreditarem em mim e por seu amor incondicional. Sem o apoio de vocês nada disso teria sentido.*

*Ao meu companheiro Andrés, meu grande amor, por estar a meu lado em todos os momentos, e por me dar a oportunidade de ser eu mesma.*

## *Filosofia do "TUBARÃO"*

*Os japoneses sempre gostaram de peixe fresco. Porém, as águas próximas ao Japão não produzem muitos peixes há décadas. Assim, para alimentar a sua população os japoneses aumentaram o tamanho dos navios pesqueiros e começaram a pescar mais longe do que nunca. Quanto mais longa a viagem, mais tempo levava para o peixe chegar. Então, o peixe já não era mais fresco. E, os japoneses não gostaram do gosto destes peixes.*

*Para resolver este problema, as empresas de pesca instalaram congeladores em seus barcos. Eles pescavam e congelavam os peixes em alto-mar. Porém, os japoneses conseguiram notar a diferença entre peixe fresco e peixe congelado e, é claro, eles não gostaram do peixe congelado.*

*Então, as empresas de pesca instalaram tanques de peixe nos navios pesqueiros. Eles podiam pescar e colocar esses peixes nos tanques e mantê-los vivos. Depois de certo tempo, pela falta de espaço, eles paravam de se mover. Eles chegavam vivos, porém cansados e abatidos. Infelizmente, os japoneses ainda podiam notar a diferença no gosto.*

*Como os japoneses resolveram este problema? Como eles conseguiram trazer ao Japão peixes saudáveis e frescos?*

*Para conservar os peixes, as empresas de pesca japonesas ainda os colocam dentro de tanques, nos seus barcos. Mas eles também adicionam um pequeno tubarão em cada tanque. O tubarão come alguns peixes, mas a maioria deles chega muito vivo e fresco no desembarque. Isso porque, os peixes são desafiados nos tanques.*

*Quando as pessoas atingem seus objetivos, elas podem perder as suas paixões. Elas podem começar a pensar que não precisam mais trabalhar tanto, então, relaxam.*

*Para esses problemas, inclusive no caso dos peixes dos japoneses, a solução é bem simples:*

*L. Ron Hubbard observou no começo dos anos 50: "O homem progride, estranhamente, somente perante a um ambiente desafiador." Quanto mais inteligente, persistente e competitiva uma pessoa é, mais ela gostará de um bom problema. Se seus desafios estão de um tamanho correto e você consegue, passo a passo, conquistar esses desafios, você fica muito feliz. Você pensa em seus desafios e se sente com mais energia. Você fica com vontade de tentar novas soluções. Você se diverte. Você fica vivo!*

*Portanto, como norma de vida, ao invés de evitar desafios, mergulhe dentro deles. Massacre-os. Curta o jogo. Se seus desafios são muito grandes e numerosos, não desista, se reorganize! Busque mais determinação, mais conhecimento e, principalmente, busque mais ajuda!*

*Se você alcançou seus objetivos, almeje objetivos maiores. Uma vez que suas necessidades pessoais ou familiares forem atingidas, vá ao encontro dos objetivos do seu grupo, da sociedade e até mesmo da humanidade. Crie seu sucesso pessoal e não se acomode nele. Você tem recursos, habilidades e destrezas para fazer a diferença.*

*"Ponha um tubarão no seu tanque e veja quão longe você realmente pode chegar!"*

*(Marco Fabossi)*

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus pelo milagre da vida.

À Dr<sup>a</sup> Nanci do Nascimento, minha orientadora, pela amizade, confiança, pelos conhecimentos transmitidos e por me mostrar sempre o melhor caminho, principalmente nos momentos de dúvida.

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

A Dr<sup>a</sup> Olga Zazuco Higa, por possibilitar a utilização de aparelhos e materiais de seu laboratório.

A Dr<sup>a</sup> Lígia Ely Morganti Ferreira Dias, pelas sugestões na avaliação do seminário de área e, por possibilitar a utilização de aparelhos e materiais de seu laboratório.

A Dr<sup>a</sup> Maria Aparecida Pires Camilo, pelas sugestões dadas durante os seminários do grupo.

A Dr<sup>a</sup> Maria Helena Belini Marumo, pelas sugestões na avaliação do seminário de área e, por possibilitar a utilização de aparelhos e materiais de seu laboratório.

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

Ao Dr. Patrick Jack Spencer, meu querido amigo, pelos ensinamentos diários e por sempre nos mostrar uma maneira prática e inteligente de resolver um problema.

Ao amigo Dr. João Ezequiel de Oliveira, “Johnninho”, por estar sempre disposto a ajudar.

Ao Dr. Carlos Jorge Roberto Soares, pelas sugestões dadas durante a qualificação deste trabalho e pela parceria durante os processos seletivos de bolsas da pós-graduação.

Ao Dr. Luiz Augusto Corrêa Passos, pelas sugestões importantes dadas na qualificação deste trabalho e pelas constantes parcerias.

Ao amigo Dr. Rui Seabra Ferreira Júnior, pelos trabalhos realizados em conjunto.

A Dra. Maria Teresa de Carvalho Pinto Ribela, pelas sugestões dadas na avaliação do seminário de área.

A Dra. Cibele Nunes Peroni, pelas conversas do dia-a-dia.

A Dra. Regina Affonso, pelos momentos divertidos nos almoços e nos seminários do grupo.

Ao meu amado amigo Dr. Andrés Jimenez Galisteo Jr, pelo auxílio no ensaio de Real Time PCR e, por todo seu carinho e dedicação.

Ao amigo José Alberto Alves da Silva, parceiro de prazos e bolsas, pelos momentos compartilhados ao longo de quase 9 anos de amizade.

Ao amigo Dr. Jean Queiroz, “Jéã”, pelas conversas a cerca da Ciência e, principalmente, pelo carinho e amizade.

Ao amigo Dr. Murilo Casare, pelo carinho, conversas e pelo auxílio com o preparo das substâncias *scavengers* utilizadas neste projeto.

Ao amigo Marcos Antônio Júnior, Xúnior, por sua amizade e apoio num momento muito importante de minha vida.

A minha querida amiga Priscila Caproni, companheira de bancada, pelos momentos compartilhados no laboratório, principalmente os mais difíceis, o que nos proporcionou criar uma grande amizade.

Ao amigo Tiago Luiz de Almeida, “Mano”, por ser esta pessoa maravilhosa que sempre nos faz sorrir com suas “teorias” do dia-a-dia.

Ao amigo Antônio Carlos Martinho Júnior, Jú, pela amizade, carinho, por nossas conversas a cerca da Biologia e pelas muitas barras de chocolate.

A amiga Stéfani Plumeri Santin, pelo carinho e amizade.

A amiga Daniele Yoshito, “minha filha”, por sua amizade, doçura e delicadeza.

A amiga Jéssica Mirco, pelo carinho e pela ajuda nos experimentos finais deste trabalho.

A minha querida amiga Fernanda de Mendonça, Cobrinha, pela amizade e pelas inúmeras conversas via e-mail e telefone.

Ao amigo Dr. Daniel Perez Vieira, nosso “Mixirica”, pelo auxílio nos ensaios de Real Time PCR e pelos momentos compartilhados na pós-graduação.

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

A amiga Miriam F. Suzuki, Mimi, pela amizade e carinho de todos os dias.

A amiga Renata Damiani, Renatinha, pelas conversas nos bastidores e por seu humor sempre perspicaz e inteligente.

A amiga Karina Corleto, Ká, por sua alegria e carinho de todos os dias.

Aos amigos Rodrigo Queiroz e Tamara, pelo carinho e amizade.

A amiga Fernanda Calvo, pela amizade, carinho e pelas trocas de auxílios no laboratório.

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

A Rosa Churra e Keli Nunes Balduino, pelas trocas de materiais e experiências no laboratório.

A Natália Malavasi Vallejo, pelos seus divertidos “ensaios musicais”.

A Cláudia, Elisa, Fernandinha, Geisa, Taís e Larissa, pelos momentos compartilhados durante os almoços na copa.

A amiga Arlete Corrêa, por sua imensa alegria e constante bom humor.

À amiga Dr<sup>a</sup> Andréa Rodas, pelas dicas importantes com relação ao trabalho no laboratório.

A Aninha, Gislene, Ilze, Rose, Romério e Verinha, pelo trabalho e constante atendimento na secretaria de pós-graduação.

Ao amigo Fábio Camargo, pela parceria na representação do corpo discente.

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

À CNPq pelo apoio financeiro.

Aos engenheiros Carlos e Elizabeth e ao Hélio, do CTR, por possibilitarem o tratamento com raios gama da proteína utilizada neste projeto.

Ao Eduardo de Moura, por seu trabalho, cuidado e organização dos equipamentos e materiais presentes no laboratório.

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

A amiga Maria Neide Mascarenhas, "Neidinha", Técnica do Biotério, pelo cuidado e tratamento dispensado aos animais.

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

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

Ao Junqueira e a Rosângela, pelo auxílio nos laboratórios do TBM.

Aos amigos do Laboratório de Protozoologia do IMTSP/USP, pelo carinho e amizade.

Aos funcionários e responsáveis pelo Laboratório de Virologia do IMTSP/USP, por disponibilizarem o aparelho de Real Time PCR.

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



# Resposta imune frente à Bothropstoxina-1 irradiada com $^{60}\text{Co}$ : Identificação das principais citocinas envolvidas e a participação de substâncias *scavengers*

Janaína Baptista Alves

## Resumo

Considerando os efeitos da radiação gama sobre proteínas e a capacidade do sistema imune de reconhecer macromoléculas modificadas, decidimos pesquisar as principais citocinas envolvidas no padrão de resposta de células Th1 ou Th2 em camundongos (B10.PL, BALB/c ou *Knockout-IFN $\gamma$ <sup>-/-</sup>*) imunizados com a Bothropstoxina-1 (BTHX-1), uma miotoxina do veneno de *Bothrops jararacussu*, na forma nativa ou irradiada, na presença ou não de substâncias *scavengers*.

Para avaliar prováveis modificações estruturais na molécula da proteína após o processo de irradiação (radiação  $\gamma$  de  $^{60}\text{Co}$ ), foi realizada a eletroforese em gel de poliacrilamida 15% para a BTHX-1, na forma nativa e irradiada, na presença ou não de substâncias *scavengers*. Os resultados mostraram que a radiação  $\gamma$  foi capaz de promover alterações na molécula da BTHX-1. Na presença dos *scavengers*, mesmo após a irradiação da toxina, houve a preservação da banda principal (14 kDa).

Com relação aos aspectos imunológicos, foram realizados ensaios de produção e identificação de anticorpos, nos quais, os animais foram imunizados com a BTHX-1, na forma nativa ou irradiada, na presença ou não dos *scavengers*. Observou-se que a proteína nativa induziu, preferencialmente, uma resposta do tipo Th2, enquanto que a proteína irradiada induziu uma resposta do tipo Th1. A toxina irradiada na presença do t-butanol induziu menor produção de IgG2b, quando comparada a toxina irradiada sem *scavengers*.

Para a quantificação da expressão de citocinas em células esplênicas obtidas dos camundongos, foi realizado o Real-time PCR para a detecção das citocinas IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-4 e IL-10. As células dos camundongos B10.PL e dos BALB/c imunizados com a BTHX-1 nativa e estimuladas *in vitro* com a toxina irradiada, apresentaram maior expressão de IFN- $\gamma$  e IL-2 (padrão de resposta Th1). As células dos *Knockout-IFN $\gamma$ <sup>-/-</sup>* imunizados com a BTHX-1 nativa apresentaram maior expressão de IL-4 (padrão de resposta Th2). As células dos camundongos B10.PL e dos BALB/c imunizados com a BTHX-1 + t-butanol apresentaram maior expressão de IL-4 e IL-10, respectivamente. Estes fatos reforçam a participação do OH• na modulação da resposta imune contra a toxina irradiada.

# Immune response against the irradiated Bothropstoxin-1: Identification of main cytokines involved and the participation of scavengers substances

Janaína Baptista Alves

## Abstract

Considering the effects of gamma radiation on proteins and the ability of immune system to recognize modified macromolecules, we have identified the major cytokines involved in immune response of B10.PL, BALB/c and *Knockout-IFN $\gamma$ <sup>-/-</sup>* mice exposed to native or irradiated bothropstoxin-1 (BTHX-1), in the presence and absence of scavengers substances. In order to evaluate possible molecule structural modifications after being irradiated (<sup>60</sup>Co gamma rays), bothropstoxin-1 was submitted to SDS-PAGE analyses. Our results indicated that irradiation process has promoted modifications in the BTHX-1 molecule, however, in the presence of scavengers and even after irradiation process, the main band of toxin was preserved (14 kDa). Sera of animals immunized with the native or irradiated toxin, in the presence or not of scavengers, were analyzed in order to quantify specific isotypes. While the native BTHX-1 induced a predominant Th2 response, the irradiated toxin apparently promoted a switch towards a Th1 pattern. The toxin, when irradiated in the presence of t-butanol, induced to a lower production of IgG2b (Th1 response) if compared with the irradiated toxin without scavengers. We also performed a Real-time PCR to quantify the expression of cytokines IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-4 and IL-10 in spleen cells from mice. The cells of B10.PL and BALB/c mice immunized with native BTHX-1 and *in vitro* stimulated with irradiated toxin, showed higher expression of IFN- $\gamma$  and IL-2 (Th1 response) than the control sample. The cells of *Knockout-IFN $\gamma$ <sup>-/-</sup>* mice immunized with native BTHX-1 showed higher expression of IL-4 (Th2 response). The cells obtained of B10.PL and BALB/c mice immunized with BTHX-1 + t-butanol, showed higher expression of IL-4 and IL-10, respectively. These facts reinforce the involvement of OH• in the modulation of immune response against the irradiated toxin.

## SUMÁRIO

	Página
<b>I – INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
1.1 Radiação Ionizante.....	1
1.2 Venenos.....	5
1.3 Atenuação de Venenos Animais.....	8
1.4 Sistema Imune.....	11
<b>II – OBJETIVOS</b> .....	<b>18</b>
<b>III - MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>19</b>
3.1 Reagentes.....	19
3.2 Animais.....	19
3.3 Purificação da BTHX-1.....	20
3.4 Cálculos das concentrações dos <i>scavengers</i> .....	21
3.5 Irradiação das Proteínas.....	23
3.6 Eletroforese (SDS-PAGE).....	23
3.7 Produção de anticorpos específicos contra BTHX-1 nativa ou irradiada.....	24
3.8 ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay).....	25
3.8.1 <i>Índice de Reatividade (IR)</i> .....	26
3.9 Cultivo de Células Esplênicas.....	27
3.10 Avaliação da expressão relativa de IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-4 e IL-10, em esplenócitos murinos, por Real-Time PCR.....	28
3.10.1 <i>Extração e quantificação de RNA</i> .....	28
3.10.2 <i>Síntese de cDNA</i> .....	28
3.10.3 <i>Confecção dos primers e eficiência de detecção</i> .....	29
3.10.4 <i>Condições da reação e análise dos resultados</i> .....	30
<b>IV – RESULTADOS</b> .....	<b>31</b>
4.1 Eletroforese (SDS-PAGE).....	31
4.2 Produção de Anticorpos.....	33
4.3 Quantificações relativas das citocinas em esplenócitos murinos.	44

<b>V – DISCUSSÃO.....</b>	<b>52</b>
<b>VI – CONCLUSÕES.....</b>	<b>64</b>
<b>VII – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>66</b>
<b>VIII – ANEXOS.....</b>	<b>79</b>

## ANEXOS

- Anexo 1** – Ensaio imunoenzimático para a avaliação da produção de anticorpos IgG total, IgG1 e IgG2b contra BTHX-1 nativa ou irradiada por camundongos B10.PL.
- Anexo 2** - Ensaio imunoenzimático para a avaliação da produção de anticorpos IgG total, IgG1 e IgG2b contra BTHX-1 nativa ou irradiada por camundongos BALB/c.
- Anexo 3** - Ensaio imunoenzimático para a avaliação da produção de anticorpos IgG total, IgG1 e IgG2b contra BTHX-1 nativa ou irradiada por camundongos *Knockout-IFN- $\gamma$ <sup>-/-</sup>*.
- Anexo 4** - Ensaio imunoenzimático para a avaliação da produção de anticorpos IgG total, contra BTHX-1 nativa ou irradiada, com ou sem *scavengers*, em camundongos B10.PL.
- Anexo 5** - Ensaio imunoenzimático para a avaliação da produção de anticorpos IgG total, contra BTHX-1 nativa ou irradiada, com ou sem *scavengers*, em camundongos BALB/c.
- Anexo 6** - Ensaio imunoenzimático para a avaliação da produção de anticorpos IgG1 e IgG2b, contra BTHX-1 nativa ou irradiada, com ou sem *scavengers*, em camundongos B10.PL.
- Anexo 7** - Ensaio imunoenzimático para a avaliação da produção de anticorpos IgG1 e IgG2b, contra BTHX-1 nativa ou irradiada, com ou sem *scavengers*, em camundongos BALB/c.
- Anexo 8** – Quantificação relativa por Real-Time PCR: IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-4 e IL-10 de células esplênicas de camundongos B10.PL, imunizados com BTHX-1 nativa ou irradiada.
- Anexo 9** - Quantificação relativa por Real-Time PCR: IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-4 e IL-10 de células esplênicas de camundongos BALB/c, imunizados com BTHX-1 nativa ou irradiada.
- Anexo 10** - Quantificação relativa por Real-Time PCR: IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-4 e IL-10 de células esplênicas de camundongos *Knockout-IFN- $\gamma$ <sup>-/-</sup>*, imunizados com

BTHX-1 nativa ou irradiada.

**Anexo 11** - Quantificação relativa por Real-Time PCR: IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-4 e IL-10 de células esplênicas de camundongos B10.PL, imunizados com BTHX-1 nativa ou irradiada, na presença de *scavengers*.

**Anexo 12** - Quantificação relativa por Real-Time PCR: IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-4 e IL-10 de células esplênicas de camundongos BALB/c, imunizados com BTHX-1 nativa ou irradiada, na presença de *scavengers*.

### ***Produção científica no período***

**Anexo 13** - Alves, J.B.; Vieira, D.P.; Galisteo JR, A.J.; Caproni, P.; Casare, M.; Andrade Jr, H.F.; Spencer, P.J.; Nascimento, N. Immunological properties of <sup>60</sup>Co gamma-rays irradiated bothropstoxin-I. Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry, v. 279, p. 817-821, 2009.

**Anexo 14** – Ferreira Junior, R.S.; Nascimento, N.; Couto, R.; Alves, J.B.; Meira, D.A.; Barraviera, B. Young ovine death during hyperimmunization: crotalic envenomation or copper toxicosis?. Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases (Online), v. 14, p. 738-749, 2008.

**Anexo 15** - Baptista, J.A.; Spencer, P.J.; Oliveira, J.E.; Casare, M.; Nascimento, N. Immune response against antigens irradiated with <sup>60</sup>Co gamma-rays. Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry, Budapeste - Hungria, v. 269, n. 3, p. 565-569, 2006.

**Anexo 16** - Ferreira Junior, R.S.; Nascimento, N.; Couto, R.; Alves, J. B.; Meira, D. A.; Barraviera, B. Laboratory evaluation of young ovines inoculated with natural or <sup>60</sup>co-irradiated Crotalus durissus terrificus venom during hyperimmunization process. Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases (Online), v. 12, p. 620-631, 2006.

**Anexo 17** - Baptista, J.A.; Vieira, D.P.; Galisteo JR, A.J.; Miyagui, C.Y.; Caproni, P.; Casare, M.; Andrade Jr, H.F.; Spencer, P.J.; Nascimento, N. Structure alteration and immunological properties of Bothropstoxin-I irradiated with <sup>60</sup>Co gamma rays. In: International Nuclear Atlantic

Conference (INAC 2007), 2007, Santos.

**Anexo 18** - Galisteo Jr., A.J.; Zorgi, N.E.; Baptista, J.A.; Hiramoto, R.M.; Nascimento, N. ; Andrade Jr, H.F. Humoral immune response of C57Bl/6j and BALB/c mice immunized with irradiated tachyzoites of Toxoplasma gondii RH strain and oral challenge with ME-49 strain. In: International Nuclear Atlantic Conference (INAC 2007), 2007, Santos.

**Anexo 19** - Caproni, P.; Baptista, J.A.; Almeida, T.L.; Passos, L.A.C.; Nascimento, N. Study of irradiated toxins with <sup>60</sup>Co gamma rays: immune system behavior. In: International Nuclear Atlantic Conference (INAC 2007), 2007, Santos.

