

NÉLIDA LUCIA DEL MASTRO DE GARCIA AGUDO

ASPECTOS BIOQUÍMICOS DA AÇÃO DE IMUNOMODULADORES NA SOBREVIVÊNCIA
DE CAMUNDONGOS IRRADIADOS COM RADIAÇÃO GAMA DE ^{60}Co

Tese apresentada ao
Instituto de Química da
Universidade de São Paulo
para obtenção do título
de "Doutor em Ciências" -
Área Bioquímica

Orientador:

Prof.Dr. José Moura Gonçalves

*Tese elaborada no Instituto de
Pesquisas Energéticas e Nuclea-
res - Comissão Nacional de Ener-
gia Nuclear / São Paulo.*

Orientador:
Prof. Dr. JOSÉ MOURA GONÇALVES

Aos meus pais
Enriqueta e Nicolás
DEDICO

*Ao Prof.Dr. José Moura Gonçalves,
orientador da presente tese,
pelos ensinamentos, estímulo
e amizade,*

NOSSA GRATIDÃO.

I N D I C E

	Pág.
1. INTRODUÇÃO	1
2. MATERIAIS E MÉTODOS	10
2.1 Animais	10
2.2 Bacilo Calmette-Guérin (BCG)	10
2.3 <u>Corynebacterium parvum</u>	10
2.4 <u>Bordetella pertussis</u>	11
2.5 Proteose-peptona	11
2.6 Lipopolissacarídeo de E. coli (LPS)	11
2.7 Irradiações	12
2.7.1 Irradiação dos animais	12
2.7.2 Irradiação de BCG	12
2.8 Esquema Experimental	12
2.9 Preparação dos homogeneizados de tecidos e ensaios enzimáticos	13
2.9.1 Determinação de fosfatase ácida	14
2.9.2 Determinação de N-acetil- β -D-glucosamini dase	15
2.10 Determinação de proteínas	16
2.11 Análise estatística	17
2.11.1 Curvas de sobrevivência	17
2.11.2 Ensaio enzimático	18
3. RESULTADOS	20
4. DISCUSSÃO	49
5. CONCLUSÕES	58
6. RESUMO	60
SUMMARY	61
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	62

1. INTRODUÇÃO

As manifestações dos efeitos biológicos da radiação, assim como as possibilidades de recuperação das lesões radioinduzidas, processam-se através dos mecanismos metabólicos do organismo. A síndrome de irradiação aguda em mamíferos é causada por danos nos vários sistemas - nervoso, digestivo, hematopoiético, vascular e endócrino - produzindo quebra das defesas do organismo e comprometimento do sistema imunológico (TALIAFERRO & TALIAFERRO, 1951; BACQ & ALEXANDER, 1961; CASARETT, 1968).

Nos últimos anos a radiosensibilidade dos diversos componentes da resposta imune tem sido objeto de numerosos estudos (ANDERSON & WILLIAMS, 1977; AGAROSI & col., 1981; KIROSHITA, 1981). Dependendo particularmente da dose de radiação e do tempo entre a exposição e a introdução do antígeno, a radiação ionizante pode suprimir (CHEN & SCHOOLEY, 1970; SLAVIN e col., 1981; PETERSON e col., 1982; MAGUIRE & JAFFEE, 1982) ou pode aumentar as respostas imunes primária e secundária (DIXON & McCONAHEY, 1963; TALIAFERRO & TALIAFERRO, 1970). Esse último aspecto não tem sido estudado na mesma extensão dos efeitos imunossupressores, mas existem dados suficientes para gerar diversas hipóteses. Dixon e colaboradores sugerem que a proliferação das células imunocompetentes após a irradiação, em adição à estimulação antigênica, seria mais pronunciada do que no caso de qualquer desses estí

mulos separadamente (DIXON & McCONAHEY, 1963; SCHMIDTKE & DIXON, 1973; HOFFSTEN & DIXON, 1974). Outros autores consideram o aumento radioinduzido da resposta imune, uma consequência da injúria das células envolvidas na regulação dessa resposta (ANDERSON & WARNER, 1976) ou seja, uma manifestação da perturbação da homeostase e das relações temporais nas ocorrências de reguladores específicos.

Radicais livres intermediários (OH , O_2^{\cdot} , $\text{O}_2^{\cdot-}$) estão implicados em danos produzidos pela radiação nos sistemas biológicos. Ao nível celular, a radiação ionizante afeta fundamentalmente as moléculas de DNA e em menor grau, o RNA e as proteínas (enzimas). A radiação pode alterar a permeabilidade de membranas, não só a membrana plasmática mas ainda as das mitocôndrias, do retículo endoplasmático e lisossomos.

Em relação à sobrevivência ao nível de doses letais, interessa o distúrbio do estado de equilíbrio dinâmico dos sistemas de renovação celular, já que a recuperação do organismo está intimamente ligada à capacidade de regeneração dos elementos funcionais.

Os diversos tipos celulares apresentam grandes diferenças em radiosensibilidade. Linfócitos são extremamente radiosensíveis. Macrófagos e monócitos circulantes, que lhes dão origem (VAN FURTH, 1980), são considerados radiorresistentes (KORNFELD & GREENMAM, 1966). Os granulócitos, em sua função sem implicar divisão celular, também são radiorresistentes (VALERIUS e col., 1981). Os macrófagos não só agem como células capazes de fagocitar bacté-

rias, restos celulares e substâncias estranhas de qualquer natureza, mas também assumem importância crítica para a ativação dos linfócitos imunitários, como células chaves na mediação de efetadores imunológicos (MACKANESS, 1964, 1969; APTE e col., 1980).

Os denominados macrófagos ativados constituem uma classe de células que apresentam atividade funcional aumentada (KARNOVSKY & LAZDINS, 1978; COHN, 1978; VAN FURTH, 1980). Certos autores consideram o processo de ativação do macrófago como sendo uma diferenciação celular irreversível e não uma modulação transitente da função celular (SCHULTZ e col., 1978; EDELSON, 1981). Ativação específica ocorre em fenômenos com base imunológica, mas os macrófagos podem ser estimulados por meios não específicos, como os que são elícitos, isto é, atraídos para um determinado local (NATHAN e col., 1979).

Os lisossomos são organelas citoplasmáticas, restritas por membranas lipoprotêicas que contêm enzimas hidrolíticas, que são as principais responsáveis pela digestão intracelular de material endógeno ou exógeno. Os lisossomos foram reconhecidos como sendo diferentes das mitocôndrias em 1955 (DE DUVE & WATTIAUX, 1966) apesar de a noção do conceito de lisossomos se remonta a METCHNIKOFF (1901). Todas as células de mamíferos estudadas contêm lisossomos com exceção dos eritrócitos. O papel dessas organelas nos tecidos tem sido revisado em minúcia (DINGLE & FELL, 1969; DINGLE, 1973). Os lisossomos estão envolvidos em muitos processos que variam desde a digestão intracelular durante

a alimentação nos animais inferiores, até as funções mais especializadas das células de mamíferos. Além do papel na fisiologia normal, os lisossomos são importantes em muitas condições patológicas; doenças de armazenamento, choque circulatório, gota, asbestose e silicose, artrite, fotossensibilização, inflamação, teratogênese e injúria tissular (WELMAN e col., 1978; KEECH, 1979). Uma propriedade distintiva dos lisossomos é sua capacidade endocitótica de ampla variedade de compostos do ambiente extracelular, que podem ser atacados pelas enzimas hidrolíticas ou simplesmente armazenados. Como as enzimas lisossomais são capazes de quebrar a maioria das grandes moléculas dos eucariontes em pequenos fragmentos, acontecerá lise celular se estas enzimas forem liberadas na célula (DEAN, 1977), se bem que, nem todas as enzimas hidrolíticas estejam presentes em todos os tipos celulares. Uma característica importante dessas enzimas é que a maioria delas funciona melhor em pH ácido.

Os efeitos de drogas ou agentes tóxicos sobre membranas lisossomais têm sido estudados mediante técnicas in vivo e in vitro, mas torna-se difícil distinguir in vivo, entre liberação real de enzimas e fragilidade das membranas. Muitas drogas vem sendo examinadas para determinar seus efeitos sobre os lisossomos, sendo que compostos antiinflamatórios são frequentemente estabilizadores dessas organelas (MALBICA, 1971). Níveis elevados de enzimas lisossomais estão associados a neoplasias (BELOWSKI e col., 1972; STARLING e col., 1981). Lisossomos são conhecidos por sua habilidade em concentrar compostos carcinogênicos (ALLI-

SON & MALUCCI , 1964. A quantificação das atividades de enzimas lisossomais é difícil considerando diversos aspectos: grande influência dos métodos de preparação, em geral centrifugação diferencial de homogeneizados de tecidos; possibilidade de labilização durante o procedimento de isolamento; a enorme diferença de tamanho e forma dos lisossomos dependente de seu estado funcional. Assim muitos pesquisadores tem optado por métodos quantitativos citoquímicos (AIKMAN & WILLS, 1974). A atividade da fração lisossomal final preparada de homogeneizado de tecido representa, na realidade, a atividade média de todos os lisossomos de todos os tipos celulares que constituem o tecido. Além disso, os métodos bioquímicos apresentam a desvantagem de exigir maior massa de tecido, em geral alguns miligramas (CHAYEN, 1978), sendo a reação bioquímica realizada em solução ou dispersão aquosa.

Em 1969, BACQ e ALEXANDER propuseram que uma possível lesão primária, após irradiação, seria o dano às membranas plasmáticas, lisossomais, mitocondriais ou nucleares. Aumento na permeabilidade poderia resultar numa liberação de enzimas, assim como enzimas ativas em sítios anormais dentro da célula, poderiam atacar moléculas das quais normalmente se encontram separadas, causando a morte celular. Em particular, esses autores consideravam a membrana lisossomal um alvo possível da radiação devido às propriedades hidrolíticas das enzimas lisossomais. Diversos trabalhos têm mostrado aumento da atividade dessas enzimas provocado pela radiação (WILLS & WILKISON, 1966; AIKMAN & WILLS, 1974; REYNOLDS & WILLS, 1974; GROSS & BALIS, 1978; POTE & ALTEKAR, 1980; TROCHA & CATRAVAS, 1980; CLARKE & WILLS, 1980).

Lisossomos isolados de baço de ratos parecem ser mais sensíveis a danos por radiação do que os provenientes do fígado e rim (WATKINS, 1970). Entretanto alguns autores (HARIKUMAR e col., 1978 e MAZANOWSKA, 1979), mesmo trabalhando com fígado, verificaram que algumas enzimas lisossomais eram liberadas em diferentes quantidades após irradiação. WATKINS (1970), por sua vez, observou que em presença de nitrogênio durante a irradiação, os lisossomos eram protegidos contra danos eventuais. Experiências com lisossomos in vitro, mostraram que algumas hidrolases ácidas são progressivamente inibidas durante o período de incubação pós-irradiação (DESAI e col., 1964; WATKINS, 1970), sendo conhecida a inibição de algumas delas por constituintes normais dos tecidos e fluidos corporais (ABDUL-FADL, 1957).

Existe correlação entre concentração de radicais livres produzidos por peróxidos lipídicos e liberação de enzimas lisossomais. Esses peróxidos podem ser produzidos por radiação ionizante ou por simples adição de água oxigenada às suspensões lisossomais. A formação de peróxidos nas membranas lipoprotêicas é acompanhada por extenso distúrbio das estruturas organizadas da membrana e este processo resulta geralmente, numa perda de funções especializadas.

A resposta à radiação in vivo, é difícil de interpretar dada a complexidade de fatores. Não é provável a produção de extensa oxidação lipídica devido aos muitos antioxidantes presentes nos tecidos, mas mesmo pequenas quantidades de peróxidos são capazes de causar danos nas

membranas. É possível, num período longo, que exista a estimulação do aparelho de Golgi para produzir e/ou liberar novos lisossomos contendo hidrolases ativas portadoras de membranas lábeis (KUBASOVA e col., 1976). É provável que a produção de peróxidos nos lipídios das membranas, possa ativar algumas hidrolases latentes, por exemplo, catepsinas e lipases. Tal ativação de catepsinas poderia resultar na digestão da própria membrana, e/ou ativação e liberação de outras enzimas lisossomais (WATKINS, 1970), o que poderia estar relacionado com o efeito radioprotetor de inibidores de proteases (PALLADINO e col., 1982).

As hidrolases ácidas estão praticamente restritas aos lisossomos que se encontram de maneira geral em todos os tipos de células (DEAN, 1977). Contudo, a atividade de hidrolases ácidas é, por exemplo, desprezível nos linfócitos e plaquetas quando comparada com a atividade nos monócitos, apresentando os granulócitos valores intermediários entre ambos os extremos (SCHNYDER & BAGGIOLINI, 1978 e RADZUN e col., 1980).

As células fagocíticas constituem o principal sistema para o estudo de enzimas lisossomais. Agentes biológicos ou sintéticos, capazes de modificar a resposta imune tissular, produzem ativação de macrófagos. As ações bactericidas de macrófagos ativados são exercidas de maneira não específica: a administração de um agente capaz de ativar macrófagos, por exemplo BCG, que é o Bacillus Calmette-Guérin, cepa atenuada de Mycobacterium bovis, aumenta a resistência contra a infecção com organismos heterólogos, por exemplo, Listeria monocytogenes e Salmonella typhimuri-

um (DUBOS & SCHAEGLER, 1957 e BLANDEN e col., 1969).

Agentes capazes de ativar macrófagos vem sendo experimentados como agentes antitumorais, tal é o caso de BCG (OLD e col., 1959; MOORE e col., 1975), Corynebacterium parvum (HALPERN e col., 1966; 1973), Bordetella pertussis (LIKHITE, 1974), entre outros (ADLAM & SCOTT, 1973; MILAS e col., 1975; GASSEL e col., 1981). As primeiras observações sobre imunoterapia do câncer foram feitas por William Coley, cirurgião de New York, nascido em 1862 (OLD, 1977). Ele observou casos avançados de câncer, que apresentavam regressão após infecção bacteriana aguda e conseguiu resultados positivos injetando em pacientes misturas de bactérias mortas. A partir do trabalho pioneiro de OLD, CLARKE e BENACERRAF (1959), sobre o efeito benéfico de BCG contra tumores transplantáveis de camundongos, muitas são as referências sobre o valor de imunopotenciadores no tratamento de diferentes neoplasias (POOLE, 1973; MOAHAN & KAPLAN, 1976; AOKI e col., 1976; BARBER & DORSETT, 1981; DAVIES, 1982). Assim, o estado funcional dos elementos fagocíticos do sistema retículo-endotelial estaria relacionado com a proteção contra infecções bacterianas e tumores.

Agentes imunopotenciadores aparecem na literatura como efetivos em aumentar a resistência às radiações ionizantes (SMITH e col., 1957; BLONDAL, 1959; BALNER e col., 1961; HALPERN & ANDRÉ, 1977; ORTALDO & MCCOY, 1980; MAYR e col., 1980; GASSEL e col., 1981; PETERS e cols., 1981).

Pareceu-nos útil que uma reavaliação das experiências se apresentasse como proposição de trabalho pa-

ra constituir o objetivo desta tese. Assim, é nosso objetivo estabelecer:

- i) se BCG, cepa Moureau - Rio de Janeiro; Corynebacterium parvum Mérieux; Bacillus pertussis (Instituto Butantã); Lipopolissacarídeo de Escherichia coli; Proteose-peptona, são capazes de reduzir a letalidade em camundongos irradiados de corpo inteiro com radiação gama de ^{60}Co ;
- ii) as mudanças na atividade de enzimas lisossomais (fosfatase ácida, N-acetil glucosaminidase) por efeito da radiação, medidas em extratos totais de baço e fígado;
- iii) a influência de agentes imunomoduladores e/ou capazes de ativar macrófagos como BCG, lipopolissacarídeo de E. coli, proteose-peptona, nas mudanças de atividade enzimática lisossomal provocadas pela radiação ionizante.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Animais

Foram utilizados camundongos BALB/c e em certas ocasiões C57BL/10, alojados em caixas metálicas, em grupos de 5 a 10 animais por caixa, sob dieta usual de laboratório (Moinho São Cristovão) e água ad libitum. Salvo especificação, os animais eram machos BALB/c de aproximadamente 8 semanas de idade, pesando 20-24 g.

2.2 Bacilo Calmette-Guérin (BCG)

Utilizou-se a cepa brasileira, estirpe Moreau - Rio de Janeiro, obtida da Fundação Ataulpho de Paiva, Instituto Viscondessa de Moraes, Rio de Janeiro, liofilizada em ampolas de 5 mg. Os camundongos foram injetados s.c. com a suspensão dos organismos, imediatamente após reconstituição, 3 a 4 semanas antes da irradiação, geralmente com 1 mg BCG/0,5 ml.

2.3 Corynebacterium parvum

Empregou-se a cepa IM1583, organismos inativados pelo calor e formol na forma de preparação imunoes timulante proveniente do Instituto Mérieux, Lyon, França, em ampolas de 4 mg de pó seco em 2 ml de suspensão aquosa. Os

animais foram injetados i.p. antes da irradiação, com 0,25 ml da suspensão.

2.4 Bordetella pertussis

A suspensão proveniente do Instituto Butantã continha aproximadamente 7×10^{11} organismos/ml, em solução salina, contendo 1:5000 de merthiolate. As diluições necessárias foram feitas em salina esterilizada e o tratamento pelo calor foi feito na diluição correspondente, em banho a 65°C durante uma hora. Os camundongos foram injetados i.p. com 7×10^9 organismos/0,1 ml, 6-7 dias antes da irradiação.

2.5 Proteose-peptona

Proteose-peptona (Difco Laboratories, Detroit, Michigan) foi preparada a 10% em solução salina estéril e colocada em banho em ebulição durante uma hora antes de ser injetada i.p. 0,75 ml/camundongo, 3 dias antes da irradiação.

2.6 Lipopolissacarídeo de E. coli (LPS)

Foi utilizado o serotipo nº 055:B5, da Sigma Chemical Company, St Louis, USA, dissolvido em salina estéril. Os animais foram injetados i.p. 1 dia antes da irradiação, com uma solução de 100 $\mu\text{g/ml}$, 20 $\mu\text{g/camundongo}$ no caso de animais fêmeas ou 50 $\mu\text{g/camundongo}$ para os machos.

2.7 Irradiações

2.7.1 Irradiação dos animais

As irradiações foram realizadas no interior duma fonte de raios gama de ^{60}Co , Gamma Cell 220 Irradiation Unit, da Atomic Energy Commission of Canada Ltd, de 9235 Ci (1 Ci de radioatividade representa $3,7 \times 10^{10}$ desintegrações por segundo, equivalente a $3,4 \times 10^{14}$ Bq) em 8 de março de 1974. A dose foi recalculada todos os meses, levando em consideração um decaimento de 0,989% por mês. Em novembro de 1982, a taxa de dose com a blindagem utilizada foi de 0,18 Gy/s, onde Gy (gray) equivale a uma energia absorvida de 1 Joule por kg. Os animais foram irradiados dentro da câmara de simetria radial, uniformemente, em grupos de 3 ou 4 animais por vez, dentro de recipiente cilíndrico de papelão de 9 cm de diâmetro e 18 cm de altura.

