

# 1 – INTRODUÇÃO

## 1.1 - Adjuvantes

Os adjuvantes são usados para ajudar o antígeno a desencadear uma resposta imune rápida, intensa e duradoura utilizando a menor quantidade de antígeno possível (GUPTA & SIBAER, 1995; HE et al, 2000).

O adjuvante ideal deve proporcionar o mínimo de reações tóxicas locais e sistêmicas, além de biodegradável, econômico e simples fabricação. Os adjuvantes podem ser agrupados em substâncias que atuam como: causador da formação de depósito no local da injeção (adjuvantes a base de óleo, combinações minerais); atuando como carreador do antígeno até as células do sistema imune (lipossomas, adjuvantes a base de óleo); e, agindo diretamente como estimulador do sistema imune (Adjuvante Completo de Freund – FCA, Lipopolissacarídeo – LPS, Toxina de Pertussis – PT) (GUPTA & SIBAER, 1995).

Dois fatores centrais envolvidos nos mecanismos de ação de adjuvantes no aumento da imunogenicidade de um antígeno incluem a proliferação de células T e sua ativação, bem como mobilização e ativação de células apresentadoras de antígeno (APCs) (LAMBRECHT et al, 2009).

Ao estudar os adjuvantes, Freund notou um expressivo aumento na produção de anticorpos ao incorporar o antígeno em parafina. Desenvolveu-se então o mais potente adjuvante conhecido, o Adjuvante Completo de Freund (FCA – Freund's Complete adjuvant), composto de uma emulsão água em óleo adicionada de Mycobacterium sp. Há também o Adjuvante Incompleto de Freund (Freund's incomplete Adjuvant - FIA), no qual não há a Mycobacterium sp. No entanto, o FCA merece atenção especial porque o seu uso pode ser perigoso, devido aos seus efeitos colaterais: dor, febre, nódulos, eritema, necrose e abscesso, é utilizado somente em projetos experimentais (SCHEIBNER, 2001; [www.fortdodge.com.br](http://www.fortdodge.com.br)).

Os adjuvantes mais usados atualmente em vacinas de humanos são os sais de alumínio, hidróxido ou fosfato (ULANOVA et al, 2001; IYER, 2003). Os antígenos vacinais unem-se ionicamete com os sais de alumínio e formam uma suspensão microscópica, da qual os antígenos são liberados lentamente no organismo, aumentando a resposta humoral de anticorpos. Esses adjuvantes têm pouca ação sobre a formação da imunidade celular. Outro adjuvante, denominado MF59, baseado na formação de uma emulsão água em óleo e que utiliza esqualeno, foi licenciado para uso na vacina de influenza (SCHATZMAYR, 2003).

No entanto, trabalhos recentes sobre alumínio e a emulsão de MF59, tem demonstrado que, além de funções da liberação lenta do antígeno, essas classes de adjuvantes também podem ativar vias de imunidade inata *in vivo*, gerando um ambiente imunocompetente no local da injeção (TRITTO et al, 2009).

Novos adjuvantes têm sido estudados com resultados variáveis, sendo possível que novos produtos sejam introduzidos em futuro próximo. Sistemas de encapsulamento de antígenos, de modo que sejam liberados mais lentamente no organismo, e com isso atingir maior número de células alvo do sistema imune, vêm sendo desenvolvidos, e novas vias de inoculação vêm sendo estudadas, em particular a introdução através da pele e em mucosas, sítios primários da infecção do organismo pela grande maioria dos microorganismos (SCHATZMAYR, 2003). Outros adjuvantes estudados têm mostrado níveis de toxicidade maiores do que o ideal em humanos, sendo alguns usados na veterinária (PATIL et al, 2002; LI et al, 2007).

Além de aumentar a imunidade e resposta imune aos antígenos administrados, outro benefício dos adjuvantes é que eles também diminuem a quantidade de antígeno necessária para induzir a resposta imune, tornando o custo da vacina mais eficaz. Assim é possível a concepção e escolha de adjuvantes adaptados às necessidades específicas do antígeno, espécie e situação (SPICKLER & ROTH, 2003).

A importância do conhecimento de novos adjuvantes e de seu mecanismo de ação é posta em evidência quando se sabe que, atualmente, a nova geração de

vacina somente terá bons resultados se ministradas com adjuvante seguro, adequado e eficaz. Assim, o uso de produtos naturais como imunoadjuvantes, sobretudo aqueles de baixa toxicidade e baixo preço, para emprego em procedimentos de imunização/vacinação humana e/ou animal, poderá tornar-se uma alternativa de interesse biológico e econômico (LIMA, 2002).

O uso dos óleos vegetais como imunoadjuvantes tem apenas raras referências na literatura especializada. Os ácidos graxos insaturados foram mostrados como agentes inflamatórios e imunorreguladores. O mecanismo de ação dos ácidos graxos como imunorreguladores parece ser exercido através das células-T (SILVA, 2001).

A *Carapa guianensis* (Andiroba) é uma espécie vegetal de uso múltiplo; a madeira e o óleo extraído das sementes são dois dos produtos mais importantes. Entre as espécies nativas da Amazônia, a madeira da andiroba é uma das mais estudadas, sendo considerada nobre e sucedânea do mogno. O óleo é procurado para uso cosmético e medicinal. Como uso medicinal é usado contra processos antiinflamatórios como: artrite, distensões musculares e alterações dos tecidos cutâneos. Popularmente, o chá da casca e das flores é usado como remédio para combater infecção bacteriana e o chá do cerne como fungicida. Recentemente, a Fundação Oswaldo Cruz lançou no mercado velas de andiroba que são indicadas para repelir mosquitos transmissores de doenças, como o da dengue e o da malária. (FERRAZ et al, 2002; FERRAZ, 2003). Na literatura revisada, não foram encontrada informação sobre o uso da andiroba como adjuvante.

O carbopol tem suas principais aplicações como gelificante na preparação de géis, usado como incrementadores da viscosidade em líquidos e como aglutinadores em comprimidos (VILLANOVA et al, 2010).

O carbopol é um espessante, bastante utilizado em formulações como emulgéis, que possui em sua estrutura uma pequena porção lipofílica em adição a uma grande porção hifrofílica funcionando como emulsificantes óleo em água. A parte lipofílica deste polímero se localiza na interface óleo-água e a porção

hidrofílica em presença de água forma um gel que envolve as gotículas de óleo (GOODRICK, 1997).

Os polímeros de carbopol têm um fenômeno de superfície chamado de bioadesão, na qual adere à superfície biológica. Muitos polímeros hidrofílicos aderem à superfície da membrana e eles atraem a água da superfície epitelial, podendo formar pontes de hidrogênio entre o polímero e o substrato aderente (ANLAR et al, 1993).

O carbopol 934 é um polímero de ácido acrílico utilizado como adjuvante, com propriedade emulsificante. A máxima associação do carbopol com o antígeno é obtida com um pH entre 6,8 e 7,2. Como o carbopol é um polímero promove um encapsulamento do antígeno, provocando uma lenta liberação do antígeno facilitando o reconhecimento deste pelas células de defesa e desencadeando uma resposta imune eficaz. Observou-se em experimentos a indução na produção de IgA e IgG em resposta a organismos de doenças respiratórias. Também houve uma melhor resposta humoral e celular quando comparado com o Hidróxido de Alumínio -  $Al(OH)_3$  e é seguro e efetivo quando testado em camundongo ([www.mvplabs.com/adjuvants.technology.htm](http://www.mvplabs.com/adjuvants.technology.htm)).

## **1.2 – Soroterapia**

Atualmente, o único tratamento eficaz comprovada em casos de acidentes ofídicos é a soroterapia, que consiste na administração de anti-soros por via e doses adequadas em tempo hábil para evitar seqüelas mais graves (ROGERO & NASCIMENTO, 1997).

A soroterapia foi introduzida como tratamento, devido a estudo de Albert Calmette e Vital Brazil. O pesquisador Calmette demonstrou que, o soro resultante da imunização de animais com o veneno de serpentes, era capaz de neutralizar as atividades tóxicas do veneno (VITAL BRAZIL, 1987)

No Brasil, o estudo sobre os anti-soros começou com Vital Brazil no início do século passado, verificando que o soro não é eficaz para todos os tipos de venenos, ou seja, existe a especificidade dos antivenenos para uma determinada espécie ou grupo de serpentes. Desde então a produção passou a ser de antivenenos monovalentes e polivalentes específicos para gênero e/ou espécie (FRANÇA & FAN, 1992).

O soro antiofídico é tradicionalmente produzido a partir da inoculação do veneno das serpentes em cavalos, que então produzem anticorpos específicos para neutralizar o efeito das toxinas. São as imunoglobulinas IgG dos cavalos, devidamente purificados e processados, que compõem os diferentes soros, contra acidentes com serpentes da família das jararacas, cascavéis, surucucus ou/e corais. Com a queda da resistência orgânica do cavalo devido à toxicidade do veneno e uso de adjuvantes tóxicos, eles podem chegar a óbito. A inoculação do veneno botrópico, provoca lesão local e efeitos sistêmicos, debilitando assim a animal (ROGERO & NASCIMENTO, 1997; MUNIZ, 2000).

A dosagem do antígeno inoculado, precisa ser muito controlada, se for pequena demais, os cavalos não produzem anticorpos suficientes e, se for excessiva, podem morrer. A toxicidade também deve ser reduzida, para minimizar os prejuízos à saúde dos animais, o que é feito tradicionalmente através de substâncias químicas chamadas glutaraldeídos ou inibidoras de centros ativos. Ao reagir contra as toxinas dos venenos, o organismo do animal também produz anticorpos contra estas substâncias químicas ou contra infecções secundárias relacionadas ao tipo de venenos, como no caso das toxinas de jararacas, que produzem lesões nos tecidos (IPEN, 2008).

## 1.3 - Serpente Bothrops

### 1.3.1 - Epidemiologia

No Brasil existem 17 espécies de serpentes que fazem parte do gênero *Bothrops*, sendo a *Bothrops atrox* (Linnaeus, 1758) encontrada em toda a Amazônia (CAMPEBELL & LAMAR, 1989).

A epidemiologia dos acidentes botrópicos relaciona-se ao fator clima e setor agrícola, tendo em cada região do Brasil períodos de maior incidência (BRASIL, 2001). No Amazonas acidentes ofídicos acontecem, principalmente, no período das chuvas (novembro a maio) quando os rios ficam cheios (IMTM, 1995).



**Figura 1:** Distribuição geográfica da *B. atrox* no Brasil



**Figura 2:** Jararaca (*Bothrops atrox*) (Paulo S. Bernarde)

(BRASIL, 2001)

Dados do Ministério da Saúde apontam em torno de 20 mil casos anualmente. Nos anos de 2008 e 2009 ocorreram 49.575 casos de acidentes com serpentes no Brasil, e na região Norte com 14.823 casos ([www.saude.gov.br](http://www.saude.gov.br)).

No estado do Amazonas foram registrados 2.811 acidentes com serpente nos anos de 2008 e 2009. Em Manaus, no mesmo período, foram atendidas na Fundação de Medicina Tropical (FMT-AM) 362 vítimas de acidentes, sendo 95% ocasionados pela espécie *B. atrox* ([www.fmt.am.gov.br](http://www.fmt.am.gov.br)).

Os acidentes humanos provocados por picadas de serpentes são um sério problema médico-hospitalar e social pela freqüência com que ocorrem e pela morbimortalidade que ocasionam, uma vez que a maior parte das regiões onde há esse tipo de acidente corresponde às nações subdesenvolvidas e os acidentes ocorrem em sua maioria, em áreas rurais remotas onde os dados epidemiológicos são geralmente escassos e subestimam a verdadeira situação (CARDOSO et al, 2003).

### **1.3.2 - Bioquímica e mecanismo de ação do veneno botrópico**

O veneno botrópico contém proteínas e peptídeos com atividades biológicas locais e sistêmicas. O veneno apresenta três atividades: proteolítica, inflamatória local aguda, coagulante e hemorrágica (ROSENFELD, 1971). Em humanos, o envenenamento por *Bothrops atrox* causa efeitos locais como inflamação, hemorragia local e necrose além de efeitos sistêmicos, inclusive alterações na coagulação de sangue e tipos vários de sangramentos distante do local de mordida (KAMIGUTI et al, 1996) São também responsáveis por distúrbios homeostático do sangue e trombose, que são largamente causados por serino e metaloproteinases, que são os seus principais componentes (MATSUI et al, 2000).

A atividade proteolítica tem sido relacionada a enzimas identificadas como serino ou metaloproteinases. Elas são responsáveis por intensas reações locais como: edema, hemorragia e necrose; ação hemorrágica promovida pelas hemorraginas ou fatores hemorrágicos; ação coagulante e liberação de bradicinina (IWANAGA & SUZUKI, 1979).

