

BK 7125826

ISSN 0101-3084

B29125836

IPEN - PUB -- 308



CNEN/SP

ipen Instituto de Pesquisas
Energéticas e Nucleares

PREPARAÇÃO DE ANTI-MIOSINA CARDÍACA HUMANA: UMA REVISÃO

Helena OKADA, Iracélia Torres de Toledo e SOUZA

PUBLICAÇÃO IPEN 308

JUNHO/1990

SÃO PAULO

PREPARAÇÃO DE ANTI-MIOSINA CARDÍACA HUMANA: UMA REVISÃO

Helena OKADA, Iracélia Torres de Toledo e SOUZA

DEPARTAMENTO DE PROCESSAMENTO

**CNEN/SP
INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES
SÃO PAULO - BRASIL**

Série PUBLICAÇÃO IPEN

INIS Categories and Descriptors

C40.00

**MYOSIN
MYOCARDIUM
MUSCLES
IMMUNOLOGY
MONOCLONAL ANTIBODIES**

IPEN - Doc - 3660

Aprovado para publicação em 28/05/90.

Note: A redação, ortografia, conceitos e revisão final são de responsabilidade do(s) autor(es).

PREPARAÇÃO DE ANTI-MIOSINA CARDÍACA HUMANA: UMA REVISÃO

Helena OKADA, Iracélia Torres de Toledo e SOUZA

COMISSÃO NACIONAL DE ENERGIA NUCLEAR - SP
INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES

Caixa Postal 11049 - Pinheiros

05499 - São Paulo - BRASIL

RESUMO

Revisa-se na literatura a caracterização físico-química e propriedades imunológicas da miosina obtida do músculo cardíaco, a produção de anticorpo monoclonal anti-miosina, a radiomarcagem deste anticorpo e sua aplicação como radiofármaco no diagnóstico do miocárdio infartado. A detecção do infarto do miocárdio por anticorpos radiomarcados para miosina é um exemplo clássico de diagnóstico radioimunológico de tecido não-maligno.

M

11/10/80

11/10/80

11/10/80

REVIEW

PREPARATION OF HUMAN CARDIAC ANTI-MYOSIN: A REVIEW

Helena OKADA, Iracélia Torres de Toledo e SOUZA

**COMISSÃO NACIONAL DE ENERGIA NUCLEAR - SP
INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES
Caixa Postal 11049 - Pinheiros
05499 - São Paulo - BRASIL**

ABSTRACT

The present communication is a review of the physicochemical characterization and immunological properties of myosin isolated from the cardiac muscle, the production of monoclonal antibody anti-myosin, the radiolabeling of this antibody and its application as radiopharmaceutical to imaging myocardial infarcts. The classical example of radioimmunologic diagnosis of non malignant tissues is the detection of myocardial infarction by radiolabeled antibodies to myosin.

INTRODUÇÃO

Desde a descrição por Köhler e Milstein em 1975 da **Tecnologia de Hibridoma** e a subsequente disponibilidade de anticorpos monoclonais contra um único determinante antigênico, estas técnicas tornaram-se um suporte para a maioria dos laboratórios que utilizam procedimentos imunoquímicos em pesquisas básicas, aplicadas ou clínicas.

A produção de anticorpos é um dos aspectos da resposta imunológica a agentes estranhos denominados antígenos. Os antígenos, através de seus determinantes antigênicos, interagem especificamente com receptores de linfócitos induzindo à resposta imune específica.

Os antígenos possuem duas propriedades: imunogenicidade, capacidade de produzir uma resposta imune específica e antigenicidade, capacidade de interagir com os anticorpos.

No estabelecimento de uma infra-estrutura para obtenção de anticorpos monoclonais utilizando a Tecnologia de Hibridoma, "consideravelmente" trabalhosa, o uso de um antígeno com alta imunogenicidade contribui para o bom êxito da produção de anticorpos monoclonais. Quanto maior a complexidade molecular do antígeno, maior a imunogenicidade. Quanto maior for a molécula antigênica maior será o número de determinantes antigênicos aumentando assim a probabilidade de interação com os receptores dos linfócitos.

A miosina cardíaca, sendo uma macromolécula com um grande número de determinantes antigênicos, portanto altamente imunogênica é antígeno ideal para induzir uma resposta imune específica, ponto de partida para a obtenção de anticorpos monoclonais.