2.7.2 Irradiação de BCG

BCG foi irradiado na forma de pó liofilizado contido em ampolas de 5 mg com uma dose de 3×10^4 Gy durante aproximadamente 10 horas na fonte de ^{60}Co descrita acima, porém sem blindagem.

2.8 Esquema experimental

As drogas utilizadas na preparação das soluções foram todas de grau de pureza analítico. Os animais utilizados em cada experiência eram consanguíneos e nascidos quase no mesmo dia para garantir homogeneidade entre

os animais em experimentação e os de referência. Na primeira fase deste estudo, os animais foram injetados com os diferentes agentes e posteriormente irradiados, sendo acompanhados no mínimo durante 60 dias a fim de estabelecer a sobrevida, determinando curvas de peso corporal, peso de baço e peso de fígado nos casos apropriados.

Para os ensaios enzimáticos, em intervalos estabelecidos, geralmente no 3º dia após irradiação, os animais foram sacrificados por sangria sob anestesia com éter anestésico e o sangue coletado.

Em cada experiência, utilizaram-se grupos constituídos de no mínimo 4 animais testemunhas e até 12 camundongos tratados. As determinações de cada grupo foram realizadas em duplicado. Os resultados apresentados foram a média de pelo menos 2 experiências independentes, calculando-se os correspondentes valores do desvio padrão(s).

2.9 Preparação dos homogeneizados de tecidos e ensaios enzimáticos

Os baços e os fígados foram removidos rapidamente, lavados em sacarose 0,25 M, secos levemente em papel de filtro e pesados. Durante toda a preparação, a temperatura foi mantida entre 0 e 4°C. Para a obtenção da preparação enzimática em meio aquoso, seguiu-se o método de WALKER e col. (1961). Os órgãos pertencentes a um mesmo grupo de animais foram homogeneizados conjuntamente: os baços num homogeneizador do tipo Potter-Envehjem com bastão

de Teflon (Arthur H. Thomas Co, Phila. Pa) durante 1 minuto; os fígados num triturador de aço inoxidável (Universal Laboratory Aid Type 309 Mechanika Precyzyjna, licence of Unipan), durante 30 segundos, pH 4,4 em solução tampão 0,05 M citrato de sódio-ácido cítrico, numa concentração final de 10% peso/volume.

As amostras foram tratadas, durante 15 segundos, com ultra-som (Sonifier Cell Disruptor, Model W185, Heat Systems, Ultrasonics, Inc., New York, fabricado pela Branson Sonic Power Co., Connecticut) 20 KHz, 100 Watts, em banho de gelo. As misturas foram centrifugadas em centrífuga refrigerada (Sorvall Superspeed RC2-B) a 1500 g e os sobrenadantes mantidos a 4°C até serem utilizados.

O sangue colhido de cada grupo foi deixado à temperatura ambiente para permitir retração do coágulo por algumas horas, separado o soro por meio de pipeta Pasteur e centrifugado a 1500 rpm num centrifugador Excelsa 3 da Fanem Ltda, São Paulo. Os sobrenadantes foram mantidos na geladeira até sua utilização.

2.9.1 Determinação de fosfatase ácida

Para a determinação da fosfatase ácida seguiu-se a metodologia baseada no método de King & Armstrong descrito no Chemical Methods in Clinical Medicine (HARRISON, 1949).

As amostras enzimáticas (0,1 ml), junto com 1,0 ml de tampão citrato de sódio-ácido cítrico, 0,05 M,

pH 4,4, foram incubadas à temperatura de 37°C, com 1,0 ml do substrato fenil fosfato dissódico (Merck AG, Darmstadt) 8,6 mM. Após 1 hora de incubação, foi adicionado em cada tubo, 0,9 ml de reagente de fenol (Reagente de fenol segundo Folin-Ciocalteu, Merck AG, Darmstadt) diluído 1:3, que contém os ácidos fosfotúngstico e fosfomolibdico. As proteínas precipitadas foram removidas por centrifugação a 1500 rpm (Centrifugador Excelsa 3, Fanem Ltda). Aliquotas do sobrenadante (2,0 ml) foram alcalinizadas mediante a adição de 2,5 ml de solução de Na₂CO₃ a 40% para deter a reação, apresentando-se o fenol liberado na sua forma aniônica. Após 15 minutos de aquecimento e posterior retorno à temperatura ambiente, a absorvância das soluções foi lida a 520 nm num colorímetro Spectronic 20 Bausch & Lomb (Arthur H. Thomas Co, Phila. Pa) mediante comparação com a curva padrão obtida a partir de 0; 0,1; 0,2; 0,4 ml de uma solução estoque de 100 mg de fenol (Mallinckrodt Chemical Works, St. Louis) em 100 ml HCl 0,1 N, diluída 1:10. Os brancos correspondentes foram submetidos ao mesmo tratamento, porém sem incubação.

Uma unidade de enzima correspondeu à hidrólise de 1 μmol de substrato à temperatura de 37°C durante 1 hora, referida a uma massa de tecido de 1 mg ou a 1 mg de proteína.

2.9.2 Determinação de N-acetil-β-D-glucosaminidase

Utilizou-se a metodologia descrita por WALKER e col. (1961).

Um volume de 0,1ml da preparação enzimática

ca foi incubado a 37°C com 0,9 ml de solução 1,8 mM do substrato p-nitrofenil N-acetil-β-D-glucosaminídeo (Sigma Chemical Co, St. Louis) em tampão citrato 0,05 M, pH 4,4 durante 1 hora. A reação foi detida mediante a adição de solução 0,25 M de Na₂CO₃. A absorvância foi lida a 400 nm num colorímetro Spectronic 20 Bausch & Lomb (Arthur H. Thomas Co, Phila. Pa.) e comparada com a curva padrão construída com 0, 20, 40 e 60 μl de solução 3,6 mM de p-nitrofenol, espectrofotometricamente puro, cedido pelo Dr. Nilo Kiyari, Departamento de Química Orgânica, do Instituto de Química, da Universidade de São Paulo. Foram deduzidos os correspondentes brancos, provenientes da incubação da preparação enzimática em tampão, assim como aquele proveniente da incubação da solução de substrato.

Uma unidade de enzima correspondeu à hidrólise de 1 μmol do substrato a 37°C durante 1 hora, referida a uma massa de 1 mg de tecido ou 1 mg de proteína.

2.10 Determinação de proteínas

Utilizou-se o método de LOWRY e col., (1951), modificado por MILLER (1959). Nessa metodologia emprega-se um volume comparativamente menor de reagente de cobre alcalino mais concentrado e um volume maior de reagente de fenol mais diluído, o que garante uma melhor mistura inicial, além de exigir menor tempo operacional.

Alíquotas de 0,5 ml de reagente de cobre alcalino composto de 10 partes de Na₂CO₃ a 10% em NaOH

0,5 N e uma parte de CuSO_4 0,5% em tartarato de potássio a 1%, foram adicionadas a alíquotas de 0,5 ml da solução de proteína. Após 10 minutos, foi adicionado rapidamente 1,5ml de reagente de fenol segundo Folin-Ciocalteu (Merck AG, Darmstadt) diluído 1:11, por tubo. As mituras foram aquecidas durante 10-20 minutos num banho de água a 50°C . Após retorno à temperatura ambiente, a absorvância das amostras foi lida a 750 nm num espectrofotômetro PMQ II 91518 (Carl Zeiss, Oberkochen, Rep. Fed. de Alemanha). A curva padrão foi construída a partir duma solução 1 mg/ml de albumina bovina, fração V (Sigma Chemical Co, St. Louis, USA) na faixa de 0,04 a 0,20 mg de proteína.

2.11 Análise estatística

2.11.1 Curvas de sobrevivência

Considerando $F_1(t)$ a função da distribuição do tempo de sobrevivência à irradiação dos camundongos testemunhas e $F_2(t)$ a dos camundongos em experimentação, pretendeu-se verificar se:

$$F_1(t) < F_2(t) \quad \text{para} \quad 0 < t \leq 60 \quad (\text{dias})$$

sendo 60 dias nosso período de observação. Não tendo idéia sobre a função de risco e sendo os dados pouco numerosos, utilizou-se procedimento não-paramétrico. Seguindo recomendação do Prof. Dr. José F. Carvalho, do Instituto de Ciências Matemáticas de São Carlos da Universidade de São Paulo, calculou-se para cada caso o nível de significância estatística

tica (P) mediante o emprego do programa PLL para análise de sobrevividas do BMDP Biomedical Computer Program P-Series 1979 (BENEDETTI & YUEN, 1979) processado num computador IBM/370. Esse programa tinha a vantagem de incluir a informação do tempo de sobrevida de cada animal para a estimativa das probabilidades de sobrevivência, aplicando estatística de Wilcoxon e Breslow para verificar a igualdade das distribuições de sobrevida dos animais tratados e não-tratados.

2.11.2 Ensaio enzimáticos

Os resultados das determinações de atividade enzimática foram analisados mediante a hipótese da igualdade de duas médias (ATALLA, 1978). Supondo duas médias: \bar{x}_1 obtida por n_1 determinações e \bar{x}_2 obtida por n_2 determinações e sendo

$$\bar{x}_1 < \bar{x}_2 \quad \text{numericamente}$$

para comparar as duas médias, calculou-se a média geral \bar{x} fazendo:

$$\bar{x} = \frac{n_1\bar{x}_1 + n_2\bar{x}_2}{n_1 + n_2}$$

Calcularam-se os valores correspondentes da distribuição normal:

$$u_1 = 2 \left(\sqrt{n_1\bar{x}_1 + 1} - \sqrt{n_1\bar{x}} \right)$$

$$u_2 = 2 \left(\sqrt{n_2\bar{x}_2} - \sqrt{n_2\bar{x}} \right)$$

A diferença $u_2 - u_1$ é considerada aproximadamente como sendo a diferença de duas variáveis que se comporta segundo a distribuição normal. Considerou-se que as duas médias diferiram entre si num nível de confiança de 0,05 ou 0,01 se $u_2 - u_1$ foi maior que:

$$1,96 \sqrt{2} = 2,77 \quad (\text{nível } 0,05)$$

$$2,58 \sqrt{2} = 3,64 \quad (\text{nível } 0,01)$$

3. RESULTADOS

A figura 1 mostra a sobrevivência de camundongos irradiados uniformemente de corpo inteiro com diferentes doses de radiação gama de ^{60}Co , taxa de dose 0,18 Gy/s. As doses usadas delimitam a região de letalidade que abrange desde dose subletal, 6 Gy, até a dose que provoca 100% de mortalidade, acima de 9 Gy.

Os animais utilizados em nossas experiências eram todos adultos e as taxas de sobrevivência não variaram significativamente, com diferenças de idade entre 6 e 16 semanas. Contudo, a perda de peso corporal provocada pela ação da radiação é maior em animais mais jovens, coincidente com a observação de outros autores (ABRAMS, 1951). Na figura 2 está representada a curva de peso de camundongos após irradiação com 8,5 Gy. Em animais de 6 semanas, a perda de peso corresponde a 26%, sendo 17% o valor correspondente para animais de 12 semanas. Um mínimo do peso corporal é atingido só após 2 semanas da irradiação com doses letais, enquanto que o menor valor de peso do baço já aparece após os primeiros dias da irradiação, mantendo-se quase inalterado o peso do fígado. A figura 3 mostra a variação de peso do baço e do fígado, logo nos primeiros dias após a irradiação com doses subletais. Nessas condições, não houve perda significativa de peso corporal nem variação no

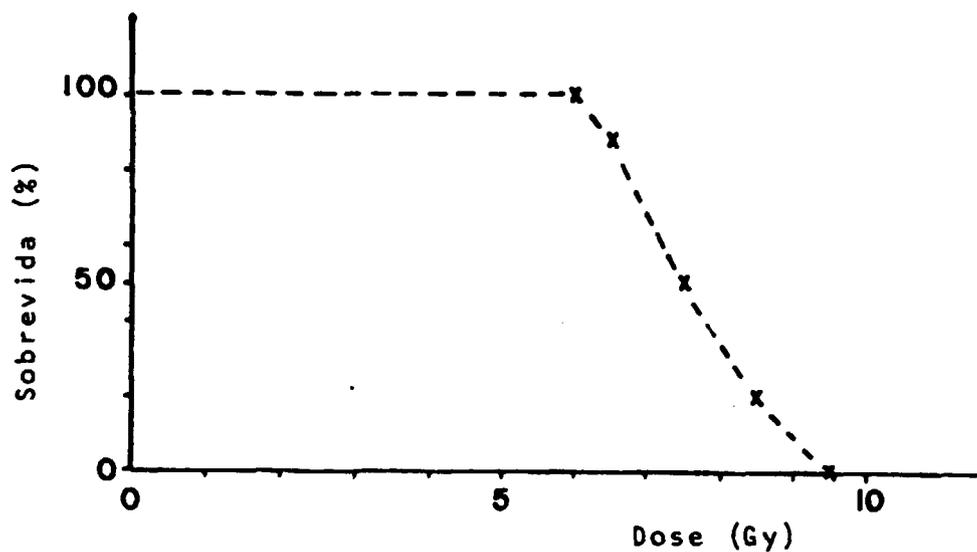


FIGURA 1. Representação gráfica da sobrevivida, após 30 dias, de camundongos irradiados com as doses de 6,0; 6,5; 7,5; 8,5; 9,5 Gy de ^{60}Co , sendo o número de animais sobreviventes/animais totais 9/9; 7/8; 5/10; 2/10; 0/10, respectivamente. Taxa de dose: 0,18 Gy/s.

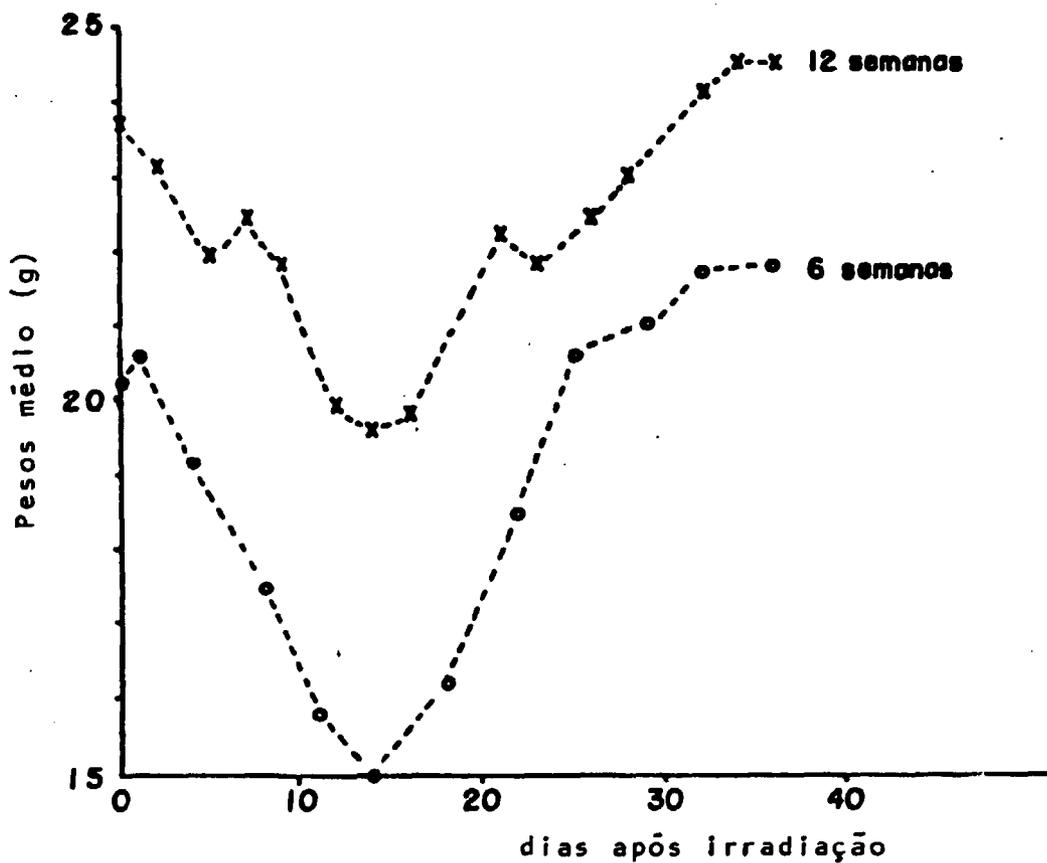


FIGURA 2. Gráfico dos pesos médios de camundongos de 6 e 12 semanas de idade, sobreviventes à irradiação com 8,5 Gy de ^{60}Co , em função do tempo após irradiação.

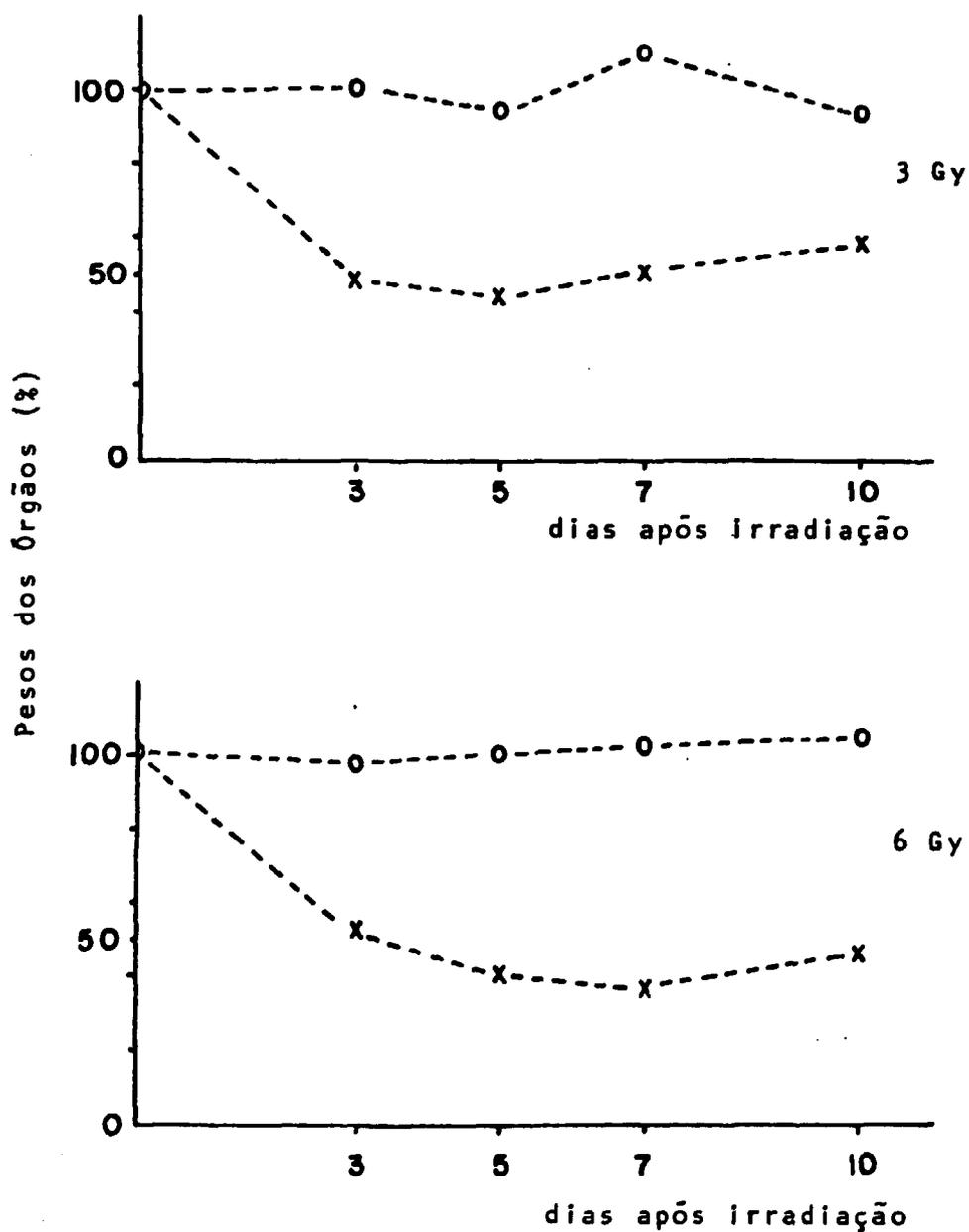


FIGURA 3. Representações gráficas dos pesos percentuais normalizados de baço e fígado de camundongos após irradiação com doses de 3 e 6 Gy ^{60}Co . Médias de 10 animais.