As metaloproteinases são proteínas com atividades proteolíticas que contêm cálcio e zinco em suas moléculas, sendo responsáveis pela hemorragia no

envenenamento botrópico (VARANDA & GIANINNI, 1994). Elas podem ser divididas em quatro classes: Classe P-I (20 e 30 kDa); Classe P-II (30 e 50 kDa); Classe P-III (50 e 80 kDa); e, Classe P-IV (80 e 100 kDa). Sendo a Classe P-III com massa molecular de 50 kDa e 80 kDa, as enzimas que apresentam intensa atividade hemorrágica nos venenos (HITE et al, 1994; BJARNASON & FOX, 1995; SERRANO & FOX, 2005). As metaloproteinases de massa molecular 23 kDa (Classe I) e 50 kDa (Classe III), respectivamente, que estão presentes em quantias mais altas no veneno de *B. atrox* de espécimes adultos (LÓPEZ-LOZANO et al, 2002).

No veneno de espécies de *B. Atrox*, procedentes da região de Manaus, foram identificadas varias classes de toxinas classificadas em metaloproteinases, serinoproteinases, fosfalipases  $A_2$ , L-aminooxidades, lectinas, fatores de crescimento dos nervos, fatores de crescimento vascular endotelial e proteínas de cisteína (GUÉRCIO et al, 2006).

As enzimas isoladas do veneno, que possuem atividades tipo “trombina-símile” são serinoproteinases, com a capacidade de atuar sobre a molécula de fibrinogênio encontrado no sangue humano, transformando diretamente em fibrina formando coágulo fraco (KAMIGUTI et al, 1988; SILVA et al, 2003). O veneno botrópico ao penetrar lentamente na circulação desfibrina o sangue, tanto pela geração de trombina como pela ação direta sobre o fibrinogênio. Se a penetração é rápida e a dose total é pequena, essa desfibrinação é precedida de hipercoagulabilidade que dura alguns minutos. Se a dose é elevada, e pela via venosa, há morte rápida por coagulação intravascular maciça dentro de minutos, seguida de liquefação do sangue pela fibrinólise posterior (ROSENFELD et al, 1967; ROSENFELD et al, 1970). As serinoproteinases estão associadas a distúrbios hemostáticos e estas enzimas apresentam massa molecular variando de 26 e 67 kDa, dependendo do teor de glicosilações (SERRANO & MAROUN, 2005).

Batroxostatina (*Bothrops atrox* Serine Proteinase) é uma enzima tipo trombina-símile derivada do veneno de *B. atrox*. Se comparado com a trombina que converte o fibrinogênio em fibrina removendo fibrinopeptídeos A e B, na batroxostatina só remove fibrinopeptídeo A (ITON et al, 1988).

As miotoxinas são componentes quantitativamente importantes nos venenos de Bothrops, com massa molecular aproximadamente, 13,5 kDa (CINTRA, et al., 1993; MANCUSO, et al., 1995). O veneno botrópico apresenta uma variedade de isoformas de PLA<sub>2</sub> miotóxicas e diferenças da expressão de isoformas entre os indivíduos (MEIER, 1986; LOMONTE & CARMONA, 1992; FLETCHER, et al, 1997).

Os venenos de serpentes podem variar na sua composição bioquímica e na antigenicidade entre os gêneros, espécies e/ou até mesmo entre indivíduos da mesma espécie, de acordo com a idade (variação ontogenética), sexo e distribuição geográfica (LOPEZ-LOZANO et al., 2002), o que pode dificultar a formulação de antivenenos específicos para a serpente que provocou o acidente.

As metaloproteinases dos venenos botrópicos causam hemorragia e desfibrinogenação (sangue incoagulável) em animais de experimentação e em acidentes em humanos. Assim o principal alvo dos soros antiofídicos é neutralizar essas toxinas.

O veneno de *B. Atrox* apresenta como principal constituinte toxinas da classe das metaloproteinases. Assim o veneno da espécie apresenta-se como antígeno ideal para avaliar tipos de adjuvantes naturais e/ou sintéticos que possam melhorar a qualidade do soro antiofídico na neutralização das atividades das metaloproteinases.

## 2 – JUSTIFICATIVA

A produção de um antiveneno com alta taxa de anticorpos e o mínimo de efeitos adversos não é fácil, pois o veneno constitui-se de uma variedade de proteínas complexas com atividade biológicas peculiares e os adjuvantes utilizados não satisfazem todas as expectativas.

As vacinas usualmente são constituídas de um antígeno e um adjuvante, que potencializa a resposta imune do antígeno. Um bom adjuvante tem que produzir o menor efeito tóxico possível e desencadear uma forte resposta imune. Sendo assim, o uso de produtos naturais como imunoadjuvantes, sobretudo aqueles de baixa toxicidade e baixo preço, utilizados na imunização/vacinação humana e/ou animal, poderá tornar-se uma alternativa de interesse biológico e econômico.

O óleo da andiroba é um produto natural comum na região e de custo baixo, sendo o mesmo utilizado para vários usos. Uma das vantagens de utilizar adjuvante a base de óleo de planta em relação aos adjuvantes a base de óleo mineral é que eles são metabolizados e assim são mais tolerados pelo organismo. Porém, este também pode resultar em uma eficácia reduzida como um adjuvante.

O Carbopol 940 é um polímero sintético de baixo custo, que tem sido utilizado experimentalmente como adjuvante, obtendo altas taxas de imunoglobulinas IgG.

Existe a necessidade de melhorar a qualidade dos soros antiofídicos nacionais, assim é preciso pesquisar novos adjuvantes naturais e sintéticos que permitam produzir soros antiofídicos com maior quantidade de anticorpos neutralizantes das toxinas dos venenos de serpentes.

Neste estudo produzimos plasmas hiperimunes em camundongos e avaliamos a presença de sinais de toxicidade do óleo de Andiroba e Carbopol 940 associados ou não com o adjuvante Hidróxido de Alumínio, utilizando como antígenos as toxinas do veneno de *B. atrox*.

### **3- OBJETIVOS**

#### **3.1 –Objetivo geral**

Produzir plasmas hiperimunes contra as toxinas do veneno de *B. atrox* utilizando adjuvantes naturais e/ou sintéticos.

#### **3.2 – Objetivos específicos**

- Produzir, em animais de laboratório, plasmas hiperimunes contra as atividades das toxinas do veneno *B. atrox* utilizando como adjuvantes óleo de Andiroba, Carbopol 940 e Hidróxido de alumínio [Al(OH)<sub>3</sub>];
- Detectar sinais de toxicidade, por meio da observação visual de manifestações de reações adversas, produzidas pelos sistemas imunizantes utilizados;
- Comparar a eficácia neutralizante dos plasmas hiperimunes de camundondos obtidos sobre as atividades tóxicas do veneno de *B. atrox*;

## **4. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.1 - Animais e Venenos**

O veneno liofilizado de *B. atrox* foi fornecido pelo Banco de Venenos do Laboratório de Toxicologia Molecular do Centro de Ofidismo Prof<sup>o</sup>. Paulo Friederich Bührnheim da Fundação de Medicina Tropical do Amazonas (FMT-AM).

Os experimentos para a avaliação *in vivo* foram feitos em camundongos albinos (*Mus musculus*) pesando entre 20-22 g, provindos do Biotério Experimental do Laboratório de Toxicologia Molecular do Centro de Ofidismo Prof<sup>o</sup>. Paulo Friederich Bührnheim. Os animais foram mantidos em gaiolas de plástico sob controle da temperatura (22° a 25° C), com água e alimentação *ad libitum*.

### **4.2– Adjuvantes e protocolos de imunização**

Diversas doses de veneno foram misturadas com um único adjuvante ou uma mistura deles, inoculados em camundongos via subcutânea no coxim plantar das patas posteriores, na região dorsal ou via intraperitoneal na região abdominal.

Os adjuvantes que foram utilizados são: Hidróxido de Alumínio [Al(OH)<sub>3</sub>], Óleo de semente de Andiroba (*Carapa guianensis* seed oil) e Carbopol 940 (Carbogel).

#### **4.2.1 – Primeiro protocolo de imunização experimental**

Realizado com 4 doses imunizantes, com intervalos de 15 dias entre cada dose. Administrado 20 µl da solução das misturas (antígeno + adjuvante) em solução salina 0,9 %, via subcutânea no coxim plantar das patas posteriores em todos os grupos de adjuvantes, exceto no de Hidróxido de Alumínio que foi 200 µl da solução via intraperitoneal na região abdominal.

A dose do antígeno foi de 8 µg de veneno *B. atrox* em todos os grupos, exceto em Hidróxido de Alumínio que foi 20 µg de veneno *B. atrox* como dose do antígeno.

- **Grupo experimental com o adjuvante Carbopol 940:** 64 % em solução salina 0,9 %.

- **Grupo experimental com o adjuvante Óleo de Andiroba:** 96 % em solução salina 0,9 %.

- **Grupo experimental com os adjuvantes Óleo de Andiroba + Carbopol 940:** 91 % de óleo de Andiroba + 9 % de Carbopol 940 em solução salina 0,9 %.

- **Grupo experimental com o adjuvante Hidróxido de Alumínio:** 0,2 mg Al(OH)<sub>3</sub> em solução salina 0,9 %.

#### 4.2.2 – Segundo protocolo experimental de imunização

Realizado com 4 doses imunizantes, com intervalos de 15 dias entre cada dose. Administrado 100 µl da solução das misturas (antígeno+adjuvante) em solução tampão PBS pH 7,4 10 mM, via subcutânea na região dorsal, alternando os locais de administração.

Na primeira, segunda e terceira imunização foram administradas, respectivamente, doses do antígeno de: 20 µg, 40 µg e 80 µg do veneno de *B. atrox*.

Na quarta imunização foi aplicado apenas o veneno com dose do antígeno de 100 µg veneno *B atrox* em 100 µl de solução tampão PBS pH 7,4 10 mM.

- **Grupo experimental com o adjuvante Hidróxido de Alumínio:** 1 mg em solução tampão PBS pH 7,4 10 mM.

- **Grupo experimental com o adjuvante Óleo de Andiroba + Hidróxido de Alumínio:** 1 mg de Hidróxido de Alumínio, 50 % de óleo de Andiroba e 0,5 % de Tween 80 em solução tampão PBS pH 7,4 10 mM.

- **Grupo experimental com o adjuvante Carbopol 940 + óleo de Andiroba:** 9 % de Carbopol 940, 91 % de óleo de Andiroba e 0,5 % de Tween 80 em solução tampão PBS pH 7,4 10 mM.

- **Grupo experimental com o adjuvante Hidróxido de Alumínio + Carbopol 940 + óleo de Andiroba:** 1 mg de Hidróxido de Alumínio, 8 % de Carbopol 940, 77 % de óleo de Andiroba e 0,5 % de Tween 80 em solução tampão PBS pH 7,4 10 mM.

#### 4.2.3 – Terceiro protocolo experimental de imunização

Realizado com 4 doses imunizantes, com intervalos de 15 dias entre cada dose. Administrado 100 µl da solução das misturas (antígeno + adjuvante) em solução tampão pH 7,4 10 mM, via subcutânea na região dorsal alternando os locais de administração.

Na primeira, segunda e terceira imunização foram administradas, respectivamente, doses do antígeno de: 20 µg, 40 µg e 80 µg do veneno de *B. atrox*.

Na quarta imunização foi aplicado apenas 100 µg do veneno de *B. atrox* em 100 µl de solução tampão PBS pH 7,4 10 mM.

- **Grupo experimental com o adjuvante Hidróxido de Alumínio:** 1 mg em solução tampão PBS pH 7,4 10 mM.

- **Grupo experimental com os adjuvantes Óleo de Andiroba + Hidróxido de Alumínio:** 1 mg de Hidróxido de Alumínio, 50 % de óleo de Andiroba e 0,5 % de Tween 80 em solução tampão PBS pH 7,4 10 mM.

Em todos os protocolos experimentais de imunização, após sete dias da última dose de imunização, os animais foram anestesiados com inalação de éter, sangrados pelo plexo braquial, e o sangue coletado e armazenado em tubos de hemólise por 30 min a temperatura ambiente e depois 30 min em banho-maria a 37 °C, logo a 8 °C por 1 h, centrifugado a 1500 rpm por 10 min e então coletado os plasmas hiperimunes ou não imune (controle).

### **4.3 – Neutralização das atividades enzimáticas do veneno *B. atrox* pelos plasmas hiperimunes**

#### **4.3.1 – Neutralização da atividade Gelatinase**

Avaliar a eficácia neutralizante com os plasmas hiperimunes experimentais obtidos da atividade proteolítica das Metaloproteínases do veneno botrópico sobre o colágeno (gelatina).

A atividade gelatinase do veneno *B. atrox* foi avaliada em solução de gelatina. Foi preparada Gelatina a 2 % em tampão de colagenase Tris 50 mM pH 7,5 e colocado 500 µl desta solução em tubos de ensaio.

Os Sistemas (veneno + plasma hiperimune ou não imune) foram preparados com diluições 1:1 (10 µg/10 µl em 100 µl de solução salina 0,9 %) e incubadas a 37 °C por 30 min. Após a incubação os sistemas foram agregados a cada tubo de ensaio com Gelatina a 2 %, e incubado por 6 horas a 37 °C. Posteriormente, os sistemas foram levados a 4 °C por 12 horas e após o tempo transcorrido foi avaliado a formação ou não do gel. Os ensaios foram feitos em duplicatas.

A formação de gel de gelatina sugere a inibição da atividade proteolítica das metaloproteínases hemorrágicas do veneno e a gelatina líquida sugere a não inibição das metaloproteínases pelos plasmas hiperimunes.