Miosina é a proteína mais abundante nas células cardíacas. Após o infarto do miocárdio o dano irreparável às células conduz a um aumento na permeabilidade da membrana celular miocárdial permitindo a entrada de macromoléculas. Se a molécula extra-celular é um anticorpo monoclonal para um componente intra-celular (miosina) concentra-se dentro do tecido danificado. Assim um anticorpo monoclonal para miosina cardíaca ligado a um radionuclídeo identifica necroses do miocárdio.

MIOSINA: CONCEITOS BÁSICOS

A miosina é uma molécula longa em forma de bastão. Possui uma "cauda" composta de dois polipeptídeos e uma "cabeça" complexa com atividade enzimática catalizando a hidrólise de ATP em ADP e fosfato. Tem peso molecular total em torno de 500.000 daltons e 160 nm de comprimento.

No sistema contráctil das células musculares existem 2 tipos de filamentos: os espessos, formados por moléculas de miosina e os delgados, formados por moléculas de actina. Esses filamentos se organizam em arranjos paralelos, encaixando-se uns nos outros formando grupos denominados sarcômeros. Durante a contração muscular em cada sarcômero, os

filamentos espessos deslizam para o espaço entre os filamentos provocando o encurtamento de toda a fibra muscular. A hidrólise do ATP a ADP e fosfato fornece a energia química para o deslizamento dos filamentos. Cada molécula de miosina em um filamento espesso tem uma "cabeça". Essas "cabeças", regularmente espaçadas ao longo do filamento espesso, são na realidade enzimas. Hidrolizam o ATP à medida que perfazem contatos fugazes e repetitivos com o filamento delgado, de tal forma que se exerçam forças de deslizamento provocando o movimento dos filamentos espessos ao longo dos filamentos delgados em direção às extremidades dos sarcômeros. Acredita-se que a hidrólise do ATP é acompanhada de mudanças na forma ou conformação da "cabeça" da miosina, produzindo força mecânica. Assim actina e miosina, além de outras proteínas do sistema contráctil, são especializadas nas transformações de energia química do ATP na energia mecânica da contração e relaxamento muscular. As células musculares têm diferentes formas de especialização. O músculo cardíaco tem contrações rítmicas. O músculo esquelético branco tem resposta rápida e pode funcionar sem oxigênio, enquanto que o vermelho é mais lento e requer oxigênio. O músculo cardíaco contém filamentos de miosina e actina mas difere do músculo esquelético por ser continuamente ativo no ritmo regular de contração e relaxamento e não possui intervalo de trabalho amplo como o mostrado pelo músculo esquelético. Além disso, o coração tem um metabolismo completamente aeróbico em todos os instantes, contrastando com o esquelético que pode funcionar anaerobicamente em curtos períodos. Pelo fato do coração ser normalmente aeróbico e obter praticamente toda a sua energia da fosforilação oxidativa, a impossibilidade do oxigênio atingir uma porção do músculo cardíaco, quando os vasos sanguíneos são bloqueados por depósito de lipídeos, pode ocasionar a morte desta região do músculo cardíaco, processo conhecido como infarto do miocárdio.

A análise das atividades enzimáticas da miosina, extraída do músculo cardíaco e músculo esquelético, branco e vermelho, de coelhos, demonstram a existência de dois tipos de miosina. Um tipo caracterizado por uma atividade enzimática (ATPase) alta está presente no músculo esquelético branco. O outro tipo, caracterizado por baixa atividade enzimática, é encontrado no músculo cardíaco e esquelético vermelho (Katz e col., 1966). Uma grande quantidade de ferro presente no músculo cardíaco e esquelético vermelho (Amberson e col., 1964) pode ser responsável pela ATPase baixa (Inesi e col., 1964). A possibilidade de impurezas ou trocas na miosina durante os procedimentos de purificação influenciam a atividade enzimática. As diferenças enzimáticas entre os dois tipos de miosina não refletem em diferença nas propriedades hidrodinâmicas (Katz e col., 1966). A conformação, tamanho e o peso molecular são os mesmos (Gergely e col., 1957; Mueller e col., 1964; Davis e col., 1960), aspectos na estrutura secundária e terciária e a composição de aminoácidos, geralmente são similares (Kay e col., 1964; Iyencor e col., 1965). As diferenças observadas estão no conteúdo de cisteína (Bárány e col., 1964) na sensibilidade proteolítica (Gergely, 1969; Kay e col., 1964; Mueller e col., 1964) e imu

nológicas (Finck,1965).