(o) fígado;

(x) baço.

peso do fígado, mas o baço já no 39 dia apresenta a metade do peso inicial com tendência à recuperação só após 10 dias. Para doses letais a perda de peso do baço é ainda mais acentuada, podendo cair mais de 80% do peso inicial, ao 39 dia após irradiação, como mostram mais adiante as figuras 15, 16 e 17.

Em todos os casos, a diminuição do peso corporal dos camundongos, foi antecedida por uma queda na ingestão de alimentos, já a partir do 19 dia após irradiação.

Os valores de pesos percentuais de baço e fígado após administração de agentes imunomoduladores estão apresentados na figura 4. Corynebacterium parvum e BCG, conhecidos imunoestimuladores, provocam aumento substancial do peso do baço entre a 1^a e 2^a semanas após injeção, tendo sido registrados os valores de 360% e 220%, respectivamente, após a 1^a semana, apresentando também pequeno aumento do peso do fígado no caso de C. parvum. BCG por sua vez, produz ainda aumento no peso do baço por volta da 4^a semana. Já proteose-peptona, agente capaz de aumentar a proporção de macrófagos peritoneais, não provoca modificações nos pesos de baço e fígado.

De maneira geral, os agentes experimentais capazes de produzir esplenomegalia em camundongos, não são também capazes de suprimir a perda de peso decorrente da ação da radiação nesse órgão, mas a recuperação parece ser mais acentuada. A curva de peso dos animais injetados por exemplo com BCG e posteriormente irradiados (Fig.5), a-

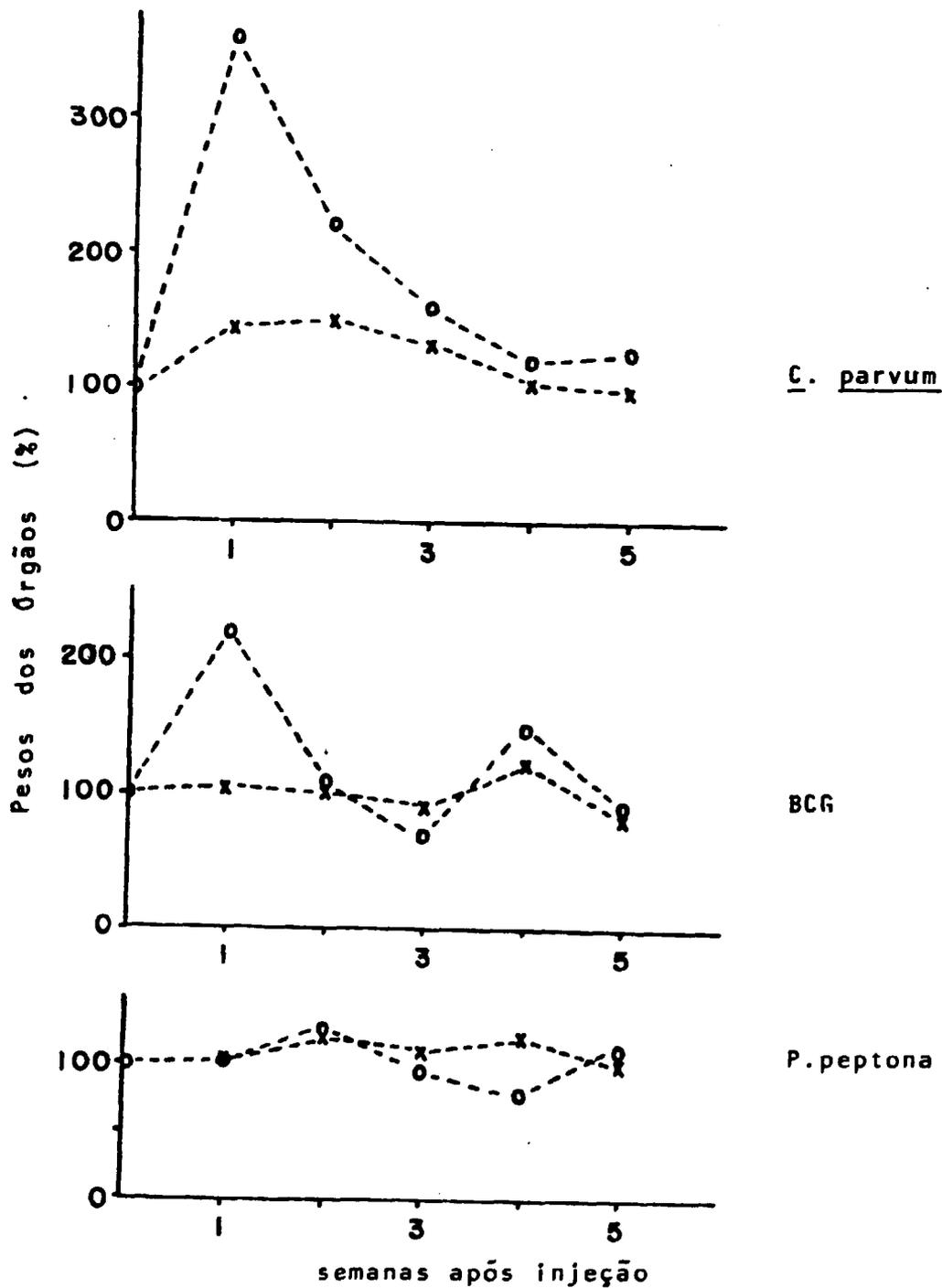


FIGURA 4. Representações gráficas dos pesos percentuais normalizados de baço e fígado de camundongos após injeção de C. parvum, BCG, protose-peptona. Médias de 10 animais.

(x) fígado;

(o) baço.

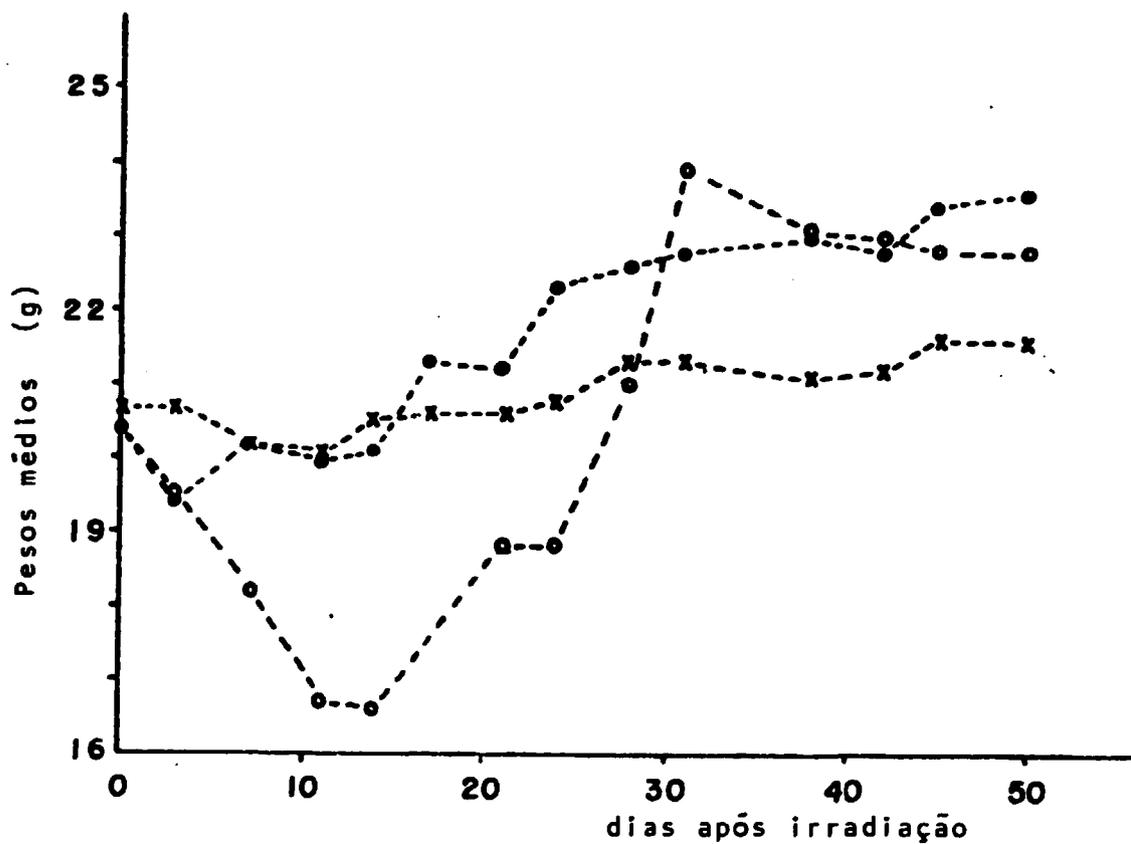


FIGURA 5. Gráfico dos pesos médios de camundongos em função do tempo.

- (●) injetados com BCG 3 semanas antes;
- (o) injetados e posteriormente irradiados com 8,5 Gy ^{60}Co ;
- (x) não tratados.

presenta valores superiores após o mínimo do que dos correspondentes animais não tratados. Aos animais injetados com BCG, pareceria corresponder valores de pesos corporais aumentados em relação aos não tratados, salvo nos primeiros dias após a administração, em que essa tendência está invertida.

A injeção de solução isotônica de NaCl, nos camundongos, excipiente líquido utilizado, não produziu qualquer modificação na sobrevivência à radiação, assim os animais testemunhas não foram injetados.

As curvas de sobrevivência após irradiação de camundongos tratados com os diferentes agentes, assim como as dos não tratados pertencentes aos respectivos lotes, são apresentadas a partir da figura 6. Nas próprias figuras encontra-se o valor de P , nível de significância, ao qual podemos considerar que as curvas correspondentes aos animais tratados são estatisticamente diferentes das dos animais não tratados. A figura 6 representa o resultado de experiências nas quais se estabelece a influência da injeção prévia, 3 dias antes, de 50 e 75 mg de proteose-peptona/camundongo. Os valores de sobrevivência a 60 dias após irradiação são de 70 e 69% para essas doses injetadas, sendo 20 e 13% os correspondentes valores dos grupos não tratados. Neste tipo de experiência o exemplo mais significativo é o representado na figura 6B ($P:0,01$). A figura 7A, por sua vez, mostra experiência semelhante à anterior porém realizada com camundongos C57BL/10. Neste caso, o efeito de proteose-peptona sobre a sobrevivência de camundongos irradiados é oposto: a sobre-

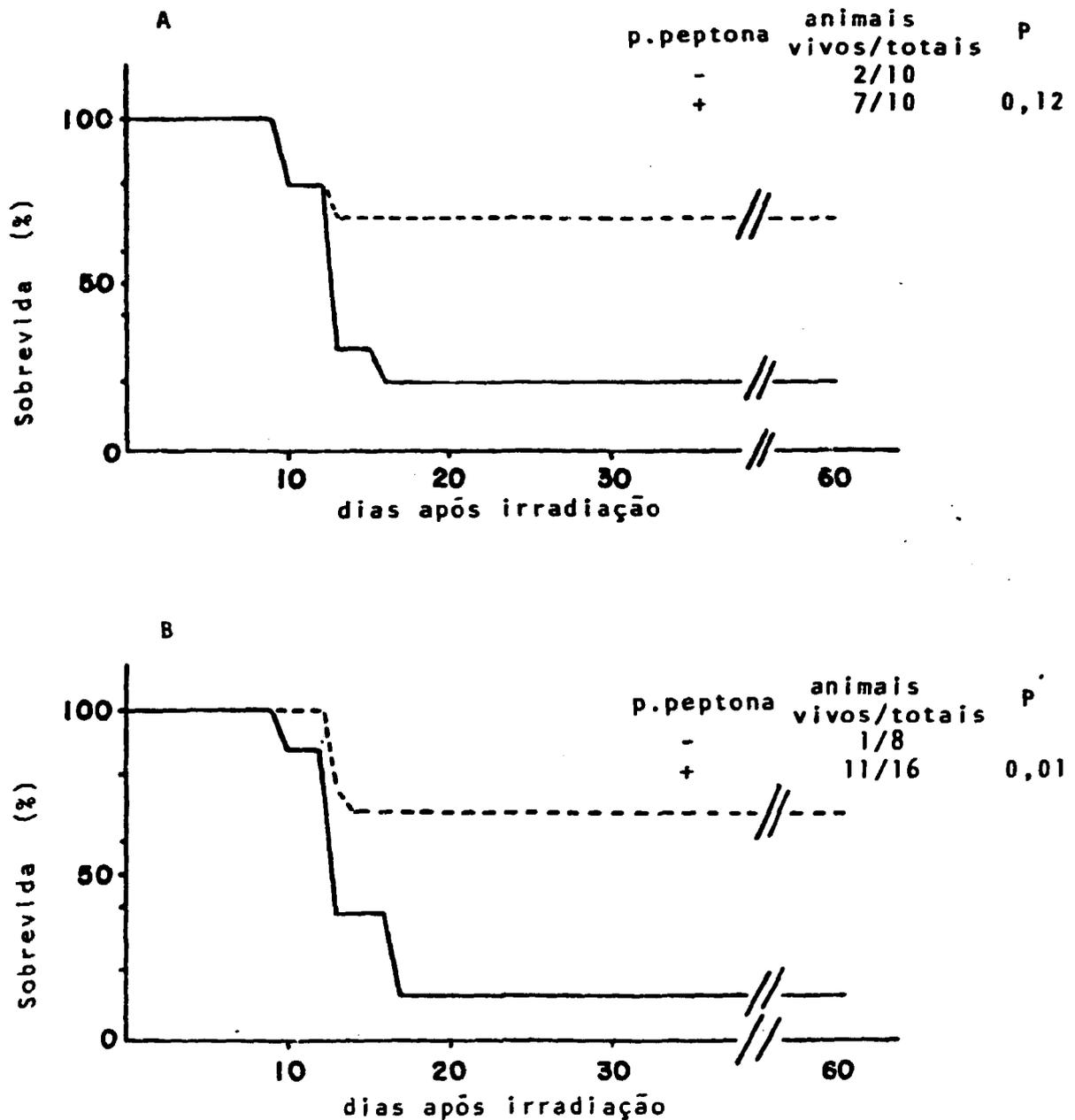


FIGURA 6. Representações gráficas da sobrevivida versus tempo, de camundongos irradiados com 8,5 Gy ^{60}Co não tratados (-) ou tratados com proteose-peptona (---).

A) 50 mg/0,5 ml

B) 75 mg/0,75 ml

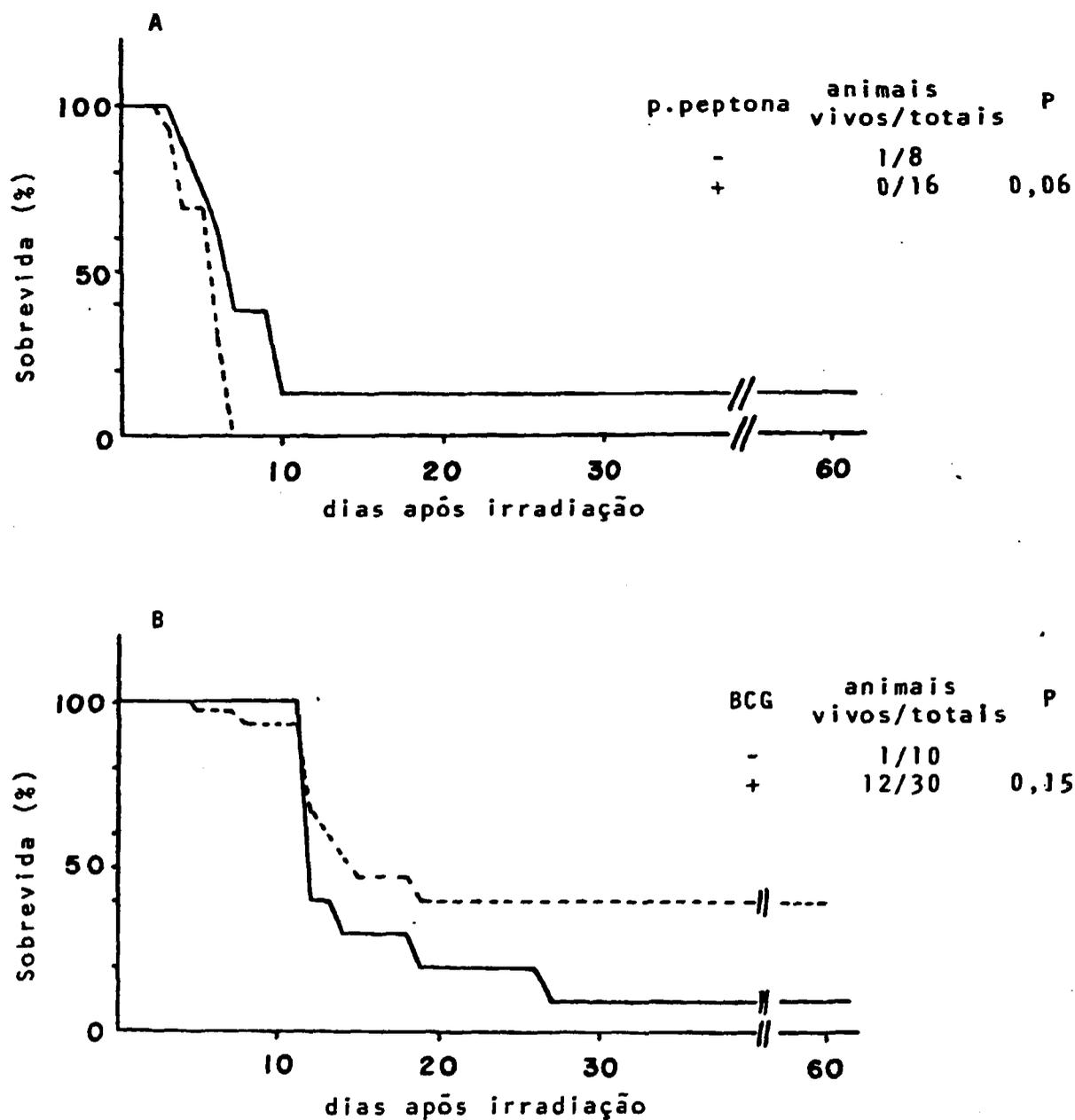


FIGURA 7. Representação gráfica da sobrevivência versus tempo, de camundongos irradiados com 8,5 Gy ^{60}Co , tratados (---) e não tratados (—).