#### **4.3.2 – Neutralização da atividade Coagulante**

Neutralizar a atividade proteolítica das Metaloproteinases e serinoproteinases na alteração dos fatores de coagulação do sangue através dos plasmas hiperimunes experimentais obtidos.

A atividade coagulante do veneno *B. atrox* foi avaliada em plasma humano. Previamente foram preparados tubos de ensaio com 200 µl de plasma humano citratado a 37 °C.

Os Sistemas (veneno+plasma hiperimune) foram preparados em diferentes diluições, tendo como dose desafio 10 µg do veneno de *B. atrox* em 50 µl de solução salina 0,9 % e incubadas a 37 °C por 30 min. Após a incubação o sistema foi agregado a cada tubo de ensaio com plasma humano e incubado a 37 °C. Posteriormente, os sistemas foram avaliados quanto ao tempo de início de formação do coágulo de fibrina. Os ensaios foram feitos em triplicata.

O aumento do tempo de início da formação do coágulo de fibrina com respeito ao tempo do controle, sugere a inibição pelos plasmas hiperimunes da atividade das metaloproteinases e serinoproteinases sobre as toxinas do veneno do *B. atrox* que atuam sobre os fatores da coagulação.

#### **4.3.3 – Neutralização da atividade Hemorrágica**

Neutralizar as atividades das Metaloproteinases do veneno botrópico, responsáveis pela hemorragia, através do plasma hiperimune.

A atividade hemorrágica foi avaliada *in vivo* em camundongos.

Os sistemas (veneno+plasma hiperimune) foram preparados em diferentes diluições, tendo como dose desafio 10 µg do veneno *B. atrox* em 100 µl de solução salina 0,9 % e incubados a 37° C por 30 min. Após a incubação os sistemas foram injetados via intradérmica no abdômen dos camundongos, previamente depilados.

Após 2 horas, os animais foram sacrificados, a pele removida e o diâmetro (mm) do halo hemorrágico medida.

A porcentagem de eficácia da neutralização da atividade hemorrágica dos plasmas hiperimunes foi obtida pela seguinte fórmula:

$$\% \text{ Eficácia neutralizante} = 100 - \left( \frac{\text{diâmetro experimental} \times 100}{\text{diâmetro controle}} \right)$$

#### **4.3.4 – Neutralização da atividade Desfibrinogenante**

Neutralizar a atividade desfibrinogenante do veneno botrópico pelos plasmas hiperimunes obtidos.

A neutralização da atividade desfibrinogenante foi avaliada *in vivo*.

Os Sistemas (veneno+plasma hiperimune) foram preparados com diluições 1:1 (6 µg/6 µl em 200 µl de solução salina 0,9 %) e incubadas a 37 °C por 30 min. Após a incubação, os sistemas foram injetados via intravenosa (veia caudal) em grupos de três camundongos. Após duas horas os animais foram anestesiados por inalação de éter, sangrados pelo plexo braquial, e o sangue coletado, deixado em tubos de vidro por uma hora á temperatura ambiente.

A capacidade de neutralização dos plasmas hiperimunes foi verificada após esse período, com a observação ou não de coagulação sanguínea. A formação de coágulo sugere inibição da atividade desfibrinogenante pelos plasmas hiperimunes usados.

#### **4.3.5 – Neutralização da atividade Letal**

A atividade letal DL<sub>50</sub> do veneno *B. atrox* foi previamente determinado em 100 µl de veneno/camundongos com 20-22 g por López-Lozano (2002) segundo o método de probitos (FINNEY, 1971).

Para a avaliação da neutralização da atividade letal do veneno de *B. atrox*, foram formados grupos de três camundongos imunizados com doses de veneno da *B. atrox* segundo o terceiro protocolo experimental, utilizando como adjuvante  $\text{Al(OH)}_3$  (3 grupos) e óleo de Andiroba +  $\text{Al(OH)}_3$  (3 grupos).

Após imunização dos camundongos, foram injetados pela via intraperitoneal, as doses desafios de  $3\text{DL}_{50}$ ,  $4\text{DL}_{50}$  ou  $5\text{DL}_{50}$  do veneno diluído em solução salina 0,9 % de NaCl, volume final de 500  $\mu\text{l}$  por camundongo. Os animais foram observados por 24 horas, anotando-se o número de mortos em relação ao tempo.

#### **4.4- Análise Imunoquímica**

##### **4.4.1 - Western Blotting**

Primeiramente foi preparado o gel de Tris-tricina com Glicerol. Foram utilizadas as seguintes soluções: Solução A ( Tris-HCl 0,2M pH 8,9); Solução B ( Tris-HCl 0,1M pH 8,2/Tricina 0,1M/SDS 0,1%); Solução C ( Tris-HCl 3M pH 8,4/SDS 0,3 %); AB-3 (Acrilamida 48 %/Bisacrilamida 1,5 %); AB-6 (Acrilamida 46,5 %/Bisacrilamida 3%); Glicerol; Tampão Amostra ( Não-reduzida: 0,5 ml de Tris-HCl 0,5M pH 6,8/0,4ml glicerol/0,8 ml SDS 10 %/0,2 ml H<sub>2</sub>O); H<sub>2</sub>O (ultra-pura) ; Persulfato de Amônia a 10 % - PSA 10 % (20  $\mu\text{l}$  /200  $\mu\text{l}$  H<sub>2</sub>O ultra-pura); TEMED (Tetrametiletilenodiamina).

Foi preparado a solução de gel separador ( 3,3 ml Solução C, 3,3 ml AB-6, 1,1 ml Glicerol, 2,3 ml de H<sub>2</sub>O ultra pura, 70  $\mu\text{l}$  PSA 10 %, 7  $\mu\text{l}$  TEMED) e espaçador ( 2,5 ml Solução C, 1,5 ml AB-3, 3,5 ml de H<sub>2</sub>O ultra pura, 70  $\mu\text{l}$  PSA 10 %, 7  $\mu\text{l}$  TEMED). A montagem dos géis foi feita em placas de vidro de 10cmx8cm, e com espaçadores de 1,5 mm de espessura. Primeiro foi colocado o gel separador e depois o espaçador até polimerização dos géis, depois foi feito a solução do gel concentrador (0,8 ml Solução C, 0,5 ml AB-3, 2,1 ml de H<sub>2</sub>O ultra pura, 50  $\mu\text{l}$  PSA 10 %, 5  $\mu\text{l}$  TEMED), colocar o pente e depois o gel.

As amostras de veneno foram diluídas volume a volume com concentrações de 20 µg e 10 µg com tampão da amostra sob condições não-redutoras, e incubadas por 30 minutos a 37 °C e aplicadas no gel.

A corrida eletroforética foi realizada com 20 mA, 40 V e a 10 °C. Após a eletroforese os géis foram coradas com Coomassie Blue R-250 a 0,02 %, e descoradas em solução de metanol 50 % e ácido acético 10 %. Os padrões de massa molecular utilizados neste experimento foram do veneno de *B. atrox* (LÓPEZ-LOZANO et al, 2002), cujas massas moleculares das toxinas são de 50, 23 e 14 kDa.

Para o teste de western blotting foram utilizadas as seguintes soluções: Tampão de transferência (3 g Tris, 14,4 g Glicina, 200 ml Metanol e 1L H<sub>2</sub>O); Solução de Ponceau-S (500 mg corante de Ponceau-S, 1 ml ácido acético e 100 ml H<sub>2</sub>O); solução de lavagem ou Tris-salina - TBS (1,21 g Tris, 8,76 g NaCl e 1L H<sub>2</sub>O); solução de lavagem ou Tris-salina-tween – TBS-T (1L Tris-salina; 500 µl tween); solução bloqueadora (leite desnatado a 5% dissolvido em 100 ml Tris-salina); substrato cromógeno (4α cloro 1 naftol a 8,3 %, metanol a 0,57 %, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 0,14 %, 35 ml tris-salina).

Foi preparada em um recipiente contendo tampão de transferência a seguinte seqüência de montagem: suporte de plástico perfurado, folha de espuma, duas folhas de papel de filtro cortadas no tamanho do suporte, o gel, a membrana de nitrocelulose, novamente duas folhas de papel de filtro cortadas no tamanho do suporte, folha de espuma e o suporte perfurado.

O conjunto foi colocado imediatamente na cuba com tampão de transferência com a membrana de nitrocelulose voltada para o pólo positivo. O processo de transferência foi realizado com 260 mA e 550 V durante três horas.

Foi retirado o suporte plástico da cuba e cuidadosamente foram removidos a membrana e o gel. Para verificar a eficiência de transferência a membrana foi

corada com solução de Ponceau-S e o gel de acrilamida com solução corante de comassie blue r-250.

A membrana foi colocada por duas horas a temperatura ambiente em solução bloqueadora. Foi adicionado o plasma na diluição de 1 µl de plasma para 200 µl de TBS, deixando incubar “overnight” a 4°C. Depois lavado três vezes por cinco minutos com TBS-T.

Foi adicionado o conjugado imunoenzimático (na solução bloqueadora), na diluição de 1 µl de anti IgG para 2000 µl de TBS, incubado por duas horas a temperatura ambiente. Depois lavar três vezes por cinco minutos com TBS-T e mais duas vezes por cinco minutos com TBS.

Foi adicionado o substrato cromógeno, sob agitação. Por último, a reação foi interrompida lavando exaustivamente com água corrente.

#### **4.5 - Testes Estatísticos**

Para a análise estatística será utilizado o Teste t de Student e a análise de variância (ANOVA), com níveis de probabilidade menores que 5% ( $p < 0,05$ ).

## **5 – RESULTADOS**

### **5.1 - Estudo imunológico**

#### **5.1.1 - Obtenção do plasma hiperimune com imunização subcutânea no coxim plantar e intraperitoneal na região abdominal dos camundongos através do primeiro protocolo experimental**

Foram formados quatro grupos com 6 camundongos cada para serem imunizados, utilizando-se os adjuvantes: Carbopol 940; óleo de Andiroba e óleo de Andiroba + Carbopol 940.

Nesses grupos as aplicações das imunizações foram na região do coxim plantar das patas posteriores dos camundongos, via subcutânea. Assim foi observada uma boa resposta inflamatória local, com reações locais de edema e rubor. O grupo óleo de Andiroba + Carbopol 940 apresentou uma reação inflamatória local (coxim plantar) maior intensidade em relação aos outros grupos.

Após as imunizações os camundongos foram sacrificados para a coleta do plasma como descrito no item 4.2.1. O plasma não imune coletado foi utilizado para um melhor controle dos resultados, para avaliar a atividade do plasma não imune inibindo as atividades enzimáticas do veneno botrópico.

### 5.1.1.2 - Avaliação da eficácia neutralizante da atividade gelatinase pelos plasmas hiperimunes obtidos no primeiro protocolo experimental

Foram realizados os testes de neutralização da atividade gelatinase e hemorrágica para avaliar a resposta imune humoral induzida pelos adjuvantes de cada grupo.

**Tabela 1:** Neutralização da atividade gelatinase do veneno de *B. atrox* pelo plasma hiperimunes obtido utilizando os adjuvantes Al(OH)<sub>3</sub>, Carbopol 940, óleo de Andiroba, óleo de Andiroba + Carbopol 940.

<b>Grupos</b>	<b>Atividade gelatinase</b>	<b>Gelificação</b>
Veneno (controle)	Líquido	-
Plasma não imune	Gel	+
Al(OH) <sub>3</sub>	Gel	++++
Carbopol 940	Gel	++
óleo de Andiroba	Gel	++
óleo de Andiroba + Carbopol 940	Gel	++++

**Gel:** atividade gelatinase inibida;

**Líquido:** atividade gelatinase não inibida

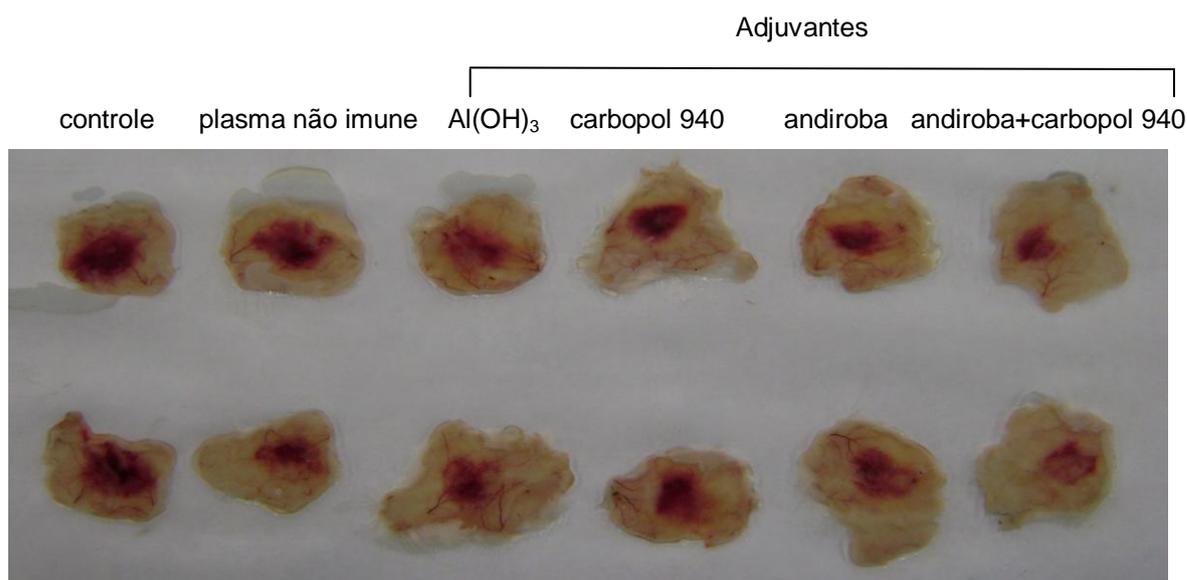
**+** = grau de gelificação

**Dose desafio:** 10 µg

**Diluição veneno/plasma hiperimune:** 10 µg /10 µl

Na tabela 1 observamos uma melhor resposta imune humoral com o adjuvante  $Al(OH)_3$  e óleo de Andiroba + Carbopol 940, quando comparado com o controle, pois além da formação do gel, que indica inibição da atividade gelatinase, nesses grupos ocorreu uma maior consistência do gel. Mas também observamos que o plasma não imune também formou gel, indicando presença de proteínas naturais no plasma animal que inibem parcialmente a atividade gelatinase, mas este apresentou uma menor consistência do gel.

