UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica
Área de Tecnologia de Fermentações

Veneno de *Bothrops jararaca* modificado com mPEG (monometoxi-polietileno glicol) para elaboração de um adjuvante complexado à partícula antigênica

Marco Antonio Stephano

Tese para obtenção do grau de
DOUTOR

Orientador:
Prof. Dr. José Abrahão Neto

São Paulo
2005

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica
Área de Tecnologia de Fermentações

Veneno de *Bothrops jararaca* modificado com mPEG (monometoxi-polietileno glicol) para elaboração de um adjuvante complexado à partícula antigênica

Marco Antonio Stephano

Tese para obtenção do grau de
DOUTOR

Orientador:
Prof. Dr. José Abrahão Neto

São Paulo
2005

Ficha Catalográfica
Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

S827v Stephano, Marco Antonio
Veneno de *Bothrops jararaca* modificado com mPEG
(monometoxi-polietileno glicol) para elaboração de um adjuvante
complexado à partícula antigênica / Marco Antonio
Stephano -- São Paulo, 2005.
100p.

Tese (doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas
da Universidade de São Paulo. Departamento de Tecnologia
Bioquímico-Farmacêutica.

Orientador: Abrahão Neto, José

1. Agente tóxico de origem animal : Toxicologia 2. Enzima :
Serpente : Bioquímica animal 3. Antígeno : Imunologia I. T.
II. Abrahão Neto, José, orientador.

615.94 CDD

Marco Antonio Stephano

Veneno de *Bothrops jararaca* modificado com mPEG (monometoxi-
polietileno glicol) para elaboração de um adjuvante complexado à
partícula antigênica

Comissão Julgadora
da
Tese para obtenção do grau de Doutor

Prof. Dr. José Abrahão Neto
orientador/presidente

1º. examinador

2º. examinador

3º. examinador

4º. examinador

São Paulo, _____ de _____.

Aos meus pais Maximo Lamberto
Stephano (em memória) e Daisy
Stephano pelo amor, exemplo de
vida e dignidade ao qual me
ensinaram. A vocês o meu amor
eterno.

AGRADECIMENTOS

A **DEUS** pela inspiração e amor incondicional e por quem tenho minha maior dedicação.

À **Dra. Hisako Gondo Higashi** pelo carinho, incentivo e pelas aulas de vida, estas que não se aprendem em escolas e faculdades. São experiências únicas e de eterna gratidão.

Ao **Prof. Dr. Rosalvo Guidolin** pelo carinho e afeto transmitidos, seja nas horas mais difíceis ou nos momentos de maior alegria como este.

Ao **Prof. Dr. Isaias Raw** por toda atenção e confiança desses anos de trabalho, os quais os valores de sabedoria e dedicação profissional me servem de exemplo.

Ao **Prof. Dr. José Abrahão Neto** pela amizade, confiança e cumplicidade desses anos de estudos.

Ao **Dr. Celso Pereira Caricati** pela amizade e profissionalismo compartilhado ao longo dos anos. O meu especial obrigado pela ajuda durante este período na Comissão de Biossegurança, nos trabalhos com vacinas veterinárias e adjuvantes.

Ao **Prof. Dr. Bronislaw Polakiewicz** pela amizade e confiança estabelecidas nessa jornada cultural.

À **Profa. Dra. Thereza Christina Vessoni Penna** por todas as palavras de incentivo e amizade que tem demonstrado.

Ao **Dr. José Roberto Marcelino** pela ajuda, amizade e as jornadas de trabalhos onde pudemos compartilhar nossas experiências. Obrigado pelas amostras de veneno e soro, sem os quais não teria sido possível a conclusão deste trabalho.

À **Dra. Josefina Farina Moraes** pela ajuda nos doseamentos *in vivo*, por abrir as portas do biotério de experimentos (Infectório). A você e sua equipe um agradecimento especial por todo cuidado que vocês tiveram com os animais.

À **Dra. Ivone Kazuko Yamagushi** pela amizade, atenção e compartilhamento de idéias nos últimos tempos.

À **Vivian Mie Yshikawa** pela amizade e carinho transmitidos em todos os momentos.

À **Aline Tojeira Prestia** pela amizade e afeto em todos os momentos fáceis e difíceis.

À **Danielle de Moraes Rocha** pela amizade, atenção e troca de experiência nestes três últimos anos.

À **Andréia Dias** pela amizade, mesmo que em sua forma silenciosa. O meu muito obrigado.

À **Tânia Yoshimoto** pela amizade e exemplo de dedicação aos animais.

À **Patrícia Gulgilhelme** pela amizade às vezes distante mas sempre no coração.