- A) camundongos C57BL/10 tratamento: proteose-peptona 75 mg/0,75 ml;
- B) camundongos BALB/c, tratamento: 125 µg BCG previamente irradiado com 3×10^4 Gy em 0,25 ml.

vida dos animais tratados é inferior à dos camundongos não tratados, sendo os valores respectivos 0 e 13%. Já a figura 7B representa a primeira de uma série de experiências nas quais se exemplifica o efeito de diferentes doses de BCG na sobrevivência à irradiação. Neste caso, a sobrevivência à irradiação foi aumentada de 10 para 40% nos animais BALB/c tratados com 125 μ g de BCG que fora previamente irradiado, porém esse efeito não chega a ser mensuravelmente significativo segundo o teste estatístico de ordenação utilizado ($P: 0,15$).

A figura 8 mostra a representação gráfica de experiências envolvendo o efeito de diferentes doses de BCG viável. Na figura 8A estão representadas as curvas de sobrevivência de camundongos BALB/c irradiados, tratados e não tratados com 200 μ g de BCG, cuja ação se traduz num aumento da sobrevivência de 30 para 70%. Na figura 8B é apresentada uma outra experiência que mostra o efeito de 125 μ g de BCG viável. Assim como no caso anterior, ambas as doses de BCG apresentam ação modificadora da curva de sobrevivência à irradiação, sendo neste último caso 0 a 30% os percentuais respectivos.

Nas figuras 9A e 9B estão exemplificadas experiências semelhantes às anteriores, porém utilizando camundongos C57BL/10. Neste caso, a ação do BCG é exercida também nesta cepa, coisa que não acontecia no caso da ação de proteose-peptona. Na figura 9 são apresentados percentuais de sobrevivência de 30 e 20% para os animais previamente injetados com 1 mg de BCG, machos e fêmeas respectivamente, sendo, para ambos os casos, 0% a sobrevivência dos animais não tratados. É interessante verificar que apesar de o aumento da

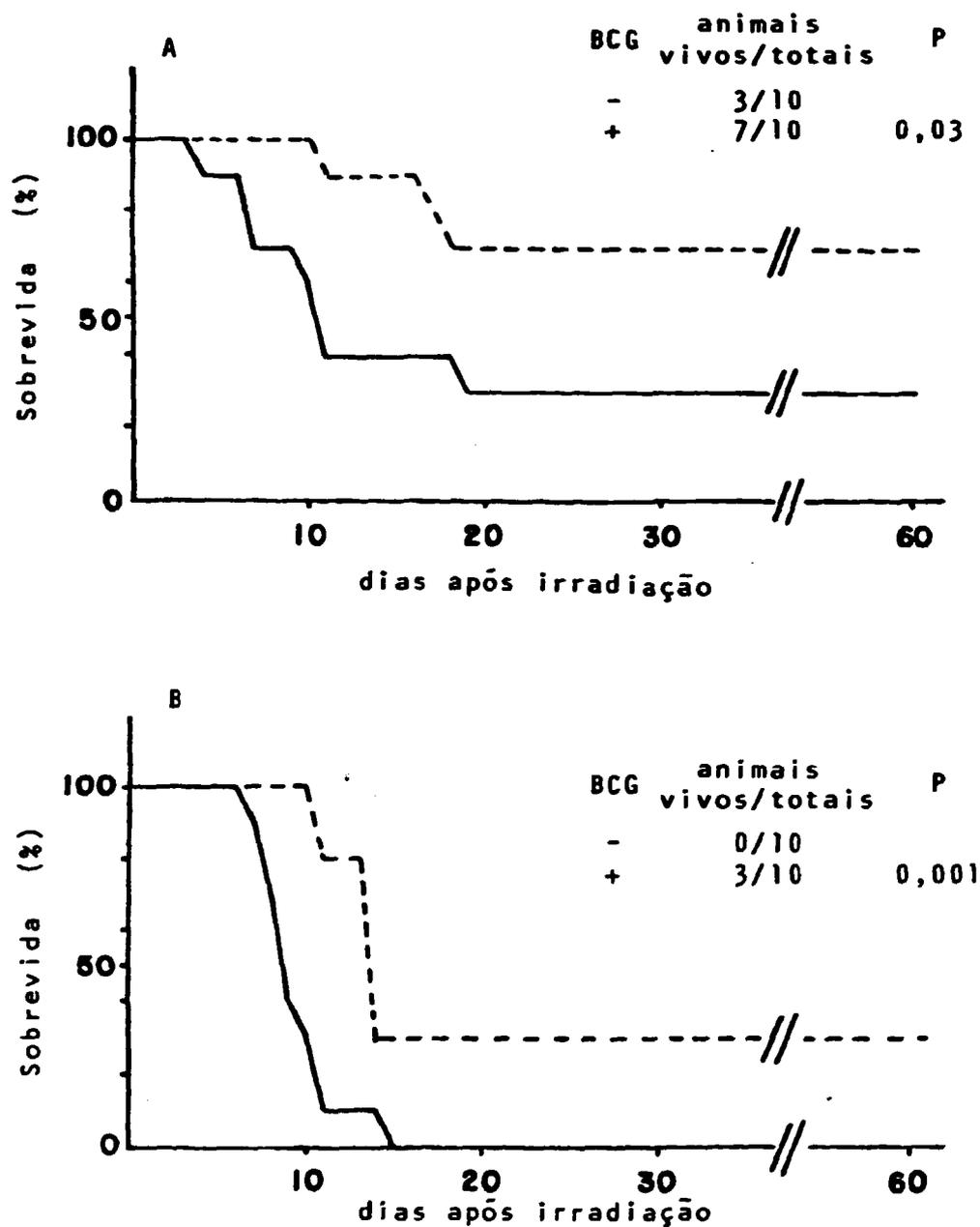


FIGURA 8. Representação gráfica da sobrevivência de camundongos irradiados com 8,5 Gy ^{60}Co não tratados (—) e tratados com BCG (---).

A) 200 $\mu\text{g}/0,1$ ml.

B) 125 $\mu\text{g}/0,1$ ml.

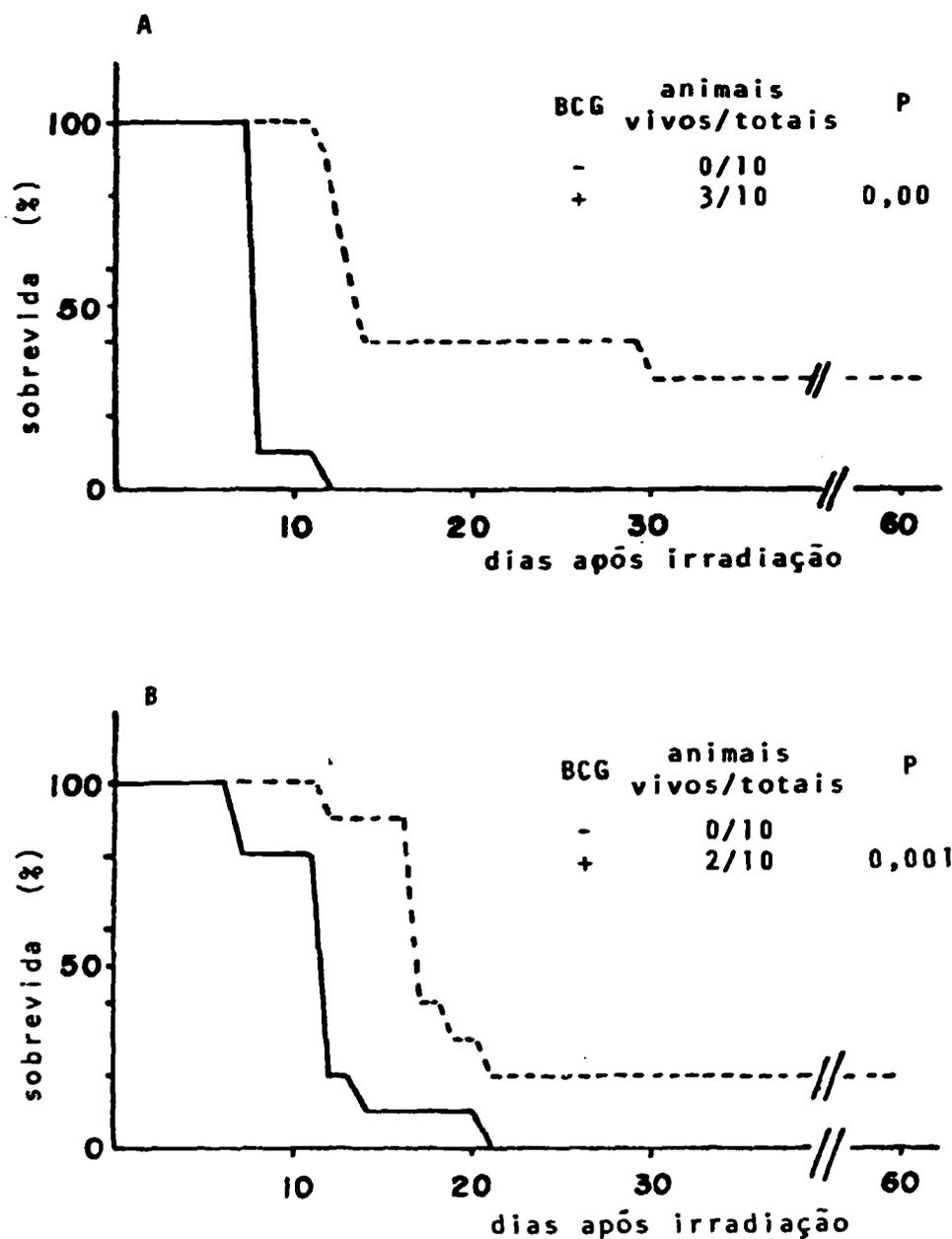


FIGURA 9. Representação gráfica da sobrevivência de camundongos C57BL/10 irradiados com 8,5 Gy ^{60}Co não tratados (—) e tratados com BCG (---) 1 mg/0,25 ml.

- A) animais machos;
 B) animais fêmeas.

sobrevida ser discreto, ele é altamente significativo segundo o teste estatístico usado, tanto para o caso de animais machos quanto para fêmeas. Os resultados deste conjunto de experiências, contudo, não mostram relação entre ação e doses de BCG, pelo menos dentro da faixa de 125 a 1000 µg de BCG/camundongo.

Na figura 10 estão descritas experiências realizadas para verificar a ação de Bordetella pertussis na sobrevida à irradiação. Nas experiências descritas na figura 10A, a injeção desse microorganismo, tratado ou não pelo calor, não é capaz de aumentar a sobrevida, sendo os valores obtidos de 0 a 13% respectivamente para os animais tratados, contra 40% para os não tratados, o que denota evidente sensibilização à radiação. Já na figura 10B são apresentados os resultados de experiência semelhante, mas na qual o número de organismos injetados é 100 vezes menor. Neste caso, não existe qualquer modificação na sobrevida, sendo os valores obtidos de 22 e 30% para os animais tratados e não tratados, respectivamente.

A figura 11 exemplifica a ação de LPS na sobrevida à irradiação. Esse agente imunomodulador, é capaz de induzir notória radioproteção quando injetado na véspera da irradiação mas não é efetivo quando injetado 5 dias antes (observação pessoal não mostrada nos Resultados). Nesta experiência, os valores percentuais da sobrevida à irradiação aumentam de 25 para 69% e de 20 para 75% para animais machos e fêmeas, respectivamente, quando injetados com LPS.

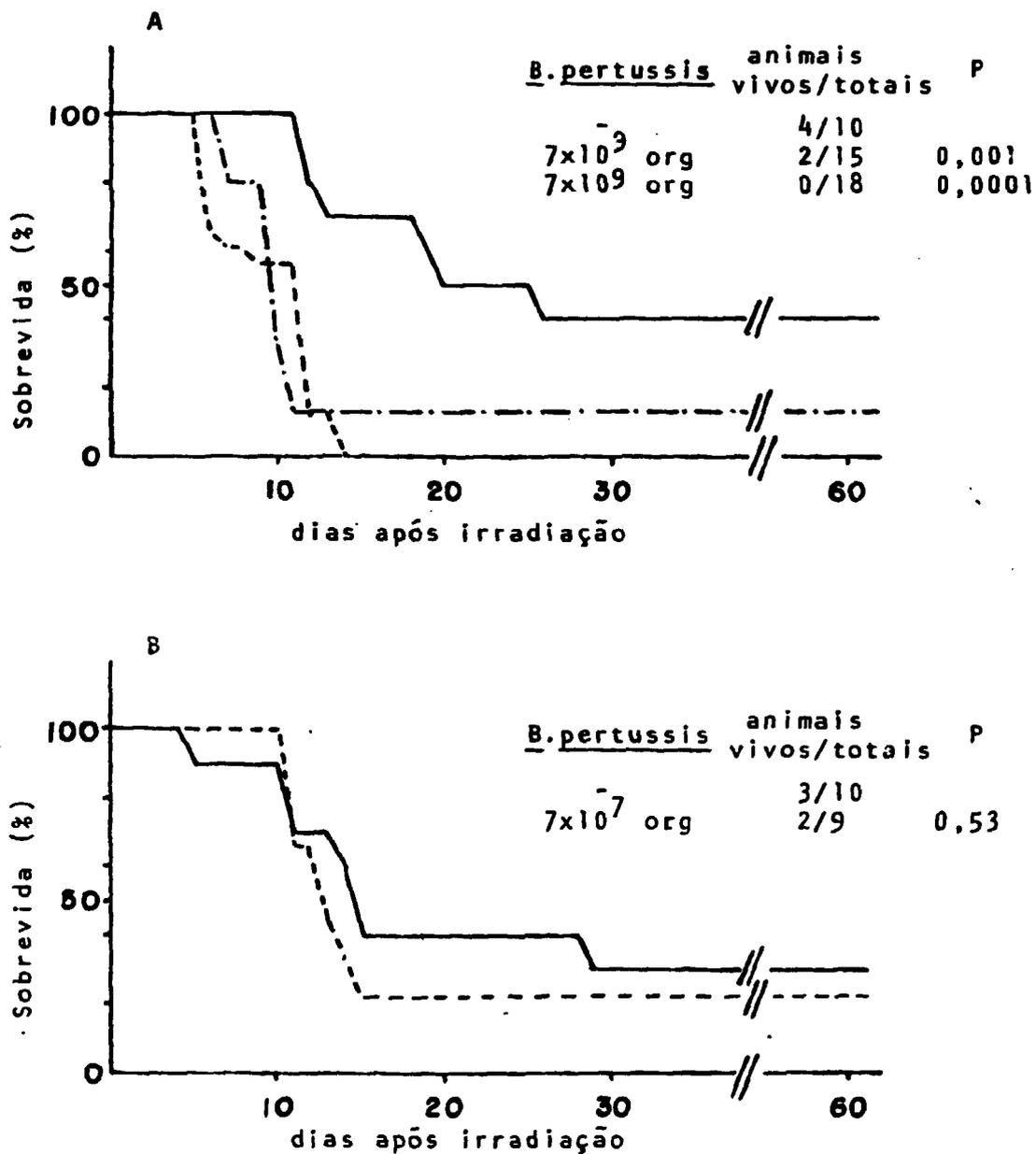


FIGURA 10. Representação gráfica da sobrevivência de camundongos irradiados com 8,5 Gy ^{60}Co não tratados (—), tratados com Bordetella pertussis (---) e tratados com Bordetella pertussis submetido a ação do calor (-.-.-).

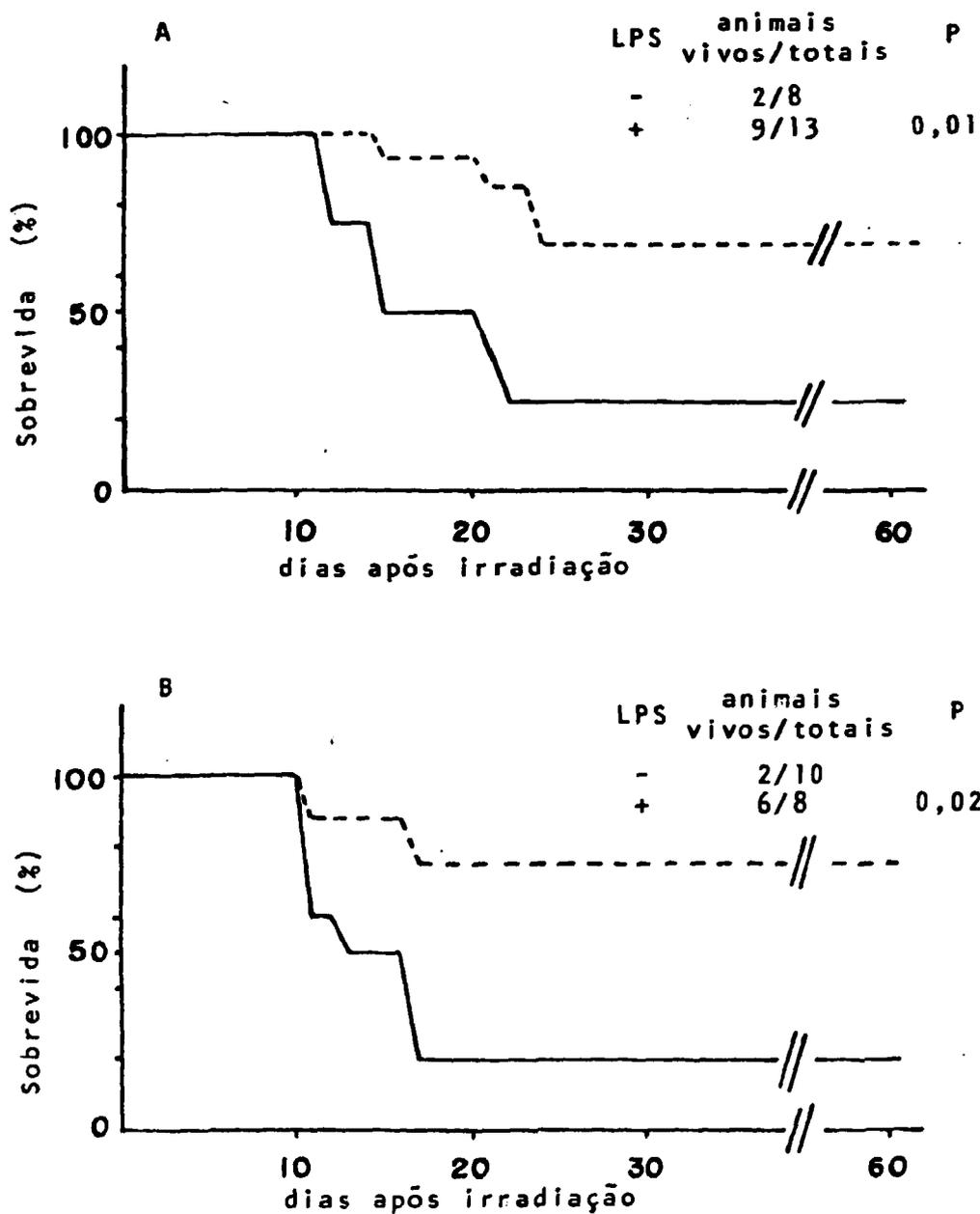


FIGURA 11. Representação gráfica da sobrevivência de camundongos irradiados com 8,5 Gy ^{60}Co não tratados (—) e tratados com LPS (---).