### 5.1.1.3 - Avaliação da eficácia neutralizante da atividade hemorrágica pelos plasmas hiperimunes



**Figura 3:** Neutralização da atividade hemorrágica do veneno *B. atrox*, realizado *in vivo*, pelos plasmas hiperimunes obtidos utilizando os adjuvantes  $Al(OH)_3$ , Carbopol 940, óleo de Andiroba e óleo de Andiroba + Carbopol 940. Dose desafio do veneno *B. atrox*: 10  $\mu$ g/camundongo. Diluição veneno/plasma: 10  $\mu$ g/10  $\mu$ l.

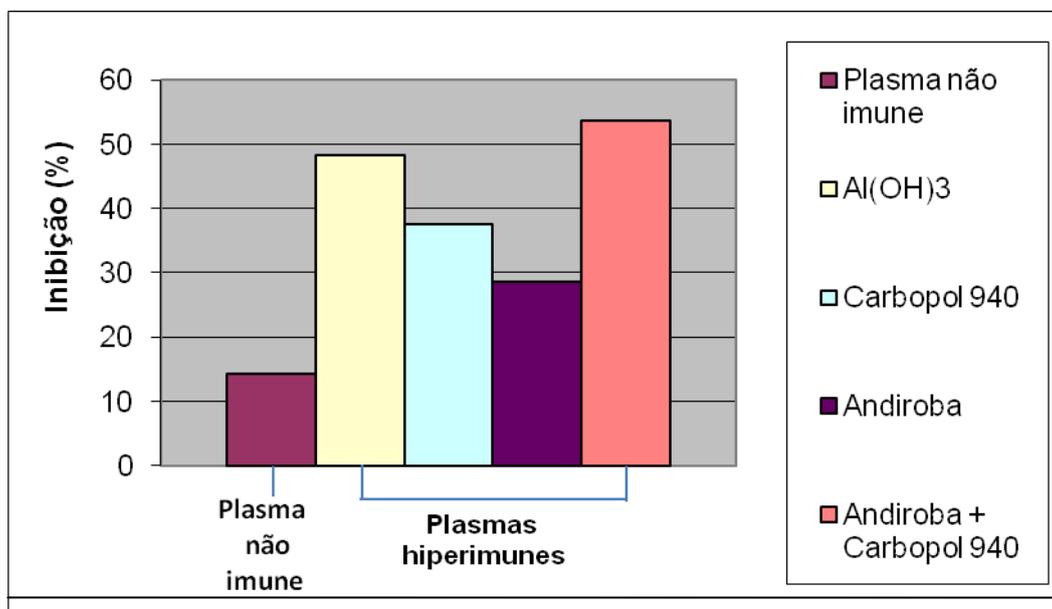
**Tabela 2:** Neutralização da atividade hemorrágica do veneno *B. atrox*, realizada *in vivo*, pelos plasmas hiperimunes dos camundongos imunizados utilizando os adjuvantes Al(OH)<sub>3</sub>, Carbopol 940, óleo de Andiroba e óleo de Andiroba + Carbopol 940.

<b>Grupos</b>	<b>Diâmetro da hemorragia</b>	<b>Intensidade da hemorragia</b>
Veneno (controle)	28mm ±1	++++
Plasma não imune	24mm ±1	++++
Al(OH) <sub>3</sub>	13mm ±1	+
Carbopol 940	17,5mm ±1,5	+++
Óleo de Andiroba	20mm ±0	++
Óleo de Andiroba+carbopol 940	14,5mm ±1	—

**Dose desafio do veneno:** 10 µg/camundongo

+ = grau de intensidade hemorrágica

**Gráfico 1:** Neutralização da atividade hemorrágica do veneno *B. atrox*, avaliada *in vivo*, pelos plasmas hiperimunes dos camundongos imunizados utilizando os adjuvantes Al(OH)<sub>3</sub>, Carbopol 940, óleo de Andiroba e óleo de Andiroba + Carbopol 940.



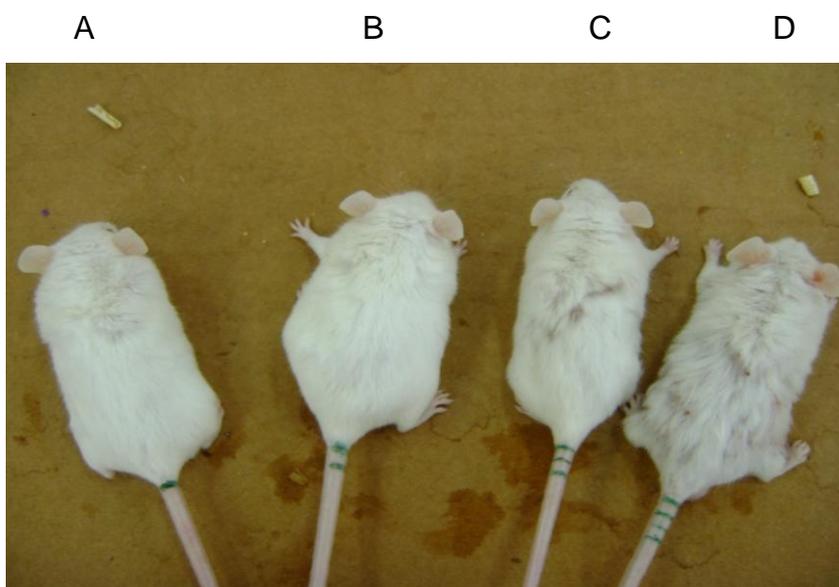
Dose desafio do veneno: 10 µg/camundongo

Na figura 3 e tabela 2 observamos que os adjuvantes Al(OH)<sub>3</sub> e óleo de Andiroba + Carbopol 940 induziram uma melhor resposta humoral contra as toxinas que causam a atividade hemorrágica do veneno observando-se a formação de um menor diâmetro hemorrágico com ambos os plasmas hiperimunes, os quais inibiram aproximadamente, 50 % da atividade hemorrágica.

Com esses resultados tanto na inibição da atividade gelatinase como na hemorrágica, os adjuvantes Al(OH)<sub>3</sub> e óleo de Andiroba + Carbopol 940, foram escolhidos para prosseguir com os testes.

### 5.1.2 - Obtenção de plasma hiperimune com imunização subcutânea na região dorsal dos camundongos utilizando o segundo protocolo experimental

Foram formados quatro grupos com 6 camundongos cada para serem imunizados com os seguintes adjuvantes:  $\text{Al}(\text{OH})_3$ ,  $\text{Al}(\text{OH})_3$  + óleo de Andiroba, óleo de Andiroba + Carbopol 940 e  $\text{Al}(\text{OH})_3$  + óleo de Andiroba + Carbopol 940. Nesses grupos as aplicações das imunizações foram na região dorsal dos camundongos via subcutânea.



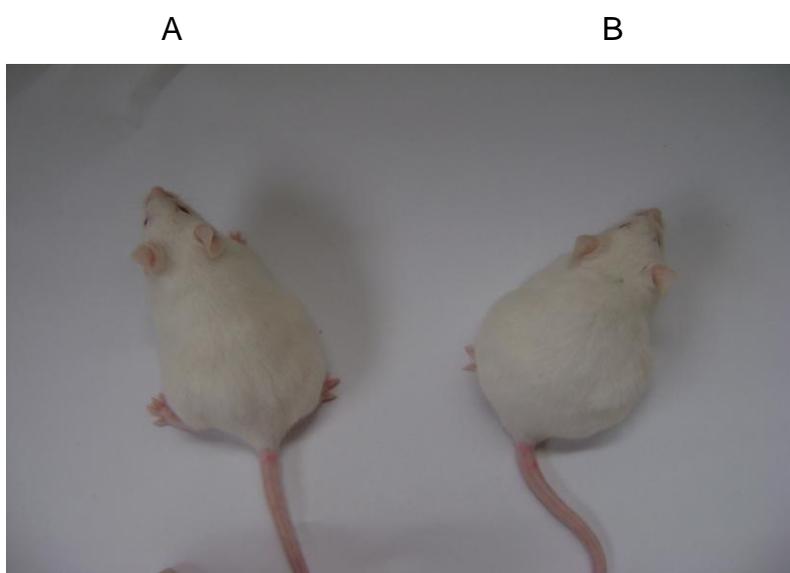
**Figura 4:** Camundongos imunizados na região dorsal via subcutânea utilizando os adjuvantes:  $\text{Al}(\text{OH})_3$  (A),  $\text{Al}(\text{OH})_3$  + óleo de Andiroba (B), óleo de Andiroba + Carbopol 940 (C) e  $\text{Al}(\text{OH})_3$  + óleo de andiroba + Carbopol 940 (D).

Na figura 4 podemos observar sinais de toxicidade externas visíveis, principalmente, no grupo óleo de Andiroba + Carbopol 940 e grupo  $\text{Al}(\text{OH})_3$  + óleo de Andiroba + Carbopol 940, os quais apresentaram irritação na pele e queda de pêlos, indicando reação alérgica, possivelmente, devido a efeito tóxico do Carbopol 940.

Diante desses resultados optamos pelos grupos  $\text{Al}(\text{OH})_3$  e óleo de Andiroba +  $\text{Al}(\text{OH})_3$  para darmos continuidades aos testes.

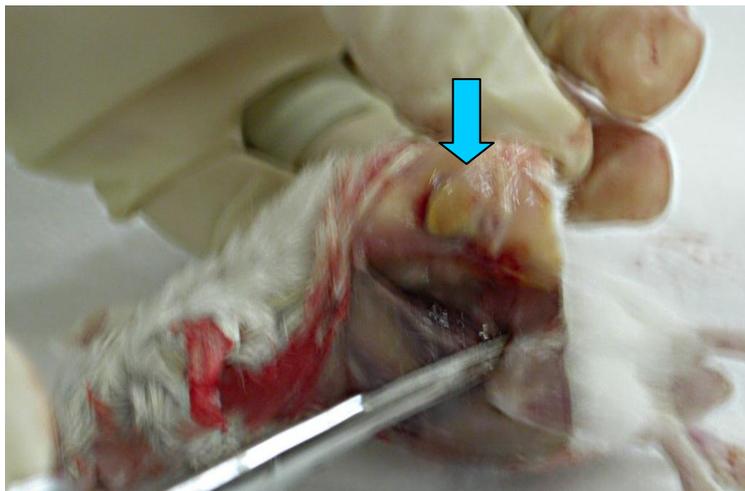
### 5.1.3 - Obtenção de plasma hiperimune com imunização subcutânea na região dorsal de camundongos utilizando o terceiro protocolo experimental

Foram formados dois grupos com 6 camundongos cada para serem imunizados com os adjuvantes:  $\text{Al}(\text{OH})_3$  e óleo de Andiroba +  $\text{Al}(\text{OH})_3$ . Nesses grupos as aplicações das imunizações foram na região dorsal dos camundongos via subcutânea.



**Figura 5:** Camundongos imunizados via subcutânea na região dorsal utilizando os adjuvantes:  $\text{Al}(\text{OH})_3$  (A) e óleo de Andiroba +  $\text{Al}(\text{OH})_3$  (B).

Como se observa na figura 5 os camundongos não apresentaram sinais de toxicidade externas visíveis. Mas na figura 6 observamos no grupo óleo de Andiroba +  $\text{Al}(\text{OH})_3$  a presença de depósitos subcutâneos nos locais das aplicações, indicando a indução de infiltrado local.



**Figura 6** : Formação de depósitos subcutâneos utilizando o adjuvante óleo de Andiroba +  $Al(OH)_3$ .

### 5.1.3.1 – Neutralização das atividades enzimáticas pelos plasmas hiperimunes

#### 5.1.3.1.1 - Neutralização da atividade Coagulante

Para verificar a eficácia de inibição dos plasmas hiperimunes da atividade coagulante foi utilizado plasma humano citratado.

**Tabela 3:** Neutralização da atividade coagulante do veneno *B. atrox* em plasma humano, pelo plasma hiperimune obtido utilizando o adjuvante  $Al(OH)_3$ .