**Anexo 20** - XVI World Congress of the International Society on Toxinology and X Congresso da Sociedade Brasileira de Toxinologia, 2009, Recife - Pernambuco - Brasil.

**Anexo 21** - XVI World Congress of the International Society on Toxinology and X Congresso da Sociedade Brasileira de Toxinologia, 2009, Recife - Pernambuco - Brasil.

**Anexo 22** - Toxoplasma Centennial Congress, 2008, Búzios.

**Anexo 23** - Recent Developments and Applications of Nuclear Technologies, 2008, Bialowieza, Polônia.

**Anexo 24** - IX Symposium of the Brazilian Society on Toxinology, 2007, Fortaleza.

**Anexo 25** - IX Symposium of the Brazilian Society on Toxinology, 2007, Fortaleza.

**Anexo 26** - IX Symposium of the Brazilian Society on Toxinology, 2007, Fortaleza.

**Anexo 27** - III Simpósio de Imunologia: Imunidade Inata, 2006, Botucatu - SP.

**Anexo 28** - XXXIII Annual Meeting on Basic Research in Chagas Disease & XXII Annual Meeting of the Brazilian Society of Protozoology, 2006, Caxambú.

## I - INTRODUÇÃO

### 1.1 Radiação Ionizante

A radiação ionizante consiste de ondas eletromagnéticas que se propagam com alta velocidade, energia e, ao interagir com a matéria pode produzir efeitos variados, como a ionização e excitação, possuindo um alto poder de penetração (Figura 1). A ionização consiste na produção de íons, radicais e elétrons livres na matéria que sofreu a interação. Dependendo de sua energia, a radiação ionizante pode atravessar vários centímetros do tecido humano, por isso é muito utilizada em aplicações médicas como a radioterapia (GROSH & HOOPYWOOD, 1979; BOYER *et al*, 2001).

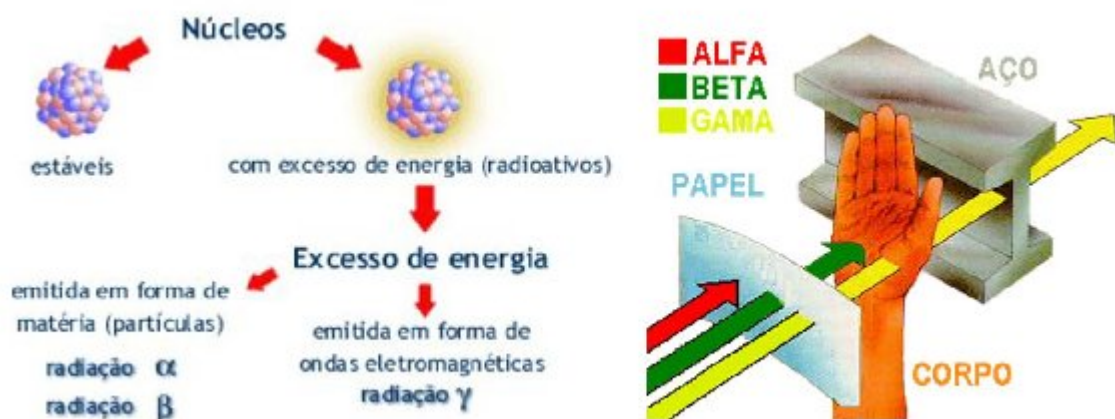


Figura 1 – Ilustração esquemática de alguns tipos de radiação e sua capacidade de penetração na matéria.



Seus efeitos podem ser diretos ou indiretos, sendo o primeiro uma conseqüência da interação direta da radiação com componentes celulares como o DNA, proteínas e lipídeos, provocando alterações estruturais em suas moléculas, o que constitui cerca de 30% do efeito biológico das radiações. O efeito indireto se dá quando a radiação interage com as moléculas de água presentes no meio intracelular, formando os produtos da radiólise da água (OH•, H•, elétron aquoso, por exemplo). A radiólise da água corresponde à cerca de 70% do efeito biológico produzido pelas radiações e sua maior ocorrência, deve-se ao fato de a água ocupar grande parte da composição celular (MICHAELS & HUNT, 1978).

Nas moléculas de água os átomos estão unidos através de ligações químicas formadas por um par de elétrons. Quando a radiação interage com as moléculas de água, estas ligações químicas se desfazem e, cada fragmento molecular passa a conter um único elétron em sua órbita externa, agora não pareado e ávido por estabelecer nova ligação. Estes fragmentos carregados, instáveis e reativos constituem os produtos da radiólise da água (Figura 2) (STEFANIC *et al*, 2009).

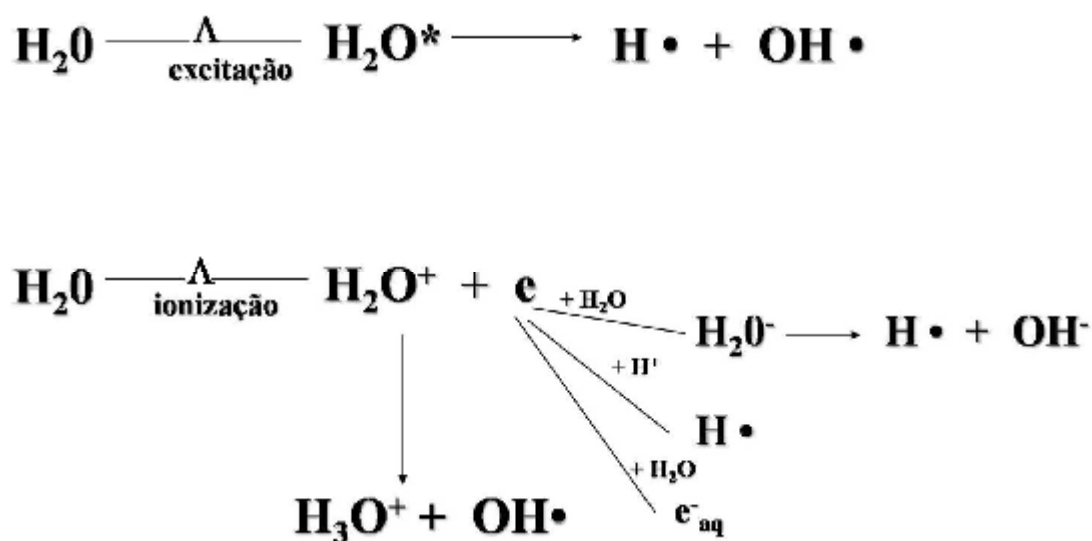


Figura 2 – Resumo das reações da radiólise da água (BURTON, 1947; ALLEN, 1948).

Dentre os produtos da radiólise da água, destaca-se o radical hidroxila ( $\text{OH}\cdot$ ), que é responsável pela abstração dos hidrogênios do carbono alfa e de grupamentos sulfidrilas, além de reagir com anéis aromáticos de aminoácidos como o triptofano, tirosina e fenilalanina, formando radicais altamente reativos. O elétron aquoso ( $\text{e}^-_{\text{aq}}$ ), além de reagir com os hidrogênios dos aminoácidos aromáticos, pode promover a desaminação de aminoácidos como a alanina, glicina, histidina, cisteína e cistina (BUTLER et al, 1984). O  $\text{OH}\cdot$  pode ser o principal responsável pela agregação das proteínas, devido a sua capacidade de formar ligações cruzadas entre elas (HAWKINS & DAVIES, 2001).

As alterações químicas que a radiação causa em proteínas são: fragmentação, “cross-linking”, agregação e oxidação pelos produtos gerados na radiólise da água (MOON & SONG, 2000).

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

Contudo, estas alterações podem ser minimizadas pela adição, no momento da irradiação, de substâncias *scavengers* que competem no meio pelas espécies reativas específicas, impedindo a ação das mesmas sobre a molécula protéica (ZHOU *et al*, 2007). Como exemplo destas substâncias pode-se citar o nitrato de sódio ( $\text{NaNO}_3$ ), que atua como *scavenger* do elétron aquoso e, o t-butanol, que apresenta afinidade pelo radical hidroxila.

O ânion nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) reage rapidamente com o elétron aquoso, tanto que concentrações de  $\text{NaNO}_3$ , acima de alguns milimolares, são suficientes para promover reações de redução das moléculas de elétron aquoso geradas na radiólise da água (HIROKI *et al*, 2002).

Alcoóis como o t-butanol são amplamente utilizados como *scavengers* de espécies reativas formadas através de radiólise ou fotólise. A neutralização do radical hidroxila ( $\text{OH}\bullet$ ) pelo t-butanol se dá através de reações de abstração que ocorrem predominantemente no carbono alfa, formando radicais menos reativos que serão subseqüentemente eliminados (MEZYK & MADDEN, 1999).

## 1.2 Venenos

Envenenamentos provocados por picadas de animais peçonhentos representam um relevante problema de saúde pública mundial. No caso de picadas de serpentes, estima-se a ocorrência de mais de 5 milhões de casos por ano, sendo 50.000 - 100.000 casos fatais, havendo sérios impactos sócio-econômicos, particularmente em países em desenvolvimento (GUTIÉRREZ *et al*, 1995).

No Brasil são encontrados quatro gêneros de serpentes peçonhentas de importância médica: *Bothrops* (jararacas), *Crotalus* (cascavéis) e *Lachesis* (surucucus), pertencentes à família *Viperidae*, e *Micrurus* (corais), pertencente à família *Elapidae* (TOKARNIA & PEIXOTO, 2006). Cerca de 29.000 casos de acidentes ofídicos são registrados anualmente no país, dos quais, aproximadamente 88% estão relacionados às serpentes do gênero *Bothrops* (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005; ARAUJO *et al.*, 2008).

Venenos animais compreendem uma grande variedade de toxinas, muitas das quais são proteínas e polipeptídeos que apresentam inúmeros efeitos deletérios (GUTIÉRREZ *et al*, 2003). Venenos de serpentes das subfamílias *Crotalinae* e *Viperinae*, por exemplo, são ricos em enzimas proteolíticas capazes de provocar hemorragias locais e sistêmicas (CARNEIRO *et al*, 2002).

A composição dos venenos de serpentes varia de acordo com a espécie das mesmas, idade, localização geográfica, condições climáticas e dieta. A heterogeneidade desses venenos pode contribuir para as

diferenças nos sintomas clínicos observados após envenenamento sistêmico (FRANCISCHETTI *et al*, 1998).

Os venenos botrópicos, por exemplo, possuem uma grande quantidade de enzimas, dentre elas, a fosfolipase  $A_2$  e a L-aminoácido oxidase. Apesar da complexidade de componentes presentes nestes venenos, seus efeitos estão relacionados às suas propriedades proteolíticas, hemorrágicas e coagulantes. Nos acidentes botrópicos, as lesões locais podem ser atribuídas à atividade proteolítica destes venenos sendo que, após sua absorção, ocorrem hemorragias em diversos órgãos e tecidos (ZAMUNÉR *et al*, 2004).

A bothropstoxina-1 (BTHX-1), objeto deste estudo, é um homodímero do veneno de *Bothrops jararacussu*, caracterizada como uma miotoxina com 13721 Da (SPENCER *et al*, 1998).

Apesar de não apresentar atividade catalítica, a BTHX-1 pode ser considerada uma fosfolipase  $A_2$  por apresentar homologia com as fosfolipases  $A_2$  de venenos de serpentes da família *Crotalidae* (CHO *et al*, 1988; ANDRIÃO-ESCARSO *et al*, 2000).

As fosfolipases  $A_2$  são uma classe de enzimas cálcio-dependentes que catalisam a hidrólise da ligação 2-acil-éster do 3-sn-fosfolípideo, sendo constituídas por uma cadeia simples de 122 resíduos de aminoácidos, com massa molecular em torno de 14000 Da (SOARES *et al*, 2002). Essas enzimas podem ser isoladas de venenos de serpentes e artrópodes, apresentando propriedades tóxicas e digestivas; venenos de mamíferos, como o ornitorrinco e, mais recentemente, de extratos de plantas medicinais (LIZANO *et al*, 2003). Os venenos de serpentes contêm um

grande número de isoenzimas de fosfolipase A<sub>2</sub>, que podem apresentar propriedades neurotóxicas, miotóxicas, cardiotoxicas ou anticoagulantes (GUILLEMIN *et al*, 2003).

Conforme mencionado, a bothropstoxina-1 (BTHX-1) é uma miotoxina e sabe-se que o grande problema dos envenenamentos com serpentes cujo veneno encerra miotoxinas, é a neutralização ineficiente destes componentes pelo soro específico (antibotrópico) (DIAS DA SILVA *et al*, 1989).

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

A produção de plasma ou soro hiperimune depende da imunogenicidade de cada veneno sendo que alguns gêneros de serpentes apresentam veneno com baixa capacidade imunogênica e alta toxicidade. Isto impede a inoculação de doses capazes de estimular uma resposta imunológica adequada, além de prejudicar o animal produtor, tendo, como conseqüência, a produção de soro pouco imunogênico (CAMEY *et al*, 2002). E, além destes fatores, a eficácia do antiveneno depende tanto da especificidade e afinidade dos anticorpos ao amplo espectro de componentes do veneno, bem como, de sua capacidade em neutralizar tais componentes *in vivo* (GUTIÉRREZ *et al*, 2003).

Por estas razões é necessário o desenvolvimento de técnicas que reduzam a toxicidade do veneno, além de proteger os animais soroprodutores, resultando na produção de antivenenos com anticorpos que apresentem maior poder neutralizante.

Uma vez que os venenos de serpentes são constituídos basicamente de proteínas, a radiação ionizante vem sendo empregada como ferramenta para modificar algumas propriedades das toxinas, buscando diminuir a toxicidade sem, contudo, descaracterizar as propriedades imunológicas.

### **1.3 Atenuação da Toxicidade de Venenos Animais**

Venenos de serpentes, geralmente, são altamente tóxicos e pouco imunogênicos. Acidentes envolvendo serpentes do gênero *Bothrops* (p.ex., jararacuçu, jararaca e urutu), normalmente desencadeiam efeitos locais, tais como hemorragia, isquemia e necrose, bem como sistêmicos, que vão desde alterações na coagulação sanguínea até quadros de insuficiência renal aguda (IRA). As serpentes do gênero *Bothrops* são responsáveis pela maior parte da mortandade humana relacionada a acidentes ofídicos quando comparadas às serpentes peçonhentas de outros grupos (OSHIMA-FRANCO *et al*, 2004).

No intuito de diminuir a toxicidade destes venenos, muitos métodos têm sido aplicados. CARMICHAEL (1927) utilizou o ricinoleato de sódio para diminuir a toxicidade do veneno de cascavel. Trata-se de um processo lento que envolve várias etapas de precipitação e filtração das soluções. KOCHOLATY e colaboradores (1968) diminuíram a toxicidade do veneno da cascavel sul-americana utilizando um

procedimento denominado foto-oxidação, para o qual foi preparada uma solução contendo o referido veneno e azul de metileno, diluídos no tampão adequado e submetidos a leituras em um equipamento denominado respirômetro. FREITAS e colaboradores (1998) encapsularam a crotoxina (toxina do veneno de *Crotalus durissus terrificus*) em lipossomas e concluíram que houve redução na sua toxicidade. Dentre outras metodologias utilizadas estão a radiação ultra-violeta (U.V), formaldeído, carboximetilcelulose, raios-x, glutaraldeído, iodação e raios gama (NASCIMENTO *et al*, 1996). A radiação ionizante (fonte de  $^{60}\text{Co}$ ) tem se destacado, mostrando ser uma excelente ferramenta na destoxicação de venenos totais ou frações isoladas dos mesmos, por manter ou até mesmo melhorar suas propriedades imunológicas.

SOUZA e colaboradores (2002) trabalharam com o veneno total de *Bothrops jararacussu*, o qual apresenta miotoxinas em sua composição. Os autores utilizaram o veneno na forma nativa ou irradiada, radiação gama de  $^{60}\text{Co}$ , e observaram que o veneno irradiado não apresentou efeitos miotóxicos nas preparações musculares testadas *in vitro*, quando comparado ao veneno nativo. Tal fato os levou a concluir que a radiação gama foi eficiente na neutralização da toxicidade do referido veneno.

BAPTISTA e colaboradores (2005) observaram que a bothropstoxina-1, do veneno de *Bothrops jararacussu*, irradiada (radiação gama de  $^{60}\text{Co}$ ) apresentou uma diminuição de toxicidade de cerca de cinco vezes, quando comparada à forma nativa da proteína. Esta análise foi feita empregando-se ensaio de citotoxicidade celular realizado em células CHO (*Chinese hamster ovary*).



HIRAMOTO e colaboradores (2002) trabalhando com o parasita intracelular *Toxoplasma gondii* observaram que não houve alterações nas características de biologia celular do referido parasita, após o mesmo ter sido submetido aos efeitos da radiação gama a uma dose de 255 Gy. Este fato também foi comprovado por GALISTEO e colaboradores (2005), ou seja, os autores observaram que as características de invasão *in vitro* dos parasitas, foram preservadas mesmo após a irradiação.

CAPRONI (2009) realizando um ensaio de citotoxicidade celular para o veneno total de *Bothrops jararacussu*, nativo ou irradiado, utilizando macrófagos peritoneais de camundongos, observou que o veneno irradiado foi 40% menos tóxico, quando comparado com a sua forma nativa.

Todos os fatos acima referidos reforçam o fato de que a radiação gama caracteriza-se como uma importante ferramenta para a destoxicação de venenos e toxinas, bem como microrganismos patogênicos, preservando as suas características imunogênicas.

Destruição de aminoácidos, com o conseqüente rompimento de cadeias peptídicas, alterações de ligações (H-H e S-S) intramoleculares e reorganização da molécula protéica por agregação (FERRY *et al*, 2008), são algumas das alterações estruturais que podem ocorrer, levando à mudanças nas propriedades biológicas (enzimáticas, farmacológicas e imunológicas) das proteínas irradiadas (DU & GEBICKI *et al*, 2004). Existem indicações de uma diferença quanto à radiosensibilidade dessas várias funções biológicas, sendo as propriedades imunológicas as mais radiorresistentes.

#### 1.4 Sistema Imune

O sistema imune é uma entidade biológica altamente dinâmica. Como consequência, a resposta imune observada nos organismos superiores é, na verdade, produto de um longo período de interação entre os seres vivos. Por esta razão, é absolutamente pertinente conceber a idéia de que selecionamos organismos e moléculas novas a todo o momento, bem como também somos selecionados (LITMAN *et al*, 2005). Desta maneira, impõe-se à resposta imune uma elevada variabilidade, a qual pode ser observada através da adoção de diferentes estratégias, muitas simultâneas e, sistematicamente direcionadas com o propósito de obter uma situação de equilíbrio. Este amplo espectro de resposta foi e sempre será determinante à sobrevivência das espécies (MURPHY & REINER, 2002).

Há dois tipos fundamentais de resposta imune: a inata (ou natural) e a adaptativa. A resposta inata ocorre sem exigir uma prévia exposição ao agente infeccioso, enquanto a resposta adaptativa lança mão da produção de anticorpos contra um determinado agente e é adquirida durante a vida de um indivíduo como reação adaptativa à presença de patógenos específicos (DELVES & ROITT, 2000). Tanto a imunidade inata como a adaptativa dependem da atividade de células brancas do sangue, ou seja, os leucócitos. A imunidade inata é mediada, principalmente, por granulócitos, macrófagos e células NK (*natural killer*). Já as respostas adaptativas são mediadas por linfócitos, que proporcionam a imunidade duradoura (JANEWAY *et al*, 2002).

Os componentes solúveis da resposta inata incluem as proteínas do sistema complemento, proteínas de fase aguda, citocinas e interferons ( $\alpha$  e  $\beta$ ). Enquanto a resposta adaptativa envolve a proliferação antígeno-específica de células B e T, que ocorre mediante a interação de receptores de superfície destas células com os antígenos (O'GARRA & VIEIRA, 2004) .