A) animais machos (50 µg/0,25 ml);

B) animais fêmeas (20 µg/0,20 ml).

A figura 12 mostra os resultados do efeito de Corynebacterium parvum na sobrevivência à irradiação. Os resultados mostram aumento da sobrevivência de 25 para 55% e de 0 para 33% quando os camundongos foram injetados 1 semana ou 10 dias antes da irradiação, respectivamente. Em ambos os casos há significativa radioproteção induzida pela administração de 500 µg de C. parvum Mérieux.

As experiências realizadas para determinar atividades enzimáticas lisossomais antes e após irradiação foram realizadas dosando-se a N-acetil-beta-D-glucosaminidase e, a fosfatase ácida.

Foram feitas determinações de fosfatase ácida e de N-acetil-beta-D-glucosaminidase nos soros dos diferentes grupos de animais. Não foi possível, contudo, estabelecer qualquer relação sistemática e significativa entre atividade enzimática e doses de radiação ou tempo após irradiação, sendo os valores obtidos nas dosagens dos diversos grupos ao redor de 10 e 20 mU/ml soro para fosfatase ácida e N-acetil-beta-D-glucosaminidase, respectivamente.

Na figura 13, esquematizam-se determinações de atividade enzimática para essas duas enzimas no baço e fígado de animais não irradiados e a diferentes intervalos após irradiação com doses subletais (6 Gy). É possível perceber um aumento significativo de ambas enzimas esplênicas já no 39 dia (P: 0,01), mantendo-se valores aumentados com pequenas oscilações não significativas, inclusive no 109 dia. Entretanto, nesse mesmo período, os níveis de atividade de N-acetil-beta-D-glucosaminidase e fosfatase ácida hepática não

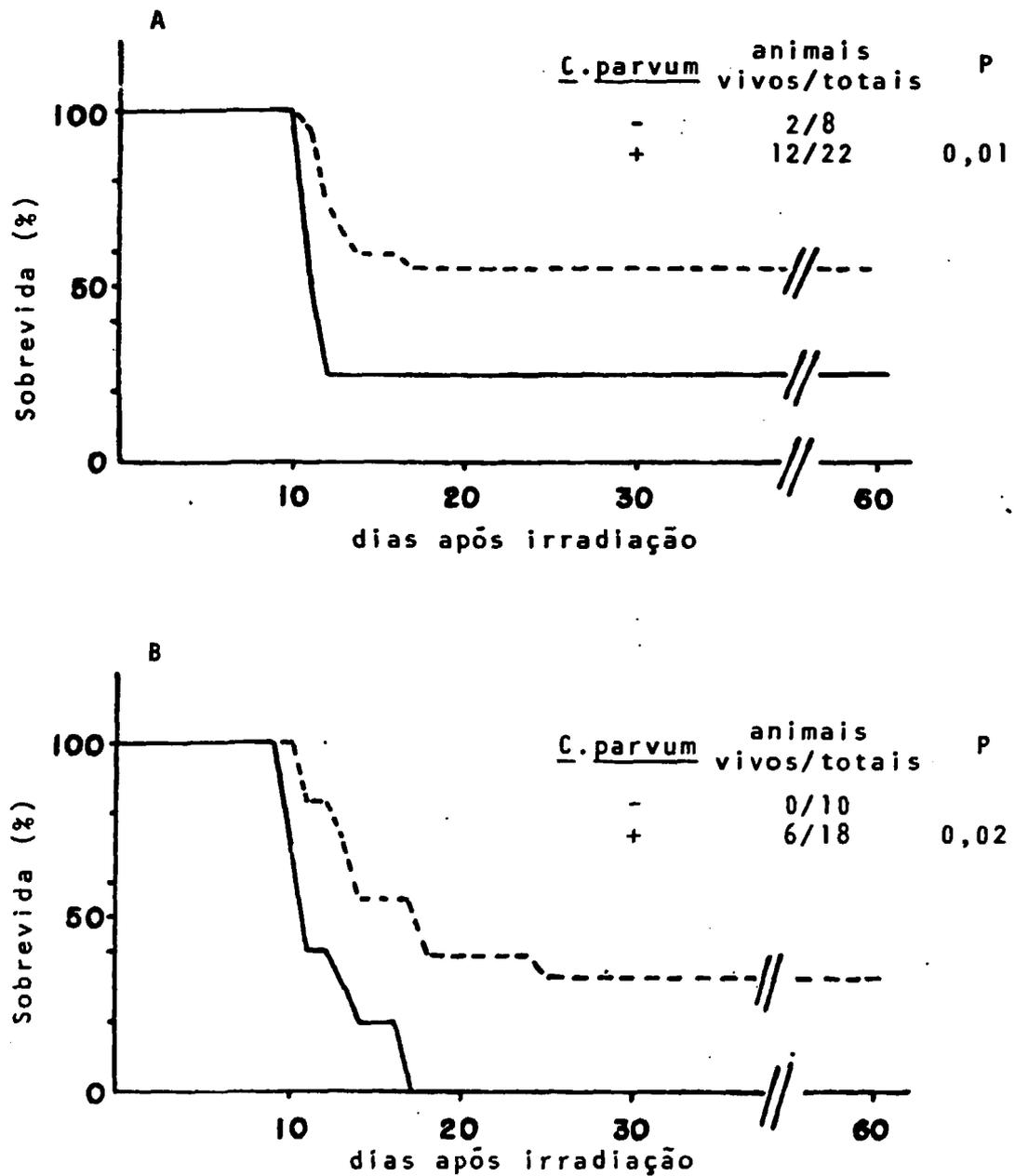
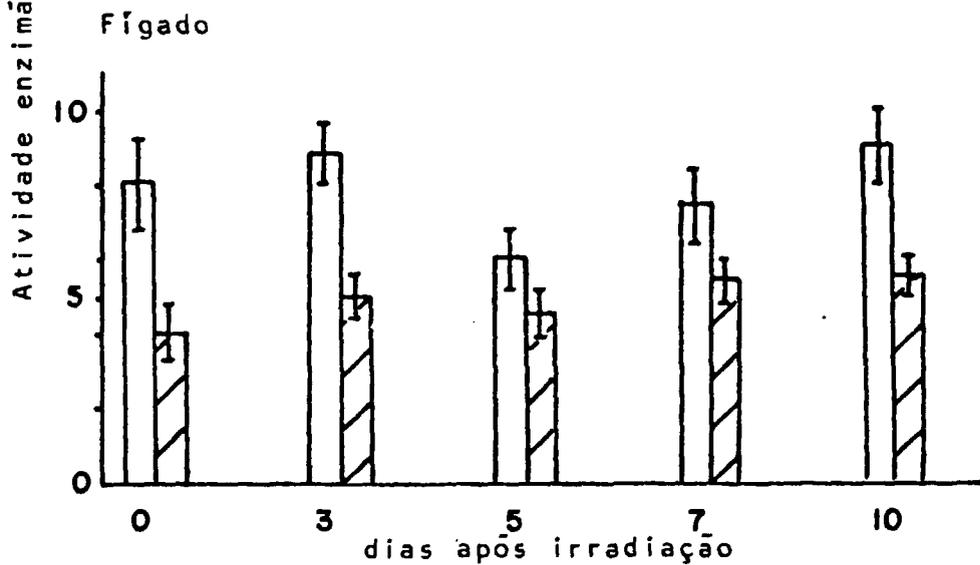
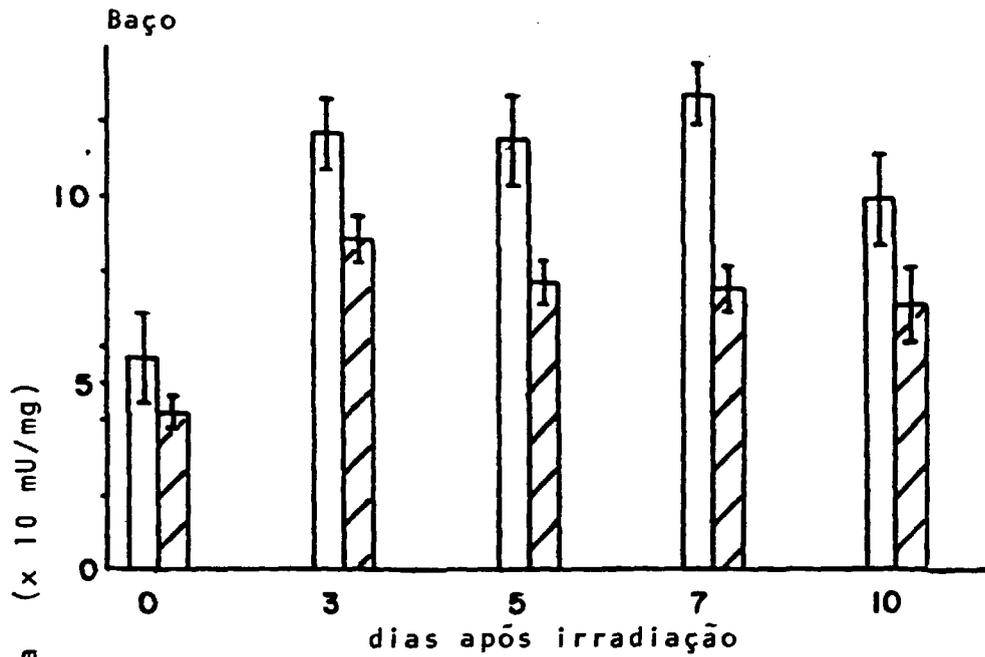


FIGURA 12. Representação gráfica da sobrevivência de camundongos irradiados com 8,5 Gy ^{60}Co não tratados (—) e tratados com Corynebacterium parvum (---).

A) injetados i.p. 1 semana antes da irradiação;

B) injetados s.c. 10 dias antes da irradiação.



□ N-acetil-beta-D-glucosaminidase

▨ fosfatase ácida

FIGURA 13. Representação gráfica da atividade enzimática no baço e fígado após irradiação gama 6 Gy ^{60}Co . (Médias \pm s).

sofrem mudanças significativas, apesar de apresentar valores aparentemente mais altos no 39 dia quando comparado ao não irradiado (tempo 0), assim como uma queda aparente no 59 dia. Nestas experiências, a atividade de N-acetil-beta-D-glucosaminidase esplênica eleva-se de aproximadamente 57 mU/mg de tecido para ao redor de 120 mU/mg no 39 dia após irradiação, enquanto que para a enzima hepática esses valores permanecem com poucas alterações ao redor de 80 mU/mg, com ou sem irradiação. Fosfatase ácida esplênica tem também sua atividade quase duplicada por efeito da radiação: partindo de valores de 42 mU/mg, atinge o nível de 88 mU/mg ao 39 dia. A enzima hepática, entretanto, permanece com valores quase inalterados ao redor do nível inicial de 40 mU/mg, nos diversos intervalos após irradiação.

Foram determinadas as atividades enzimáticas em diferentes doses de radiação. Na figura 14, encontram-se os resultados das determinações das duas enzimas esplênicas e hepáticas de animais irradiados previamente com 0, 6, 8,5 e 11 Gy de radiação gama de ^{60}Co . Aparentemente, as doses que abrangem a região de letalidade não apresentam diferenças substanciais no teor das enzimas esplênicas: a atividade de N-acetil-beta-D-glucosaminidase e fosfatase ácida se eleva de valores iniciais de 74 e 47 mU/mg para valores de 132 e 90 mU/mg, respectivamente, por efeito de 6 Gy de radiação gama, não se modificando, substancialmente, com o aumento de dose. O aumento na atividade de ambas enzimas esplênicas, por efeito da radiação, é significativo (P: 0,01), salvo para o caso de dose supraletal onde o aumento é menos evidente. Para as mesmas doses de radiação, não é

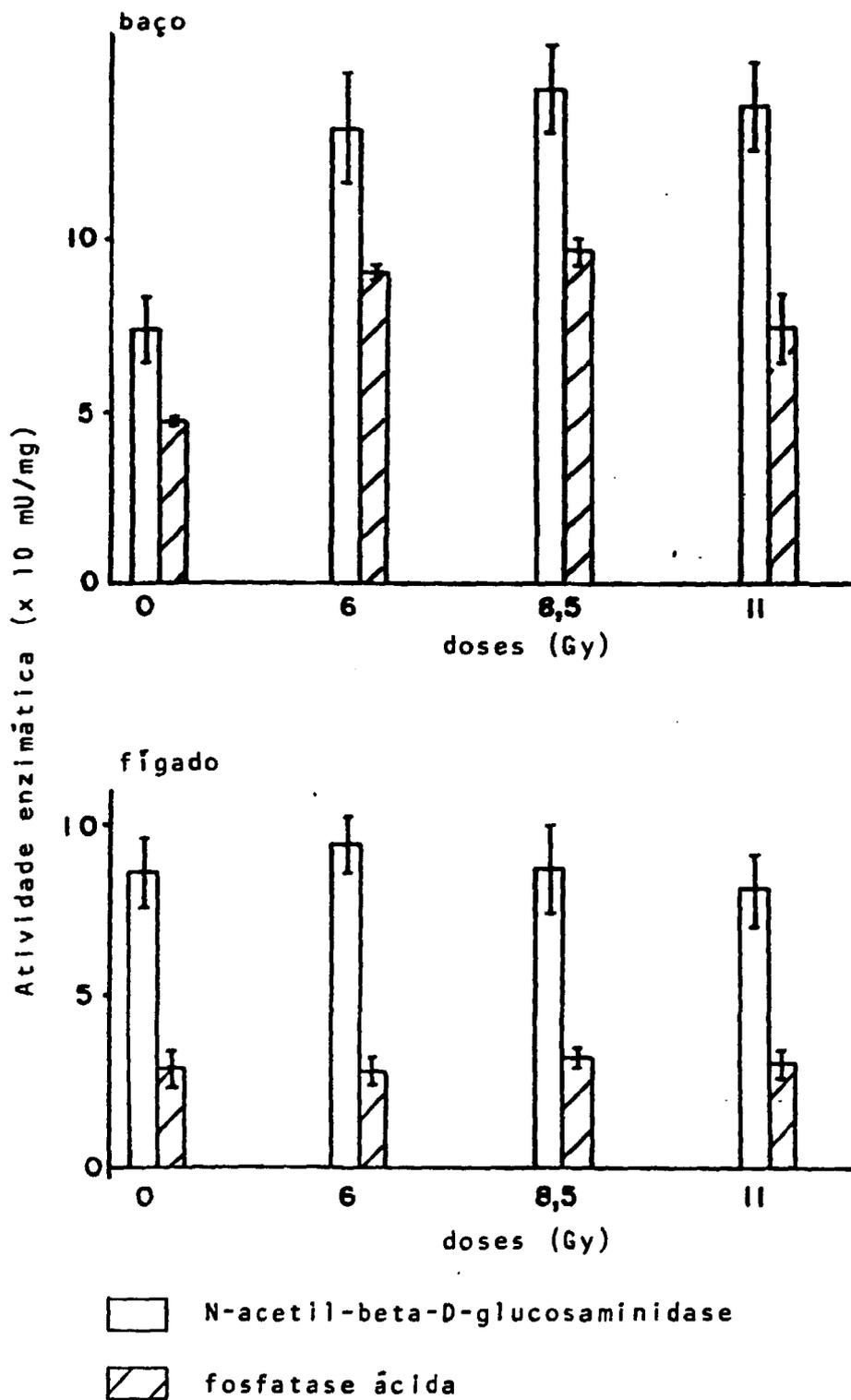


FIGURA 14. Representação gráfica da atividade enzimática 3 dias após irradiação em baço e fígado de camundongos machos, idade 16 semanas. (Médias \pm s).

evidente qualquer modificação na atividade das enzimas hepáticas. É possível verificar, comparando os resultados apresentados nas figuras 13 e 14, que os valores das atividades enzimáticas estão levemente aumentados neste último grupo de experiências, onde os animais utilizados tinham 16 semanas de idade, enquanto que nas demais experiências, os camundongos tinham aproximadamente 8 semanas de idade.

A figura 15A representa a atividade de fosfatase ácida esplênica de camundongos irradiados com 8,5 Gy de ^{60}Co e não irradiados, em função do tempo de incubação com o substrato. O aumento na atividade enzimática é significativo ($P: 0,05$), duplicando praticamente aos 10, 20, 30 e 60 minutos de incubação nos extratos dos baços de animais irradiados, em relação aos valores dos animais testemunhas. Os valores dos pesos médios absolutos dos baços assim como dos pesos percentuais respectivos aparecem na mesma figura (Fig. 15B), sendo evidente a enorme diminuição desses valores como consequência da irradiação.

A figura 16 mostra, de forma esquematizada, os resultados do conjunto de experiências realizadas para estabelecer a influência do tratamento prévio com BCG no aumento da atividade enzimática provocado pela radiação. A figura 16A apresenta os resultados das determinações de atividade de fosfatase ácida esplênica expressa com μmoles de substrato liberados/mg de tecido nos diferentes intervalos de incubação, dos 4 grupos em experimentação: animais não tratados previamente; animais injetados 3 semanas antes com 1 mg de BCG; animais irradiados com 8,5 Gy 72 horas antes; animais tratados com BCG e posteriormente irradiados. Na

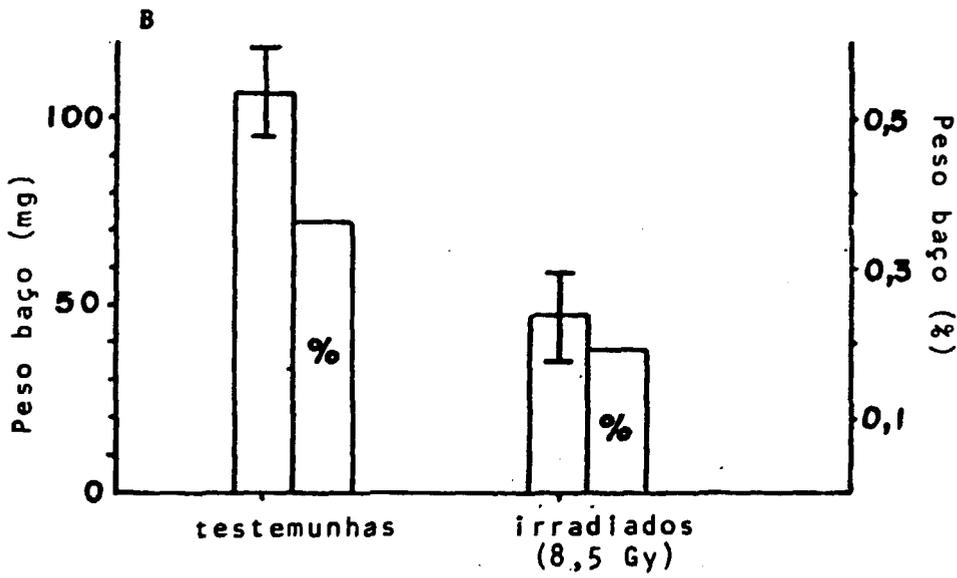
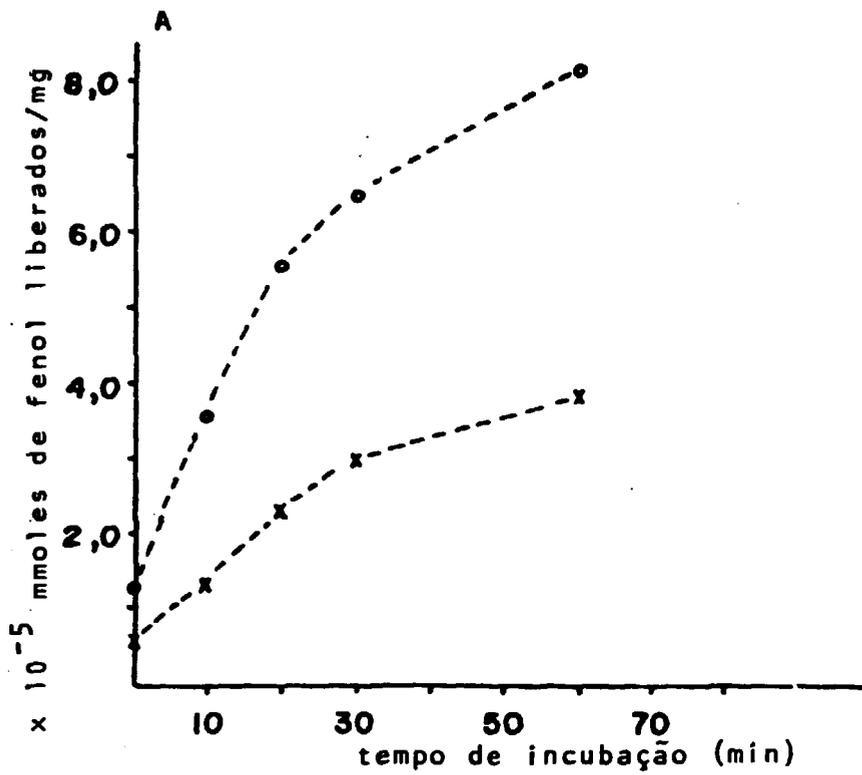


FIGURA 15. Representação gráfica da: A) atividade fosfatase ácida esplênica de grupos testemunhas (-x-) e grupos irradiados 3 dias antes (-o-), de animais de 16 semanas de idade (Médias \pm s); B) Pesos dos baços correspondentes em mg e em valores percentuais. (Médias \pm s).