Os estudos sobre o tamanho e a natureza química da miosina foram exaustivos em preparações enzimáticas de músculo esquelético (Holtzer e col.,1959; Szentgyorgy,1951) porém são poucos os dados disponíveis para a miosina cardíaca (Davis e col.,1960). Além disso foram descritos valores diferentes de peso molecular para miosina cardíaca. Olson (Olson, 1959) relata 223.000 daltons enquanto que Gergely e Kölher,1957 e Davis e col.,1960, apresentam evidências de que a miosina obtida do músculo cardíaco tem peso molecular de 500.000 daltons, similares à miosina obtida do músculo esquelético (Holtzer e col.,1959; Laki e col.,1955) sugerindo formas de monômeros e dímeros (Davis e col.,1960).

PREPARAÇÃO DA MIOSINA CARDÍACA

A miosina cardíaca humana usada como antígeno na obtenção de anticorpo monoclonal anti-miosina, pode ser extraída do músculo cardíaco fresco e purificada (Khaw e col.,1984^a) de acordo com o método de Katz, 1966. Extrações iniciais de miosina eram obtidas com músculo cardíaco es_u tocado em congelador (Bárány e col.,1964). Entretanto, apesar das inúmeras lavagens, da homogenização exaustiva das miofibrilas, das repetidas reprecipitações de actomiosina para remoção da actina, a miosina cardíaca extraída apresentava um colorido avermelhado, que não era observado nas preparações de miosina esquelética, além disso apresentava contaminação de actomiosina bem maior como a que ocorre com a miosina esquelética. Este inconveniente é superado quando se usa músculo cardíaco fresco (Katz e col.,1966).

A miosina cardíaca é precipitada em força iônica baixa formando o "pellet" menos denso do que a miosina esquelética branca, após a centrifugação.

A concentração da miosina obtida na extração é determinada por espectrofotometria. O rendimento deve ser em torno de 75 a 300 mg de miosina pura por 100 g de músculo cardíaco (Elenbogen e col.,1960; Katz e col.,1966). A homogeneidade da preparação é determinada através de eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil-sulfato de sódio (SDS-PAGE) (White e col.,1968; Neville e col.,1971; Gibson,1974; Stephens e col., Zingales,1984). A amostra de miosina separa-se em bandas de cadeias pesada, leve e traços de proteínas contaminantes, a miosina extraída pode ser purificada por cromatografia de troca iônica em gel de dietil-amino-etil DEAE-Sephadex A-50 (forma DE CLORETO) ou em dietil-amino-etil DEAE celulose (Asahi,1963; Richards e col.,1967).

A miosina, extraída do músculo cardíaco humano, pelo método de Katz,1966, é usada na imunização de camundongos da linhagem BALB/c. Os camundongos são injetados intraperitonealmente. São imunizados vários animais, ao mesmo tempo, para aumentar a possibilidade de obtenção de anticorpos com a especificidade e título desejados. Avalia-se a resposta dos animais injetados, geralmente através do imunoensaio ELISA, e os melhores

respondedores são selecionados. Alguns desses animais servirão à produção de soro imune. Outros serão empregados nos experimentos de fusão celular. No caso de fusão celular, o animal é sacrificado e, em condições estéreis, o seu baço é removido e dele é preparado uma suspensão de células que são fundidas com células de mieloma de acordo com a técnica descrita por Camargo e Lopes, 1983, e cultivadas em placas plásticas de 96 poços. Após o desenvolvimento das colônias no poço avalia-se a presença do anticorpo antimiosina por imunoensaio ELISA. Híbridos positivos são clonados por diluição limitante. Observa-se a produção de anticorpo monoclonal para miosina cardíaca em cerca de 30% dos poços (Khaw e col., 1984^a). Esses autores obtiveram uma linha parental híbrida R11D10 para a produção de anticorpo monoclonal usado na imunodeteção do infarto do miocárdio. O anticorpo monoclonal foi purificado do fluido ascítico por afinidade cromatográfica utilizando proteína A na imunoabsorção (Wilman e col., 1973; Khaw e col., 1983) e o grau de pureza determinado por eletroforese em gel de poli-acrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) (Neville, 1971).