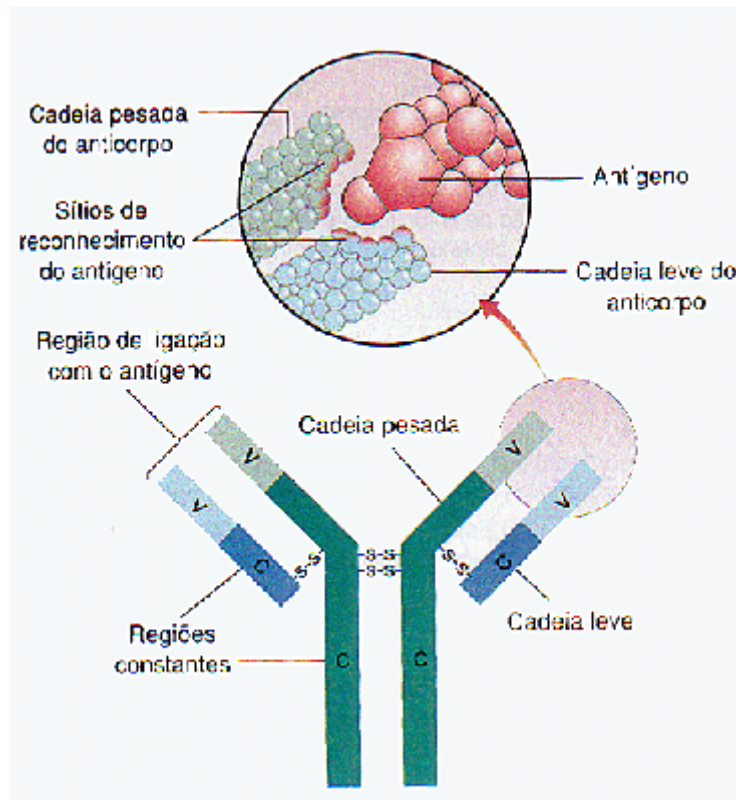
As células B secretam imunoglobulinas e anticorpos antígeno-específicos, responsáveis pela eliminação extracelular de patógenos. Quando ativadas pelo antígeno, as células B diferenciam-se em células produtoras de anticorpos, havendo cinco classes de imunoglobulinas, IgG, IgA, IgM, IgD e IgE, sendo quatro subclasses de IgG (IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4) e duas de IgA (IgA1 e IgA2), em humanos (ROITT & DELVES, 2004). Em camundongos as subclasses de IgG são IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3 (COUTELIER *et al*, 1987). Todas as imunoglobulinas são glicoproteínas e podem conter de 3 a 13 % de carboidratos, dependendo da classe de anticorpo, apresentando diferentes funções e sendo essenciais para a manutenção da estrutura do anticorpo (McHEYZER-WILLIAMS & McHEYZER-WILLIAMS, 2005).

As moléculas de anticorpo possuem forma em Y que consiste em três segmentos de igual tamanho, conectados por uma porção flexível. As ligações de hidrogênio estão presentes entre as cadeias leves e pesadas e nas cadeias pesadas entre si. Estas ligações, bem como as ligações dissulfídricas possibilitam este arranjo em Y (Figura 3) (BRADEN *et al*, 1998).

Embora as imunoglobulinas apresentem algumas diferenças estruturais, que caracterizam as suas classes, elas possuem uma estrutura básica muito consistente e semelhante. A região de ligação ao antígeno, que varia amplamente entre as

moléculas de anticorpos, é conhecida como Região Variável (V). Essa variabilidade permite o reconhecimento e ligação a uma ampla gama de antígenos (BRADEN & POLJAK, 1995). A região responsável pelas funções efetoras (biológicas) da molécula de anticorpo é denominada Região Constante (C) e, embora apresente cinco formas principais, ou isotipos, especializados na ativação de diferentes mecanismos efetores imunes, ela não apresenta a mesma variabilidade estrutural da região V (FABER *et al*, 1998).

A estrutura da imunoglobulina é responsável pela sua função graças à associação existente entre seus componentes. Ou seja, no terminal amina há as porções variáveis (V) da cadeia leve e da cadeia pesada. São as zonas responsáveis pela ligação ao antígeno. Já as porções constantes (C) da cadeia pesada e da cadeia leve são as responsáveis pelas atividades biológicas das imunoglobulinas como, por exemplo, ativação de linfócitos T, ativação do sistema complemento e promover a fagocitose (KIM *et al*, 1995).



**Figura 3 – Estrutura básica da molécula de anticorpo, mostrando detalhe da região de ligação com o antígeno (AMABIS E MARTHO, 2004).**

As células T auxiliam as células B na produção de anticorpos e podem eliminar patógenos intracelulares através da ativação de macrófagos e pelo aniquilamento de células infectadas. As células T também produzem citocinas que estimulam o crescimento de células B conduzindo, assim, a sua divisão e maturação para a produção de anticorpos (McHEYZER-WILLIAMS *et al*, 2003).

Existem dois tipos majoritários de células T efetoras, os linfócitos T auxiliares (*helper*) (Th) e os linfócitos T citotóxicos (Tc), que carregam em suas superfícies moléculas CD4 ou CD8, respectivamente. As células Th CD4+ são as orquestrantes da resposta imune, reconhecendo antígenos externos, e ativando

outros caminhos da resposta imune mediada por células a fim de erradicar o patógeno (DELVES & ROITT, 2000).

As células Th CD4<sup>+</sup> reconhecem antígenos ligados às moléculas MHC de classe II e apresentam dois subtipos, células Th1 e células Th2, que surgem de um precursor Th0 e são diferenciadas de acordo com as citocinas que produzem, pois morfológicamente são indistinguíveis (Figura 4) (BRADLEY *et al*, 2000). Contudo, a resposta gerada é muito diferente. Algumas linhagens de camundongos apresentam diferentes padrões de resposta celular Th1 e Th2, como é o caso dos camundongos C57BL/6 e BALB/c. Os camundongos da linhagem C57BL/6 desenvolvem preferencialmente resposta celular do tipo Th1 enquanto que a linhagem BALB/c prima pela resposta de células Th2 (PINCHUK & FILIPOV, 2008).

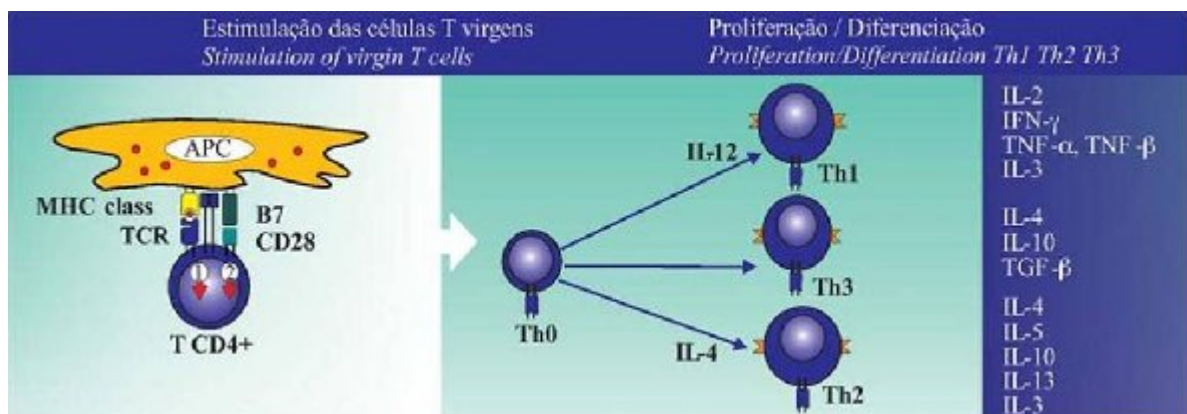


Figura 4 – Esquema com os subtipos de células Th CD4<sup>+</sup>. Imagem obtida de JANEWAY *et al*, (2002).

As citocinas são proteínas pequenas (15-25 kDa) liberadas por várias células do organismo, normalmente em resposta a um estímulo ativador e, induzem respostas por meio de ligações a receptores específicos (PARKIN & COHEN, 2001). A maioria das citocinas apresenta múltiplos efeitos biológicos, os quais dependem da célula-alvo, ou seja, células T, células B, macrófagos, células de tecidos, etc (SPRENT & SURH, 2002).

As células Th1 produzem a interleucina 2 (IL-2), que induz a proliferação das células T, incluindo aquelas células CD4+ da resposta autócrina. A interleucina 2 também estimula a divisão das células T CD8+ e sua citotoxicidade. Outra citocina produzida pelas células Th1 é o interferon- $\gamma$ , responsável pela ativação de macrófagos que eliminam patógenos intracelulares e ainda, induzem a citotoxicidade das células “natural killer”. Portanto, as citocinas produzidas pelas células Th1, são as principais responsáveis pela indução da resposta inflamatória (PARKIN & COHEN, 2001; CHANG, *et al*, 1990).

Existe um *feedback* positivo que se refere ao fato do interferon  $\gamma$  estimular as células Th0 a transformarem-se em células Th1 e, ao mesmo tempo, inibindo a diferenciação de células Th2. Estas últimas produzem as interleucinas 4, 5, 6 e 10, que favorecem a produção de anticorpos. A interleucina 4 induz as células B a produzir IgE, por exemplo, e também promove um *feedback* positivo ao favorecer a indução da resposta Th2 e suprimir a diferenciação de células Th1. Assim, a resposta Th2 está associada com doenças alérgicas (DELVES & ROITT, 2000; PARKIN & COHEN, 2001).

O mecanismo que controla a diferenciação das células Th CD4+ ainda não está bem definido, mas sabe-se que ele pode ser muito influenciado pelas citocinas presentes durante a fase proliferativa inicial da ativação das células T (JANEWAY *et al*, 2002).

Considerando a capacidade da radiação em modificar proteínas, melhorando seu potencial imunológico, e que estudos recentes indicaram a predominância de uma resposta de células Th1 para proteínas irradiadas (BAPTISTA *et al*, 2006), uma avaliação das principais citocinas envolvidas na resposta imunológica gerada contra uma proteína irradiada é de extrema importância, principalmente nos casos onde a substância é um mau imunógeno.



## II – OBJETIVOS

### Geral

Pesquisar as principais citocinas envolvidas no padrão de resposta de células Th1 ou Th2 em camundongos imunizados com a Bothropstoxina-1 (BTHX-1), uma miotoxina do veneno de *Bothrops jararacussu*, na forma nativa ou irradiada.

### Específicos

- Comparar a produção de anticorpos específicos após imunização com a BTHX-1 nativa ou irradiada entre as linhagens de camundongos B10.PL e BALB/c.
- Avaliar a produção de anticorpos específicos por parte de camundongos *Knockout-IFN $\gamma$ <sup>-/-</sup>*, após imunização com a BTHX-1 nativa ou irradiada.
- Avaliar a produção de anticorpos específicos em camundongos B10.PL e BALB/c, após imunização com a BTHX-1 nativa ou irradiada, na presença de substâncias *scavengers*.
- Quantificar a expressão das citocinas IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-4 e IL-10 em células esplênicas de camundongos B10.PL, BALB/c ou *Knockout-IFN $\gamma$ <sup>-/-</sup>*, imunizados com a BTHX-1 nativa ou irradiada.
- Quantificar a expressão das citocinas IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-4 e IL-10, em células esplênicas de camundongos B10.PL e BALB/c, imunizados com a BTHX-1 nativa ou irradiada, na presença de substâncias *scavengers*.

### III – MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Reagentes

Todos os reagentes utilizados neste projeto são de qualidade pró-análise e foram obtidos comercialmente.

#### 3.2 Animais

Camundongos isogênicos BALB/cJ, B10.PL (*Background* C57BL/10Sn) e *Knockout-IFN $\gamma$ <sup>-/-</sup>* (*Background* C57BL/6-*INF- $\gamma$ <sup>-/-</sup>* Ko) foram obtidos da colônia do Biotério do IPEN/CNEN/SP e mantidos em mini-isoladores com meio absorvente esterilizado, recebendo água e comida. Os ensaios seguiram as regras de cuidados de animais de laboratório (NIH publ. N° 86-23, revisado em 1985) e estiveram de acordo com os princípios de ética de experimentação animal (SBCAL/COBEA).

### 3.3 Purificação da BTHX-1

A BTHX-1 foi purificada do veneno total de *Bothrops jararacussu*, através de uma cromatografia de troca iônica, mais especificamente, de troca catiônica.

Para tanto, 60 mg do veneno total de *Bothrops jararacussu* cristalizado (Instituto Butantan) foi diluído em tampão fosfato de sódio 25 mM, pH 7,8 e centrifugado a 3000 g em uma micro centrífuga (Eppendorf<sup>®</sup>), por três minutos. O sobrenadante foi filtrado em uma membrana com poro de 0,22 µm e injetado em uma coluna de troca catiônica Resource-S de 1 mL, conectada a um sistema FPLC (Pharmacia<sup>®</sup>), previamente equilibrada com tampão fosfato de sódio 25 mM, pH 7,8 (tampão A). O tampão B era constituído de fosfato de sódio 25 mM/NaCl 2M, pH 7,8. Após a injeção, a coluna foi lavada com 10 mL de tampão B 7,5%, com um fluxo de 2,5 mL/minuto para eluição da fração não adsorvida à matriz. Em seguida, iniciou-se um gradiente linear (1%/mL) do tampão B, por 25 mL. Então, a coluna foi regenerada com 10 mL de tampão B, seguidos de 10 mL de A. A absorbância do eluato foi monitorada em 280 nm (SPENCER *et al*, 1998).

### 3.4 Cálculos das concentrações dos scavengers

Para os referidos cálculos, levou-se em consideração que a concentração relativa entre os produtos formados (na radiólise da água) e os *scavengers* é igual a 1 (um), isto é, para cada molécula de radical livre formada, haverá uma molécula de *scavenger* atuando no meio.

Da seguinte maneira:

De Gy para ev:

$$1 \text{ Gy} — 6,6 \times 10^{15} \text{ ev}$$

$$2000 \text{ Gy} — 1,32 \times 10^{19} \text{ ev}$$

$$100 \text{ ev} — 2,7 \text{ e}^- \text{ aq}$$

$$1,32 \times 10^{19} \text{ ev} — 3,56 \times 10^{17} \text{ e}^- \text{ aq}$$

$$100 \text{ ev} — 3,2 \text{ OH}\cdot$$

$$1,32 \times 10^{19} \text{ ev} — 4,22 \times 10^{17} \text{ OH}\cdot$$

Irradiação de 2kGy:

1 mol –  $6,02 \times 10^{23}$  moléculas

X mol –  $3,56 \times 10^{17} e^-_{aq.}$ ; portanto, a concentração do *scavenger* para elétron aquoso é de 0,60  $\mu$ M.

1 mol –  $6,02 \times 10^{23}$  moléculas

X mol –  $4,22 \times 10^{17} OH\cdot$ ; portanto, a concentração do *scavenger* para radical hidroxila é de 0,70  $\mu$ M.

### 3.5 Irradiação das Proteínas

A bothropstoxina-1 (BTHX-1) (2mg/mL) em solução salina, na presença ou não de substâncias *scavengers*, foi submetida à ação de raios gama de uma fonte de  $^{60}\text{Co}$  (GammaCell<sup>®</sup>, Atomic Agency of Canada Ltd) a uma dose de 2000 Gy, com taxa de dose de 3,51 kGy/hora. Todo o processo de irradiação foi desenvolvido sem a utilização de atenuador, de forma homogênea, na presença de oxigênio, e uma amostra controle foi mantida fora do irradiador durante todo o tempo de tratamento.

### 3.6 Eletroforese (SDS-PAGE)

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

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

### 3.7 Produção de anticorpos específicos contra a BTHX-1 nativa ou irradiada

Anticorpos antiproteínas, específicos, foram obtidos pela imunização de camundongos (BALB/c, B10.PL e *Knockout-IFN- $\gamma$ <sup>-/-</sup>*) com amostras de BTHX-1, nativa ou irradiada, com ou sem substâncias *scavengers*, seguindo o método clássico de imunização preconizado por HARLOW & LANE (1988) com ligeiras modificações. Foram utilizados de 5 a 7 animais por grupo.

Durante todo o processo os camundongos foram inoculados, via subcutânea, no dorso, com soluções de 20 $\mu$ g/mL (4  $\mu$ g/animal) de cada amostra de proteína, diluída em solução salina 0,9%. Passados 15 dias do primeiro inóculo, procedeu-se a coleta de sangue dos animais através do plexo retro-orbital, com o objetivo de pesquisar anticorpos específicos no plasma. Após a 1<sup>a</sup> coleta de sangue realizou-se o 2<sup>o</sup> inóculo e, após 7 dias do mesmo, procedeu-se nova coleta. Seguiu-se o mesmo intervalo de tempo para a coleta após o 3<sup>o</sup> inóculo.

O sangue dos animais foi colhido em tubos cônicos Eppendorf<sup>®</sup> de 1,5 mL, contendo 5 $\mu$ L de heparina (Liquemine - ROCHE<sup>®</sup>), para evitar a coagulação. O plasma foi separado dos elementos figurados do sangue por centrifugação (Eppendorf<sup>®</sup> Centrifuge 5810 R) (500 g, 10 minutos), imediatamente aliquotado e estocado (freezer -80°C).

### 3.8 ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay)

O plasma, obtido dos animais imunizados com a BTHX-1, na forma nativa ou irradiada, na presença ou não de substâncias *scavengers*, foi submetido ao ensaio de ELISA a fim de pesquisar-se a presença de anticorpos decorrente do processo de imunização e a reatividade das proteínas, na forma nativa, com os mesmos. Para tanto, o ELISA foi feito em micro placas, às quais era adsorvida a proteína purificada (1,0µg/poço/100µl), em tampão carbonato/bicarbonato pH 9,6, *overnight* a 4°C. Após sucessivas lavagens com PBS contendo 0,5% de Tween 20, eventuais sítios de ligação foram bloqueados com solução de bloqueio (PBST + Leite-3g/100mL) por 1 hora, à 37°C. Após novas lavagens, o plasma foi diluído, adicionado às placas e incubado por 1 hora, a 37°C. Seguindo a fase de lavagem acima descrita, os conjugados de peroxidase com IgG total, IGg1 e IGg2b de camundongo, diluídos a 1/10000 em solução de bloqueio, foram adicionados nos poços predeterminados e incubados por 1 hora, à 37°C. As últimas lavagens foram seguidas pela adição de cromógeno OPD (o-fenil-n-diamine), 0,5mg/mL de tampão citrato de sódio/ácido cítrico (0,05 M e pH 5,0), contendo 10µL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> à 30%, adicionado no momento do uso. A reação foi interrompida pela adição de 50µL de ácido cítrico 0,2M por poço e a absorvância, a 450nm, foi determinada em leitor de micro placas. Os resultados foram expressos arbitrariamente em Índice de Reatividade (IR).



### **3.8.1 Índice de Reatividade (IR)**

O cálculo do Índice de Reatividade foi realizado através da razão entre a média dos valores de absorvância obtidos para as amostras dos animais imunizados, pela média dos valores de absorvância das amostras do grupo controle (não imunizado).

### 3.9 Cultivo de Células Esplênicas

Realizou-se o cultivo de células esplênicas a fim de obter-se o RNA dos esplenócitos de camundongos imunizados com a BTHX-1 nativa ou irradiada.

O conteúdo do baço, retirado de camundongos BALB/c, B10.PL e *knockout- $\text{INF}\gamma^{-/-}$*  (2 a 3 animais por grupo) de forma estéril, foi lavado e homogeneizado com meio de cultura RPMI 1640 com 10% de SFB (soro fetal bovino) suplementado com antibióticos e transferido para tubos cônicos (Falcon®) de 15 mL. Em seguida, esses tubos foram submetidos à centrifugação, em centrífuga CELM LS-3 plus, a 840 g, por 15 minutos. Posteriormente, trabalhando em fluxo laminar, o sobrenadante foi descartado, o *pellet* foi homogeneizado com 5 mL de solução de lise [cloreto de amônio 0,16M/Tris (hidroximetil) aminometane 0,17M] para romper as hemácias e novamente submetido à centrifugação. Após a mesma, o sobrenadante foi descartado e o *pellet*, onde estavam os esplenócitos, foi homogeneizado com meio de cultura. Então, essa solução foi diluída para uma concentração de 1/1000 e procedeu-se a contagem das células em câmara de Neubauer. A concentração de células utilizada foi de  $2 \times 10^7$  células/mL, sendo  $2 \times 10^6$  células/poço. Então, estas últimas foram aplicadas em placas de 24 poços na presença da BTHX-1 (5µg/poço) nativa ou irradiada, na presença ou não das substâncias *scavengers*. Alguns poços foram mantidos sem antígeno. As placas foram incubadas em estufa de 5% de CO<sub>2</sub>, a 37° C por 72 horas.