Veneno:Plasma	Tempo (segundos) de início da coagulação
Veneno (controle)	12 ±1
1:0,5	29 ±2
1:1	_**
1:2	_**
1:3	_**

-\*\*Tempo maior que 5 minutos

Dose desafio de veneno: 10 µg /200 µl de plasma humano

**Tabela 4:** Neutralização da atividade Coagulante do veneno *B. atrox* pelo plasma hiperimune obtido utilizando o adjuvante óleo de Andiroba + Al(OH)<sub>3</sub>.

<b>Veneno:Plasma</b>	<b>Tempo (segundos) de início da coagulação</b>
Veneno (controle)	13 ±1
1:0,5	35 ±5
1:1	-**
1:2	-**
1:3	-**

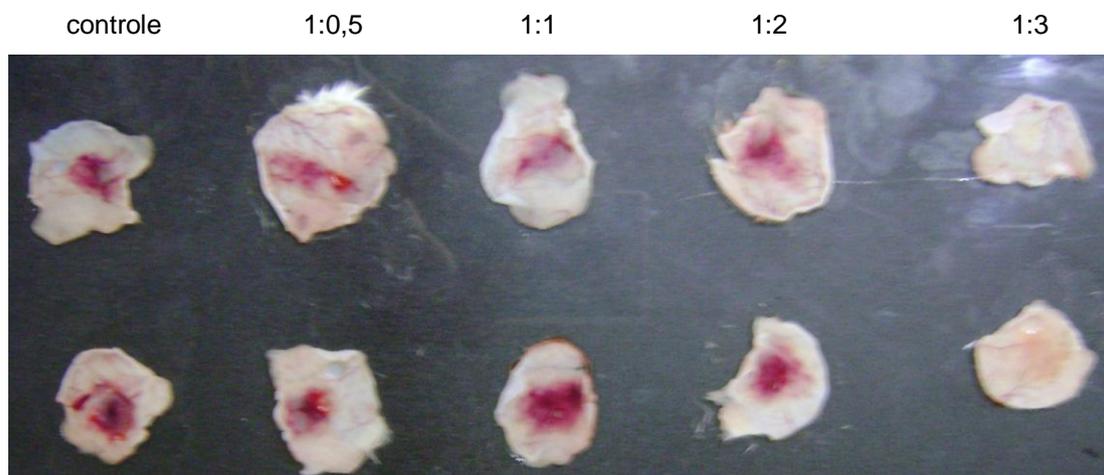
-\*\*Tempo maior que 5 minutos

Dose desafio de veneno: 10 µg /200 µl de plasma humano

As tabelas 3 e 4 demonstram que os plasmas hiperimunes desde a menor diluição (1:0,5) apresentaram 100 % de inibição do tempo de início da formação do coágulo de fibrina quando comparado com o controle. Enquanto que nas demais diluições o tempo de início de coagulação foi maior que 5 minutos. Estes dados sugerem que ambos adjuvantes utilizados, induziram uma boa produção de anticorpos contra as toxinas serino e metaloproteinases do veneno *B. atrox*, que consomem os fatores de coagulação do plasma humano.

### 5.1.3.1.2 - Neutralização da atividade Hemorrágica

#### 5.1.3.1.2.1 – Plasma hiperimune utilizando o adjuvante Al(OH)<sub>3</sub>



**Figura 7:** Neutralização *in vivo* da atividade Hemorrágica do veneno *B. atrox* pelas diferentes diluições do plasma hiperimune obtido utilizando o adjuvante Al(OH)<sub>3</sub>. Dose desafio de veneno: 10 µg /camundongo.

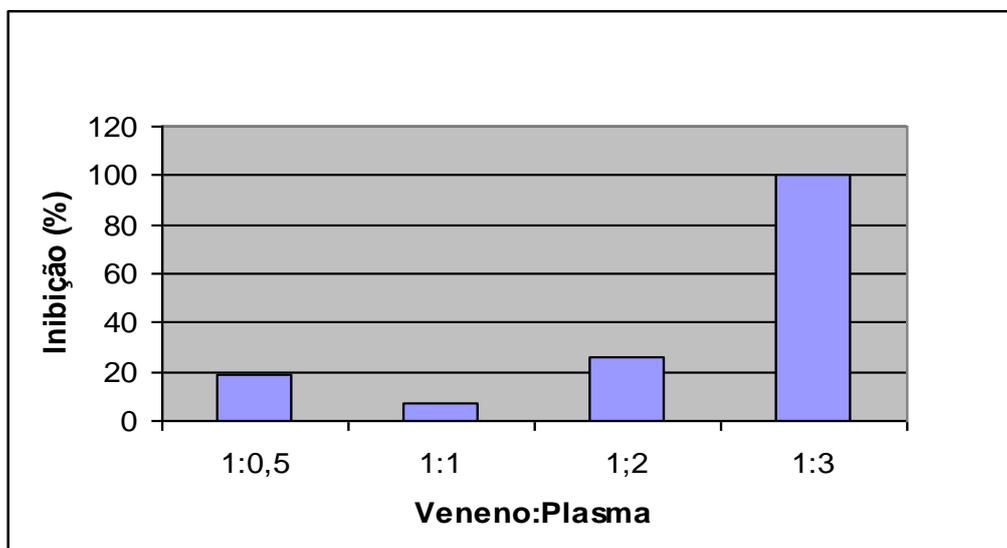
**Tabela 5:** Neutralização *in vivo* da atividade Hemorrágica do veneno *B. atrox* pelo plasma hiperimune obtido utilizando o adjuvante Al(OH)<sub>3</sub>.

<b>Veneno:plasma</b>	<b>Diâmetro da hemorragia</b>	<b>Intensidade da hemorragia</b>
Veneno (controle)	13,5mm ±1,5	++++
1:0,5	11mm ±2	+++
1:1	12,5mm ±1,5	++
1:2	10mm	++
1:3	0,0	—

**Dose desafio de veneno:** 10 µg /camundongos

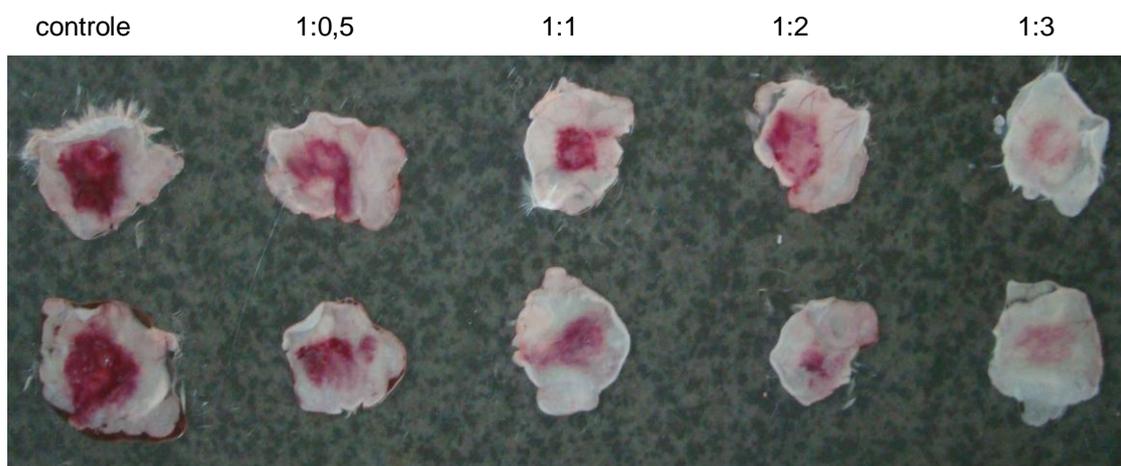
+ = grau de intensidade hemorrágica

**Gráfico 2:** Neutralização *in vivo* da atividade Hemorrágica do veneno *B. atrox* pelo plasma hiperimune obtido utilizando o adjuvante  $\text{Al}(\text{OH})_3$ .



Dose desafio de veneno: 10  $\mu\text{g}$ /camundongo.

#### 5.1.3.1.2.2 – Plasma hiperimune utilizando o adjuvante Óleo de Andiroba + $\text{Al}(\text{OH})_3$



**Figura 8:** Neutralização da atividade Hemorrágica do veneno *B. atrox* pelas diferentes diluições de plasma hiperimune utilizando óleo de Andiroba +  $\text{Al}(\text{OH})_3$ . Dose desafio de veneno: 10  $\mu\text{g}$ /camundongo.

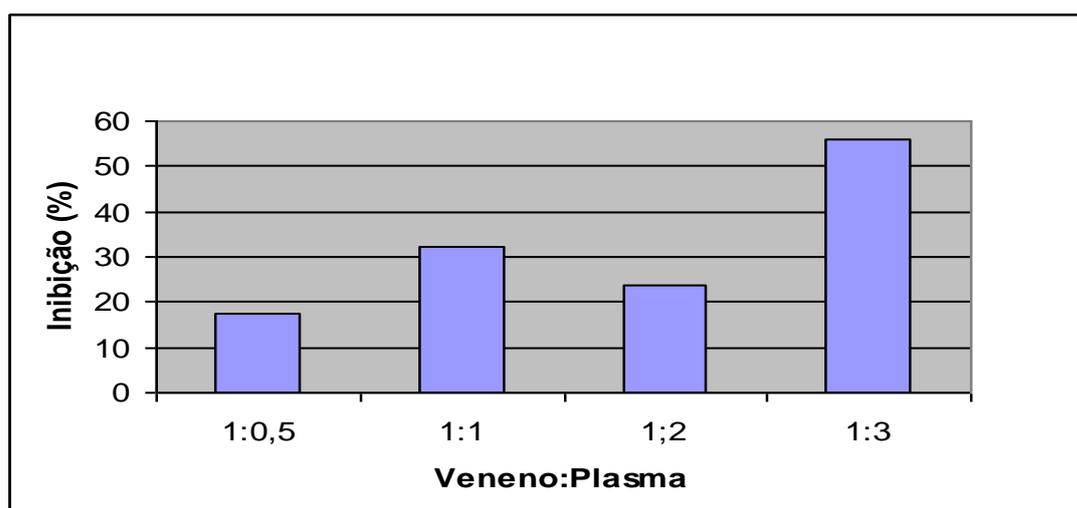
**Tabela 6:** Neutralização da atividade Hemorrágica do veneno *B. atrox*, avaliada in vivo, pelo o plasma hiperimune obtido utilizando o adjuvante óleo de Andiroba + Al(OH)<sub>3</sub>.

Veneno:plasma	Diâmetro da Hemorragia	Intensidade da Hemorragia
Veneno (controle)	17mm ±1	++++
1:0,5	14mm ±1	++
1:1	11,5mm ±1,5	++
1:2	13mm ±2	+
1:3	7,5mm ±1,5	—

Dose desafio de veneno: 10 µg/camundongo.

+ = grau de intensidade hemorrágica

**Gráfico 3:** Neutralização da atividade Hemorrágica do veneno *B. atrox*, realizado in vivo, pelo o plasma hiperimune utilizando o adjuvante óleo de Andiroba + Al(OH)<sub>3</sub>.



Dose desafio de veneno: 10 µg/camundongo.

A figura 7 e tabela 5 mostram que o plasma hiperimune obtido utilizando o adjuvante Al(OH)<sub>3</sub> apresentou inibição total da atividade Hemorrágica na diluição 1:3.

Na figura 8 e tabela 6 mostraram que plasma hiperimune obtido utilizando o adjuvante óleo de Andiroba +  $\text{Al(OH)}_3$  apresentou no máximo uma inibição de 55,88% com a diluição 1:3, mas com intensidade hemorrágica baixa.

Se comparado os dois plasmas hiperimunes, o plasma hiperimune obtido com o adjuvante  $\text{Al(OH)}_3$  conseguiu 100% de inibição da atividade Hemorrágica com diluição 1:3, já o com o plasma hiperimune obtido com o adjuvante óleo de Andiroba +  $\text{Al(OH)}_3$  atingiu apenas inibição de 55,88% quando comparado os diâmetros hemorrágicos. Mas se comparamos as intensidades hemorrágicas (figuras 7 e 8), observamos que o plasma hiperimune utilizando o adjuvante óleo de Andiroba +  $\text{Al(OH)}_3$  apresentaram melhor atividade inibitória com diluições 1:2 e 1:1 em relação ao plasma hiperimunes utilizando o adjuvante  $\text{Al(OH)}_3$ . Isto sugere que o plasma hiperimune obtido utilizando o adjuvante óleo de Andiroba +  $\text{Al(OH)}_3$  inibe a atividade hemorrágica com diluições mais baixas.

### 5.1.3.1.3 – Neutralização *in vivo* da atividade Desfibrinogenante

**Tabela 7:** Neutralização *in vivo* da atividade desfibrinogenante do veneno *B. atrox* pelos plasmas hiperimunes obtidos utilizando os adjuvantes  $\text{Al(OH)}_3$  e óleo de Andiroba +  $\text{Al(OH)}_3$ .