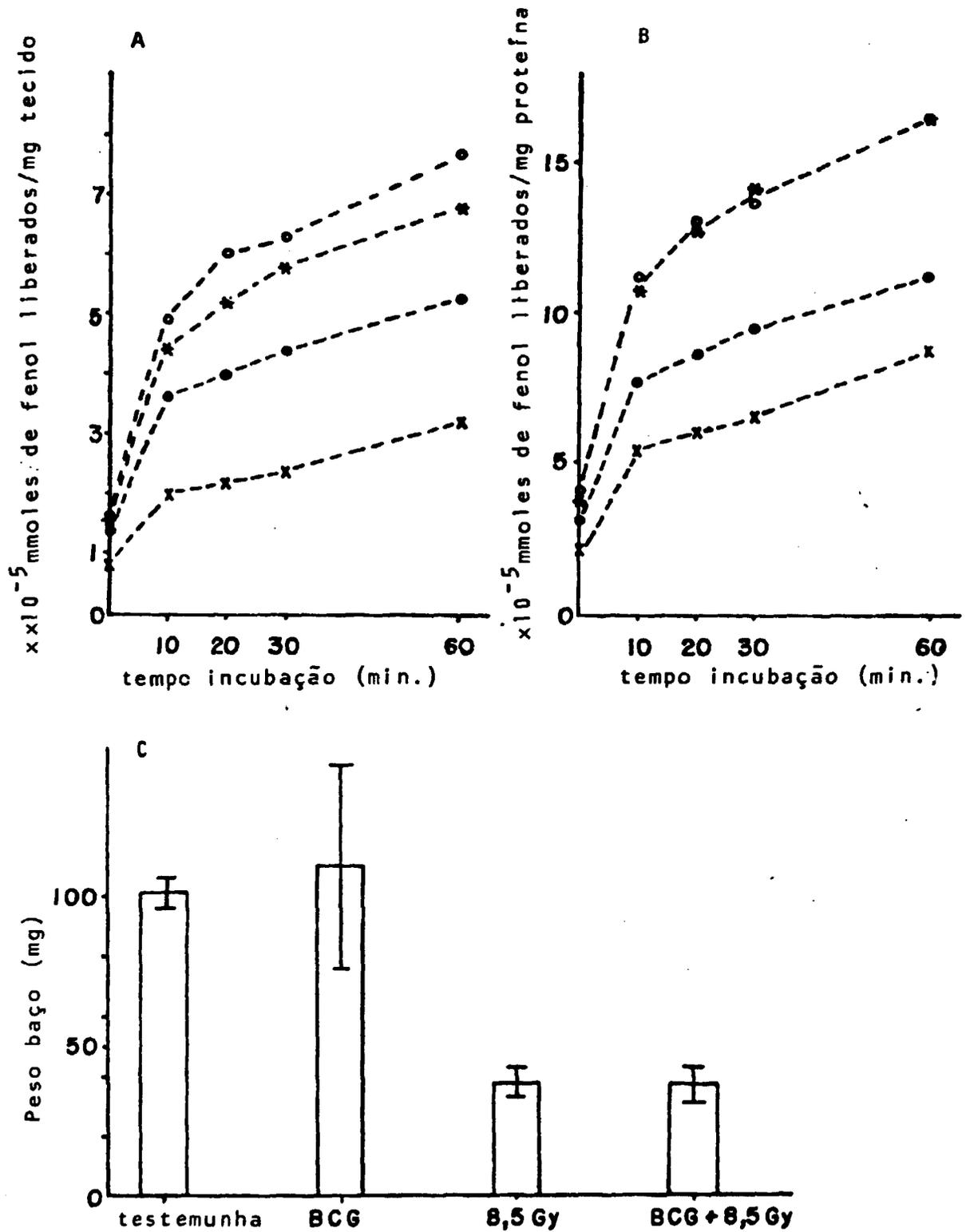


FIGURA 16. Representação gráfica da atividade fosfatase ácida esplênica de camundongos não tratados (-x-), injetados com 1mg de BCG (-●-), irradiados com 8,5 Gy ^{60}Co (-*-), e injetados e irradiados (-o-).

A) Atividade enzimática expressa como mmol fenol liberados/mg tecido;

B) Atividade enzimática expressa como mmol fenol liberados/mg proteína;

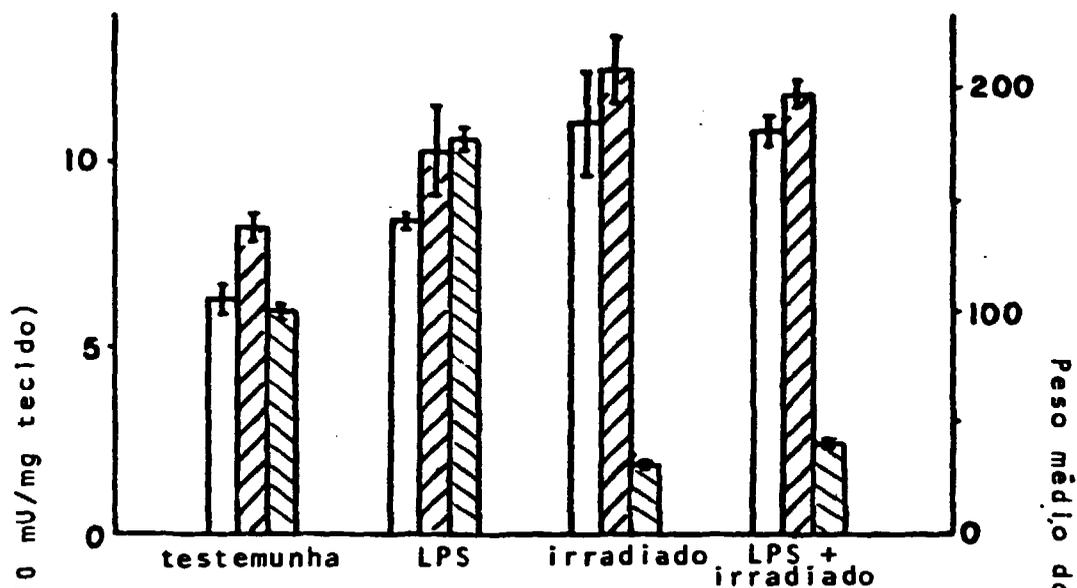
C) Peso médio dos baços correspondentes (Médias \pm s).

44.

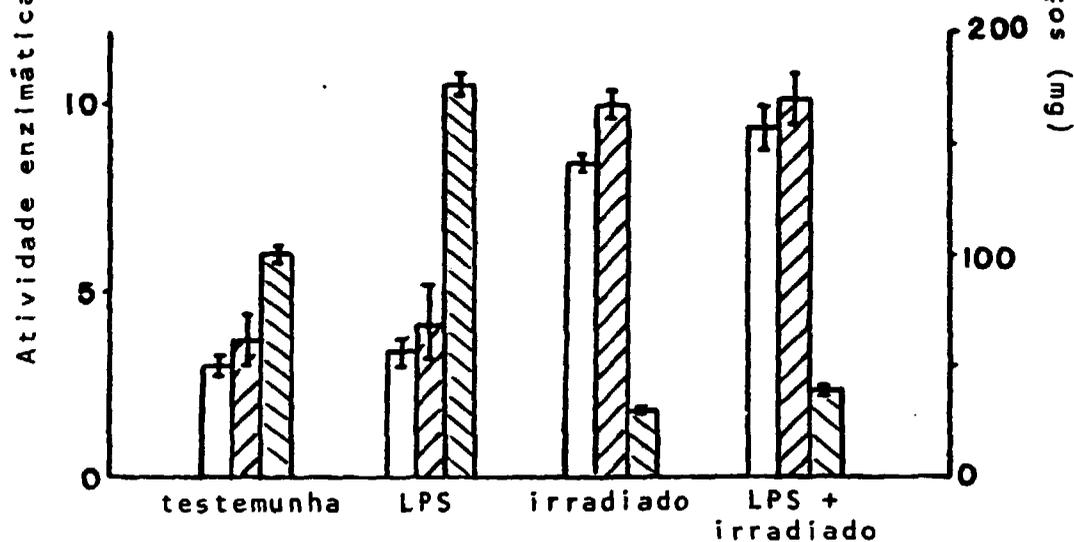
figura 16B são apresentados os dados correspondentes, expressos como μ moles de substratos hidrolizados/mg de proteína. Em ambas representações gráficas é possível perceber, para cada período de incubação, valores de atividade enzimática aumentados nos grupos de animais tratados com BCG. Os grupos de animais irradiados, submetidos ou não a tratamento com BCG, apresentam valores maiores ainda, porém sem diferenças significativas entre eles. Isto é mais evidente ainda quando os dados são expressos por mg de proteína onde os dois grupos coincidem numa mesma curva. Na figura 16C são apresentados os valores dos pesos dos baços dos grupos correspondentes. Os pesos dos baços guardam relação inversa com os dados enzimáticos; atividade enzimática aumentada corresponde ao peso do órgão diminuído, assim como fora mostrado anteriormente na figura 15. Os pesos dos baços correspondentes aos animais tratados somente com BCG mostram grandes diferenças entre eles, indicado por um valor elevado para o desvio padrão dessa média, o que poderia significar diferenças individuais na imunoestimulação.

A influência do tratamento prévio com LPS no aumento da atividade enzimática como consequência da irradiação está representada na figura 17. A mesma figura mostra a influência do tratamento dos extratos dos órgãos com ultra-som na atividade enzimática, assim como os valores dos pesos dos baços de 4 grupos de animais: o grupo testemunha; os animais tratados com 50 μ g de LPS 4 dias antes; o grupo irradiado com 8,5 Gy 3 dias antes; o grupo de animais que fora injetado e irradiado 4 e 3 dias antes, respectivamente. A figura 17A mostra o aumento significativo (P: 0,01) da

A) N-acetil-beta-glucosaminidase



B) Fosfatase ácida



- sô homogeneizado
- tratado pelo ultra-som
- pesos dos baços

FIGURA 17. Representação gráfica da atividade enzimática de extratos de baços de camundongos com ou sem tratamento pelo ultra-som: testemunhas, injetados 4 dias antes com 50 µg; irradiados com 8,5 Gy ^{60}Co ; injetados e irradiados. Valores dos pesos dos baços (Médias \pm s).

atividade de N-acetil-beta-D-glucosaminidase como consequência da irradiação, sendo neste caso também insignificante a variação devida à administração prévia do lipopolissacarídeo. Na figura 17B encontram-se os resultados das dosagens de fosfatase ácida nesses mesmos grupos. O aumento significativo da atividade enzimática só é percebido como consequência da irradiação, mas não por efeito do imunomodulador. Junto aos valores das atividades enzimáticas encontram-se indicados os valores correspondentes dos pesos médios dos baços. É evidente o grande aumento no peso do baço como consequência da administração de LPS 4 dias antes, e sua sensível diminuição por efeito da radiação, independentemente dada injeção prévia desse agente. As figuras 17A e 17B mostram os valores das determinações enzimáticas dos extratos de baço que foram submetidos simplesmente à homogeneização e os que, além da homogeneização sofreram um posterior tratamento pelo ultra-som, que foi o tratamento usual. Em todos os casos de grupos não submetidos a ultra-som, houve um decréscimo não significativo das atividades estimadas.

Na figura 18 encontram-se os resultados das determinações de N-acetil-beta-D-glucosaminidase em baço e fígado de grupos de animais tratados ou não com proteose - peptona (75 mg), as 0, 4, 24, 48 e 72 horas após irradiação com 8,5 Gy de ^{60}Co . Quatro horas após irradiação, não há qualquer mudança nas atividades enzimáticas. Vinte e quatro horas após, aparentemente, existe um aumento não significativo. As atividades enzimáticas aumentadas são significativas 48 horas (P: 0,05) e 72 horas (P: 0,01) após a irradiação. De

acordo com nossos resultados, o tratamento prévio com proteose-peptona não produz alteração nos níveis de N-acetil-beta-D-glucosaminidase no fígado, seja nos animais não irradiados (tempo 0 no gráfico), seja nos animais irradiados.

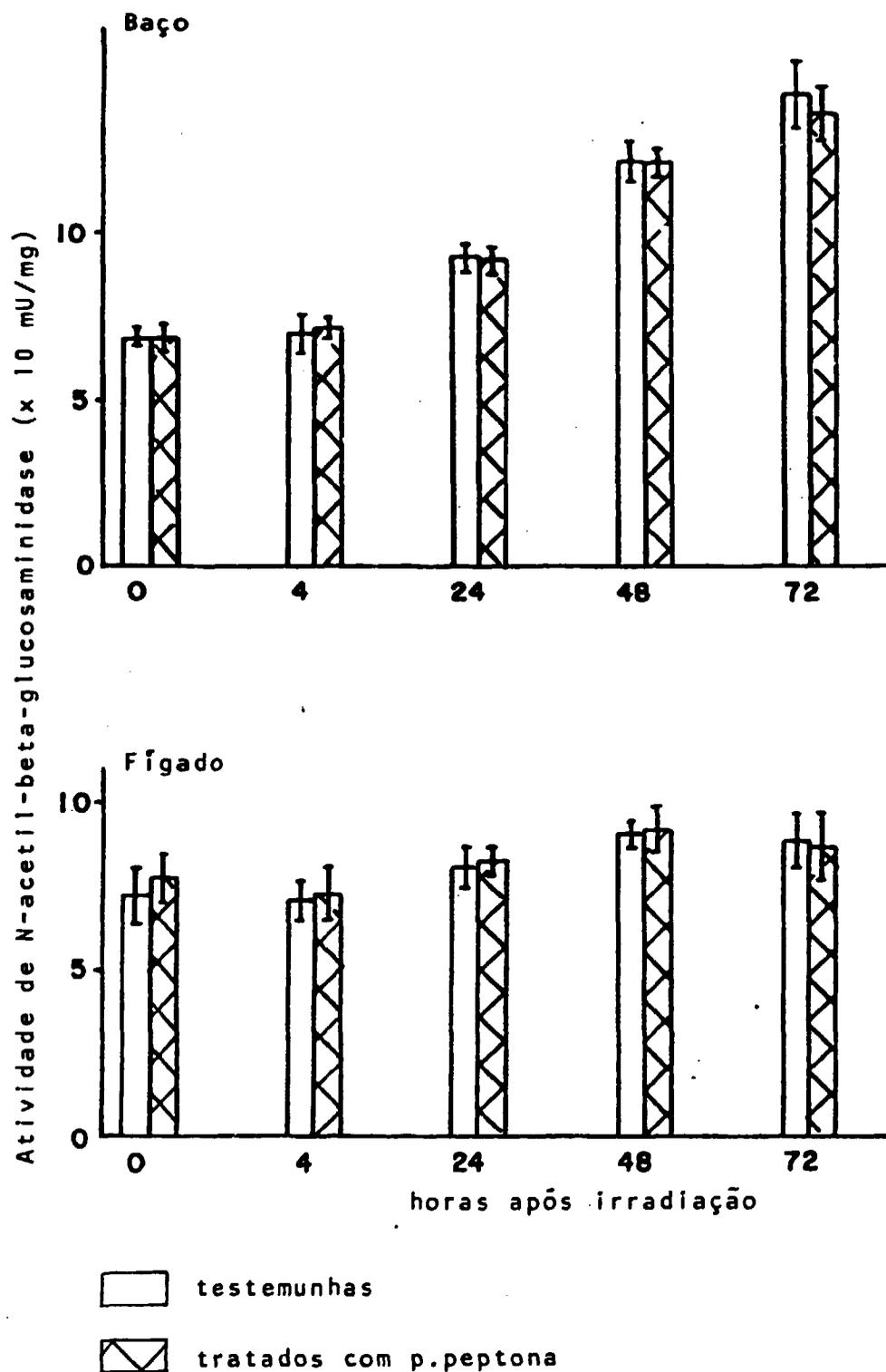


FIGURA 18. Representação gráfica da atividade de N-acetil-beta-D-glucosaminidase em baço e fígado após irradiação com 8,5 Gy ^{60}Co , de camundongos tratados ou não com proteose-peptona (75 mg) (Médias \pm s).

4. DISCUSSÃO

Pelo conhecimento de como a radiação exerce seus efeitos nos organismos, é possível aprender como utilizá-la mais efetivamente no tratamento de doenças, principalmente câncer, e como prover proteção efetiva contra seus efeitos nocivos.

Apesar de se acreditar que a morte de um animal se dá como consequência de várias mudanças bioquímicas complexas, existe um padrão coerente na relação entre tempo de sobrevivência e dose de radiação. Com base nos trabalhos de QUASTLER (1945, 1956), atualmente pode-se considerar que a morte de camundongos entre 2 e 4 semanas após a irradiação, seria provocada pela chamada síndrome hematopoiética: as células proliferativas dos tecidos formadores de sangue teriam perdido sua habilidade de dar origem a células funcionais das quais depende a vida. A morte de camundongos entre 4 e 5 dias após irradiação seria resultado, entretanto, da chamada síndrome intestinal, que seria a consequência da destruição da capacidade proliferativa das células precursoras, as quais dão origem ao revestimento de células epiteliais do intestino. Segundo ROY e col. (1982), trabalhando em camundongos com taxas de dose entre 0,25 e 0,50 Gy/min de radiação X, as duas sintomatologias distintas estariam caracterizadas por doses de 6 e 12 Gy, respecti

vamente. Em nosso caso, utilizamos para estudo, fundamentalmente, irradiações gama com doses de 8,5 Gy de ^{60}Co , com taxas de doses iguais ou maiores que 10,8 Gy/min, sobrevivendo a morte entre o 49 e o 289 dia. É possível concluir que existem as duas síndromes envolvidas na letalidade radioinduzida.