### **3.10 Avaliação da expressão relativa de IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-4 e IL-10, em esplenócitos murinos, por Real-Time PCR**

#### **3.10.1 Extração e quantificação de RNA**

Passadas as 72 horas de incubação, conforme descrito no item 3.9, as células foram homogeneizadas no reagente Trizol<sup>®</sup> (Invitrogen<sup>®</sup>) e mantidas até o momento da extração a -80 °C. O RNA foi extraído seguindo as especificações do fabricante sendo suas concentrações determinadas por leitura da absorvância a 260, 280 e 320 nm em espectrofotômetro Ultrospec300<sup>®</sup> (Pharmacia Biotech<sup>®</sup>).

#### **3.10.2 Síntese de cDNA**

As bibliotecas de cDNA foram sintetizadas por transcrição reversa a partir de 5  $\mu$ g de RNA total utilizando M-MLV RT e Oligo(dT)<sub>12-18</sub> (Invitrogen<sup>®</sup>). As amostras de cDNA foram mantidas em freezer -20°C até a realização dos ensaios de *real-time* PCR.

### 3.10.3 Confecção dos primers e eficiência de detecção

Todos os *primers* utilizados foram desenhados utilizando o *software* Primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu/>) e as seqüências obtidas no banco de dados NCBI Nucleotide Databases (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Para o ensaio de *real-time* PCR, todos os *primers* foram testados e as reações padronizadas, sendo a eficiência da reação determinada pela fórmula:

$$E = (10^{(-1/\text{slope})} - 1) \times 100$$

Todos os *primers* utilizados apresentaram eficiência igual ou superior a 90%, de acordo com a tabela abaixo:

**Tabela 1:** Seqüência dos *primers* para IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-4, IL-10,  $\beta$ -actina e respectiva eficiência da reação obtida na padronização do *real-time* PCR.

Primers		Seqüências	Produto (bp)	Eficiência
IFN- $\gamma$	Sense	5'-GTCCAGCGCCAAGCATTCAA-3'	391	90%
	Antisense	5'-GTCCCCCACCACCAGATACA-3'		
IL-2	Sense	5'-TGGAGCAGCTGTTGATGGAC-3'	363	93%
	Antisense	5'-GAGGGCTTGTTGAGATGATGCT-3'		
IL-4	Sense	5'-ACCCCCAGCTAGTTGTCATC-3'	307	94%
	Antisense	5'-CGAAAAGCCCGAAAGAGTC-3'		
IL-10	Sense	5'-CTCAGTTCCCATTCTATTTATTCAC-3'	336	92%
	Antisense	5'-GGATCTCCCTGGTTTCTCTTC-3'		
$\beta$ -actina	Sense	5'-TGGAATCCTGTGGCATCCATGAAAC-3'	349	91%
	Antisense	5'-TAAAACGCAGCACAGTAACAGTCCG-3'		

#### **3.10.4 Condições da reação e análise dos resultados**

Os ensaios de *real-time* PCR foram realizados no ABI Prism 7300 Sequence Detection System<sup>®</sup> (Applied Biosystems<sup>®</sup>), utilizando Power SYBR<sup>®</sup> Green PCR Master Mix (Applied Biosystems<sup>®</sup>) seguindo protocolo do fabricante.

O termo-ciclador foi programado para realizar 95°C por 10 minutos, 40 repetições de 95°C por 15 segundos e 60°C por um minuto e seguido de um passo de denaturação.

Os resultados foram expressos em valores de Ct (*cycle threshold* – número de ciclos necessários para atingir o limiar de detecção). Todas as amostras foram testadas em duplicatas. Para a análise quantitativa foi adotada a mesma quantidade de cDNA em todas as reações e utilizou-se a média dos valores de Ct obtidos das duplicatas.

Para o cálculo da expressão gênica relativa foi utilizado o método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ , onde  $\Delta\Delta Ct$  foi obtido pela razão entre o  $\Delta Ct$  dos animais imunizados e o  $\Delta Ct$  dos animais do grupo controle, como descrito por LIVAK *et al.*, 2001.

## IV – RESULTADOS

### 4.1 Eletroforese (SDS-PAGE)

A eletroforese em gel de poliacrilamida a 15%, da bothropstoxina-1, nativa ou irradiada, na presença ou não das substâncias *scavengers* indicou que no caso da BTHX-1 irradiada sem *scavengers* (Figura 5, linha B), houve a formação de bandas de maior peso molecular. Por outro lado, observou-se que a BTHX-1 nativa sem *scavengers* (Figura 5, linha A), mesmo em presença do agente redutor ( $\beta$ -mercaptoetanol), não houve a dissociação das subunidades que formam o homodímero. Analisando a BTHX-1 irradiada na presença do  $\text{NaNO}_3$  ou do t-butanol (Figura 5, linhas D e F), observou-se também a formação de produtos de maior peso molecular, contudo houve preservação da banda principal (14 kDa) mesmo após a radiação.

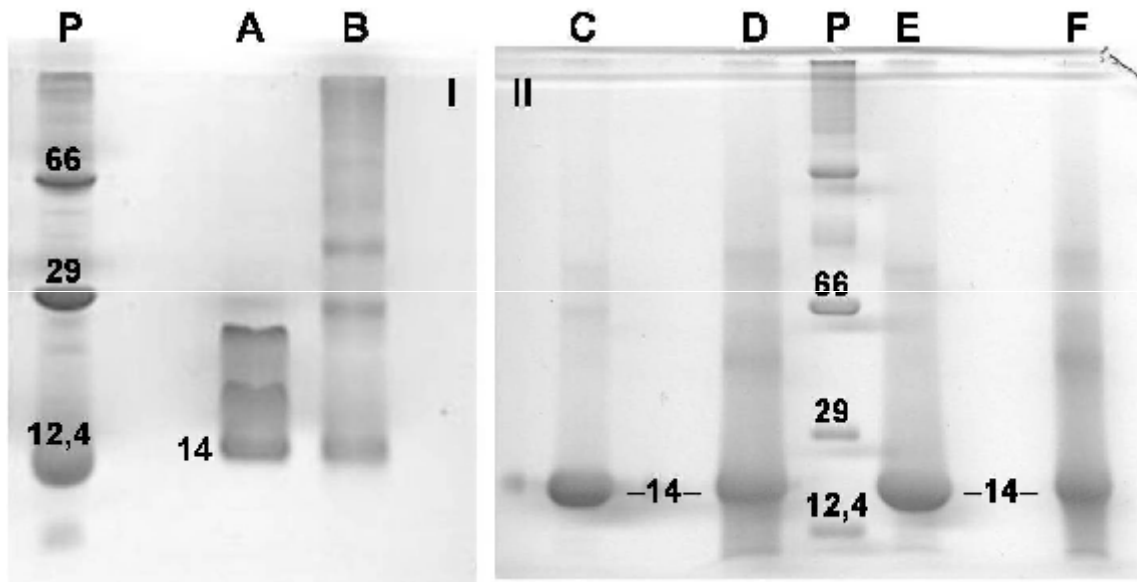


Figura 5 – Eletroforese em gel de poliacrilamida 15%, em condições redutoras. (A) BTHX-1 nativa sem *scavengers*; (B) BTHX-1 irradiada sem *scavengers*; (C) BTHX-1 nativa+NaNO<sub>3</sub>; (D) BTHX-1 irradiada+NaNO<sub>3</sub>; (E) BTHX-1 nativa+t-butanol; (F) BTHX-1 irradiada+t-butanol; Padrão de peso molecular (P).

## 4.2 Produção de Anticorpos

O ELISA foi realizado a fim de se pesquisar a presença de anticorpos obtidos no processo de imunização de camundongos B10.PL, BALB/c ou *Knockout*-IFN- $\gamma^{-/-}$ , com a BTHX-1 nativa ou irradiada, na presença ou não dos scavengers t-butanol e nitrato de sódio (NaNO<sub>3</sub>).

O resultado na Figura 6, mostrou que a produção de anticorpos específicos contra a BTHX-1, nativa ou irradiada, por parte dos camundongos B10.PL, bem como pelos BALB/c, foi bastante semelhante. Ou seja, em ambas as linhagens de camundongos a BTHX-1, nativa ou irradiada, foi capaz de induzir a produção de anticorpos e os mesmo foram responsivos, tanto para IgG total, como para as subclasses IgG1 e IgG2b (Figuras 7 e 8, respectivamente).



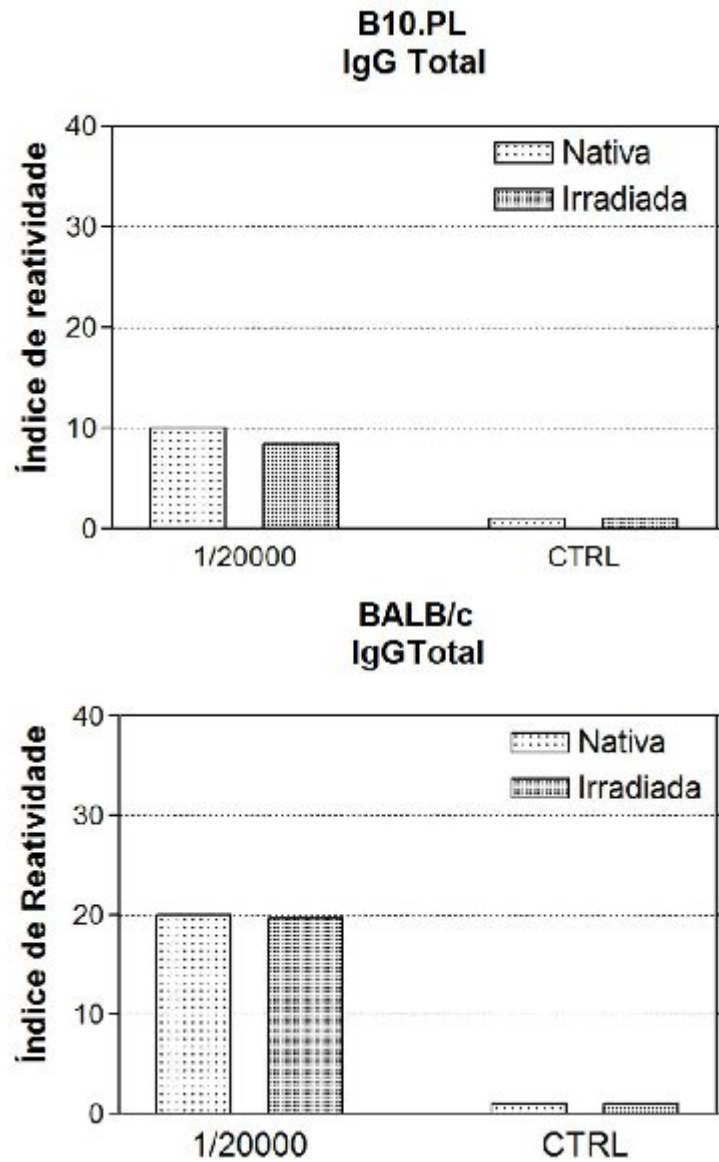
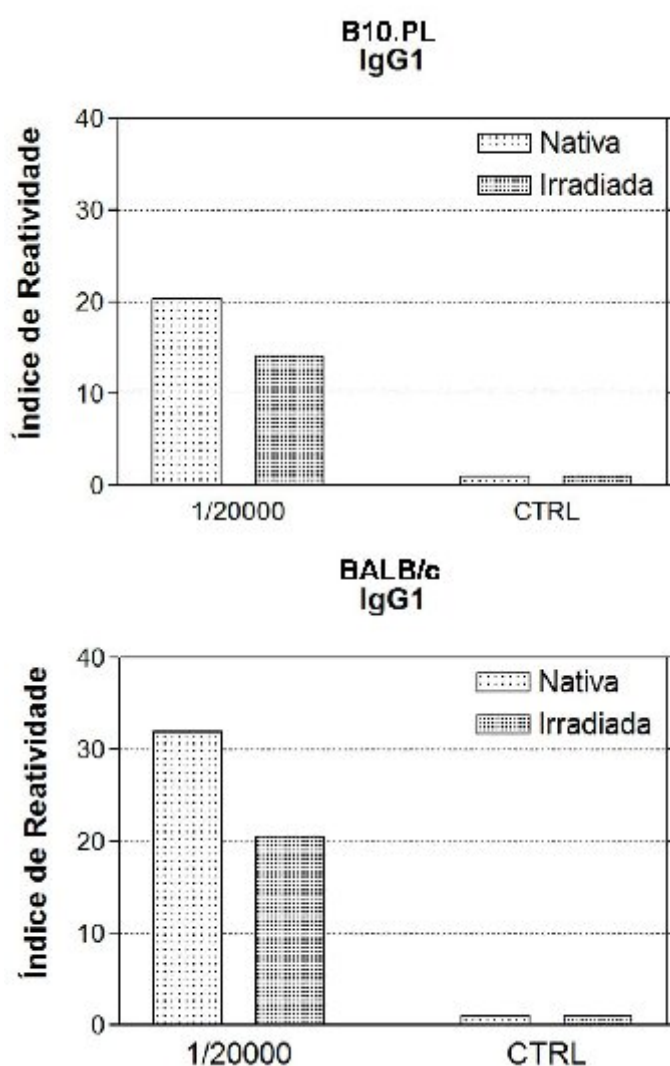


Figura 6 - Ensaio imunoenzimático para a avaliação da produção de anticorpos IgGTotal contra BTHX-1 nativa ou irradiada, por camundongos B10.PL e BALB/c. n= 5 animais/grupo.

Na Figura 7, observa-se que para ambos as linhagens de animais a BTHX-1 nativa induziu maior produção de IgG1 em relação à toxina na forma irradiada, ao passo que esta última induziu maior produção de IgG2b (Figura 8), quando comparada à forma nativa da toxina.



**Figura 7 - Ensaio imunoenzimático para a avaliação da produção de anticorpos específicos (IgG1) contra BTHX-1 nativa ou irradiada, por camundongos B10.PL e BALB/c. n= 5 animais/grupo.**

Ainda na Figura 8, no caso dos camundongos B10.PL, podemos observar que a produção de IgG2b foi cerca de quatro vezes maior quando os animais foram imunizados com a BTHX-1 irradiada.

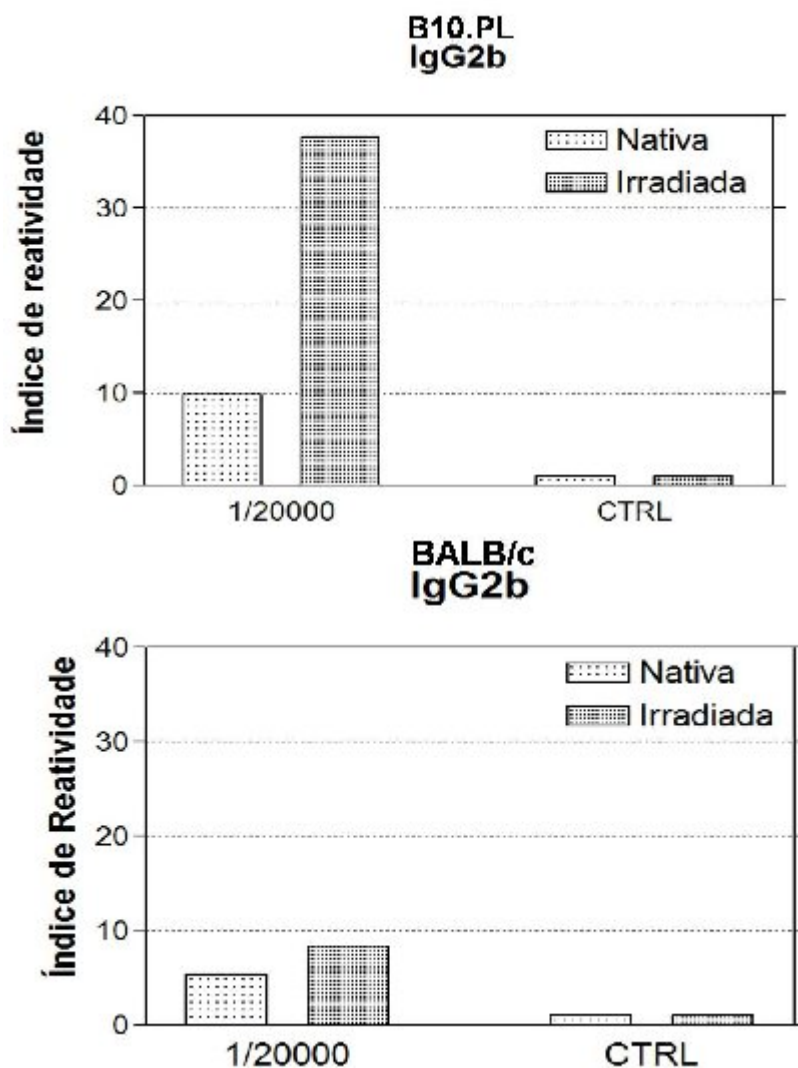


Figura 8 - Ensaio imunoenzimático para a avaliação da produção de anticorpos específicos (IgG2b) contra BTHX-1 nativa ou irradiada, por camundongos B10.PL e BALB/c. n= 5 animais/grupo.

Na Figura 9 observa-se que os anticorpos produzidos contra a BTHX-1 irradiada, em camundongos *Knockout-IFN- $\gamma$ <sup>-/-</sup>*, foram capazes de reconhecer a forma nativa da toxina. Para a dosagem de subclasses, observa-se que a BTHX-1 nativa apresentou títulos de anticorpos superiores para a dosagem de IgG1, em relação à dosagem de IgG2b, como também foi observado anteriormente para os camundongos B10.PL e BALB/c. Para os camundongos *Knockout-IFN- $\gamma$ <sup>-/-</sup>* a forma irradiada da toxina mostrou dosagem cerca de 2,5 vezes maior para IgG2b em relação à IgG1.

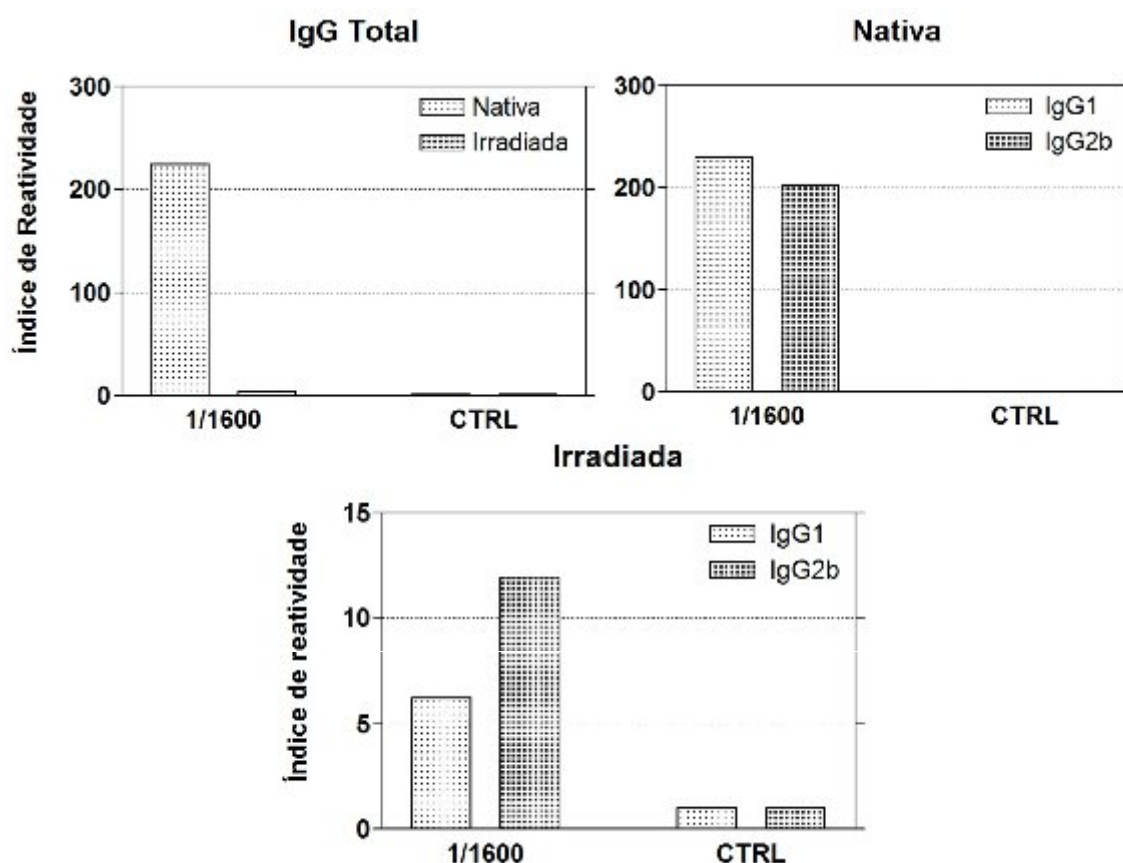


Figura 9 - Ensaio imunoenzimático para a avaliação da produção de anticorpos específicos contra BTHX-1 nativa ou irradiada, por camundongos *Knockout-IFN- $\gamma$ <sup>-/-</sup>*. n= 7 animais/grupo.