Em Medicina Nuclear utiliza-se o fragmento, em vez do anticorpo no seu todo, pois além de melhorar a imagem é depurado do sangue rapidamente (Larson e col., 1983).

O fragmento é preparado por digestão papaínica (Porte, 1959; Khaw e col., 1984^a) e o Fab é separado do Fc e o anticorpo monoclonal não digerido por imunoabsorção em Proteína A. A mistura de Fab é finalmente cromatografada em coluna TSK 4000 em HPLC (cromatografia líquida de alta resolução) (Khaw e col., 1987).

RADIONARCAÇÃO E APLICAÇÃO

As tentativas iniciais em utilizar, como radiofármaco, fragmentos de antimiosina policlonal marcados com ¹²⁵I (Khaw e col., 1978), ^{99m}Tc (Kramer e col., 1974) e ¹¹¹In (Krycareck e col., 1977) para localização e visualização experimental do infarto de miocárdio encontraram várias limitações (Matter, 1986). A miosina, pelo fato de ser uma proteína de peso molecular alto, possuindo portanto, vários determinantes antigênicos na sua estrutura, estimula a produção de anticorpos específicos com diferentes afinidade e especificidade. Por outro lado sendo o anticorpo policlonal uma mistura de anticorpos com afinidade e correlação variando de animal para animal, de sangria para sangria, adiciona uma heterogeneidade na já complexa resposta imune. O fator crítico para o uso clínico do policlonal é a dificuldade em se obter quantidades significativas de fragmento Fab antimiosina estéreis e livres de pirogênio. Porém, com o advento da tecnologia de hibridoma (Köhler e Milstein, 1975) conseguiu-se a produção praticamente ilimitada de anticorpo monoclonal, proteína homogênea, monoespecífica com alto grau de confiança e reprodutibilidade. Khaw e col. em 1984 utilizando a tecnologia de fusão celular, desenvolveram anticorpo monoclonal para miosina cardíaca designado R11D10.

Os fragmentos R11D10 ligados a substâncias radioativas localizam e visualizam regiões do infarto do miocárdio por cintilografia gama (Khaw e col., 1984^a).

Após o infarto do miocárdio, o dano irreparável às células conduz a um aumento na permeabilidade da membrana celular permitindo a entrada de macromoléculas na célula, o que não acontece com o miocárdio normal (Khaw e col., 1976; Khaw e col., 1979; Stakianakis e Deland, 1982). Em pacientes com infarto agudo de miocárdio os anticorpos específicos, radiomarcados, para miosina cardíaca, localizam-se especificamente nas membranas das células danificadas e são identificados por cintilografia. Neste sistema os componentes intracelulares são usados como antígeno para o imunodiagnóstico (Khaw e col., 1976; Khaw e col., 1978; Stakianakis e col., 1982; Khaw e col., 1984^a).

Os anticorpos monoclonais são extremamente específicos, porém sua especificidade é para epítopes antigênicos e não para toda a molécula o que faria supor uma redução substancial da sua localização no tecido alvo em relação aos policlonais. Foi observado, porém, uma localização elevada no infarto miocárdio canino (Khaw e col., 1983) sugerindo que a quantidade de anticorpo monoclonal anti-miosina ligado a miócitos necróticos não apresenta fator limitante, pois existe um excesso de epítomos de miosina em relação a concentração de anticorpo usado (Khaw e col., 1984^a).