<b>Sistemas</b>	<b>Atividade Desfibrinogenante</b>
Veneno (controle)	Não coagulou
Plasma hiperimune obtido com $\text{Al(OH)}_3$	Coagulação instantânea
Plasma hiperimune obtido com óleo de Andiroba + $\text{Al(OH)}_3$	Coagulação instantânea

**Dose desafio de veneno:** 6  $\mu\text{g}$ /camundongo

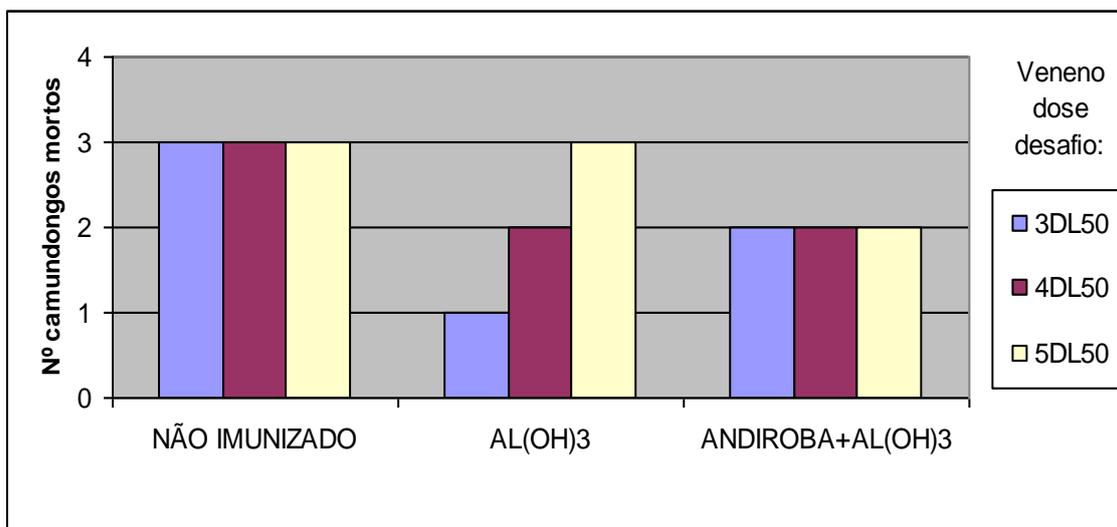
**Diluição veneno/plasma:** 6  $\mu\text{g}$ /6  $\mu\text{l}$

Avaliado em camundongos, os sistemas foram injetados por via endovenosa.

Segundo a tabela 7 observou-se que os plasmas hiperimunes experimentais obtidos neutralizaram a atividade desfibrinogenante das toxinas serino e metaloproteinases do veneno *B. atrox* que consomem os fatores de coagulação sanguínea.

#### 5.1.5.1.4 - Neutralização da atividade Letal: resultados preliminares

**Gráfico 4:** Neutralização da atividade Letal do veneno *B. atrox* em camundongos imunizados utilizando os adjuvantes Al(OH)<sub>3</sub> ou óleo de Andiroba + Al(OH)<sub>3</sub>.



1DL<sub>50</sub> = 100 µg de veneno de *B. atrox*/camundongos de 20 - 22g.

1DL<sub>50</sub> = 5 mg/kg; 3DL<sub>50</sub> = 15 mg/kg; 4DL<sub>50</sub> = 20 mg/kg; 5DL<sub>50</sub> = 25 mg/kg

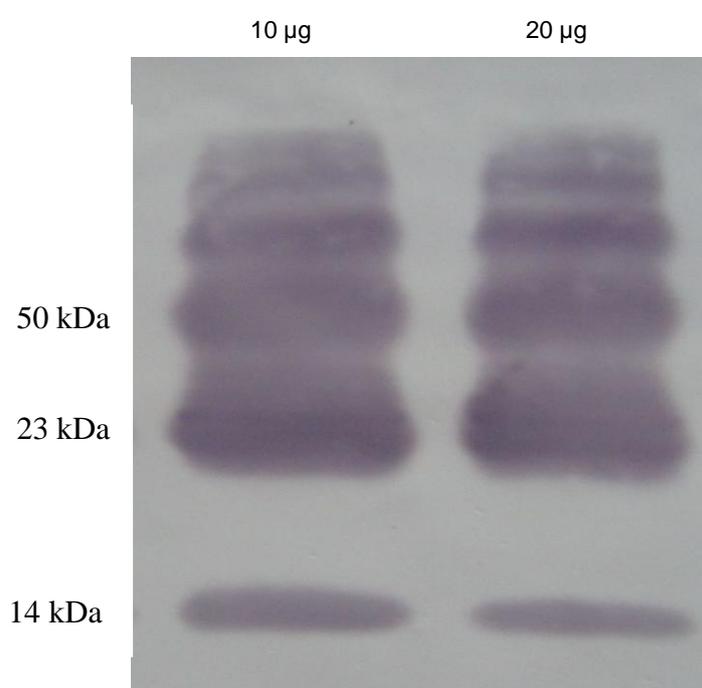
Tempo de observação: 24 h

Observamos no Gráfico 4 que, em altas doses (5DL<sub>50</sub>) do veneno, sobreviveram mais camundongos imunizados utilizando o adjuvante óleo de Andiroba + Al(OH)<sub>3</sub>, do que com o adjuvante Al(OH)<sub>3</sub>, sugerindo uma resposta imune humoral mais intensa e específica, mas não podemos deixar de frisar sobre as diferenças fisiológicas existentes entre os indivíduos que pode ter influenciado na sobrevivência dos mesmos.

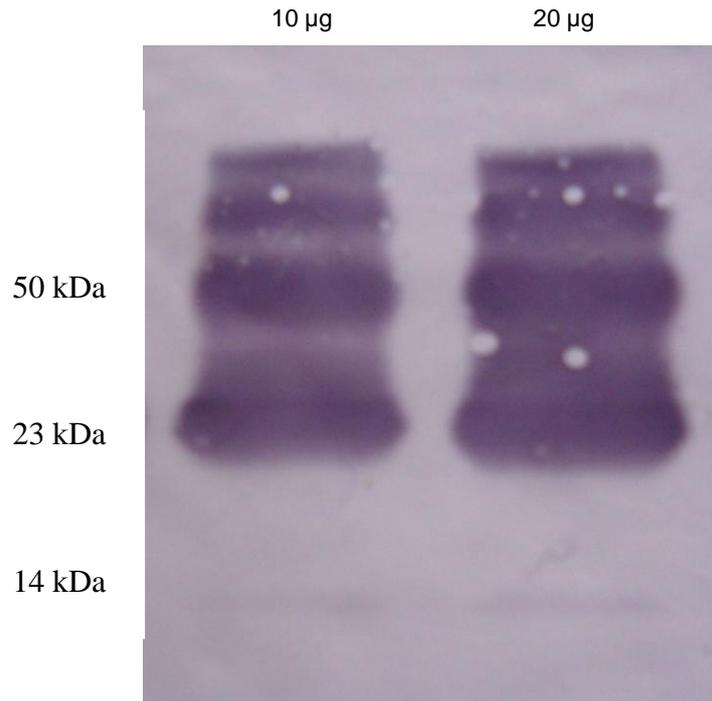
### 5.1.3.1.5 – Análise Imunoquímica: interação antígeno-anticorpo

#### 5.1.3.1.5.1 – Western Blotting

Western Blotting foi utilizado para avaliar a interação antígeno/anticorpo. Para detecção de IgG foi utilizado uma diluição de 1µl:200µl (Plasma/TBS), com concentrações de veneno de 10 µg e 20 µg.



**Figura 9:** Interação das toxinas do veneno *B. atrox* com as imunoglobulinas IgG do plasma hiperimune obtido utilizando o adjuvante Al(OH)<sub>3</sub>. Dose desafio de veneno *B. atrox* de 10 µg e 20 µg. Foram detectadas toxinas, principalmente, com massa molecular de 14 kDa, 23 kDa e ≥50 kDa.



**Figura 10:** Interação das toxinas do veneno *B. atrox* com as imunoglobulinas IgG do plasma hiperimune obtido utilizando o adjuvante óleo de Andiroba + Al(OH)<sub>3</sub>. Dose desafio de veneno *B. atrox* de 10 µg e 20 µg. Foram detectadas toxinas com massa molecular de 14 kDa, 23 kDa e ≥50 kDa.

Observamos interação das toxinas do veneno de *B. atrox* com as imunoglobulinas IgG dos dois plasmas hiperimunes experimentais obtidos com os adjuvantes Al(OH)<sub>3</sub> e óleo de Andiroba + Al(OH)<sub>3</sub>.

Nas figuras 9 e 10 observamos que com o plasma hiperimune obtido utilizando o adjuvante óleo de Andiroba + Al(OH)<sub>3</sub> foram detectadas toxinas com massas moleculares de 23 kDa e ≥50 kDa com mais intensidade do que com o plasma hiperimune obtido com o adjuvante Al(OH)<sub>3</sub>, mas com fraca interação antígeno-anticorpo com as de toxinas com massa molecular de 14 kDa.

As bandas com maior intensidade detectada com o plasma hiperimune utilizando o adjuvante óleo de Andiroba + Al(OH)<sub>3</sub>, sugere a presença de maior número de interações entre as toxinas do veneno *B. atrox* com as imunoglobulinas IgG. O que nos reporta para o teste de neutralização da atividade hemorrágica, no qual apresentou hemorragia de menor intensidade desde as menores diluições indicando uma inibição das metaloproteinases presentes no veneno *B. atrox*, quanto ao teste de neutralização da atividade letal mesmo em altas doses de letalidade os

camundongos imunizados apresentaram uma sobrevida, sugerindo uma resposta humoral mais intensa e específica.

## 6 - DISCUSSÃO

Plasma hiperimune é o plasma concentrado de imunoglobulinas, produzido pela estimulação do sistema imune através de um antígeno.

Um adjuvante é uma substância que tem a capacidade de aumentar a resposta imune humoral e/ou celular, quando este é acrescentado em uma vacina ou é injetado ao mesmo tempo com o antígeno (SCHATZMAYR, 2003).

Quando o antígeno é uma mistura complexa de proteínas e peptídeos e cada um destes apresenta diferentes alvos no sistema fisiológico, como no caso do veneno de serpentes do gênero *Bothrops* (CALVETE, 2009), fica mais difícil encontrar um adjuvante capaz de ajudar o sistema imune a produzir um efeito benéfico específico para todas as toxinas do veneno, para assim se ter uma boa resposta imune com o mínimo de efeito tóxico. Assim sendo, foi utilizado o veneno da *B. atrox* juntamente com 4 tipos de adjuvantes, já que a escolha de qualquer adjuvante requer uma relação entre melhora da resposta e menor nível aceitável de reações adversas.

O nosso trabalho consistiu basicamente em produzir plasma hiperimune com atividade neutralizante das atividades biológicas do veneno *B. atrox* utilizando como adjuvantes o óleo de Andiroba, Carbopol 940 e Hidróxido de Alumínio, e observar possíveis sinais de reações adversas.

Inicialmente, foram feitos alguns testes para comparar a atuação dos adjuvantes em potencializar a resposta imunológica para o antígeno, as toxinas do veneno da *B. atrox*. Dos adjuvantes selecionados foi óleo de Andiroba, Carbopol 940 e Adjuvante de Freund, mas logo com uma reação tóxica forte deste, a qual matou os camundongos imunizados, o mesmo foi substituído pelo Hidróxido de Alumínio, que é o adjuvante mais utilizado em seres humanos atualmente (ULANOVA et al, 2001).

Em outros resultados o Carbopol 940 apresentou reações adversas como: irritação na pele e queda de pêlos dos camundongos, o que pode indicar uma

reação alérgica. Como o adjuvante ideal deve proporcionar o mínimo de reações locais e sistêmicas (HE et al, 2000), o mesmo não continuou no estudo. Ficando para dar continuidade ao estudo, na indução de resposta imune quanto na ausência de reações adversas graves, o Hidróxido de Alumínio e óleo de Andiroba.

No presente estudo mostrou-se em ensaio *in vivo* que, o plasma hiperimune obtido utilizando os adjuvantes  $\text{Al}(\text{OH})_3$  e óleo de Andiroba +  $\text{Al}(\text{OH})_3$  nas proporções 1:3 foram capazes de neutralizar total e parcial, respectivamente, o quadro hemorrágico, uma das manifestações locais mais severas induzidas pelo veneno de *B. atrox* (BRASIL, 2001). Esse resultado sugere a presença de imunoglobulinas IgG que inibiram as metaloproteinases, que segundo Terra (2009) o veneno da Jararaca é composto, predominantemente, por metaloproteinase PIII (43-54 %) que são as responsáveis por hemorragias intensas.

No procedimento de neutralização da Letalidade pelo plasma hiperimune, utilizando o adjuvante  $\text{Al}(\text{OH})_3$ , apresentou uma melhor neutralização do veneno na dose letal  $3\text{DL}_{50}$  (300  $\mu\text{g}$ ), ou seja, mais de 50% dos camundongos sobreviveram. Já com plasma hiperimune utilizando o adjuvante óleo de Andiroba +  $\text{Al}(\text{OH})_3$ , mesmo não ocorrendo mais de 50 % de sobreviventes, foi interessante, pois a neutralização do veneno foi possível mesmo em altas dosagens letais ( $5\text{DL}_{50} = 500 \mu\text{g}$ ), indicando uma neutralização da toxicidade do veneno de *B. atrox*, possivelmente, devido a uma resposta adquirida humoral a uma pré-exposição ao antígeno, pelas imunizações, desencadeando rapidamente imunoglobulinas IgG específicas.