Nas Figuras 10 e 11 observa-se que a BTHX-1, nativa ou irradiada, na presença ou não de *scavengers*, foi capaz de induzir a produção de anticorpos. Observa-se ainda, que a BTHX-1 irradiada, na presença ou não dos *scavengers*, foi imunogênica e os anticorpos formados foram capazes de reconhecer a forma nativa da toxina. Observa-se, ainda na Figura 10, uma discreta diminuição no título de anticorpos, quando a toxina foi irradiada em presença do t-butanol e do NaNO<sub>3</sub>, quando comparada à BTHX-1 irradiada sem *scavengers*.

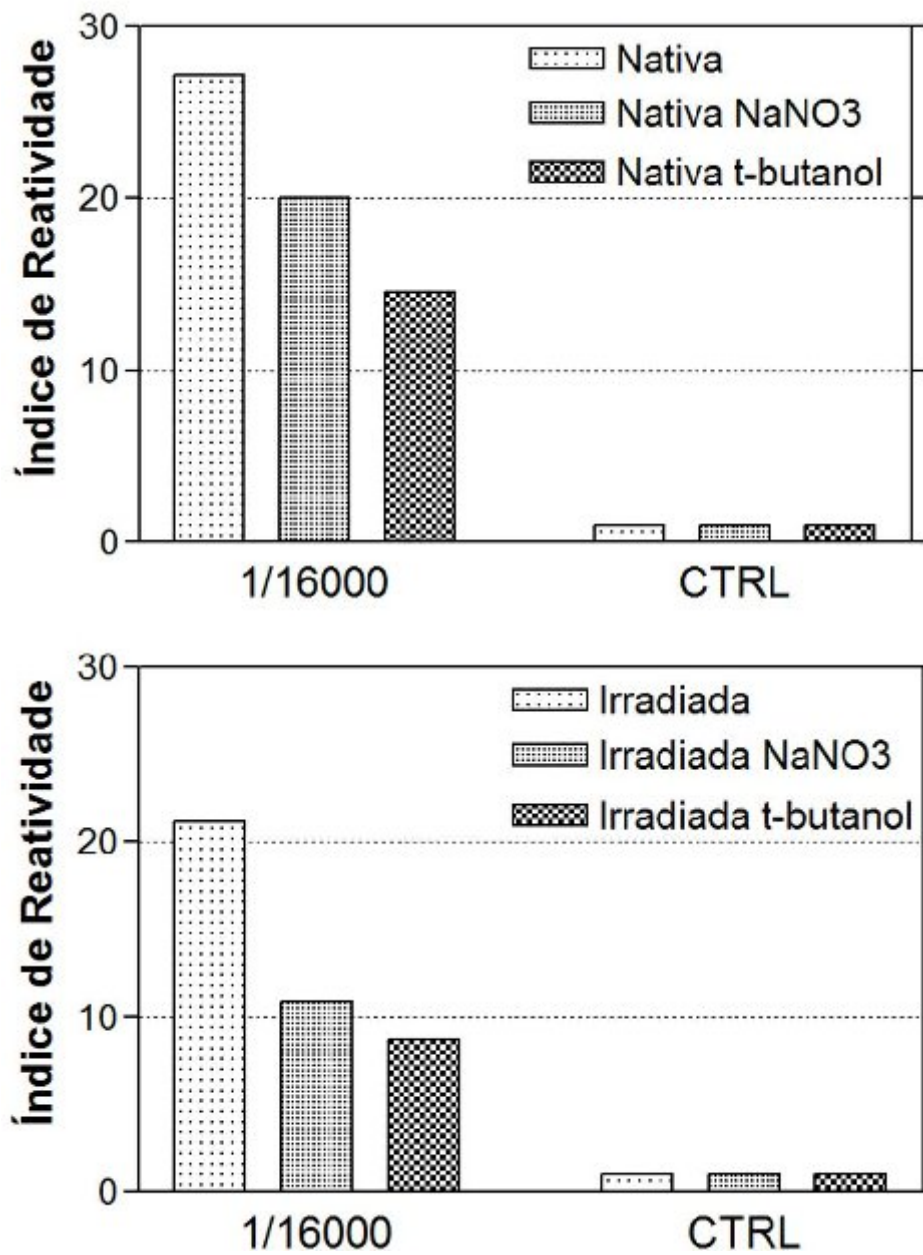


Figura 10 - Produção de anticorpos específicos (IgG total) contra BTHX-1 nativa ou irradiada, com ou sem *scavengers*, em camundongos B10.PL. n= 5 animais/grupo.

No caso dos camundongos BALB/c (Figura 11) houve uma diminuição na produção de anticorpos quando a BTHX-1 foi irradiada na presença do t-butanol, em relação à toxina irradiada na presença do NaNO<sub>3</sub>.

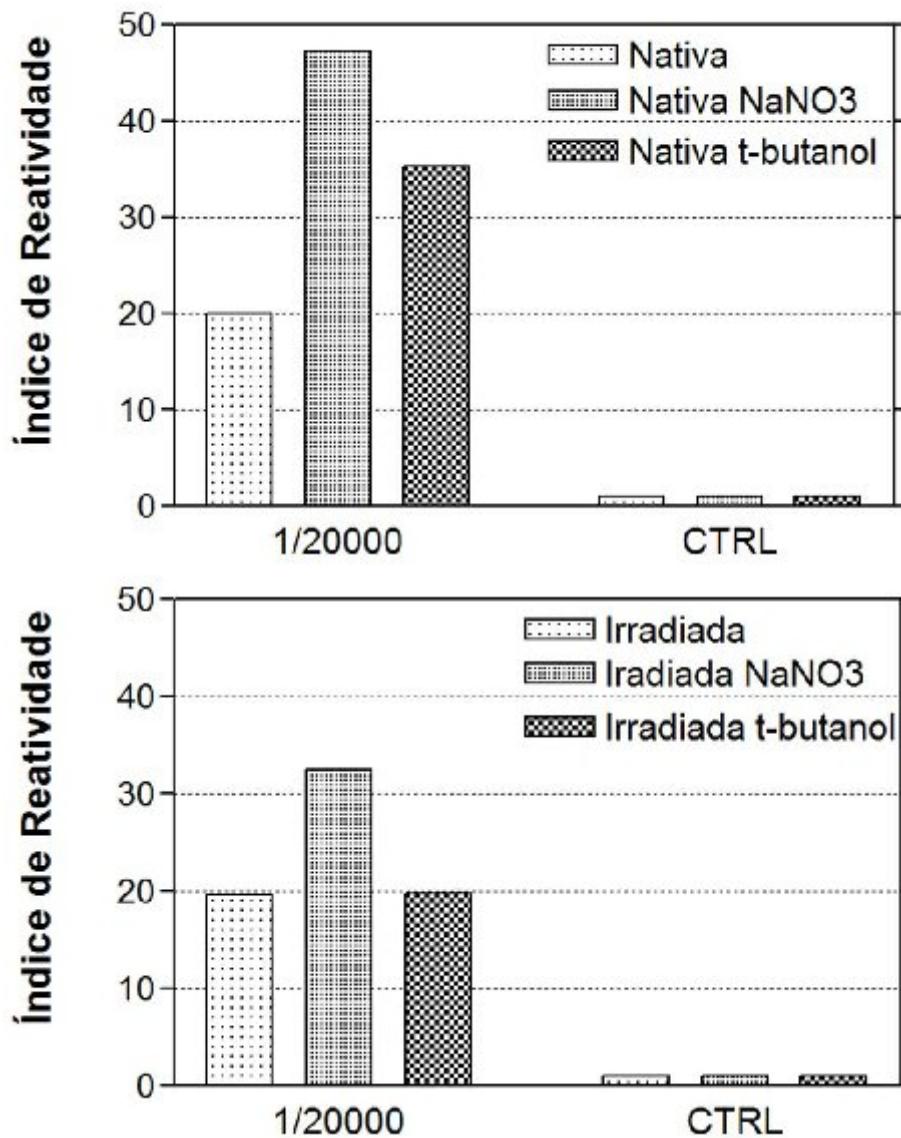


Figura 11 - Produção de anticorpos específicos (IgG total) contra BTHX-1 nativa ou irradiada, com ou sem *scavengers*, em camundongos BALB/c. n= 5 animais/grupo.

Na Figura 12 observa-se que a produção de anticorpos contra a BTHX-1 nativa e também contra a irradiada, na presença de *scavenger*, por camundongos B10.PL, apresentou títulos de anticorpos superiores para a dosagem de IgG1, em relação à dosagem de IgG2b. O mesmo foi observado na Figura 13 para os camundongos BALB/c.

No caso dos camundongos B10.PL (Figura 12), a indução da produção de anticorpos IgG2b, pela BTHX-1 irradiada, foi cerca de 2 vezes maior na presença do  $\text{NaNO}_3$  do que na presença do t-butanol.



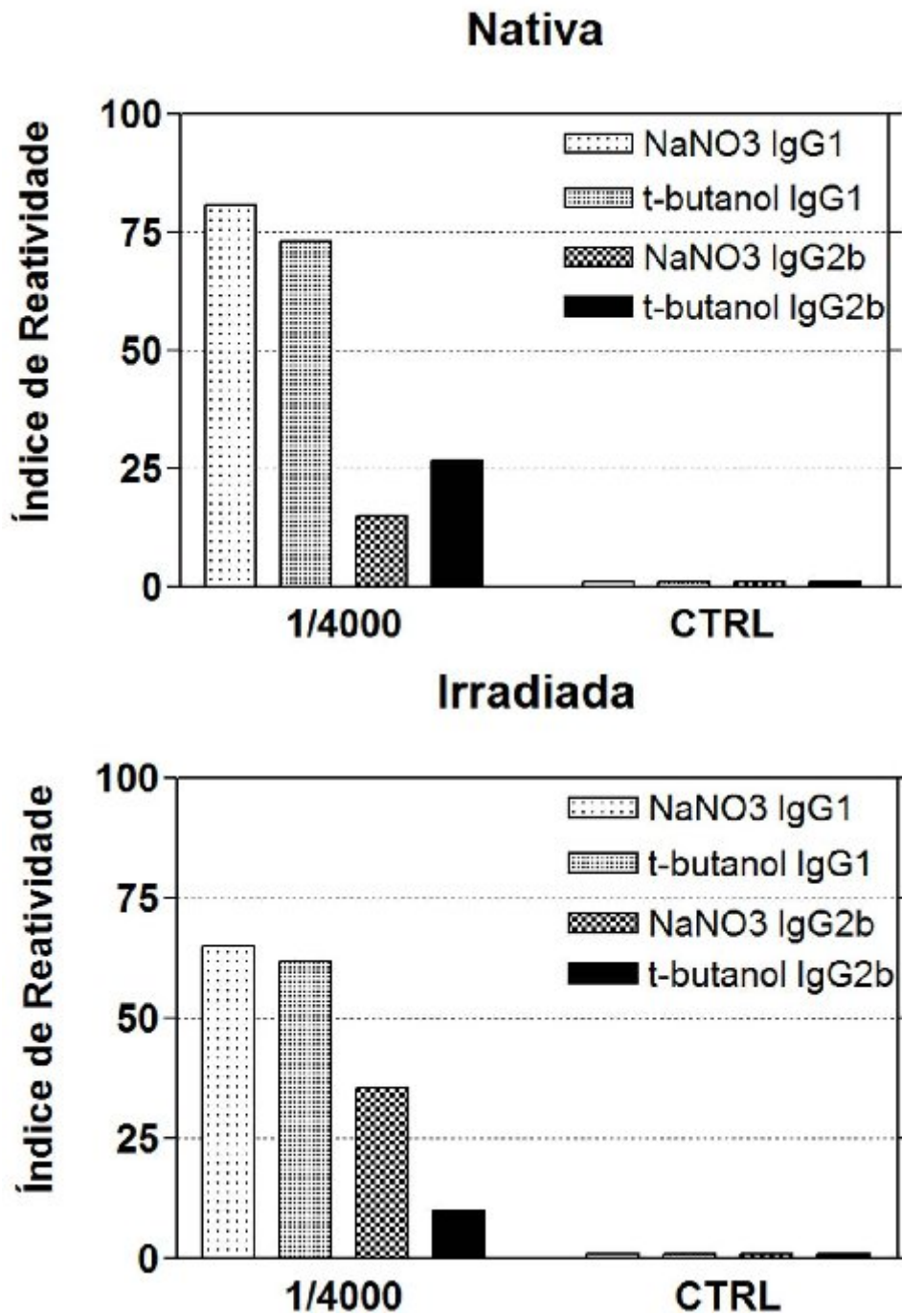


Figura 12 - Produção de anticorpos específicos (IgG1 e IgG2b) em camundongos B10.PL, contra a BTHX-1, nativa ou irradiada, na presença dos scavengers. n= 5 animais/grupo.

Os camundongos BALB/c (Figura 13) também apresentaram maior produção de IgG2b quando foram imunizados com a BTHX-1 na presença do NaNO<sub>3</sub>, em relação à toxina irradiada na presença do t-butanol, bem como em relação a toxina nativa.

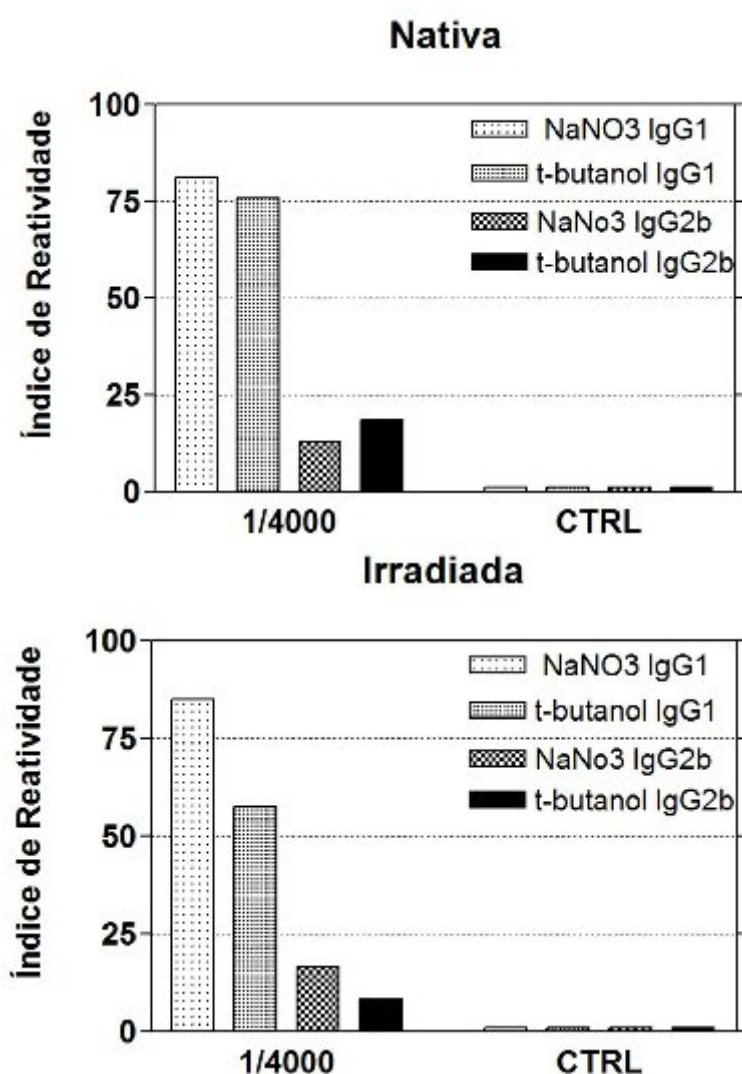


Figura 13 - Produção de anticorpos específicos (IgG1 e IgG2b) em camundongos BALB/c, contra a BTHX-1, nativa ou irradiada, na presença dos scavengers. n= 5 animais/grupo.

### 4.3 Quantificações relativas das citocinas em esplenócitos murinos

Para a quantificação da expressão das citocinas IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-4 e IL-10 em células esplênicas obtidas de camundongos B10.PL, BALB/c ou *Knockout-IFN- $\gamma$ <sup>-/-</sup>*, foi realizado o Real-time PCR. Todos os valores foram obtidos em curvas de determinação da qualidade de cópias (Ct) e em seguida foi calculada a variação da expressão gênica através da comparação com a expressão de  $\beta$ -actina.

Na Figura 14 observa-se que as células esplênicas obtidas de camundongos B10.PL imunizados com a BTHX-1 nativa e, estimuladas *in vitro* com a forma irradiada da toxina, apresentaram maior expressão de IFN- $\gamma$  (padrão de resposta de células TH1). Células esplênicas obtidas dos animais imunizados com a BTHX-1 irradiada e, estimuladas *in vitro* com a forma irradiada da toxina apresentaram expressão basal de IFN- $\gamma$ , IL-2 e IL-10. Na Figura 15 observa-se que para as células dos camundongos BALB/c também houve maior expressão das citocinas envolvidas na resposta de células Th1 (IFN- $\gamma$  e IL-2).

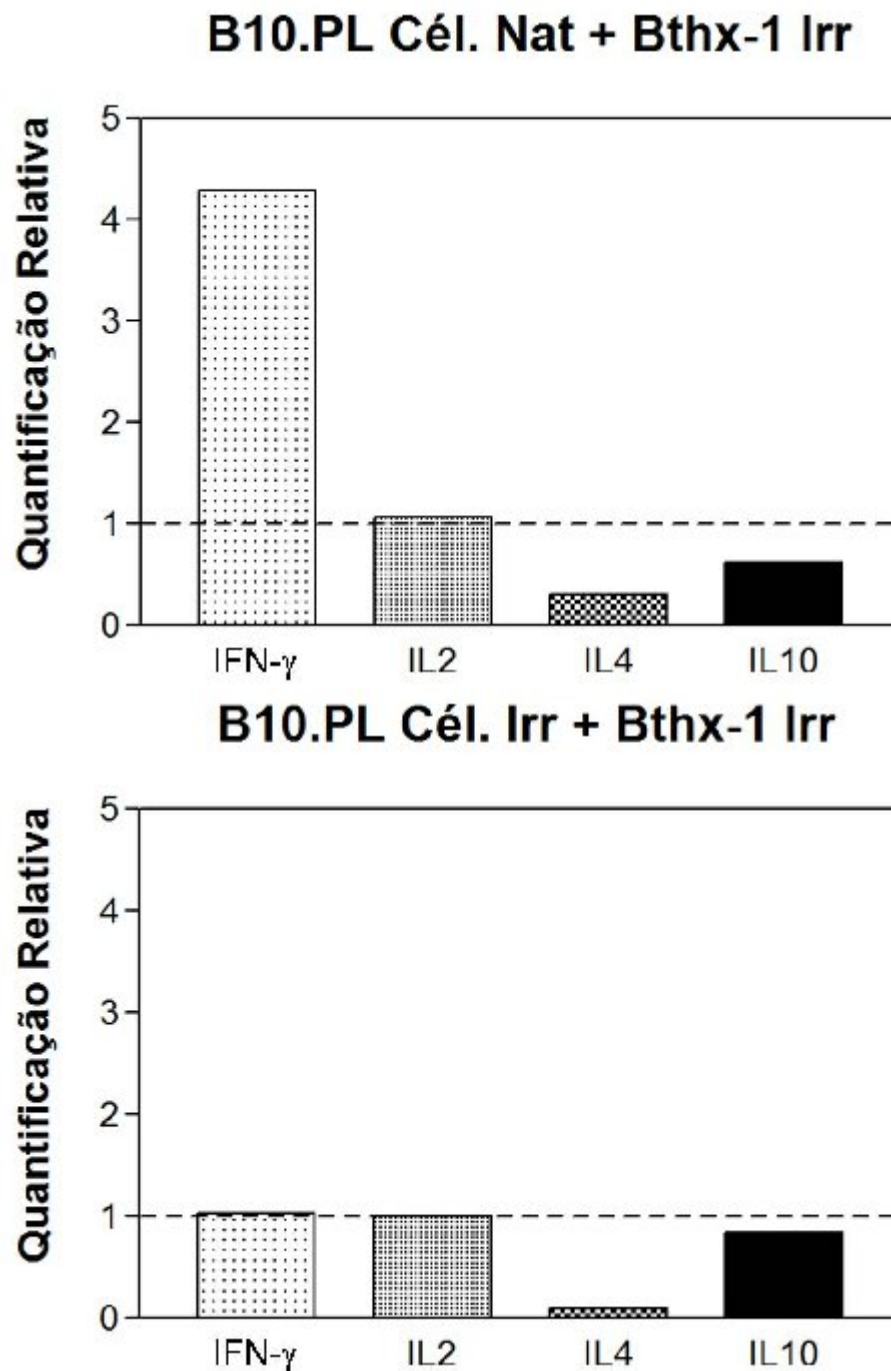


Figura 14 – Real Time-PCR : IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-4 e IL-10 de células esplênicas, de camundongos B10.PL, imunizados com a BTHX-1 nativa ou irradiada. Linha tracejada representa a expressão basal do controle ( $\beta$ -actina).