Apesar de não ser possível generalizações a respeito dos pormenores das respostas das células à radiação, mesmo no campo restrito dos mamíferos, é necessário admitir a evidência de que aumentar a sobrevivência nesta faixa de dose, deverá implicar aumentar a repopulação de células precursoras críticas (CRONKITE, 1959).

Adjuvantes derivados de componentes bacterianos são usados frequentemente, para amplificar as respostas imunológicas e entre os mais comumente utilizados se encontram endotoxinas (lipopolissacarídeos) de bactérias Gram-negativas e micobactérias mortas, no adjuvante completo de Freund. Os mecanismos mediante os quais estes imunorreguladores exercem sua influência são variados. LPS e produtos de micobactérias alteram fundamentalmente as funções dos macrófagos (POPLACK e col., 1976; DOE & HENSON, 1978; DOE e col., 1978; KIYONO e col., 1980; WAHL e col., 1980). Essa capacidade de ativação dos macrófagos é ainda retida nos subcomponentes ativos destas moléculas: lipídio A e muramil-di-peptídeo, respectivamente.

Mesmo não estando totalmente esclarecido seu modo de ação, BCG exerce efeito antitumoral de duas maneiras conhecidas: devido ao efeito potenciador que as mico

bactérias têm sobre a resposta imune em geral; e também através da produção de hiperplasia retículo endotelial e hiperatividade dos componentes celulares (MACKANESS, 1964). Essa circunstância se desenvolve não só provocada por BCG, mas também toda vez que organismos com capacidade de resposta imune mediada por células são expostos a antígenos específicos (MACKANESS e col., 1973).

Um determinado antígeno não conduz, necessariamente, à mesma resposta em diversos sistemas tumorais do camundongo, no que refere à resistência imunológica (FUJIWARA e col., 1978). Do mesmo modo, imunomoduladores podem produzir aumento, diminuição ou não produzir efeito algum na sobrevida à radiação, como mostram nossos resultados (Figs. 6-12). Injeções prévias de C. parvum, BCG, LPS e proteose-peptona aumentam a sobrevida de camundongos letalmente irradiados com radiação gama de ^{60}Co . A ação de BCG se manifesta nas duas raças de camundongos ensaiadas, entretanto a proteose-peptona, não afeta a sobrevida quando se utiliza animais C57Bl/10. Segundo UNANUE & ASKONAS (1968), da cavidade peritoneal de camundongos normais A/J e CBA/J podem ser extraídas $3-5 \times 10^6$ células, 50% das quais seriam macrófagos. Exudatos provenientes de camundongos injetados 3 dias antes com proteose-peptona contêm 10^7 células das quais 80-90% seriam macrófagos típicos. Por sua vez, KORNFELD & GREEMAN (1966) estabeleceram que a irradiação X de corpo inteiro em camundongos, produz uma queda muito mais acentuada na contagem de linfócitos de sangue periférico que a da cavidade peritoneal. A contagem de macrófagos permanece inalterada ou decresce gradualmente com doses de 12 Gy, até uns 50% do valor

controle. WALKER & LOWRIE (1981) estabeleceram que a ação citotóxica dos macrófagos in vitro utiliza peróxido de hidrogênio, sendo que a catalase protege microrganismos da destruição intracelular. A ativação produzida por proteose peptona nos macrófagos peritoneais poderia ser responsável pela proteção contra os danos decorrentes da síndrome gastrointestinal.

BASIC e col. (1978) trataram camundongos C3Hf/Bu e CBA com injeções i.p. de C. parvum viável dos laboratórios Wellcome, obtendo um aumento da sensibilidade frente à radiação X. Eles acreditam ser esse resultado consequência do aumento de sensibilidade à endotoxina liberada a partir do intestino por efeito da síndrome de radiação. As experiências que realizamos, com C. parvum Mérrieux, utilizando organismos mortos, mostram aumento da sobrevivência à radiação ionizante, resultados semelhantes aos de HALPERN & ANDRÉ (1977) mas bem menos espetaculares: eles conseguem aumentar a sobrevivência aos raios X de 10 para 100% no caso de dose de 750 rad (7,5 Gy) ou 950 rad (9,5 Gy).

BCG e C. parvum são agentes capazes de aumentar a atividade das células destruidoras naturais (natural killer cells), mecanismo mediado por células que não exigem pre-sensibilização, e que agiria através da indução de interferon por macrófagos (DJEU e col., 1979). Assim, aqueles agentes, da mesma maneira que quantidades apropriadas de endotoxinas bacterianas, são capazes de aumentar a resistência do hospedeiro de maneira não específica contra infecções bacterianas ou virais (ROWLEY, 1955; DUBOS & SCHAEGLER, 1957; WAGNER e col., 1959).

É fato conhecido (ADLAM & SCOTT, 1973) a proliferação de macrófagos no baço e fígado de animais tratados por C. parvum. O tempo de sobrevivência de camundongos irradiados letalmente pode ser significativamente estendido mediante a administração do próprio interferon ou de indutores de interferon (ORTALDO & McCOY, 1980; LVOVSKY e col., 1981). Certos autores relacionam fagocitose aumentada de macrófagos com produção de interferon in vivo (HAMBURG e col., 1980). Assim, a radioproteção produzida por agentes imunomoduladores pode ser consequência da recuperação acelerada do tecido hematopoiético ou a eficiência aumentada da resposta contra o desafio de antígenos bacterianos introduzidos no organismo em decorrência da queda de barreiras naturais provocada pela radiação.

HIERNAUX e col. (1982) consideram que a dose imunológica ótima de lipopolissacarídeo bacteriano (20 µg para fêmeas BALB/c) produz respostas primária e secundária de cinética oscilatória, fato provavelmente relacionado com os mecanismos reguladores de iniciação, amplificação e supressão da resposta imune. Isto poderia explicar a verificação do efeito radioprotetor da endotoxina quando injetada 24 horas antes e a falta desse efeito se a injeção ocorre 4 dias antes da irradiação. De acordo com nossa experiência, camundongos fêmeas são mais sensíveis à toxicidade por LPS: dose de 50 µg em machos equivale aproximadamente a 20 µg em fêmeas, com capacidade radioprotetora equivalente, apresentada na Figura 11.

Bordetella pertussis apresenta propriedades imunoestimuladoras, semelhantes ao BCG (Mycobacterium bo-

vis) e C. parvum, e, inclusive, vem sendo empregada igualmente como agente antitumoral (LIKHTE, 1974). Por sua vez, PETERS e col. (1981) observaram aumento de resistência à radiação X com a idade de ratos concomitantemente com infecções mistas de Bordetella bronchiseptica e outros germes. Em nossos ensaios, contudo, não se verificou aumento da sobrevivência, mas certa sensibilização frente à radiação (Fig. 10).

O decréscimo do tamanho e a redução do peso do baço que ocorrem horas após a exposição à radiação gama são principalmente decorrentes da morte das células linfóides altamente radiosensíveis. Segundo alguns autores a fagocitose pelos macrófagos e células reticulares das células danificadas, alcança atividade máxima 3 horas após a exposição a 10 Gy de ^{60}Co . O processo de fagocitose se completa um dia após a exposição. Nesse tempo, o baço perdeu 70-80 % de seu peso, com a liberação de enzimas dos lisossomos destruídos. Entretanto, a maior liberação de enzimas ocorre alguns dias após a irradiação, quando essas atividades fagocíticas estariam suspensas, e o baço começaria sua regeneração (HAMBURG e col., 1980; SWARTZ & SALUK, 1981).

Alguns autores mostram que dias após irradiação aparecem níveis altos de endotoxinas e bactérias no baço e fígado (WALKER, e col., 1975). Essa invasão de toxinas poderia ser responsável pela perturbação da célula, causando liberação de enzimas lisossomais.

Existe uma correlação entre a liberação de peróxido de hidrogênio e a citotoxicidade extracelular de macrófagos ativados (NATHAN & ROOT, 1977; NATHAN e col., 1979).

Dessa maneira, o aumento de atividade de enzimas lisossomais após irradiação poderia ser visto como resposta ao estímulo do peróxido de hidrogênio produzido pela interação da radiação com o material biológico ou, indiretamente, pelo estímulo da fagocitose dos restos celulares destruídos pela radiação. Nossa experiência mostra que o fato das células fagocíticas estarem previamente estimuladas, não torna o aumento de atividade lisossomal produzido pela radiação diferente do caso sem estímulo, apesar dos animais previamente injetados com imunoestimulantes apresentarem sensibilidade diminuída à radiação.

As enzimas lisossomais medidas em homogeneizados de órgãos estão sujeitas a modificações da atividade catalítica relativamente ao seu estado original. A própria molécula enzimática se modifica no processo e por diluição podem aparecer dissociações, que por sua vez podem ser compensadas por uma reativação posterior. A concentração das enzimas celulares é mantida através da degradação normal das células e por sua substituição fisiológica. Como todas as proteínas dos organismos vivos, as enzimas lisossomais estão sujeitas a transformações permanentes e continuamente estão sendo sintetizadas, ativadas, inativadas e finalmente degradadas. Segundo Schmidt & Schmidt (ADOLPH & LORENZ, 1980), no caso de lesões celulares irreversíveis, dá-se geralmente um aumento do metabolismo primário com aumento da síntese enzimática e maior fluxo através da membrana, com concomitante saída de enzimas. Já as lesões irreversíveis, com bloqueio progressivo de funções, existe redução do metabolismo com limitação da síntese enzimática, diminuição das funções de

superfície e saída progressiva de enzimas. Quando há uma lesão irreversível da membrana celular, a célula morre rapidamente. Assim, o aumento da atividade enzimática é responsabilidade das células intactas ou lesadas mas sobreviventes. A desvinculação do aumento da atividade de enzimas lisossomais e a síntese de proteínas, pode ser evidenciada por diversas experiências. Monócitos de sangue periférico, por exemplo, são capazes de secretar níveis significantes de enzimas lisossomais quando colocados in vitro em contato com estímulos solúveis immobilizados ou partículas fagocitáveis (KEELING & HENSON, 1982), sem depender de síntese proteica.

Apesar de ter sido demonstrada a ativação de enzimas lisossomais por ação de agentes capazes de produzir ativação de macrófagos, nossos experimentos não demonstram aumento na atividade enzimática lisossomal pela ação desses agentes, além do provocado pela própria radiação.

As alterações na estrutura e componentes das membranas estão envolvidas nas injúrias somáticas radio-induzidas (BAISCH, 1978; BAISCH & BLUHM, 1978), afetando funções dos receptores, reconhecimento de células ou moléculas estranhas, auto-imunização ou alterações dos processos biosintéticos relacionados com precursores extracelulares (KÓTELES, 1979; SARKAR e col., 1982).

Estudos realizados por Hofer e colaboradores mostram que os lisossomos não podem ser considerados alvo primário para a morte induzida por radiação, apesar de que exposições à radiação aparecem associadas com mudanças

pronunciadas na morfologia e distribuição de lisossomos, assim como com mudanças no estado de ativação das enzimas lisossomais (HOFER e col., 1975).

Os mecanismos que induzem os efeitos radioprotetores de imunomoduladores não são conhecidos, mas não parecem devidos exclusivamente a ações químicas, isto é, indução de agentes que estabilizariam os produtos da interação da radiação com o material biológico (água e moléculas orgânicas). De maneira análoga a ação de imunomoduladores como agentes antitumorais, parecem ser as ações reguladoras desses agentes sobre elementos do sistema imune os responsáveis pelo efeito radioprotetor, contribuindo para a superação da imunodepressão produzida pela radiação.

5. CONCLUSÕES

1. A sobrevivência à irradiação na faixa de doses letais de camundongos, pode ser aumentada pela injeção prévia de certos agentes capazes de induzir ativação de macrófagos, o que sugere o envolvimento de imunomodulação no processo.
2. O aumento de atividade enzimática lisossomal após irradiação é possível ser detectado em homogeneizados de baço, mas não nos de fígado. Esse aumento correlaciona-se inversamente com os dados pertinentes ao peso do baço, caracterizando uma hiperfunção das células remanescentes. O peso do fígado permanece constante após irradiação assim como os valores da atividade de enzimas lisossomais, medidos em extratos totais do órgão.
3. O aumento na sobrevivência produzido por BCG e LPS não se traduz, contudo, em modificações dos níveis da atividade de enzimas lisossomais além dos produzidos pela ação da radiação. A esplenomegalia produzida por esses agentes sugere o envolvimento de estímulo hematopoético na ação sobre a recuperação dos danos radioinduzidos.

4. Proteose peptona, mistura de peptídeos capaz de produzir aumento de macrófagos peritoneais como consequência de inflamação inespecífica, é capaz de aumentar a sobrevivência de camundongos irradiados porém não modifica os níveis de enzimas lisossomais, sem induzir aparentemente estimulação esplênica.

6. RESUMO

Foi feita uma avaliação da capacidade radioprotetora de BCG, C. parvum, LPS e proteose-peptona. A sobrevida à irradiação de corpo inteiro na faixa de doses letais de camundongos, pode ser aumentada por uma injeção prévia desses agentes capazes de induzir ativação de macrófagos. O aumento de atividade enzimática lisossomal após irradiação é possível ser detectado em homogeneizados de baço mas não nos de fígado. Esse aumento correlaciona-se inversamente com os dados pertinentes ao peso do baço, caracterizando uma hiperfunção das células remanescentes. O peso do fígado permanece constante após irradiação assim como os valores da atividade de enzimas lisossomais medidos em extratos totais do órgão. O aumento na sobrevida produzido por BCG e LPS não se traduz, contudo, em modificações dos níveis da atividade das enzimas lisossomais além dos produzidos pela ação da radiação. A esplenomegalia provocada por BCG e LPS sugere o envolvimento de estimulação hematopoética na ação sobre a recuperação dos danos radioinduzidos. Proteose-peptona, mistura de peptídeos capaz de produzir aumento de macrófagos como consequência de inflamação inespecífica, pode aumentar a sobrevida de camundongos irradiados porém não modifica os níveis das enzimas lisossomais, sem induzir aparentemente estimulação esplênica.

S U M M A R Y

The radioprotective action of BCG, C. parvum, LPS and proteose-peptone was evaluated. A single injection of these macrophage activating agents prior to ⁶⁰Co whole-body irradiation increased the survival rate of mice in the lethal dose range. The rise in lysosomal enzyme activity could be observed in spleen homogenates but not in liver homogenates. The increased activity correlated inversely with the spleen weight, showing a hyperfunction in the remaining cells. Liver weight remained constant after irradiation, as did the values for lysosomal enzyme activity measured in total organ extracts. The increased levels of survival attained by use of BCG and LPS did not, however, show any variations in lysosomal enzyme activity other than those produced by irradiation itself. The splenomegalia produced by BCG and LPS suggested the involvement of hematopoietic stimulation in the recovery processes of radioinduced damage. Proteose-peptone, a mixture of peptides capable of raising peritoneal macrophage levels as the result of unspecific inflammation, was effective in increasing the number of survivors among the irradiated mice without apparent splenic stimulation.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS *

1. ABUL-FADL, M.A.M. Inhibition and activation of beta-glucuronidase in urine. Biochem. J., 65:16P, 1957.
2. ABRAMS, H.L. Influence of age body weight and sex on susceptibility of mice to the lethal effects of X-radiations. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 76:729-32, 1951.
3. ADLAM, C. & SCOTT, M.T. Lymphoreticular stimulation properties of Corynebacterium parvum and related bacteria. J. Med. Microbiol., 6:261-74, 1975.
4. ADOLPH, L. & LORENZ, R. Diagnostico enzimático das doenças do coração, fígado e pancreas. Trad. de P. Picciochi. Basileia, S. Karger, 1980.
5. AGAROSI, G.; MANCINI, C.; DORIA, G. Synergism between two helper cell subpopulations characterized by different radiosensitivity and nylon adherence. J. Immunol., 126:955-60, 1981.
6. AIKMAN, A.A. & WILLS, E.D. Studies on lysosomes after irradiation. 1. A quantitative histochemical method for the study of lysosomal membrane permeability and

* De acordo com as normas preconizadas pela ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS (ABNT). As abreviaturas dos títulos de periódicos estão de acordo com o WORLD MEDICAL PERIODICALS, 3.ed., New York, 1961.

- acid phosphatase activity. Radiat. Res., 57:403-15, 1974.
7. AIKMAN, A.A. & WILLS, E.D. Studies on lysosomes after irradiation. 2. Lysosomal membrane permeability and acid phosphatase activity of lymphoid and other tissues after whole-body irradiation. Radiat. Res., 57:416-30, 1974.
8. ALLISON, A. & MALUCCI, L. Uptake of hydrocarbon carcinogens by lysosomes. Nature, 203:1024-7, 1964.
9. ANDERSON, R.E. & WARNER, N.L. Ionizing radiation and the immune response. Adv. Immunol., 24:215-335, 1976.
10. ANDERSON, R.E. & WILLIAMS, W.L. Radiosensitivity of T and B lymphocytes. Am. J. Pathol., 89:367, 1977.
11. AOKI, T.; KVEDAR, J.P.; HOLLIS JR, V.W.; BUSHAR, G.S. Streptococcus pyogenes preparation OK-432: immunoprophylactic and immunotherapeutic effects on the incidence of spontaneous leucemia in AKR mice. J. Natl. Cancer Inst., 56:687, 1976.
12. APTE, R.N.; HERTOOGS, C.F.; PLUZNIK, D.H. Regulation of lipopolysaccharide induced granulopoiesis and macrophage formation by spleen cells. 2. Macrophage-lymphocyte interactions in the process of generation of colony-stimulating factor. J. Immunol., 124(3):1223-9, 1980.
13. ATALLA, L.T. Interpretação quantitativa de resultados experimentais. São Paulo, Instituto de Energia Atômica, 1978. (IEA-Inf-60).

14. BACQ, Z.M. & ALEXANDER, P. Fundamentals in radiology.
London, Pergamon, 1961. p. 272.
15. BAISH, H. Effects of X-rays on cell membranes. 2. Changes of permeability measured by fluorescein efflux.
Rad. Environm. Biophys., 15:221-28, 1978.
16. BAISH, H. & BLUHM, H. Effects of X-rays on cell membranes. 1. Changes of membranes potential of L-cells.
Rad. Environm. Biophys., 15:213-9, 1978.
17. BALNER, H.; OLD, L.J.; CLARKE, D.A. Reduction of X-ray ultrality in mice by agents affecting the reticuloendothelial system. Radiat. Res., 15:836-49, 1961.
18. BLANDEN, R.V.; LEFFORD, M.J.; MACKANESS, G.B. The host response to Calmette-Guérin Bacillus infections in mice. J. Exp. Med., 129:1079-108, 1969.
19. BARBER, H.R.K. & DORSETT, B. Immunological aspects of gynecologic cancer. Cancer, 48:472-83, 1981.
20. BASIC, I.; WITHERS, R.H.; KASTELAN, A.; MILAS, L. Increased sensitivity of C. parvum, treated mice to ionizing whole body irradiation. Rev. Biol. Standar., 38:311-6, 1977.
21. BELOWSKI, H.; SCHMIDT, M.; SCHMIDT, F. Total activity of lysosomal enzymes in hepatic and muscle tissue in malignant neoplasms. Pol. Tyg. Lek., 27:1347-50, 1972.