A preparação de radiofármacos a partir de anticorpos monoclonais depende de um sistema de marcação que conduza a uma ligação consistente com o radionuclídeo selecionado, sem afetar significativamente a molécula do anticorpo, purificação e avaliação do composto marcado quanto as suas características que o adequam aos estudos *in vivo*. Neste sentido desenvolveram-se vários métodos para a radioiodação e o uso de reagentes radiometálicos tais como ¹¹¹In e ^{99m}Tc acoplados a quelatos como o DTPA (ácido dietileno-triamino-pentacético) (Cole e col., 1987). Inicialmente o ¹³¹I, apesar da meia-vida de 8 dias, decaimento β e γ , energia de foton alta, 364 KeV, foi o radionuclídeo de escolha para a marcação dos anticorpos monoclonais. O ¹¹¹In com meia-vida de 67 horas, energia de foton 171-254 KeV, compatível com colimadores e gama-câmaras convencionais, e a ausência de emissão β , mostrou-se vantajoso ao ¹³¹I. Porém, ao contrário do sucesso relativamente uniforme de proteínas marcadas por vários métodos de iodação, muitos investigadores não obtiveram resultados consistentes com quelatos de anticorpos monoclonais marcados com ¹¹¹In (Stakianakis e col., 1982). O ^{99m}Tc com meia-vida de 6 horas e energia γ de 141 KeV já vem sendo usado como traçador radioativo na marcação de moléculas na imagem do miocárdio quando conjugado a cintilografia (Gorten e col., 1966; Hubner, 1970; Kramer e col., 1974; Parkey e col., 1974; Zeiweiman e col., 1975) porém a especificidade desses radiofármacos não era exclusiva para o infarto do miocárdio (Pugh e col., 1976; Beller e col., 1977; Prasquier e col., 1977; Khaw e col., 1987). Já o anticorpo monoclonal para miosina cardíaca, por localizar-se especificamente nas

membranas das células danificadas, identificam necroses do miocárdio por cintilografia.

Radiomarcção do fragmento R11D10: Radioiodação. Entre os métodos clássicos, Cloramina T, Lactoperoxidase e Iodogen, este último mostrou-se o mais conveniente (Haisma e col., 1986). Fab R11D10 acoplado ao DTPA, preparado pelo método de (Krejcarek e col., 1977) como descrito previamente por Khaw e col. (Khaw e col., 1984^b) pode ser marcado com ¹¹¹In e ^{99m}Tc. Imagens cintilográficas obtidos com Fab R11D10 marcado com ^{99m}Tc mostram claramente que este radiofármaco visualiza a área infartada duas horas após a sua administração (Khaw e col., 1984^a).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AMBERSON, W.R.; BAUER, A.C.; PHILPOIT, D.E.; ROISEN, F.: Proteins and enzyme activities of press puices obtained by ultracentrifugation of white, red and heart muscles of the rabbit. J. Cell. Comp. Physiol. 63:7, 1964.
2. ASAHI, H.: Chromatography of myosin. Biochemistry 2:458, 1963.
3. BÁRÁNY, M.; CAETGENS, E.; BÁRÁNY, K.; KARP, E.: Comparative studies of rabbit cardiac and skeletal myosins. Arch. Biochem. Biophys. 106:280, 1964.
4. BELLER, G.A.; KHAW, B.A.; HABER, E.; SMITH, T.W.: Localization of radio labeled cardiac myosin-specific antibody in myocardial infarcts: comparison with technetium-99m stannous pyrophosphate. Circulation 55:74, 1977.
5. CAMARGO, E.P.; LOPES, J.D.: Anticorpos monoclonais. Ciência e Cultura 35:1062, 1983.
6. COLE, W.C.; DeNARDO, J.; MEARES, C.F.; McCALL, M.J.; DeNARDO, G.L.; EPSTEIN, A.L.; O'BRIEN, H.A.; MOI, M.K.: Comparative serum stability of radiochelates for antibody radiopharmaceuticals. J. Nucl. Med. 28:83, 1987.
7. DAVIS, J.O.; CARROL, W.R.; TRAPASSO, M.; YANKOPOULOS, N.A.; GASPER, A.: Chemical characterization of cardiac myosin from normal dogs and from dogs and from dogs with chronic congestive heart failure. J. Clin. Invest. 39:1463, 1960.
8. ELLENBOGEN, E.; IYENGAP, R.; STERN, H.; OLSON, R.E.: Characterization of myosin from normal dog heart. J. Biol. Chemistry. 235:2642, 1960.
9. EY, P.L.; PROWSE, S.J.; JENKIN, C.R.: Isolation of pure IgG₁, IgG_{2a}, IgG_{2b} immunoglobulins from mouse serum using protein A-sepharose. Immunoch. 14:429, 1978.
10. FINCK, H.: Immunological studies of myosin. III Immunochemical compa-