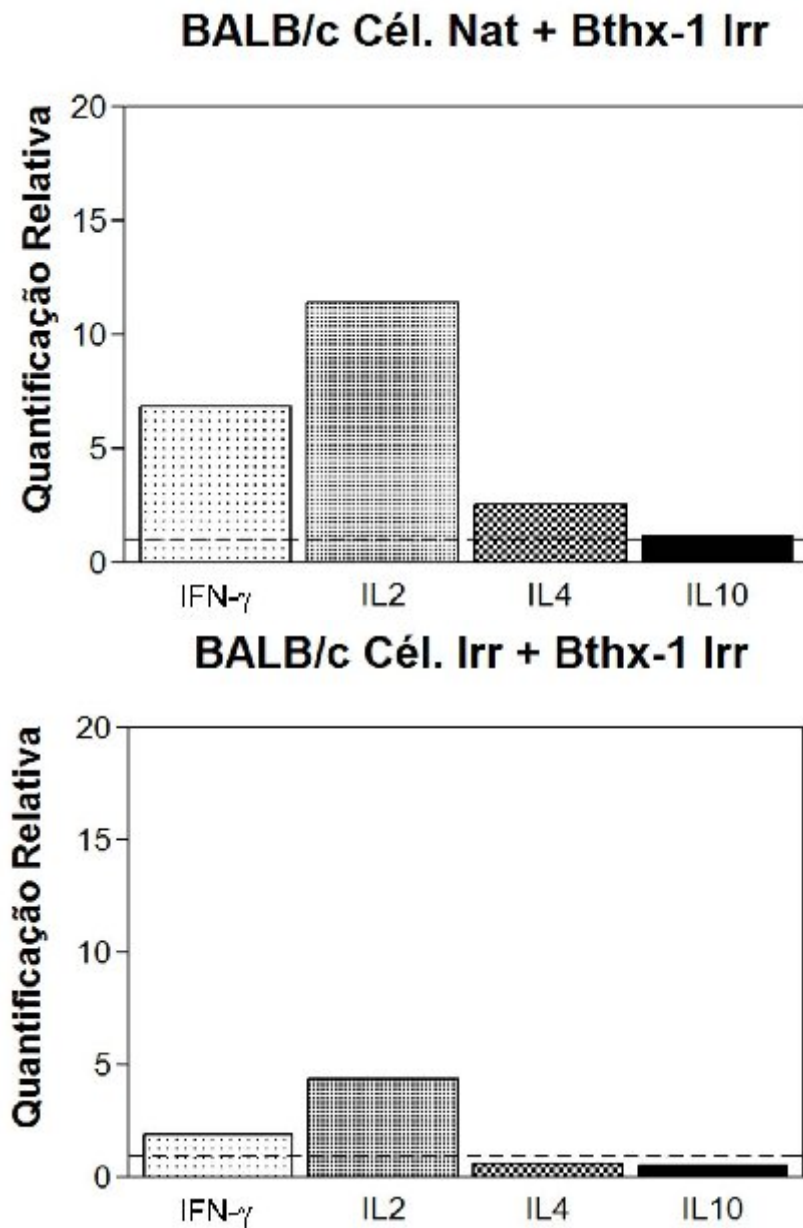


Figura 15 – Real Time-PCR : IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-4 e IL-10 de células esplênicas, de camundongos BALB/c, imunizados com a BTHX-1 nativa ou irradiada. Linha tracejada representa a expressão basal do controle ( $\beta$ -actina).

Na Figura 16 observa-se que as células esplênicas obtidas de camundongos *Knockout-IFN- $\gamma$ <sup>-/-</sup>* imunizados com a BTHX-1 nativa, apresentaram maior expressão de IL4 (resposta de células TH2) em relação às demais citocinas avaliadas. Nas células obtidas dos camundongos imunizados com a BTHX-1 irradiada, não houve detecção de expressão das citocinas em estudo.

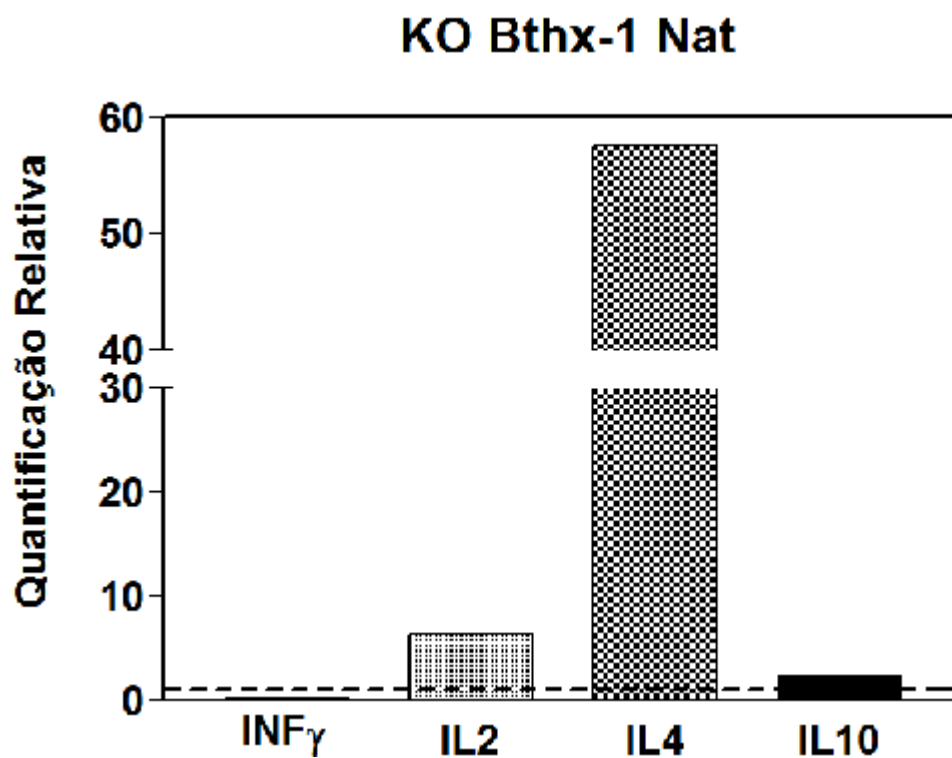


Figura 16 – Real Time-PCR : IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-4 e IL-10 de células esplênicas, de camundongos *Knockout-IFN- $\gamma$ <sup>-/-</sup>*, imunizados com a BTHX-1 nativa. Linha tracejada representa a expressão basal do controle ( $\beta$ -actina).

Na Figura 17 observa-se que as células esplênicas dos camundongos B10.PL imunizados com a BTHX-1 irradiada na presença do *scavenger* nitrato de sódio (D) apresentaram maior expressão de IFN- $\gamma$ , quando comparada à expressão das células dos animais imunizados com a toxina irradiada na presença do t-butanol (B). Estas últimas, por sua vez, apresentaram maior expressão de IL-4.

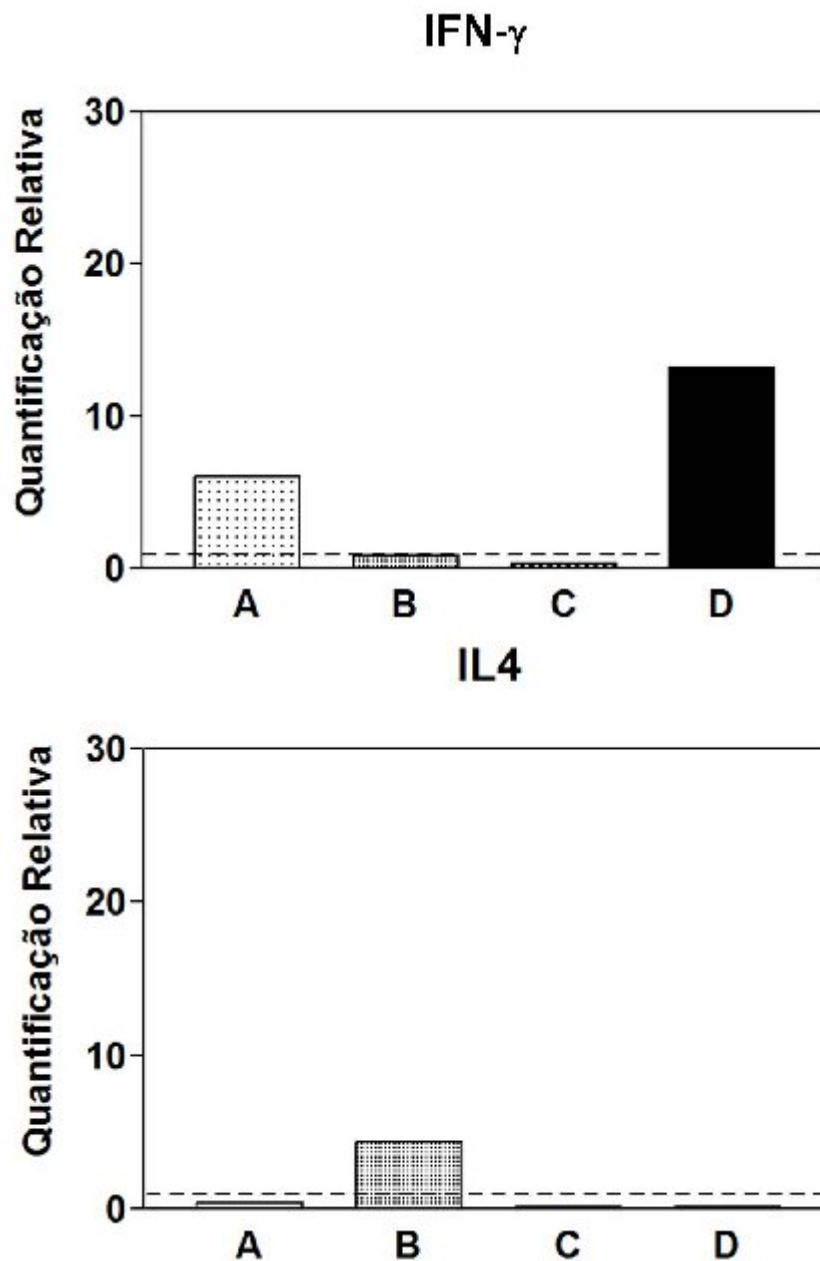


Figura 17 – Real Time-PCR: IFN- $\gamma$ , IL-4 de células esplênicas, de camundongos B10.PL, imunizados com a BTHX-1 nativa ou irradiada, na presença dos *scavengers* t-butanol e Nitrato de Sódio. A: BTHX-1 nativa + t-butanol; B: BTHX-1 irradiada + t-butanol; C: BTHX-1 nativa + Nitrato de sódio; D: BTHX-1 irradiada + Nitrato de sódio. Linha tracejada representa a expressão basal do controle ( $\beta$ -actina).



No caso das células esplênicas obtidas de camundongos BALB/c (Figura 18), observa-se que houve maior expressão de IL-2 e IL-10 quando as células foram estimuladas *in vitro* com a BTHX-1 irradiada na presença do t-butanol (B). Por outro lado, a BTHX-1 irradiada na presença do nitrato de sódio (D), induziu maior expressão de IFN- $\gamma$ , em relação à toxina irradiada na presença do t-butanol. Não foi detectada a expressão da citocina IL-4.

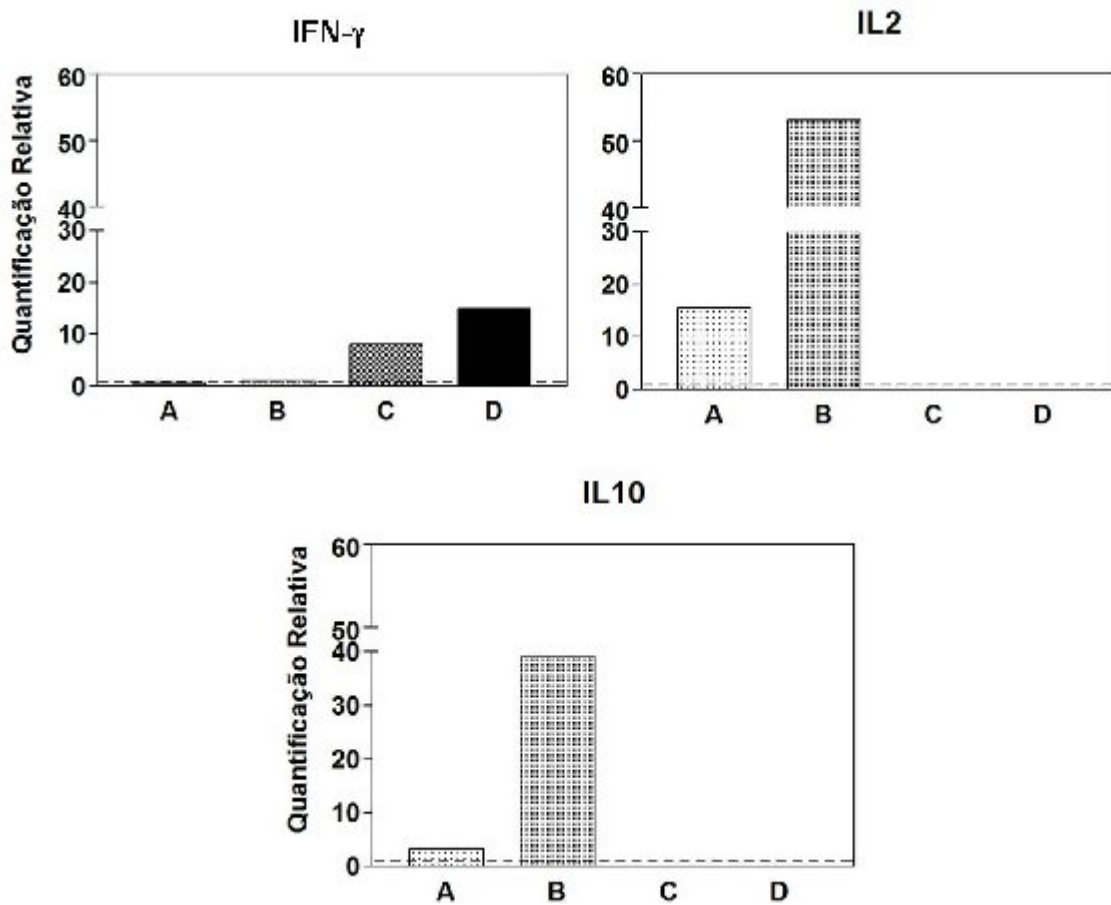


Figura 18 – Real Time-PCR: IFN- $\gamma$ , IL-2 e IL-10 de células esplênicas, de camundongos BALB/c, imunizados com a BTHX-1 nativa ou irradiada, na presença dos *scavengers* t-butanol e Nitrato de Sódio. A: BTHX-1 nativa + t-butanol; B: BTHX-1 irradiada + t-butanol; C: BTHX-1 nativa + Nitrato de sódio; D: BTHX-1 irradiada + Nitrato de sódio. Linha tracejada representa a expressão basal do controle ( $\beta$ -actina).

## V – DISCUSSÃO

A radiação ionizante, como descrito na Introdução deste trabalho, é uma ferramenta muito útil para as pesquisas envolvendo estudos imunológicos e toxicológicos. O Centro de Biotecnologia do IPEN – CNEN/SP vem, há muitos anos, dedicando parte de suas atividades ao estudo dos efeitos deste tipo de energia sobre venenos, toxinas isoladas, protozoários e outros microorganismos. Contudo, apesar de muitas das propriedades da radiação sobre proteínas de um modo geral já terem sido bem caracterizadas pelo grupo, muitos pontos ainda merecem um melhor entendimento para que o uso desta ferramenta seja ampliado. Assim, dando continuidade aos ensaios que buscam interpretar os fenômenos imunológicos desencadeados pela irradiação de venenos e, neste estudo em particular, a ação da radiação sobre a resposta imune contra a BTHX-1, seguem descritas as considerações feitas a partir dos resultados obtidos durante esta pesquisa.

A eletroforese em gel de poliacrilamida a 15%, das proteínas em estudo, permitiu identificar modificações estruturais após o processo de irradiação (radiação  $\gamma$  de  $^{60}\text{Co}$ ). As alterações observadas no perfil eletroforético da bothropstoxina-1 irradiada sem *scavengers* (Figura 5, linha B), sugerem a ocorrência de quebras na cadeia polipeptídica, em consequência da ruptura de pontes covalentes. Estas observações estão de acordo com os achados de MOON & SONG (2001), que verificaram que as proteínas podem ser convertidas em agregados de alto peso molecular devido à geração de reações de “cross-linking” interproteínas, interações hidrofóbicas e eletrostáticas e, formação de pontes dissulfeto. Trabalhando com

ovalbumina e ovomucóide, os autores observaram que a radiação  $\gamma$  promoveu a ruptura da estrutura ordenada das proteínas em questão, bem como a degradação e agregação das cadeias polipeptídicas, devido aos produtos da radiólise da água, formados durante a irradiação, e às alterações nas estruturas secundária, terciária e no perfil de massa molecular das proteínas. No caso da BTHX-1 irradiada na presença dos *scavengers* (Figura 5, linhas D e F), houve a preservação da banda principal (14kDa), correspondente à BTHX-1, devido à ação do  $\text{NaNO}_3$  e do t-butanol em neutralizarem os respectivos produtos da radiólise da água, ou seja, elétron aquoso ( $e^-_{\text{aq.}}$ ) e radical hidroxila ( $\text{OH}\bullet$ ), impedindo que os mesmos provocassem danos à molécula da toxina.

O  $\text{NaNO}_3$  e o t-butanol são denominados *scavengers* devido à sua ação neutralizadora sobre o elétron aquoso e o radical hidroxila, respectivamente, que se dá através da absorção da energia de excitação destes produtos.

Os produtos da radiólise da água podem ser designados como átomos ou moléculas com existência independente, contendo um ou mais elétrons não pareados, nos orbitais externos. Isto os torna altamente reativos e capazes de reagir com qualquer composto situado próximo à sua órbita externa, passando a ter uma função oxidante, como o  $\text{OH}\bullet$ , ou redutora de elétrons, como o  $e^-_{\text{aq.}}$ . Desta forma, estes produtos atuam como catalisadores, ou pontes, para desencadear reações químicas ou modificações em moléculas, como por exemplo, as proteínas (DOMAZOU *et al*, 2009).

Com relação aos aspectos imunológicos, a comparação entre camundongos B10.PL e BALB/c para a produção de anticorpos contra a BTHX-1, na forma nativa, mostrou títulos de anticorpos superiores para a imunoglobulina G1 (IgG1) (Figura 7) para ambas as linhagens de camundongos, o que indica a predominância de uma resposta imunológica de células Th2. Fato semelhante foi observado por ROMAN *et al*, (2007), que obtiveram uma resposta murina de células Th2, após imunização intradérmica dos animais com ovalbumina, o que resultou em altos níveis de IgG1. Da mesma maneira, RAGHAVENDRA e colaboradores, (2001), observaram uma alta produção de IgG1, em relação à produção de IgG2a, em camundongos BALB/c, sensibilizados com ovalbumina e, imunizados com melatonina, o que indicou aos autores a predominância de uma resposta de células Th2.

As células Th2 participam da imunidade humoral, auxiliando a produção de anticorpos por linfócitos B. Estas células (Th2) também são capazes de estimular a produção de diferentes isotipos, como IgA e IgE, bem como anticorpos neutralizantes como aqueles do subtipo IgG1 (McHEYZER-WILLIAMS *et al*, 2003). Todos estes anticorpos contribuem para a imunidade humoral, a qual é direcionada, principalmente, para patógenos extracelulares (SPRENT & SURH, 2002).