22. BENEDETTI, J. & YUEN, K. PlL. Life tables and survival functions. In: DIXON, W.J. & BROWN, M.B. eds. BMDP biomedical computer programs P-series 1979. Berkeley Univ. of California, 1979.
23. BLONDAL, H. Protective and therapeutic effects of bacterial polysaccharides in irradiation injury in mice. Radiat. Res., 11:582-6, 1959.
24. CASARETT, A.P. Radiation biology. Englewood Cliffs, N. J. Prentice-Hall, 1968.
25. CHENG, M.G. & SCHOOLEY, J.C. Effects of ionizing radiation and vinblastine on the proliferation of peritoneal macrophage precursors in the mouse. Radiat. Res., 41:623-36, 1970.
26. CLARKE, C. & WILLS, E.D. Effect of irradiation on lysosomal enzyme activation in cultured macrophages. Int. J. Radiat. Biol., 38(1):21-30, 1980.
27. COHN, Z.A. The activation of mononuclear phagocytes. Facts fancy and future. J. Immunol., 122(3):813-6, 1978.
28. CRONKITE, E.P. Steady state cell proliferation: its control and relation to radiation injury of the mammal. In: RADIOBIOLOGY at the intra-cellular level: proceedings of a conference on..., held at Catalina Island, Sep. 9-12, 1957. London Pergamon, 1959. p.
29. DAVIES, M. Bacillus Calmette-Guérin as an anti-tumour agent. The interaction with cells of the mammalian

immune system. Biochem. Biophys. Acta, 651:143-74,1982.

30. DEAN, R.T. Lysosomes. London, Edward Arnold, 1977. (The Institute of biology's studies in biology, 84).
31. DE DUVE, C. & WATTIAUX, R. Functions of lysosomes. Annu. Rev. Physiol., 28:435-92, 1966.
32. DINGLE, J.T. Lysosomes in biology and pathology. Amsterdam, North Holland, 1973. v.3.
33. DINGLE, J.T. & FELL, H.B. Lysosomes in biology and pathology. Amsterdam North Holland, 1969. v. 1,2.
34. DIXON, F.J. & McCONAHEY, P.J. Enhancement of antibody formation by whole body X-radiation. J. Exp. Med., 117:833-47, 1963.
35. DJEU, J.T.; HEINBAUGH, J.A.; HOLDEN, H.T.; HERBERMAN, R. B. Role of macrophages in the augmentation of mouse natural killer cell activity by Poly I: C and interferon. J. Immunol., 122(1):182-8, 1979.
36. DOE, W.F. & HENSON, P.M. Macrophage stimulation by bacterial lipopolysaccharides 1. Catalytic effect on tumor target cells. J. Exp. Med., 148(2):544-6, 1978.
37. DOE, W.F.; YANG, S.T.; MORRISON, D.C.; BETZ, S.J.; HENSON, P.M. Macrophage stimulation by bacterial lipopolysaccharides. 2. Evidence for differentiation signals delivered by Lipid A and by a protein rich fraction of lipopolysaccharides. J. Exp. Med., 148(2):557-68,1978.

38. DUBOS, R.J. & SCHAEGLER, R. Effects of cellular constituents of mycobacteria on the resistance of mice to heterologous infections. 1. Protective effects. J. Exp. Med., 106:703-17, 1957.
39. EDELSON, P.J. Macrophage activation as a process of cell differentiation. In: FEDERATION OF AMERICAN SOCIETIES FOR EXPERIMENTAL BIOLOGY. 65th annual meeting held in Atlanta, Georgia, April 12-17, 1981. p. 761. (abstracts)
40. FUJIWARA, H.; HAMAOKA, T.; KITAGAWA, M. Suppressive vs augmenting effect of the same pretreatment regimen in two murine tumour systems with distinct effector mechanisms. Jap. J. Cancer Res., 69(6):793-803, 1978.
41. GASSEL, W.D.; LAUKEL, H.; BRAUN, R.; WERNER, T.; BICKER, U. Influence of the immunomodulating compound BM 12.531 (azimexone) on radioresistance and granulopoietic colony forming units. Exp. Pathol., 20(2):105-7, 1981.
42. GROSS, N. & BALIS, J.V. Functional, biochemical and morphologic changes in alveolar macrophages following thoracic X-irradiation. Lab. Invest., 39(4):381-9, 1978.
43. HALPERN, B. & ANDRÉ, S. Radioprotection conférée par le Corynebacterium parvum contre la létalité déterminée par l'irradiation X à des doses sublétales et létales chez la souris. C.R. Acad. Sc. Paris, 284D:1617-21, 1977.

44. HALPERN, B.N.; BIOZZI, G.; STIFFEL, C.; MOUTON, D. Inhibition of tumor growth by administration of killed *Corynebacterium parvum*. Nature, 212:853-4, 1966.
45. HALPERN, B.N.; FRAY, A.; CREPIN, Y.; PLATICA, O.; LORINET, A.M.; RABOURDIN, A.; SPARROS, L.; ISAAC, R. *Corynebacterium parvum*, a potent immunostimulant in experimental infections and in malignancies. In: KNIGHT, J. ed. Immunopotentialiation. Amsterdam, Ass. Scientific Publishers, 1973. p. 217-36. (Ciba Foundation Symposium, 18).
46. HAMBURG, S.I.; CASSELL, G.H.; RABINOVITCH, M. Relationship between enhanced macrophage phagocytic activity and the induction of interferon by New castle disease virus in mice. J. Immunol., 124(3):1360-4, 1980.
47. HARIKUMAR, P.; PLUSHAN, B.; WATTIER, S.B.K.; NINJOOR, V. Alterations in liver lysosomes induced by whole-body X-irradiation of rats. Indian J. Biochem. Biophys., 15:188-92, 1978.
48. HARRISON, G.A. Chemical methods in clinical medicine. London, J. & A. Churchill, 1949. p. 365.
49. HIERNAUX, J.A.; BAKER, P.J.; DELISI, C.; RUDBACH, J.A. Modulation of the immune response to lipopolysaccharide. J. Immunol., 128(3):1054-8, 1982.
50. HOFER, K.G.; HARRIS, C.R.; SMITH, J.M. Radiotoxicity of intracellular ^{67}Ga , ^{125}I and ^3H : nuclear Vs cytoplasmic radiation effects in murine L 1210 leukemia. Int.

51. HOOSTEN, P.E. & DIXON, F.J. Effect of irradiation and cyclophosphamide on anti KLH antibody formation in mice. J. Immunol., 112:564-72, 1974.
52. KARNOVSKY, M.L. & LAZDINS, J.K. Biochemical criteria for activated macrophages. J. Immunol., 121(3):809-13, 1978.
53. KEECH, M.L. Studies of the effects of hyperthermia alone and in combination with radiation on lysosomes of cultured cells. London, 1979. (Ph. D. thesis London Univ. Department of Biochemistry St. Bartholomev's Hospital Medical Coolege).
54. KEELING, P.J. & HENSON, P.M. Lysosomal enzyme release from human monocytes in response to particulate stimuli. J. Immunol., 128(2):563-7, 1982.
55. KIROSHITA, S. A study of non-specific immunity of whole body irradiated mice. Nippon Geka Hokan, 50(1):83-94, 1981.
56. KIYONO, H.; MCGHEE, J.R.; MICHALEK, S.M. Lipopolysaccharide regulation of the immune response: comparison of response to LPS in germfree, E. colimono associated and conventional mice. J. Immunol., 124(1):36-40, 1980.
57. KORNFELD, L. & GREEMAN, V. Effects of total body X-irradiation on peritoneal cells of mice. Radiat. Res., 29:433-44, 1966.

58. LIKHTE, V.V. Rejection of mammary adenocarcinoma cell tumors and the prevention of progressive growth of incipient metastases following intratumor permeation with killed Bordetella pertussis. Cancer, 34:2790-4 , 1974.
59. LVOVSKY, E.; BENGALL, Z.; LEVINE, P.; LEISEKA, S.; ROBINSON, J.; BAUTRO, N.; LEVY, E.; SCOTT, R. Stimulation of hematopoietic stem cells by interferon inducer in non human primates receiving fractionated total body irradiation. In: AMERICAN RADIUM SOCIETY. 63rd annual meeting, held in Phoenix, Arizona, march 4-8, 1981. sem local, editor e data. p. 30.
61. LOWRY, O.H.; ROSENBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem., 193: 265-75, 1951.
62. MACKANESS, G.B. The immunological basis of acquired cellular resistance. J. Exp. Med., 120:105-20, 1964.
63. MACKANESS, G.B. The influence of immunologically committed lymphoid cells on macrophage activity in vivo. J. Exp. Med., 129:973.92, 1969.
64. MACKANESS, G.B.; AUCLAIR, D.J.; LAGRANGE, P.H. Immunopotential with BCG. I. Immune response to different strains and preparation. J. Natl. Cancer Inst., 51(5): 1655-67, 1973.
65. MAGUIRRE Jr., H.C. & JAFEE, B.D. Regional lymph node X-radiation suppresses allograft rejection. Arch. Dermatol. Res., 272:283-91, 1982.

66. MALBICA, J.O. The effect of N,N,N,N-tetramethylazoforamamide (TMAF) on lysosomal stability in the presence and absence of anti-inflammatory agents. Biochem. Biophys. Res. Commun., 44:1457-63, 1971.
67. MAYR, A.; BALJER, G.; SAILER, J.; SCHELS, D. Radioprotective effectiveness of the paramunity inducer "Pind-Avi": investigation using the model "protective tetanic vaccination in mice" after exposure to X-rays. Strahlentherapie, 156(11): 795-9, 1980.
68. KAZANOWSKA, A. Late biochemical effects in liver, kidney and intestine of rat after whole body irradiation. Nukleonika, 24:1225-32, 1979.
69. METCHNIKOFF, E. L'immunité dans les maladies infectieuses. Paris, Masson, 1901.
70. MILAS, L.; BASIC, I.; ROGELNIK, H.D.; WITHERS, R. Effects of Corynebacterium granulosum on weight and histology of lymphoid organs, response to mitogens skin allografts and a syngeneic fibrosarcoma in mice. Cancer, 35:2365-74, 1975.
71. MILLER, G.L. Protein determination for large number of samples. Anal. Chem., 31:964-, 1959.
72. MOORE, M.; LAWRENCE, N.; NIOBET, N.W. Tumour inhibition mediated by BCG in immunosuppressed rats. Int. J. Cancer, 15:897-911, 1975.

73. MORAHAN, P.S. & KAPLAN, A.M. Macrophage activation and anti tumor activity of biologic and synthetic agents. Int. J. Cancer, 17:82-9, 1976.
74. NATHAN, C.F.; BRUKNER, L.H.; SILVERSTEIN, S.C.; COHN, L.A. Extracellular cytolysis activated macrophages and granulocytes. J. Exp. Med., 149(1):84-99, 1979.
75. NATHAN, C.F. & ROOT, R.K. Hydrogen peroxide release from mouse peritoneal macrophages. Dependence on sequential activation and triggering. J. Exp. Med., 146:1648-62 ,
76. NORTH, R.J. Opinions. The concept of the activated macrophage. J. Immunol., 121(3):806-9, 1978.
77. OLD, L. Cancer immunity. Sci. Am., 236(5):62-79, 1972.
78. OLD, L.J.; CLARKE, D.A.; BENACERRAF, B. Effect of bacillus Calmette-Guerin infection on transplanted tumours in the mouse. Nature, 184:291-2, 1959.
79. ORTALDO, J.R. & McCOY, J.L. Protective effects of interferon in mice previously exposed to lethal irradiation. Radiat. Res., 81:262-6, 1980.
80. PALLADINO, M.A.; GALTON, J.E.; TROLL, W.; THORBECKE, G.J. Gamma-irradiation-induced mortality: protective effect of protease inhibitors in chickens and mice. Int. J. Radiat., 41(2):183-91, 1982.
81. PETERS, R.; SAILER, U.; PETERS, K. Zur variabilitat des dosiseffektes in strahlenbiologischen Tierversuch. Strahlentherapie, 157(2):124-33, 1981.

82. PETERSON, W.J.; PERKINS, E.H.; MAKINODAN, T. Recovery of immune competence following sublethal X-irradiation of young and old mice: a model for studying age-related loss of immunologic homeostasis. Radiat.Res., 89(1):53-64, 1982.
83. POOLE, A.R. Tumor lysosomal enzymes and invasive growth. In: DINGLE, J.T. ed. Lysosomes in biology and pathology. Amsterdam, North-Holland, 1973. v.3 p.303-7.
84. POPLACK, D.G.; SHER, N.A.; CHAPARAS, S.D.; BLAESE, R.M. Effect of Mycobacterium bovis (bacillus Calmette-Guérin). Macrophage random migration, Chemotaxis and pynocytosis. Cancer Res., 36:1233-7, 1976.
85. POTE, M.S. & ALTEKAR, W. Changes in levels of tissue specific aldolases following whole-body X-irradiation of rat. Indian J. Biochem. Biophys., 17:255-62, 1980.
86. QUASTLER, H. Studies of Roentgen death in mice. Am.J. Roentq., 54:449-56, 1945.
87. QUASTLER, H. The nature of intestinal radiation death. Radiat. Res., 4:303-20, 1956.
88. RADZUN, H.J.; PARWARESCH, M.R.; KULENKAMPPFF, C.;STEIN, H. Lysosomal acid phosphatase: activity and isoenzymes in separated horma human blood cells. Clin.Chem. Acta, 102:227-35, 1980.

89. REYNOLDS, C. & WILLS, E.D. The effect of lysosomal activation in HeLa cells. Int. J. Radiat. Biol., 25(2): 113-20, 1974.
90. ROWLEY, D. Stimulation of natural immunity to Escherichia coli infections. Lancet, 1:232-4, 1955.
91. ROY, R.M.; MALICK, M.A.; CLAK, G.M. Increased haematopoietic stem cell survival in mice injected with tocopherol after X-irradiation. Strahlentherapie, 158(5):312-8, 1982.
92. SARKAR, S.R.; SINGH, L.R.; UNIYAL, B.P.; CHAUDHURI, B. N. Effect of whole-body gamma irradiation on tissue sialic acid in experimental rats. Strahlentherapie, 158(1):47-9, 1982.
93. SCHIMDTKE, J.R. & DIXON, F.J. Effects of sublethal irradiation on the plaque-forming cell response in mice. J. Immunol., 111:691-7, 1983.
94. SCHNYDER, J. & BAGGIOLINI, M. Secretion of lysosomal hydrolases by stimulated and nonstimulated macrophages. J. Exp. Med., 148(2):435-50, 1978.
95. SCHULTZ, R.M.; PAVLIDES, N.A.; STYLOS, W.A.; CHIRICOS, M.A. Regulations of macrophage tumoricidal functions: a role for prostaglandins E series. Science, 202:320-1, 1978.
96. SLAVIN, S.; WEISS, L.; MORECKI, S.; WEIGENBERG, M. Eradication of murine leukemia with histoincompatible

- marrow grafts in mice conditioned with total lymphoid irradiation (TLI). Cancer Imm. Immunother., 11:155,8, 1981.
97. SMITH, W.W.; ALDERMAN, I.M.; GILLESPIE, R.E. Increased survival in irradiated animals treated with bacterial endotoxins. Am. J. Physiol., 191:124-30, 1957.
98. STARLING, J.R.; CLIFTON, K.H.; NORBACK, D.H. Enzymatic and ultrastructural study of lysosomes in rats bearing radiation-induced thyroid follicular carcinoma. J. Surg. Oncol., 16:15-25, 1981.
99. TALIAFERRO, W.H. & TALIAFERRO, L.S. Effects of X-rays on immunity, a review. J. Immunol., 66:181-212, 1951.
100. SWARTZ, R.P. & SALUK, P.H. Functional modifications of macrophage activity after sublethal whole-body irradiation (41118). Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 167:20-4, 1981.
101. TALIAFERRO, W.H. & TALIAFERRO, L.G. Effects of irradiation on initial and anamnestic Hemolysin responses in rabbits: antigen injection before X-rays. J. Immunol., 104:1364-76, 1970.
102. TROCHA, P.J. & CATRAVAS, G.K. Prostaglandin levels and lysosomal enzyme activities in irradiated rats. Int. J. Radiat. Biol., 38(5):503-11, 1980.
103. UNANUE, E.R. & ASKONAS, B.A. The immune response of mice to antigen in macrophages. Immunology, 15:287, 1968.

- 70.
104. VALERIUS, N.H.; STAHR, J.K.; SAXTRUP, N.O.; PLATZ, P.; ROSENKVIST, J.; SORENSEN, H. Effect of in vitro X-irradiation on lymphocyte and granulocyte function. Scand. J. Haematol., 27:9-18, 1981.
105. VAN FURTH, R. Cells of the mononuclear phagocyte system. Nomenclature in terms of sites and conditions. In: VAN FURTH, R. Mononuclear phagocytes functional aspects. London, Martinus Nighoff, 1980. Part 1, p. 1-40.
106. WAGNER, R.R.; SNYDER, R.M.; HOOK, E.W.; LUTTRELL, C. N. Effects of bacterial endotoxin on resistance of mice to viral encephalitides. J. Immunol., 83:87-98, 1959.
107. WAHL, L.M.; WAHL, S.M.; MCCARTHY, J.B. Adjuvant activation of macrophage functions. In: UNANUE, E.R. & ROSENTHAL, A.S. Macrophage regulation of immunity. London, Academic, 1980. p. 491-504.
108. WALKER, L. & LOWIE, D.B. Killing of mycobacterium microti by immunologically activated macrophages. Nature, 293:69-70, 1981.
109. WALKER, P.G.; WOOLLEN, J.W.; HEYWORTH, R. Studies on glucosaminidase. V. Kidney N-acetyl-beta-glucosaminidase and N-acetyl-beta-galactosaminidase. Biochem.J., 79:288-94, 1961.
110. WALKER, R.I.; LEDNEY, G.D.; GALEY, C.B. Aseptic endotoxemia in radiation injury and graft-vs-host disease. Radiat. Res., 62:242-9, 1975.

111. WATKINS, D.K. High oxygen effect for the release of enzymes from isolated mammalian lysosomes after treatment with ionizing radiation. Ad. Biol. Med. Phys., 13:289-305, 1970.
112. WELMAN, E.; FOX, K.M.; SELWYN, A.P.; CARROL, B.J. The effect of established beta-adrenoreceptor-blocking therapy on the release of cytosolic and lysosomal enzymes after acute myocardial infarction in man. Clin. Sci. Mol. Med., 55:549-53, 1975.
113. WILLS, E.D. & WILKINSON, A.E. Release of enzymes from lysosomes by irradiation and the relation of lipid peroxide formation to enzyme release. Biochem. J., 99:657-66, 1966.