- ri-son of myosins from chicken skeletal, heart and smooth muscles. Biochim.Biophys.Acta. 111:231,1965.
11. GERGELY, J.; GOUVEA, M.A.; KOHLER, H.: Abstract. Cardiac myosin. Circulation. 14:940,1956.
 12. GERGELY, J.; KOHLER, H.: Molecular parameters of cardiac myosin. Feb. Proc. 16:185,1957.
 13. GERGELY, J.: Muscle proteins and energy utilization. Ann.N.Y.Acad.Sci. 72:538,1959.
 14. GIBSON, W.: Polyoma virus proteins: a description of the structural proteins of the virion based on polyacrilamide gel electrophoresis and peptide analysis. Virology. 62:319,1974.
 15. GORTEN, R.J.; HARDY, L.B.; McCRAW, B.H.; STOKES, J.R.; LUMB, G.D.: The selective uptake of ²⁰³Hg-chlormerodin in experimentally produced myocardial infarcts. Amer.Heart.J. 72:71,1966.
 16. HAISMA, H.J.; HILGERS, J.; ZURAWSKI Jr., V.R.: Iodination of monoclonal antibodies for diagnosis and radiotherapy using a convenient one vial method. J.Nucl.Med. 27:1890,1986.
 17. HOLTZER, A.; LOWEY, S.: The molecular weight, size and shape of the myosin molecule. J.Amer.Chem.Soc. 81:1370,1959.
 18. HUBNER, P.H.B.: Radioisotopic detection of experimental myocardial infarction using mercury derivative of fluorescein. Cardiovasc.Res. 4:509,1970.
 19. INESI, G.; EBASHI, S.; WATANABE, S.: Preparation of vesicular relaxing factor from bovine heart tissue. Am.J.Physiol. 207:1339,1964.
 20. IYENCAR, M.R.; OLSON, R.E.: Aminoacid composition of dog heart myosin. Biochim.Biophys.Acta. 97:371,1965.
 21. KATZ, A.M.; REPKE, D.I.; RUBIN, B.B.: Adenosinetriphosphatase activity of cardiac myosin. Cir.Research. 19:611,1966.
 22. KAY, G.M.; GREEN, W.A.; OIKAWA, K: Influence of solvent composition on cardiac and skeletal myosin A as determined by optical rotatory dispersion measurements. Arch.Biochem.Biophys. 108:89,1964.
 23. KAY, G.M.; GREEN, W.A.: Physicochemical and enzymatic studies on cardiac myosin. A.Circulation Res. 14,15 (suppl.II):II-38.
 24. KHAW, B.A.; BELLER, G.A.; HABER, E.; SMITH, T.W.: Localization of cardiac myosin-specific antibody in myocardial infarction. J.Clin. Investig. 58:439,1976.
 25. KHAW, B.A.; BELLER, G.A.; HABER, E.: Experimental myocardial infarct imaging following intravenous administration of iodine-131 labeled

- antibody F(ab'), fragments specific for cardiac myosin. Circulation. 57:743,1978.
26. KHAW, B.A.; FALLON, J.T.; BELLER, G.A.; HABER, E.: Specificity of localization of myosin-specific antibody fragments in experimental myocardial infarction: histologic, histochemical, autoradiographic and scintigraphic studies. Circulation 60:1527,1979.
 27. KHAW, B.A.; FALLON, J.T.; STRAUSS, H.W.; HABER, E.: Myocardial infarct imaging of antibodies to canine cardiac myosin with Indium -111 - diethylenetriamine pentacetic acid. Science. 209:295-7,1980.
 28. KHAW, B.A.; STRAUSS, H.W.; COVALHO, A.; LOCKE, E.; GOLD, H.P.; HABER, E.: Technetium-99m labeling of antibodies to cardiac myosin and to human fibrinogen. J.Nucl.Med. 23:1011,1982.
 29. KHAW, B.A.; STRAUSS, W.; POHOST, G.M.; FALLON, J.T.; KATUS, H.A.; HABER, E.: Relation of immediate and delayed Thallium-201 distribution to localization of Iodine-125 antimyosin antibody in acute experimental myocardial infarction. Am.J.Car. 51:1428,1983.
 30. KHAW, B.A.; MATTIS, J.A.; MELICOFF, G.; STRAUSS, H.W.; GOLD, H.K.; HABER, E.: Monoclonal antibody to cardiac myosin imaging of experimental myocardial infarction. Hybridoma. 3:11,1984^a.
 31. KHAW, B.A.; STRAUSS, H.W.; CAHILL, S.L. : Sequential imaging of In-111-labeled monoclonal antibody in human mammary tumors hosted in nude mice. J.Nucl.Med. 25:592,1984^b.
 32. KHAW, B.A.; STRAUSS, W.; MOORE, R.; FALLON, J.T.; YASUDA, T.; GOLD, H.K.; HABER, E.: Myocardial damage delineated by Indium-111 antimyosin Fab and Technetium-99m pyrophosphate. J.Nucl.Med. 28:76,1987.
 33. KOHLER, G.; MILSTEIN, C.: Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. Nature. 256:160,1975.
 34. KRAMER, R.J.; GOLDSTEIN, P.E. : Accumulation of gallium -67 in regions of acute myocardial infarction. Am.J.Card. 33:861,1974.
 35. KREJCAREK, G.E.; TUCKER, K.L.: Covalent attachment of chelating groups to macromolecules. Biochem.Biophys.Res.Comm. 77:581,1977.
 36. LAKI, K.; CARROLL, W.R.: Size of the myosin molecule. Nature (lond). 175:389,1955.
 37. LARSON, S.M.; CARRASQUILLO, J.A.; KROHN, K.A.; BROWN, J.P.; MCGUFFIN, R.W.; FERENS, J.M.: Localization of ¹³¹I-labeled p97 specific Fab fragments in human melanoma as a basis for radiotherapy. J.Clin.Invest. 72:2101,1983.
 38. MATTER, S.J.: Radioiodinated monoclonal antibodies: a critical review. Appl.Radiat.Isot. 37:727,1986.