Para os animais imunizados com a BTHX-1, na forma irradiada, ambos responderam com títulos de anticorpos, para IgG2b (Figura 8), superiores àqueles apresentados pelos animais imunizados com a proteína na forma nativa. Esses fatos indicam a predominância de uma resposta de células Th1 para a proteína irradiada, corroborando resultados anteriores do nosso grupo ao trabalhar com camundongos

---

B10.PL. O mesmo foi observado para os camundongos *Knockout-IFN- $\gamma$ <sup>-/-</sup>* (Figura 9) imunizados com a toxina irradiada, apesar destes animais não apresentarem a produção de IFN- $\gamma$ , que é uma citocina muito importante no padrão de resposta de células Th1. Esse resultado nos indicou que, provavelmente há outras citocinas responsáveis pelo *sweet* de resposta de células Th1. Como a IL-12, que é produzida por macrófagos ativados e, estimula o desenvolvimento de células Th1 (DELVES & ROITT, 2000). PAVANELLI (2007), trabalhando com camundongos BALB/c, observou altos níveis de IgG2a após imunização dos animais com a bradisinina, o que indicou ao autor uma resposta preferencial de células Th1. Estas últimas estão envolvidas na imunidade celular, mais especificamente, na ativação de macrófagos. Ou seja, as células Th1 ativam as propriedades microbicidas dos macrófagos e, também são capazes de induzir as células B a produzirem anticorpos efetivos em opsonizar patógenos extracelulares, os quais serão englobados por células fagocitárias (DELVES & ROITT, 2000).

Quando os animais (B10.PL e BALB/c) (Figuras 10 e 11) foram imunizados com a BTHX-1 irradiada na presença dos *scavengers* houve uma diminuição na produção de anticorpos em relação à toxina irradiada na ausência dos *scavengers*. Esta última, por sua vez, induziu menor produção de anticorpos quando comparada à toxina na forma nativa. Porém, os anticorpos formados contra a BTHX-1 irradiada foram capazes de reconhecer a forma nativa da toxina, mostrando-se tão responsivos quanto àqueles formados contra a BTHX-1 nativa. Estes achados corroboram os de NASCIMENTO e col. (1996), que trabalharam com a crotoxina (do veneno de *Crotalus durissus terrificus*) e observaram que os anticorpos produzidos

contra a crotoxina irradiada foram eficientes em reconhecer a forma nativa da toxina, apesar de seu título ter sido menor em relação ao título de anticorpos produzidos contra a crotoxina nativa.

Os resultados do ensaio imunoenzimático (ELISA) dos camundongos B10.PL (Figura 12) e dos BALB/c (Figura 13), demonstraram que a BTHX-1 irradiada, na presença do nitrato de sódio, induziu títulos de anticorpos superiores para IgG2b, quando comparada à sua forma nativa, indicando a predominância de uma resposta de células Th1. Em contrapartida, quando a toxina foi irradiada com t-butanol houve uma discreta diminuição na produção de anticorpos do isotipo IgG2b, indicando um possível papel modulador do radical hidroxila (OH•) na produção dos mesmos, bem como, na toxicidade da proteína. Isto se deve provavelmente ao fato do OH• ser uma das espécies mais reativas dentre os produtos formados na radiólise da água (DU & GEBICKI, 2004). AKYÖN (2002) estudou o efeito *scavenger* da astaxantina, um carotenóide, sobre radicais livres de oxigênio, produzidos por células do sistema imune, na resposta inflamatória provocada por doenças crônicas, como a infecção gástrica provocada por *Helicobacter pylori*. Ficou demonstrado que na presença da astaxantina houve uma alteração no padrão da resposta imune para *H. pylori*, ou seja, de uma resposta de células Th1 para células Th2.

A dicotomia do desenvolvimento de uma resposta de células Th1 ou Th2 após estimulação por um determinado antígeno parece estar relacionada com a natureza deste antígeno e com os estímulos por ele desencadeados (TAKATSU & KARIYONE, 2003). O processo se inicia com a apresentação do antígeno, ou seja, a

proliferação de células Th1 é estimulada por antígenos apresentados por macrófagos, enquanto as células Th2 proliferam muito bem em resposta a antígenos apresentados por células dendríticas (SINGH & AGREWALA, 2006). CARDI e cols. (1998), trabalhando com a crotoxina (toxina majoritária do veneno de *Crotalus durissus terrificus*), observaram que a crotoxina irradiada (radiação gama de  $^{60}\text{Co}$ ) era preferencialmente captada por macrófagos através de receptores específicos destas células denominados Receptores *Scavengers* (ScvR). Os autores utilizaram bloqueadores destes receptores e observaram que a captação da crotoxina irradiada, por macrófagos, na presença destes bloqueadores foi menor em relação à sua captação na ausência dos bloqueadores.

Todos estes processos, ou seja, o reconhecimento e apresentação de antígenos bem como as diferenças funcionais entre as respostas de células Th1 e Th2, são influenciados por citocinas (HOLDSWORTH *et al*, 1999).

A fim de avaliar mais detalhadamente o padrão de resposta de células Th1 ou Th2, frente à BTHX-1 nativa ou irradiada, decidimos pela avaliação da expressão gênica das principais citocinas esplênicas obtidas dos animais imunizados com a referida toxina.

Os resultados obtidos com a expressão gênica de citocinas esplênicas, obtidas de camundongos B10.PL (Figura 14), mostraram que a expressão de IFN- $\gamma$ , foi maior quando as células obtidas dos animais imunizados com a BTHX-1 nativa foram estimuladas *in vitro* com a toxina na sua forma irradiada. No caso dos camundongos BALB/c (Figura 15), que possuem uma tendência para resposta de



células Th2 (HSIEH *et al* 2006), observou-se uma maior expressão de IFN- $\gamma$  e IL-2, em relação à IL-4 e IL-10, pelas células dos animais imunizados com ambas as formas da toxina, nativa ou irradiada e, estimuladas *in vitro* com a BTHX-1 irradiada. HAN e colaboradores (2007) examinaram os efeitos da irradiação- $\gamma$  na expressão do mRNA, em esplenócitos murinos, de citocinas envolvidas nas respostas imunes Th1 ou Th2. Os autores observaram que o nível de mRNA do IFN- $\gamma$  nestes esplenócitos era reduzido 3 horas após a irradiação, enquanto a expressão da IL-10 aumentou neste mesmo período. JIANG & MÖLLER, (1999) avaliaram o padrão de secreção de citocinas em esplenócitos de camundongos BALB/c estimulados *in vitro* com o cloreto de mercúrio (HgCL<sub>2</sub>), uma substância tóxica principalmente para o sistema renal. Os autores observaram uma alta produção de IL-2 (produzida por células Th1) em relação a IL-4, após 22 horas de incubação dos esplenócitos com o HgCL<sub>2</sub>.

As citocinas são mediadores solúveis da resposta imune, que apresentam rápida degradação e, portanto, meia-vida curta (YATES *et al*, 2000). São altamente potentes, agindo freqüentemente, em concentrações muito pequenas, combinadas a receptores de superfície celular de alta afinidade, produzindo alterações no RNA e na síntese protéica (SALLUSTO *et al*, 2000). O IFN- $\gamma$  e a IL-2 são citocinas imunoregulatórias, produzidas por células Th1. O IFN- $\gamma$  atua na ativação de macrófagos e participa da resposta imune mediada por células (MURPHY & REINER, 2002). A IL-2, por sua vez, estimula a amplificação de células T ativadas, que expressam receptores IL-2 de alta afinidade e, estimula o crescimento de células hematopoiéticas (HWANG *et al*, 2005).

Os resultados da expressão gênica das células obtidas de camundongos *Knockout-IFN- $\gamma$ <sup>-/-</sup>* (Figura 16), mostraram que houve maior expressão de IL-4, em relação às demais citocinas, pelas células dos animais imunizados com a BTHX-1 nativa. A IL-4 é uma das citocinas produzidas pelas células Th2 e, participa da ativação e crescimento de células B, bem como, pode inibir a ativação de macrófagos (ANSEL *et al*, 2006). Estes dados estão de acordo com aqueles observados no ELISA (Figura 9), onde, a BTHX-1 nativa induziu maior produção de IgG1 em relação à IgG2b. Como a IgG1 é um anticorpo que tem a sua produção influenciada por células Th2, estes fatores nos sugeriram a predominância de uma resposta de células Th2 para a toxina nativa. Diferente da toxina irradiada que induz, preferencialmente, uma maior resposta de células Th1. GARSSSEN e cols. (1999) observaram os efeitos da radiação ultravioleta no padrão de resposta de células Th1/Th2 em esplenócitos murinos de animais imunizados com ovalbumina. Os autores expuseram os animais a uma dose de 2,2 kJ/m<sup>2</sup> de radiação UV, por 16 segundos, num período de quatro dias consecutivos. Após este período os animais foram imunizados com a ovalbumina. A avaliação da expressão de citocinas pelos esplenócitos obtidos destes animais mostrou aos autores um aumento da expressão de IL-4 e IL-10 pelas células dos animais expostos à radiação UV em relação à expressão de IFN- $\gamma$  e em relação aos animais do grupo controle, ou seja, não expostos à radiação UV.

WALLGREN e colaboradores (2005), trabalhando com células mononucleares de sangue periférico humano, observaram que altas doses de radiação ultravioleta (UVB) inibiam a capacidade proliferativa destas células. Porém, ao expor as referidas

células à radiação- $\gamma$ , a capacidade proliferativa das mesmas era mantida e os autores observaram a indução de uma resposta típica Th1 por parte destas células mononucleares, pois apresentaram altos níveis de expressão de IFN- $\gamma$ . Esta última, dentre outras funções, é uma citocina capaz de inibir a ativação de células Th2 (SCHRODER *et al*, 2004).

O mecanismo através do qual as citocinas induzem a diferenciação seletiva das células TCD4 em células Th1 ou Th2 não é totalmente conhecido. Mas sabe-se que elas podem agir quando a célula TCD4 é ativada pela primeira vez por uma célula apresentadora de antígeno ou durante a fase proliferativa que se segue a esta ativação (SMITH *et al*, 2006). Desta maneira, como referido anteriormente, a natureza do antígeno, no caso do presente trabalho, uma proteína irradiada ou não-irradiada, apresenta um importante papel no direcionamento do tipo de resposta imune desencadeada.

Os dados do real-time PCR, dos camundongos B10.PL (Figura 17), imunizados com as toxinas na presença dos *scavengers* mostraram que houve maior expressão de IFN- $\gamma$  pelas células dos animais imunizados com a BTHX-1 nativa + t-butanol e pelas células dos animais imunizados com a toxina irradiada na presença do NaNO<sub>3</sub>. Enquanto que as células dos animais imunizados com a BTHX-1 irradiada na presença do t-butanol, apresentaram maior expressão de IL-4, em relação às demais citocinas em estudo. Esses dados corroboram àqueles obtidos através do ELISA (Figura 12), onde observamos uma diminuição na produção de anticorpos IgG2b, quando os animais foram imunizados com a BTHX-1 irradiada + t-butanol. A imunoglobulina G2b é um dos anticorpos que tem sua produção influenciada pelas

células Th1, que produzem, dentre outras citocinas, o IFN- $\gamma$  (O'GARRA & VIEIRA, 2007). HAN e colaboradores, (2005) avaliaram a expressão de citocinas em esplenócitos murinos obtidos de camundongos BALB/c e C57BL/6 previamente imunizados com ginseng (100mg/kg), um polissacarídeo de origem vegetal. Os esplenócitos obtidos destes animais foram estimulados *in vitro* com o ginseng (50 $\mu$ g/mL) e posteriormente submetidos aos efeitos da radiação gama de  $^{60}\text{Co}$  a uma dose de 5,0 kGy. Os autores observaram uma maior expressão de citocinas envolvidas no padrão de resposta de células Th1, como o IFN- $\gamma$ , pelos esplenócitos tratados com o ginseng em relação às células controle, ou seja, não tratadas com o polissacarídeo. Para as citocinas envolvidas no padrão de resposta de células Th2, como a IL-4, os autores não observaram diferenças significativas na sua expressão pelas células tratadas e não tratadas com o ginseng. Os autores concluíram que o ginseng diminuiu a possibilidade de imunossupressão, promovida pela radiação gama, na expressão de citocinas produzidas por células Th1.

As células obtidas dos camundongos BALB/c (Figura 18) imunizados com a BTHX-1 irradiada na presença do  $\text{NaNO}_3$ , apresentaram maior expressão de IFN- $\gamma$  em relação às células dos animais imunizados com a toxina nativa +  $\text{NaNO}_3$ . O nitrato de sódio é o *scavenger* que tem afinidade pelo elétron aquoso ( $e^-_{\text{aq}}$ ), que é um dos produtos formados no processo de radiólise da água. O padrão de resposta imune induzido nos animais imunizados com a BTHX-1 irradiada na presença deste *scavenger* foi predominantemente Th1, o que nos leva a crer que, os danos provocados pelo  $e^-_{\text{aq}}$ , na toxina irradiada, não exercem um papel tão relevante no padrão de resposta imune induzido pela mesma. Isto porque, com a retirada do  $e^-_{\text{aq}}$ .

do meio pelo  $\text{NaNO}_3$ , o padrão de resposta imune induzido pela BTHX-1 irradiada não foi alterado. As células obtidas dos animais imunizados com a BTHX-1 irradiada, na presença do t-butanol, apresentaram maior expressão de IL-2 e IL-10 quando comparadas às células dos animais imunizados com a toxina nativa + t-butanol. Este fato concorda com os resultados obtidos do ELISA de subclasses (Figura 13), onde, a BTHX-1 irradiada + t-butanol induziu maior produção de IgG1 em relação à produção de IgG2b. A IgG1 é a imunoglobulina envolvida no padrão de resposta de células Th2, as quais produzem, dentre outras, a citocina IL-10. Esta última atua inibindo o crescimento de células Th1 (HEIN, *et al*, 2001 & HAN *et al*, 2007).

Estes fatos reforçam a participação do  $\text{OH}\bullet$  na modulação da resposta imune contra a toxina irradiada. Ou seja, com a retirada do  $\text{OH}\bullet$  do meio, pelo t-butanol, as alterações na estrutura da proteína diminuiriam, havendo assim, uma conseqüente diminuição na atenuação da toxicidade. Portanto, a resposta imune desencadeada pela proteína irradiada, na presença de t-butanol, seria bastante semelhante à resposta obtida com a proteína nativa. ANRAKU e colaboradores (2008) observaram que as alterações estruturais provocadas na albumina humana por radicais livres de oxigênio, eram diminuídas pela ação “scavenger” da quitosana. GRÉMY e colaboradores (2006) avaliaram a expressão de citocinas envolvidas no padrão de resposta de células Th1 ou Th2 em células da mucosa ílaca de ratos *Wistar* tratados com o ácido cafeico (CAPE) (30mg/kg), um composto fenólico com propriedades antioxidantes, e posteriormente submetidos aos efeitos da radiação gama de  $^{60}\text{Co}$ . Os autores observaram uma diminuição na expressão de  $\text{IFN}\gamma$  e IL-2 nos animais tratados com o ácido cafeico em relação aos animais não tratados. Enquanto que a

expressão de IL-4 não apresentou alterações, no grupo tratado, mesmo após a irradiação. Os autores concluíram que o referido composto fenólico apresentou um papel modulador favorecendo a resposta de células Th2.

A resposta imune é o resultado de uma série de interações que ocorrem entre as células do sistema imune, anticorpos e citocinas, portanto, a avaliação dos perfis de secreção das mesmas, após a estimulação com uma toxina irradiada, é um passo importante para entender a ação de uma proteína irradiada no sistema imune.

Nossos resultados indicaram que a irradiação da BTHX-1 promoveu alterações significantes em sua estrutura (BAPTISTA *et al*, 2006), porém muitas das propriedades imunológicas da forma nativa da toxina foram mantidas. A radiação ionizante provou ser uma ferramenta poderosa na produção de melhores imunógenos, sem afetar e, por vezes, melhorando suas propriedades antigênicas. Estes fatores indicam a potencial utilização de proteínas irradiadas como imunógenos para processos de imunização.

## VI – CONCLUSÕES

- Camundongos B10.PL, BALB/c e *Knockout-IFN- $\gamma$ <sup>-/-</sup>*, imunizados com a BTHX-1 irradiada, responderam com títulos de anticorpos, para IgG2b, superiores àqueles apresentados pelos animais imunizados com a proteína nativa, demonstrando a predominância de uma resposta de células Th1 para a proteína irradiada.
- A BTHX-1 irradiada sem *scavenger*, ou apenas com o NaNO<sub>3</sub>, induziu títulos de anticorpos superiores para IgG2b, quando comparada à sua forma nativa, indicando a predominância de uma resposta de células Th1 nos camundongos B10.PL e BALB/c.
- A toxina irradiada, na presença de t-butanol, demonstrou uma discreta diminuição na produção de anticorpos do isotipo IgG2b, em camundongos B10.PL e BALB/c, sugerindo um papel modulador do radical hidroxila (OH•) na produção desses anticorpos, bem como, na toxicidade da proteína.
- A expressão de IFN- $\gamma$  foi maior quando as células obtidas dos camundongos B10.PL imunizados com a BTHX-1 nativa foram estimuladas *in vitro* com a toxina na sua forma irradiada. Para os camundongos BALB/c, houve maior expressão de IFN $\gamma$  e IL-2, em relação a IL-4 e IL-10, pelas células dos animais imunizados com ambas as formas da toxina, nativa ou irradiada e, estimuladas *in vitro* com a BTHX-1 irradiada.

- As células obtidas de camundongos *Knockout-IFN- $\gamma$ <sup>-/-</sup>*, apresentaram maior expressão de IL-4, em relação às demais citocinas, quando os animais foram imunizados com a BTHX-1 nativa.
- As células esplênicas dos camundongos B10.PL imunizados com a BTHX-1 irradiada, na presença do NaNO<sub>3</sub>, apresentaram maior expressão de IFN- $\gamma$  quando comparada à expressão das células dos animais imunizados com a toxina irradiada na presença do t-butanol. Este fato sugere a participação do OH• na modulação da resposta imune contra a toxina irradiada.
- As células esplênicas obtidas de camundongos BALB/c imunizados com a BTHX-1 irradiada na presença do t-butanol, apresentaram maior expressão de IL-2 e IL-10. A BTHX-1 irradiada na presença do nitrato de sódio induziu maior expressão de IFN- $\gamma$ , em relação à toxina irradiada na presença do t-butanol.



## VII – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDRIÃO-ESCARSO, SH; SOARES, AM; RODRIGUES, VM; ÂNGULO, Y; DÍAZB, C; LOMONTE, B; GUTIÉRREZ, JM; GIGLIO, JR, (2000), Myotoxic phospholipases A2 in Bothrops snake venoms: Effect of chemical modifications on the enzymatic and pharmacological properties of bothropstoxins from *Bothrops jararacussu*. *Biochimie* **82**:755–763.
- AMABIS, JM & MARTHO, GR, (2004), **Biologia dos organismos**. Ed. Moderna, 366p.
- AKYON, Y, (2002), Effect of antioxidants on the immune response of *Helicobacter pylori*. *Clin. Microbiol. Infect.*, **8**:438-441.
- ALLEN, AO, (1948), Radiation chemistry of aqueous solutions. *J. Phys. Colloid. Chem.* **52(3)**:479-490.
- ANSEL, KM; DJURETIC, I; TANASA, B; RAO, A, (2006), Regulation of Th2, differentiation and IL4: Locus Accessibility. *Annu. Rev. Immunol.* **24**:607–656.
- ARAUJO, H.P; BOURGUIGNON, S.C., BOLLER, M.A.A., DIAS, A.A.S.O., LUCAS, E.P.R., SANTOSAND, I.C.; DELGADO, I.F., Potency evaluation of antivenoms in Brazil: The national control laboratory experience between 2000 and 2006. *Toxicon*, **51**: 502-14, 2008.
- ANRAKU,M; KABASHIMA, M; NAMURAA, H; MARUYAMA, T; OTAGIRI, M; GEBICKI, JM; FURUTANI, N; TOMIDA, H, (2008), Antioxidant protection of human serum albumin by chitosan. *Int. J. of Bio. Macromol.*, **43**:159–164.