Quanto à neutralização da atividade desfibrinogenante *in vivo*, quando utilizado o plasma hiperimune/veneno nas proporções 1:1( $\mu\text{l} / \mu\text{g}$ ), ambos os plasmas hiperimunes experimentais inibiram essa atividade, sugerindo uma quantidade de imunoglobulinas IgG inibidoras das toxinas dos venenos botrópicos que consomem os fatores de coagulação do sangue, as metaloproteinases e serinoproteinases. Segundo Kamiguti et al (1988), a ação tipo da “trombina-símile” que são serinoproteinases transformam o fibrinogênio diretamente em fibrina, formando um coágulo fraco, causando problemas hemostáticos.

Os perfis eletroforéticos do veneno de *B. atrox* mostram proteínas, principalmente, com massas moleculares variando de 14 kDa, 23 kDa e 50 kDa, segundo estudo de López-Lozano et al (2002). No teste de Western Blotting confirmou-se reatividade antígeno-anticorpo entre os anticorpos dos dois plasmas hiperimunes experimentais produzidos e as toxinas do veneno. Com o plasma hiperimune obtido utilizando o adjuvante óleo de Andiroba + Al(OH)<sub>3</sub> observou-se pela intensidade das bandas, uma maior interação antígeno-anticorpo, indicando uma maior reatividade com proteínas de massas moleculares de 23 kDa e ≥50 kDa, possivelmente, metaloproteinases (LOZANO et al, 2002). Reforçando o resultado de neutralização total e parcial pelos plasmas hiperimunes utilizados do quadro hemorrágico, que é ocasionado por alterações provocadas pelas metaloproteinases de alta massa molecular que agem diretamente sobre os capilares induzindo o extravasamento (TAMBOURGIT et al, 1992).

As toxinas de 14 kDa, foram evidenciadas de forma fraca com o plasma hiperimune obtido utilizando os adjuvantes óleo de Andiroba + Al(OH)<sub>3</sub>, já com o adjuvante Al(OH)<sub>3</sub> foram detectadas, e podem ser fosfalipases A<sub>2</sub>, responsáveis pelos efeitos miotóxicos (LEITE et al, 1999). Sugerindo que o adjuvante Al(OH)<sub>3</sub> é melhor para induzir resposta imune contra esta classe de toxinas quando comparado o adjuvante óleo de Andiroba + Al(OH)<sub>3</sub>.

Quanto às reações adversas foi observada a formação de “depósitos” no local da injeção, no dorso dos camundongos imunizados como mostram as figuras (4 e 6). O efeito de depósito com liberação lenta melhora a apresentação do antígeno para as células efectoras e promove um aumento da resposta imune e eficácia da vacina (<http://www.mvp-technologie.com>). Observamos esse efeito de depósito tanto nos adjuvantes a base de óleo como com os polímeros sintéticos.

Foram observados irritações da pele e queda dos pêlos, como sinais de toxicidade nos camundongos imunizados com carbopol 940. Estudo toxicológico realizado com carbopol, polímeros de alta massa molecular, demonstrou uma baixa toxicidade e potencial para irritação. Testes realizados em coelhos mostraram pouca irritação da pele, quando testados com concentração de 100 % de carbopol 910 ou 934. Nenhuma irritação ocular moderada quando testados com carbopol 910, 934,

940 ou 941 nas concentrações de 0,20 – 100 %, relacionaram os efeitos devido à presença de benzeno como impureza presente nos polímeros carbopol (HOSMANI et al, 2006). Nos levam a sugerir que, a associação dos adjuvantes óleo de Andiroba + Carbopol 940 e  $\text{Al(OH)}_3$  + óleo de Andiroba + Carbopol 940 (figura 4) não é indicada, pois potencializa uma hipersensibilidade de contato.

## 7 – CONCLUSÕES

Segundo nossos resultados podemos concluir:

- Enzimas das classes das fosfolipases  $A_2$  (14 kDa), serinoproteases e metaloproteínas (23 kDa e  $\geq 50$  kDa) estão presentes na composição do veneno *B. atrox*. Delas, as serinoproteases e metaloproteínas foram inibidas pelos plasmas hiperimunes experimentais obtidos, ocasionando inibição da hemorragia com o adjuvante  $Al(OH)_3$  e desfibrinogenante com o adjuvante  $Al(OH)_3$  e adjuvante óleo de andiroba +  $Al(OH)_3$ ;
- As doses desafio testadas do veneno de *B. atrox*, induziram letalidade em camundongos imunizados tanto com os adjuvantes  $Al(OH)_3$  como óleo de Andiroba +  $Al(OH)_3$ , mas ocorreu sobrevida, mesmo em altas dosagens, nos camundongos que produziram o plasma hiperimune com o adjuvante óleo de Andiroba +  $Al(OH)_3$ , sugerindo uma melhor indução na produção de anticorpos neutralizantes;
- Segundo o teste de western blotting, o adjuvante óleo de Andiroba +  $Al(OH)_3$  induz o sistema imune do camundongo a maior produção de anticorpos contra as toxinas do veneno de *B. atrox* em 23 a 50 kDa. Já a produção de anticorpos contra as toxinas de 14 kDa foi muito fraca;
- Presença de reações adversas como queda de pêlo e irritação da pele com o adjuvante Carbopol 940 ocasionadas devido a hipersensibilidade de contato, potencializado pela presença de  $Al(OH)_3$  e óleo de andiroba.
- O adjuvante óleo de Andiroba +  $Al(OH)_3$  apresentou melhor eficácia quanto a diminuição da intensidade hemorrágica e letalidade, comparando-o ao  $Al(OH)_3$ , possivelmente devido a uma liberação mais lenta do antígeno, induzindo assim uma melhor resposta imune;

- Quanto a presença de reação adversa local, o adjuvante óleo de Andiroba +  $\text{Al(OH)}_3$  apresentou depósitos subcutâneos, que pode estar relacionados aos melhores resultados deste em relação ao adjuvante  $\text{Al(OH)}_3$ , devido ao maior tempo de exposição do antígeno no local de inoculação;
- O plasma hiperimune obtido utilizando o adjuvante óleo de Andiroba +  $\text{Al(OH)}_3$  teve uma resposta imune igual ou maior se comparado com o adjuvante  $\text{Al(OH)}_3$ . Quanto a sinais de toxicidade externos visíveis apresentaram os adjuvantes de Freund, Carbopol 940 e óleo de Andiroba +  $\text{Al(OH)}_3$ , menos no  $\text{Al(OH)}_3$ .

## 8 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALAGÓN, A. C.; MOLIMAR, R. R.; POSSANI, L. D.; FLETCHER, JR.; CRONAN, J. E.; JULIA, J. Z. **Venom from the Snake Bothrops asper Garmon**. Biochem j. 1980, 185:695-704.

ANLAR, S.; CAPAN, Y.; HINCAL, A. A. **Physico-chemical and bioadhesive properties of polyacrylic acid polymers**. Pharmazie, 48(4),285-287,1993.

BJARNASON, J. B.; FOX, J. W. **Hemorrhagic toxins snake venoms**. J. Toxic.-Toxin. Rev. 7, 121-209, 1988/89.

BJARNASON, J. B.; FOX, J. W. **Snake venom metalloendopeptidases: reprotolysins**. Meth. Enzymol. 248, 1995.

BOCHNER, R.; STRUCHINER, C. J. **Acidentes por animais peçonhentos e sistemas nacionais de informação**. Cad. Saúde Pública, Rio de Janeiro, 18(3):735-746, Mai-Jun, 2002.

BOCHNER, R.; STRUCHINER, C. J. **Epidemiologia dos acidentados ofídicos nos últimos 100 anos no Brasil: uma revisão**. Cad. Saúde Pública, Rio de Janeiro,

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes ofídicos**. Brasília, Centro de Documentação do Ministério da Saúde, 1998.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes ofídicos**. 2 ed. Brasília, Centro de Documentação do Ministério da Saúde, 2001.

CARDOSO, J. L. C., et al. **Animais peçonhentos do Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes**. São Paulo: SARVIER, 2003.

CAMPBELL, J. A.; LAMAR, W. W. **The venomous reptiles of Latin America.** Cornell University, New York, 1989, 425p.

CALVETE, J. J.; SANZ, L.; ÂNGULO, Y.; LAMONTE, B.; GUITÉRREZ, J. M. **Venoms, venomics, antivenomics.** Elsevier, 2009:1736-1743.

CINTRA, A. C. O.; MARANGONI, S.; OLIVEIRA, B.; GIGLIO, J. R. **Bothropstoxin-1: amino acid sequence and function.** J. Prot. Chem., v.12,p.57-64, 1993.

CLISSA, P. B. **Caracterização do efeito jararagina sobre a produção e liberação de citocinas pró-inflamatórias em modelo murino.** 2002. 110f. Tese (Tese em Imunologia): Instituto de Ciências Biomédica da Universidade de São Paulo – São Paulo.

COSTA, E. P.; CLISSA, P. B.; TEIXEIRA, C. F. P.; MOURA-DA-SILVA, A. M.. **Importance of metalloproteinases and macrophages in viper venoms-induced local inflammation.** Inflammation, v.26, p.13-17, 2002.

CRIBBS, D. H.; GHOCHIKYAN, A.; VASILEVKO, V.; TRAN, M.; PETRUSHINA, I.; SADZIKAVA, N.; BABIKYAN, D.; KESSLAK, P.; KIEBER-EMMONS, T.; COTMAN, C. W.; AGADJANYAN, G. **Adjuvant-dependent modulation of Th1 and Th2 responses to immunization with b-amyloid.** International Immunology, 2003, vol. 15, n 4, p. 505-514.

FERRAZ, I. D. K. **Andiroba: Carapa guaianensis AUBL.** Informativo técnico rede de sementes da Amazônia, n 1, 2003.

FERRAZ, I. D. K. et al. **Sementes e plântulas de andiroba (Carapa guianensis AUBL. E Carapa procera D. C.): aspectos botânicos, ecológicos e tecnológicos.** Acta Amazônica, 2002, 32:647-661.

FINNEY, D. J. **Probit analysis.** 3 ed. Cambridge University Press, 1971, 356p.

FLETCHER, J. E.; CELISTRE DE ARAÚJO, H. S.; OWNBY, C. L. **Molecular events in myotoxic effects of phospholipases.** In: KINI, R.M. Venom phospholipase A2 enzymes: structure, function and mechanism, Chichester: John Wiley and Sons, 1997, p.459-500.

FRANÇA, F. O. S.; FAN, H. W. **Soroterapia.** In: SCHVARTSMAN, E. (ed). Plantas venenosas e animais peçonhentos. 2<sup>o</sup> edição. Sarvier: São Paulo, p. 176.

GOOGRICK, B. F. **Carbopol – High performance polymers for pharmaceuticals.** Bulletin 14: 24, 1997.

GLENN, G. M.; O'HAGAN, D. T. **Adjuvants: progress, regress and pandemic preparedness.** Expert Rv. Vaccines 6(5), 651-652 (2007).

GUÉRCIO, R. A. P.; SHEUCHENKO, A. S.; LÓPEZ-LOZANO, J. L.; PABA, J.; SOUSA, M. V.; RICART, C. A.O. **Ontogenetic variations in the venom proteome of the Amazonian snake *Bothrops atrox*.** Proteome Science, 2006, 4:11.

GUPTA, R. K.; SIBAER, G. R. **Adjuvants for human vaccines-current status, problems and future prospects.** Vaccine, 1995, vol. 13, n. 14, p. 1263-1276.

HE, Q.; MITCHELL, A. R.; JOHNSON, S. L.; WAGNER-BARTAK, C.; MORCOL, T.; BELL, S. J. D. **Calcium Phosphate Nanoparticle Adjuvant.** Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology, Nov 2000, vol. 7, n 6, p. 899-903.

HOSMANI, A. H.; THORAT, Y. S.; KASTURE, P. V. **Carbopol and its pharmaceutical significance: a review.** Disponível em: <http://www.pharmainfo.net>. Acesso em: 06 de Março de 2010.

HITE, L. A.; JIA, L. G.; BJARNASON, J. B.; FOX, J. W. **cDNA Sequences for four snake venom metalloproteinases: structure, classification, and their relationship to mammalian reproductive proteins.** Arch. Biochem. Biophys. 308 (1) 182-191, 1994.

IMTM. **Boletim do Núcleo de Epidemiologia e Saúde Pública.** Instituto de Medicina Tropical de Manaus, 1995. 1(3) : 3.

IYER, S.; HOGENESCH, H.; HEM, S. L. **Relationship between the degree of antigen adsorption to aluminum hydroxide adjuvant in interstitial fluid and antibody production.** Vaccine, 21 (2003) 1219-1223.

IPEN. **Irradiação aumenta eficiência de soros antiofídicos.** Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares. Disponível em: <http://www.ipen.br> . Acesso em: 14 de Agosto de 2008.

ITON, N.; TANAKA, N.; FUNAKOSHI, I.; KAWWASAKI, T.; MIHASHI, S.; YAMASHINA, I. **Organization of the Gene for Batroxobin, a thrombin-like snake venom enzyme.** The Journal of Biological Chemistry, vol. 263, June 5, pp. 7628-7631, 1988.