39. Methods in Enzymology: structural and contractile proteins 85:(Part B, 1982.
40. MUELLER, H.; FRANZEN, J.; RICE, R.V.; OLSON, R.E.: Characterization of cardiac myosin from the dog. J.Biol.Chem. **329**:1447, 1964.
41. NEVILLE, D.M.: Molecular weight determination of protein dodecyl sulfate complexes by gel electrophoresis in a discontinuous buffer system. J.Biol.Chem. **246**:6328, 1971.
42. OLSON, R.E.: Myocardial metabolism in congestive heart failure. J.Chron. Dis. **9**:442, 1959.
43. PARKEY, R.E.; BONTE, F.J. : A new method for radionuclide imaging of acute myocardial infarction in humans. Circulation. **50**:540, 1974.
44. PORTE, R.R.: The hydrolysis of rabbit gamma-globulin and antibodies with crystalline papain. Biochem.J. **73**:119, 1959.
45. FRASQUIER, R.; TARDASCH, M.R. : The specificity of the diffuse pattern of cardiac uptake in myocardial infarction imaging with technetium-99m stannous pyrophosphate. Circulation. **55**:61, 1977.
46. PUGH, B.R.; BUJA, L.M. & col.: Cardioversion and "false positive" Technetium-99m stannous pyrophosphate myocardial scintigrams. Circulation. **54**:339, 1976.
47. RICHARDS, E.G.; CHUNG, C.S.; MENGEL, D.B.; OLCOTT, H.S.: Chromatography of myosin on diethylethylamine-sephadex A-50. Biochemistry. **6**:528, 1967.
48. STAKIANAKIS, G.N.; DELAND, F.H.: Radioimmuno diagnosis and radioimmuno therapy, 1982. J.Nucl.Med. **23**:840, 1982.
49. STEPHENS, R.E.: High-resolution preparative SDS-polyacrylamide gel electrophoresis: fluorescent visualization and electrophoretic elution-concentration of protein bands. Analy.Biochem. **65**:369, 1975.
50. SZENT-GYORGYI, A.: The chemistry of muscular contraction. 2nd ed. New York, Academic Press, 1951.
51. ZEWEIMAN, F.G.; HOLMAN, B.E. : Selective uptake of ^{99m}Tc complexes and ⁶⁷Ga in acutely infarcted myocardium. J.Nucl.Med. **16**:975, 1975.
52. ZINGALES, B.: Analysis of proteins by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis: 374. Genes and antigens of parasites. CM. Morel, editor. Fundação Oswaldo Cruz-Rio de Janeiro, Brasil, 1984.
53. WHITE, A.; HANDLER, P.; SMITH, A.L.: Principles of Biochemistry. 4th ed. International Student Edition: 711.
54. WIKMAN-COFFELT, J.; ZELIS, R.; FENNER, C.; MASON, D.T.: Myosin chains of myocardial tissue. I. Purification and immunological properties

of myosin heavy chains. Bioch.Bioph.Res.Comm. 51:1097,1973.