- BAPTISTA, JA; SPENCER, PJ; HIGA, OZ; DE ANDRADE JR, HF; CASARE, MS; CAMPOS, LA; NASCIMENTO, N, (2005), Immune Response Against Bothropstoxin-I Irradiated With  $^{60}\text{Co}$  Gamma Rays. The International Nuclear Atlantic Conference (INAC 2005). Santos –SP.
- BAPTISTA, JA; SPENCER, PJ; OLIVEIRA, JE; CASARE, MS; NASCIMENTO, N, (2006), Immune Response Against Antigens Irradiated With  $^{60}\text{Co}$  Gamma Rays. *J. of Radio. and Nuclear Chem.*, **269**:565-569.
- BOYER, AL; BUTLER, EB; DIPETRILLO, TA; ENGLER, MJ; FRAASS, B; GRANT III, W; LING, CC; LOW, DA; MACKIE, TR; MOHAN, R; PURDY, JA; ROACH, M; ROSENMAN, JG; VERHEY, LJ; WONG, JW; CUMBERLIN, RL; STONE, H AND PALTA, R, (2001), Intensity-modulated radiotherapy: current status and issues of interest. *Int. J. Rad. Oncol. Biol. Phys.*, **51(4)**: 880–914.
- BRADEN, BC AND POLJAK, RJ, (1995), Structural features of the reactions between antibodies and protein antigens. *FASEB J.* **9**: 9-16.
- BRADEN, BC; GOLDMAN, ER; MARIUZZA, KA; POLJAK, RJ, (1998), Anatomy of an antibody molecule: structure, kinetics, thermodynamics and mutational studies of the antilysozyme antibody D1 .3. *Immunol. Rev.* **163**:45-57.
- BRADLEY, LM; HARBERTSON, J; FRESCHI, GC; KONDRACK, R; LINTON, PJ, (2000), Regulation of Development and Function of Memory CD4 Subsets. *Immunol. Res.* **21**:149–158.
- BURTON, M, (1947), Radiation Chemistry. *J. Phys. Chem.* **51(2)**:611-625.

- BUTLER, J; LAND, EJ & SWALLOW, AJ, (1984), Chemical mechanisms of the effects of high energy radiation on biological systems. *Radiat. Phys. Chem.* **24**:273-282.
- CAMEY, KU; VELARDE, DT; SANCHES, EF, (2002), Pharmacological characterization and neutralization of the venoms used in the production of Bothropic antivenom in Brazil. *Toxicon*, **40**:501-509.
- CAPRONI, P, (2009), Ação da bothropstoxina-1 e do veneno total de *Bothrops jararacussu* irradiados sobre o sistema imune. São Paulo, 61p. (Dissertação de Mestrado- IPEN- CNEN/SP).
- CARDI, BA; NASCIMENTO, N; ANDRADE-JR, HF, (1998), Irradiation of *Crotalus durissus terrificus* crotoxin with  $^{60}\text{Co}$  gamma-rays induces its uptake by macrophages through scavenger receptors. *Int. J. Radiat. Biol.*, **73(5)**:557-564.
- CARMICHAEL, EB, (1927), Detoxification of rattlesnake venom by sodium ricinoleate. *Proc. Soc. Exper. Biol. Med.*, **4**:445-454.
- CARNEIRO, SM; ASSAKURA, MT; BARRENCE, FAC; CARDOSO, SRT; CAMARGO, ACM; SESSO, A, (2002), Immunolocalization of venom metalloproteases in venom glands of adult and of newborn snakes of *Bothrops jararaca*. *Tissue Cell.*, **34(6)**:381-389.
- JEAN-PAUL COUTELIER, JP; van der LOGT, JTM; HEESSEN, FWA; WARNIER, G; van SNICK, J, (1987), IgG2a restriction of murine antibodies elicited by viral infections. *J. Exp. Med.*, **165**:64-69.

- CHANG, T; SHEA, CM; URIOSTE, S; THOMPSON, RC; BOOM, WR; ABBAS, AK, (1990), Heterogeneity of helper/inducer T lymphocytes-Responses of IL-2 and IL-4-producing (Th1 and Th2) clones to antigens presented by different accessory cells. *T. J. of Immuno.*, **145** (9):2803-2808.
- CHO, W; MARKOWITZ, MA & KÉZDY, FJ, (1988), A New Class of Phospholipase A2 Substrates: Kinetics of the Phospholipase A2 Catalyzed Hydrolysis of 3 -(Acyloxy)-4-nitrobenzoic Acids. *J.Am.Chem.Soc.*, **110**:5166-5171.
- DELVES, PJ & ROITT, IM, (2000), The immune System – First of two parts. *Adv. in Immuno.*, **343**:37-49.
- DIAS DA SILVA, W.; GUIDOLIN R.; RAW, I.; HIGASHI, H.G.; CARICATTI, C.P.; MORAIS, I.F.; LIMA, M.L.S.R.; YAMAGUCHI, I.K.; NISHIKAWA, A.K.; STEPHANO, M.A.; MARCELINO, J.R.; PINTO, J.R. & SANTOS, M.J., Cross-reactivity of horse monovalent antivenoms to venoms of ten *Bothrops* species. *Mem. Inst. Butantan*, **51**: 153-168, 1989.
- DOMAZOU, AS; KOPPENOL, WH; GEBICKI, JM, (2009), Efficient repair of protein radicals by ascorbate. *Free Radic. Biol. Med.*, **46**:1049–1057.
- DU, J & GEBICKI, JM, (2004), Proteins are major initial cell targets of hydroxyl free radicals. *T. Inter. J. of Biochem. & Cell Biol.*, **36**:2334–2343.
- FABER, C; SHAN, L; FAN, Z; GUDDAT, LW; FUREBRING, C; OHLIN, M; BORREBAECK, CAK; Edmundson, AB, (1998), Three-dimensional structure of a human Fab with high affinity for tetanus toxoids. *Immunotechnology*. **3**: 253–270.

- FERRY, M; NGONO-RAVACHE, Y; PICQ, V; BALANZAT, E, (2008), Irradiation of Atactic Polystyrene: Linear Energy Transfer Effects. *J. Phys. Chem. B.* **112(35)**:10879-10889.
- FRANCISCHETTI, IMB; CASTRO, HC; ZINGALI, RB; CARLINI, CR; GUIMARÃES, JA, (1998), Bothrops sp. Snake Venoms: Comparison of Some Biochemical and Physicochemical Properties and Interference in Platelet Functions. *Comp. Biochem. Physiol.* **119C(1)**:21–29.
- FREITAS, TV; DINIZ, CR; FREZARD, F, (1998), The use of liposomes as snake venom vehicles: Application in protective immunization. *J. Toxicol. Toxin Reviews*,**17**:441-466.
- GALISTEO JR, AJ, HIRAMOTO, RM, CARMO, CV, ALVES, JB, ANDRADE JR, HF, (2005), 255 Gy irradiated tachyzoites of *Toxoplasma gondii* induce intestinal immune response in C57Bl/6j mice immunized by oral route. The International Nuclear Atlantic Conference (INAC 2005). Santos –SP.
- GARSSEN,J; VANDEBRIEL, RJ; DE GRUIJL, FR; WOLVERS, DAW; VAN DIJK, M; FLUITMAN, A; VAN LOVEREN, H, (1999), *Immunology*, **97**:506–514.
- GUILLEMIN, I; BOUCHIERT, C; GARRIGUES, T; WISNER, A & CHOUMET, V, (2003), Sequences and structural organization of phospholipase A2 genes from *Vipera aspis aspis*, *V. aspis zinnikeri* and *Vipera berus berus* venom – Identification of the origin of population based on ammodytin I 1 heterogeneity. *Eur. J. Biochem.*, **270**: 2697-2706.

- GRÉMY, O; BENDERITTER, M; LINARD, C, (2006), Caffeic acid phenethyl ester modifies the Th1/Th2 balance in ileal mucosa after  $\gamma$ -irradiation in the rat by modulating the cytokine pattern. *World J. Gastroenterol.* **21**; **12(31)**:4996-5004.
- GROSH, DS & HOOPYWOOD, LE, (1979), *Biological effects of radiation*, 2<sup>nd</sup> ed., New York, Academic Press.
- GUTIÉRREZ, J.M., LOMONTE, B., (1995), Phospholipase A2 myotoxins from *Bothrops* snake venoms. *Toxicon* **33**:1405–1424.
- GUTIÉRREZ, JM; LEON, G; LOMONTE, B, (2003), Pharmacokinetic-pharmacodynamic relationships of immunoglobulin therapy for envenomation. *Clin. Pharm.* **42(8)**: 721-741.
- HAN, SK; SONG, JY; YUN, YS; YI, SY, (2005), Ginsan Improved Th1 Immune Response Inhibited by Gamma Radiation. *Arch. Pharm. Res.*, **28(3)**:343-350.
- HAN, SK; SONG, JY; YUN, YS; YI, SY, (2007), Effect of gamma radiation on cytokine expression and cytokine-receptor mediated STAT activation. *Int. J. of Rad. Biol.*, **82(9)**: 686–697.
- HARLOW, E & LANE, D, (1988), *Antibodies. A Laboratory Manual*. Ed. Cold Sprig Harbor Lab, N.Y.
- HAWKINS, AL & DAVIES, MJ, (2001), Generation and propagation of radical reactions on proteins. *Biochim. Biophys. Acta.* **1504**:196-219.
- HEIN, J; SCHELLENBERG,U; BEIN,G & HACKSTEIN,H, (2001), Quantification of Murine IFN-g mRNA and Protein Expression: Impact of Real-Time Kinetic RT±PCR Using SYBR Green I Dye. *Scand. J. Immunol.* **54**:285-291.

- HIRAMOTO, RM, GALISTEO JR, A.J, NASCIMENTO, N; ANDRADE JR, HF,( 2002), 200Gy sterilized *Toxoplasma gondii* tachyzoites maintain metabolic functions and mammalian cell invasion, eliciting cellular immunity and cytokine response similar to natural infection in mice. *Vaccine*, 20(16): 2072-2081.
- HIROKI, A; PIMBLOTT, SM; LAVERNE, JA, (2002), Hydrogen Peroxide Production in the Radiolysis of Water with High Radical Scavenger Concentrations. *J. Phys. Chem. A.*, **106**:9352-9358.
- HOLDSWORTH, SR; KITCHING, AR; TIPPING, PG, (1999), Th1 and Th2 helper cell subsets affect patterns of injury and outcomes in glomerulonephritis. *Kidney Int.* **55**:1198-1216.
- HSIEH,CS; MACATONIA,SE; O'GARRA, A; MURPHY, KM, (2006), T Cell genetic background determines default T helper phenotype development in vitro. *J. Exp. Med.* **181**:713-721.
- HWANG, ES; HONG, J; GLIMCHER, LH, (2005). IL-2 production in developing Th1 cells is regulated by heterodimerization of RelA and T-bet and requires T-bet serine residue 508. *J. Exp. Med.* **202(9)**:1289–1300.
- JANEWAY, CA; TRAVERS, MW; SHLOMCHIK, M, (2002), **Imunobiologia – O Sistema imune na Saúde e na Doença**. Artmed Editora, 767p.
- JIANG, Y & MÖLLER, G, (1999), IL-2 may be a limiting factor precluding lymphocytes from genetically resistant mice from responding to HgCl<sub>2</sub>. *Int. Immunol.* **11(5)**:627–633.

- KIM, JK; TSEN, MF; GHETIE, V; WARD, ES, (1995), Evidence that the hinge region plays a role in maintaining serum levels of the murine IgG1 molecule. *Mol. Immunol.* **32(7)**: 461-475.
- KOCHOLATY, WF; GOETZ, CS; ASHLEY, DB, (1968), Immunogenic response of the venoms of fer-de-lance, *Bothrops atrox asper*, *la cascavella*, *Crotalus durissus terrificus* following photooxidative detoxification. *Toxicon*, **5**:153-158.
- LAEMMLI, UK, (1970), Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**:680-685.
- LITMAN, GW; JOHN P. CANNON, JP; DISHAW, LJ, (2005), Reconstructing immune phylogeny: new perspectives. *Nat. Rev. Immunol.*, **5(11)**: 866-879.
- LIVAK, KJ, SCHMITTGEN, TD, (2001), Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)). *Methods*, **25(4)**: 402-408.
- LIZANO, S; DOMONT, G & PERALES, J, (2003), Natural phospholipase-A(2) myotoxin inhibitor proteins from snakes, mammals and plants. *Toxicon*, **42(8)**:963-977.
- McHEYZER-WILLIAMS, M; McHEYZER-WILLIAMS, L; PANUS, J; POGUE-CALEY, R; BIKAH, G; DRIVER, D; EISENBRAUN, M, (2003), Helper T-cell-regulated B-cell immunity. *Microbes and Infection*, **5**:205-212.
- McHEYZER-WILLIAMS, LJ & McHEYZER-WILLIAMS, MG, (2005), Antigen-specific memory B cell development. *Annu. Rev. Immunol.*, **23**:487-513.



- MEZYK, SP & MADDEN, KP, (1999), Self-Recombination Rate Constants for 2-Propanol and tert-Butyl alcohol Radicals in Water. *J. Phys. Chem. A.*, **103**:235-242.
- MICHAELS, HB; HUNT, JW, (1978), A model for radiation damage in cells by direct effect and by indirect effect: a radiation chemistry approach. *Radiat. Res.*, **74**:23-34.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE DO BRASIL, Brasília: *Secretaria Nacional das Ações Básicas de Saúde*. Acidentes ofídicos: Contribuição ao estudo da morbidade, 2005.
- MOON, S & SONG, KB, (2001), Effect of  $\gamma$ -irradiation on the molecular properties of ovalbumin and ovomucoid and protection by ascorbic acid. *Food. Chem.*, **74**:479-483.
- MURPHY, KM & REINER, SL, (2002), The lineage decisions of helper T cells. *Nature Rev./Immunol.*, **2**: 933-944.
- NASCIMENTO, N; SEEBART, CS; FRANCIS, B; ROGERO, JR; KAISER, II, (1996), Influence of ionizing radiation on crotoxin: biochemical and immunological aspects. *Toxicon*, **34**(1):123-131.
- O´GARRA, A & VIEIRA, P, (2004), Regulatory T cells and mechanisms of immune system control. *Nature/Medicine*, **10**(8):801-805.
- O´GARRA, A & VIEIRA, P, (2007), TH1 cells control themselves by producing interleukin-10. *Nature. Rev./Immunol.*, **7**: 425-428.

- OSHIMA-FRANCO, Y; LEITE, GB; DAL BELO, CA; HYSLOP, S; PRADO-FRANCESCHI, J; CINTRA, ACO; GIGLIO, JR; CRUZ-HÖFLING, MA; RODRIGUES-SIMIONI, L, (2004), The Presynaptic Activity of Bothropstoxin-I, a Myotoxin from *Bothrops jararacussu* Snake Venom. *Bas. & Clin. Pharmac.& Toxicol.*, **95**: 175–182.
- PARKIN, J; COHEN, B, (2001), An overview of the immune system. *Lancet*, **357**:1777-89.
- PAVANELLI, WR (2007), Immunization with bradikinin induce pain and TH1 standard of immune response. *Interbio*. **1**:(2): 30-37.
- PINCHUK L.M. & FILIPOV N.M., (2008), Differential effects of age on circulating and splenic leukocyte populations in C57BL/6 and BALB/c male mice. *Immun. Ageing.*, **5**:1.
- RAGHAVENDRA, V; SINGH, V; KULKARNI, SK; AGREWALA, JN, (2001), Melatonin enhances Th2 cell mediated immune responses: Lack of sensitivity to reversal by naltrexone or benzodiazepine receptor antagonists. *Mol. Cell. Biochem.* **221**:57–62.
- ROITT, I & DELVES, PJ, (2004), **Fundamentos de Imunologia**. Guanabara Editora, 489p.
- ROMAN, B S; ESPUELAS, S; GÓMEZ, S; GAMAZO, C; SANZ, M L; FERRER, M; IRACHE, J M (2207), Intradermal immunization with ovalbumin-loaded poly-ε-caprolactone microparticles conferred protection in ovalbumin-sensitized allergic mice. *Clin. & Experim. Aller.*, **37**(2): 287-295.

- SALLUSTO, F; MACKAY, CR; LANZAVECCHIA, A, (2000), The role of chemokine receptors in primary, effector, and memory immune responses. *Annu. Rev. Immunol.* **18**:593-620.
- SINGH, V & AGREWALA, JN, (2006), Regulatory role of pro-Th1 and pro-Th2 cytokines in modulating the activity of Th1 and Th2 cells when B cell and macrophages are used as antigen presenting cells. *BMC Immunol.* **7(17)**:1-10.
- SCHRODER, K; HERTZOG, PJ; RAVASI, T; HUME, DA, (2004), Interferon- $\gamma$ : an overview of signals, mechanisms and functions. *J. Leukoc. Biol.* **75(2)**:163-189.
- SMITH, KM; GARSIDE, P; MCNEIL, RC; BREWER, JM, (2006), Analysis of co-stimulatory molecule expression on antigen-specific T and B cells during the induction of adjuvant-induced Th1 and Th2 type responses. *Vaccine.* **24**:3035–3043.
- SOARES, AM; Oshima-Franco, Y; Vieira, CA; Leite, GB; Fletcher, JE; Jiang, MS; Cintra, ACO; Giglio, JR; Rodrigues-Simioni, L, (2002), Mn<sup>2+</sup> ions reduce the enzymatic and pharmacological activities of bothropstoxin-I, a myotoxic Lys49 phospholipase A2 homologue from *Bothrops jararacussu* snake venom. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **34**:668–677.
- SOUZA, FAD; SPENCER, PJ; ROGERO, JR; NASCIMENTO, N; DAL PAI-SILVA, M; GALLACCI, M, (2002), <sup>60</sup>Co gamma irradiation prevents *Bothrops jararacussu* venom neurotoxicity and myotoxicity in isolated mouse neuromuscular junction. *Toxicon.* **40**: 1101-1106.
- SPENCER, PJ; Aird, SD; Boni-Mitake, M; Nascimento, N; Rogero, JR, (1998), A single-step purification of bothropstoxin-1. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **31**:1125-1127.

- SPRENT, J & SURH, CD, (2002), T Cell Memory. *Annu. Rev. Immunol.* **20**:551-79.
- STEFANIC, I; LJUBIC, I; BONIFACIC, M; SABLJIC, A; ASMUS, KD; ARMSTRONG, DA, (2009), A surprisingly complex aqueous chemistry of the simplest amino acid. A pulse radiolysis and theoretical study on H/D kinetic isotope effects in the reaction of glycine anions with hydroxyl radicals. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **11**:2256–2267.
- TAKATSU, K & KARIYONE, A, (2003), The immunogenic peptide for Th1 development. *Int. Immunopharmacol.* **3**:783–800.
- TOKARNIA, CH & PEIXOTO, PV, (2006), A importância dos acidentes ofídicos como causa de mortes em bovinos no Brasil. *Pesq. Vet. Bras.* **26(2)**:55-68.
- WALES, A & KUSEL, JR, (1992), Biochemistry of irradiated parasite vaccines: Suggested models for their mode of action. *Parasitol. Tod.*, **8(11)**:358-363.
- WALLGREN, AC; ALDERY, J; ANDERSSON, B; KARLSSON-PARRAY, A & BÄCKER, AE, (2005). The Direct Pathway of Human T-Cell Allorecognition is not Tolerized by Stimulation with Allogeneic Peripheral Blood Mononuclear Cells Irradiated with High Dose Ultraviolet B. *Scandin. J. of Immunol.*, **63**: 90–96.
- YATES, A; CLAUDIA BERGMANN, J; HEMMEN, LV, STARK, J; CALLARD, R, (2000). Cytokine-modulated Regulation of Helper T Cell Populations. *J. Theor. Biol.* **206**:539-560.
- ZAMUNER, SR; GUTIÉRREZ, JM; MUSCARA, MN; TEIXEIRA, AS; TEIXEIRA, CFP, (2004), *Bothrops asper* and *Bothrops jararaca* snake venoms trigger microbicidal functions of peritoneal leukocytes *in vivo*. *Toxicon.* **39**:1505-1513.

ZHOU, X; JI, WJ; ZHU, Y; HE, B; LI, H; HUANG, TG; LI, YM, (2007), Enhancement of endogenous defenses against ROS by supra-nutritional level of selenium is more safe and effective than antioxidant supplementation in reducing hypertensive target organ damage. *Med. Hypoth.*, **68**: 952–956.

## **ANEXOS**