IWANAGA, S.; SUZUKI, T. **Enzymes in snake venom.** In: LEE, C.L. Snake venoms. New York: Springer Verlag, 1979, p.61-158.

KAMIGUTI, A. S.; CARDOSO, J. L.; MARUYAMA, M.; SANO-MARTINS, I. S.; MORENA, P.; CHUDZINSKI, A. M.; TOMY, S. C.; ANTÔNIO, L. S.; SANTOS, M. L.; KELEN, E. M. A. **Studies on blood agulation and frininolysis in patients bitten by Bothrops jararaca snake.** In: Encontro Brasileiro de Hemostasia e Trombose, 5.; Jornada Brasileira de Hemofilia, 7.; 1988, Florianópolis. Anais, p. 14.

KAMIGUTI, A. S.; HAY, C. R. M.; ZUZEL, M. **Inhibition of collagen-induced platelet aggregation as the result of cleavage of  $\alpha 2\beta 1$ -integrin by the snake venom metalloproteinase Jararhagin.** Biochem J. 1996; 320:635–641.

LAMBRECHT, B. N.; KOOL, M.; WILLART, M.; HAMMAD, H. **Mechanism of action of clinically approved adjuvants.** Current opinion in Immunology, 2009, 21:1-7.

LAMBERT, A. L.; WINSETT, D. W.; COSTA, D. L.; SELGRADE, M. K. **Transfer of Allergic Airway Responses with Serum and Lymphocytes from Rats Sensitized to Dust Mite.** Am J Respir Crit Care Med. 1998; 157: 1991-1999.

LENZ, G. **Métodos Imunológicos.** Biofísica, 2004.

LEITE, V. L.; ANDRADE, M. F.; LÚCIA, M.; GOUVÊA, C. M. P. **Método para isolamento da miotoxina do veneno de *Bothrops neuwiedi* e avaliação de sua atividade.** Alfenas, 5:63-68, 1999.

LI, H., NOOKALA, S.; RE, F. **Aluminum Hydroxide Adjuvantes Activate Caspase-1 and Induce IL-1 and IL 18 Release.** The Journal of Immunology, 2007, 178:5271-5276.

LIMA, M. G. S. **Uso de óleos vegetais como adjuvantes de resposta imunológica em procedimentos de imunização/vacinação.** Universidade Federal do Ceará – UFC, Ceará: 2002.

LIN, T. L. **Adverse effects of excess surfactants upon umulsification.** Cosmet. & Toilet., v. 106, p. 71-80, 1991.

LÓPEZ-LOZANO, J. L. **Venenos de serpentes da Amazônia – Propriedades e relações moleculares, fisiológicas e taxonômicas.** 2002. 180f. Tese (Tese em Biologia Molecular) – Faculdade de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Brasília, Brasília.

LOPEZ-LOZANO, J. L., SOUSA, M. V., RICART, C. A., CHAVEZ-OLORTEGUI, C., FLORES SANCHEZ, E., MUNIZ, E. G., BUHRNHEIM, P. F., MORHY, L. **Ontogenetic variation of metalloproteinases and plasma coagulant activity in venoms of wild *Bothrops atrox* specimens from Amazonian rain forest.** Toxicon, 2002, Jul, 40 (7), 997-1006.

LOMONTE, B.; CARMONA, E. **Individual expression patterns of myotoxin isoforms in the venom of the snake *Bothrops asper***. *Comp. Biochem. Physiol.*, v.102B, p.325-329, 1992.

MANCUSO, L. C.; CORREA, M. M.; VIEIRA, C. A.; CUNHA, O. A. B.; LACHAT, J. J.; SELISTRE DE ARAÚJO, H. S.; OWNBY, C. L.; GIGLIO, J. R. **Fractionation of *Bothrops pirajai* snake venom: isolation and characterization of piranotoxin-I, a new myotoxic protein**. *Toxicon*, v.33, n. 5, p. 615-626, 1995.

MATSUI, T; FUJIMURA, Y.; TITANI, K. **Snake venom proteases affecting hemostasis and thrombosis**. *Biochim et Biophys Acta*. 2000, 1477:146–156.

MEIER, J. **Individual and age-dependent variations in the venom of the Fer-the-lance (*Bothrops atrox*)**. *Toxicon*, v.24, p. 41-46, 1986.

MUNIZ, E. G. **Veneno de *Crotalus durissus ruruima* – propriedades moleculares, farmacológicas e imunológicas**. 2000. 80f. Dissertação (Dissertação em Patologia Tropical) – Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade do Amazonas, Manaus.

NOVAES, A. P.; LUCAS, S.; ABE, A. S.; FERNANDES, W.; PUORTO, G.; ALMEIDA, I. L. **Envenenamento Botrópico em bovinos: tratamento opcional**. *Vetrinary News*, v.6, 1999, p. 8-11.

PATIL, P. K.; BAYRY, J.; RAMAKRISHNA, C.; HUGAR, B.; MISRA, L. D.; PRABHUDAS, K.; NATARAJAN, C. **Immune Responses of Sheep to Quadrivalent Double Emulsion foot-and-Mouth Disease Vaccines: Rate of Development of Immunity and Variations among other Ruminants**. *Journal of Clinical Microbiology*, Nov. 2002, vol. 40, n. 11, p. 4367-4371.

PERREIRA. A. Z. P. **Análise da variabilidade ortogenética do veneno de *Bothrops* (Amaral, 1921) (Serpentes, VIPERIDAE): Implicações adaptativas aos itens alimentares**. 2006. 97f. Dissertação (Dissertação em Fisiologia Geral) – Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo – São Paulo.

RESENDE, F. C. B. et al. **Adjuvantes de vacinas: possibilidades de uso em seres humanos ou animais.** Rev. Bras. Alerg. Immunopatol. Vol 27, n. 3, 2004, 27 (3):116-124.

ROGERO, J. R.; NASCIMENTO, N. **Atenuação da toxicidade de venenos ofídicos por meio da radiação ionizante.** Biotecnologia Ciência & desenvolvimento, ano I, n. 2, julho/agosto de 1997, 24-26.

ROSENFELD, G. **Symptomatology, pathology and treatment of snake bites in South América.** In – Bucherl, W, Buckeley, E.E., Deulofeu, V., editors. Venomous animals and their venoms. New Yourk – Academic Press, 1971, 354-841.

ROSENFELD, G.; NAHAS, L.; CILLO, D. M. et al. **Envenenamentos por Serpentes e Escorpiões.** In: Cintra, P.; Ramos, J. and Valle, J. R.: Atualização Terapêutica - 8ª Edição, Livraria Editora Artes Médicas Ltda., S. Paulo, 1970. p.984.

ROSENFELD, G.; NAHAS, L.; KELEN, E. M .A. **Coagulant, Proteolytic and Hemolytic Properties of Some Sanke Venoms.** In: Bucherl, W.; Buckley, E. and Deulofeu, V.: Venomous Animals and Their Venoms. New York, Academic Press INC, 1967, V.1, Cap.9, p.229.

SANTOS, M. M. B.; MELO, M. M.; JÁCOME, D. O.; FERREIRA, K. M.; OLIVEIRA, N. J. F.; ALZAMORA FILHO, F. **Avaliação de diferentes tratamentos sobre as alterações hemostáticas após envenenamento botrópico (*Bothrops alternatus*) experimental em cães.** Biosci. J., Uberlândia, v.19, n.3, p.123-130, Sept./Dec. 2003.

SCHEIBNER, V. **Adverse effects of adjuvants in vaccines.** Nexus, Dec 2000, vol. 8, n. 1 & Feb 2001, vol. 8, n. 2.

SCHATZMAYR, H. G. **Novas perspectivas em vacinas virais.** Hist. Cienc. Saúde-Manguinhos, v.10, supl. 2, Rio de Janeiro, 2003.

SERRANO, S. M. T.; FOX, J. W. **Structural considerations of the snake venom metalloproteinases, key members of the M12 reprotin family of metalloproteinases.** *Toxicon* 45(8), 969-985, 2005.

SERRANO, S. M. T.; MAROUN, R. C. **Snake venom serine proteinases: sequence homology vs. substrate, a paradox to be solved.** *Toxicon* 45(8):1115-1132, 2005.

SILVA, A. C. **Proceedings VI.** Pharmatech: 2001, 165-166.

SILVA, M. B.; SCHATTNER, M.; RAMOS, C. R. R.; JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO, I. L. M.; GUARNIERI, M. C.; LAZZARI, M. A.; SAMPAIOS, C. A. M.; POZNER, R. G.; VENTURA, J. S.; HO, P. L.; CHUDZINSKI-TAVASSI, A. M. **A prothrombin activator from *Bothrops erythromelas* (jararaca-da-seca) snake venom: characterization and molecular cloning.** *Biochem. J.* 2003, 369:129-139.

SPICKLER, A. R.; ROTH, J. A. **Adjuvants in veterinary medicine: modes of action and side effects.** *J. Vet. Intern. Med.* 2003, May-June: 17(3).

STITES, D. P. et al. **Imunologia Médica.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.

TAMBOURGIT, D. V.; CAMPOS, A. C. M. R.; FREITAS, M. C. W.; MAGNOLI, F. C.; SILVA, W. D.; EICKSTEDT, V. R. D. V.; SANTOS, M. C.; FURTADO, M. F. D.; KIPNIS, T. L. **Manipulation of the Complement System by Animal Venoms.** *Memórias do Instituto Butantan*, 1992, 54(2):9-10.

TERRA, R. M. S.; PINTO, A. F. M.; GUIMARÃES, J. A.; FOX, J. W. **Proteomic profiling of snake venom metalloproteinases (SVMPs): Insights into venom induced pathology.** *Toxicon*, 54, 836-844, 2009.

TRITTO, E.; MOSCA, F.; GREGORIO, E. **Mechanism of action of licensed vaccine adjuvants.** Sixth World Congress of Vaccines, immunization and immunotherapy 26 May 2009, 3331-3334.

ULMER, J. B.; VALLEY, U.; RAPPUOLI, R. **Vaccine manufacturing: challenges and solutions**. Nature biotechnology, Nov. 2006, v. 24, n. 11, p. 1377-1383.

ULANOVA, M.; TARKOWSKI, A.; HAHN-ZORIC, M.; HANSON, L. A. **Common Vaccine Adjuvant Aluminum Hidroxiado Up-Regulates Accessory properties of Humam Monocytes via an Interleukin-4-dependent mechanism**. Infection and Immunity, Feb. 2001, vol. 69, n.2, p. 1151-1159.

WACK, A. et al. **Combination adjuvants for the induction of potent, long-lasting antibody and the T-cell responses to influenza vaccine in mice**. Vaccine, 2008, n. 26, p. 552-561.

WAGSTAFF, S. C.; LAING, G. D.; THEAKSTON, R. D. G.; PAPASPYRIDIS, C.; HARRISON, R. A. **Bioinformatics and Multiepitope DNA Immunization to desing rational snake antiveneno**. Plos Medicine, v. 3, p.832-844, June 2006.

WARRELL, D. A. Snake venoms science and clinical medicina. **1. Russell's viper – biology, venom and treatment of bites**. Trans R Soc Trop Méd Hyg. 1989 Nov-Dec, 83 (6), 732-40.

WAN, S. G.; JIN, Y.; LEE, W. H.; ZHANG, Y. **A snake venom metalloproteinase that inhibited cell proliferation and induced morphological chages of ECV 304 cells**. Toxicon, 47(2006): 480-489.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Requirement for snake antivenins**. Geneva: World Health Organization, 1971. 21-44, (WHO Tech. Rep. Ser., 21).

VARANDA, E. A; GIANNINI, M. J. S. **Bioquímica de venenos de serpentes**. In: BARRAVIEIRA, B. Venenos animais: uma visão integrada. Rio de Janeiro: EPUC, 1994, Cap. 14, p.205.

VILLANOVA, J. C. O. et al. **Aplicações farmacêuticas de polímeros**. Polímeros: Ciência e Tecnologia, vol. 20, n. 1, p.51-64, 2010.

VITAL BRAZIL, O. **History of the primordia of snake-bite accident serotherapy.** Memórias do Instituto Butantan, 1987, 49(1):7-20.

### **Links na internet**

<http://www.saude.gov.br>. Acidentes com animais peçonhentos crescem 33% em seis anos no Brasil. Acesso em: 16 de Agosto de 2010.

<http://www.fmt.am.gov.br>. Acidentes peçonhentos. Acesso em: 19 de Agosto de 2010.

<http://www.portalamazonia.globo.com>. Jararaca lidera acidentes com cobras no Amazônia. Acesso em: 15 de Agosto de 2010.

<http://www.fortdodge.com.br>. Adjuvantes. Acesso em: 04 de Agosto de 2008.

<http://www.mvp-technologie.com>. Carbigen. Acesso em: 14 de Agosto de 2008.

<http://www.mvplabs.com/adjuvants.technology.htm>. Adjuvant technologies. Acesso em: 01 de Outubro de 2008.

<http://www.medicina.ufba.br/.../Roteiro20%de20%antigenos%2002-1.pdf>. Antígenos. Acesso em: 19 de Janeiro de 2010.

<http://pt.wikipedia.org/wiki/Antigeno>. Antígeno. Acesso em: 19 de Janeiro de 2010.