À **Karen Cristine Julio Oshiro** pela amizade, carinho e dedicação profissional.

Ao **Renato Itamar Cardoso Fajoni** pela amizade e espírito descontraído de ser.

À **Alessandra Cassolino**, a mais nova companheira de trabalho, o meu agradecimento pela amizade e carinho.

À **Marlene, Silvio, Mauricio, Luiz, Ademir, Marcos, Edinho, Luiza, Junia e Inete**, em fim, todo o pessoal da Seção de Processamento de Plasma Hiperimunes, o meu muito obrigado.

À **Abigail, Izilda, Maria, Julia, Wagner Maria José, Perpétua, Sidnéa** o meu sincero agradecimento por toda ajuda nestes últimos anos e principalmente pela paciência.

À **Elisa Volotão Stephano**, minha filha, os meus mais sinceros agradecimentos, e também as minhas desculpas por tanta ausência. Por você e para você é que eu nunca desisto.

À **Meire Volotão Stephano**, por todo exemplo de perseverança e luta pela vida. Agradeço por todo apoio em todos os momentos sem o qual não teria concluído este trabalho. A você toda a minha gratidão pelo apoio e por poder sempre contar contigo.

O estudo da gramática não faz poetas. O estudo da harmonia não faz compositores. O estudo da psicologia não faz pessoas equilibradas. O estudo das "ciências da educação" não faz educadores. Educadores não podem ser produzidos. Educadores nascem. O que se pode fazer é ajudá-los a nascer.

Rubem Alves

RESUMO

Enzimas, biofármacos e produtos de origem biológica de modo geral sempre foram obstáculos para o uso terapêutico. Isto em função dos riscos de reação adversa que poderiam ocasionar bem como a indução de uma resposta imunológica desejável ou não.

A utilização do monometoxipolietileno glicol (mPEG) conjugado a proteínas e enzimas trouxe novas perspectivas de utilização de substâncias naturais como substâncias farmacológicas ativas, pois o fato de estarem conjugadas a um polímero inerte atribui uma nova estrutura físico-química a essas substâncias, diminuindo consideravelmente os riscos de anafilaxia e a biodegradação por formação de complexos antígeno-anticorpo.

Os estudos das variáveis inseridas no fenômeno de formação da estrutura mPEG e proteína, como também os novos sistemas de fornecimento de fármaco-químicos, trouxeram subsídios para o desenvolvimento deste trabalho no que se refere ao fornecimento de antígeno para o sistema imunológico.

Este trabalho demonstrou que o mPEG pode ser utilizado como adjuvante e ao mesmo tempo como indutor de mecanismos de tolerância imunológica. Esta modulação ocorre em função da concentração de mPEG conjugado a molécula protéica, de modo que baixas concentrações de amins conjugadas levam a um mecanismo de adjuvanticidade com aumento da produção de IL-4 e IL-5 e conseqüentemente aumento da produção de anticorpos quando comparados ao antígeno somente. Por outro lado os mecanismos de tolerância foram demonstrados pelo aumento da produção de IL-2, INF- γ e TNF- α quando concentração de mPEG ultrapassa a de 30% das amins livres demonstrando uma ativação de células Th1.

Também ficou demonstrado que a utilização do mPEG pode ser usada para diminuir ou até mesmo eliminar a atividade tóxicas de venenos peçonhentos. Pois durante os experimentos realizados houve uma diminuição de no mínimo de 50% da toxicidade.

ABSTRACTS

Enzymes, biopharmaceutics and biological products in general way had always been obstacles for the therapeutically use. This in function of the risks of adverse reaction that could cause as well as the induction of a desirable immunological reply or not.

The use of the monomethoxypolyethylene glycol (mPEG) conjugated proteins and enzymes brought new perspectives of natural substance use as active pharmacology substances, therefore the fact to be conjugated to an inert polymer had given to a good new physical-chemistry structure of these substances, diminishing the risks of anaphylaxis and the biodegradation for of complexes antigen-antibody formation.

However the new studies of the inserted variable in the phenomenon of structure mPEG and protein formation as the system of supply of pharmacology-chemistries had also brought subsidies for the development of this work as for supply of antigen for the immune system.

This work demonstrated that the MPEG can be used as adjuvant and at the same time as inductive of mechanisms of immunological tolerance. This modulation occurs in function of the concentration of conjugated MPEG the protein molecule, in way that low conjugated concentrations of amine with consequence take to a mechanism of adjuvant effect with increase of the production of IL-4 and IL-5 and increase antibodies production when compared with the antigen only. On the other hand the tolerance mechanisms had been demonstrated by the increase of the IL-2 production, INF- γ and TNF- α when MPEG concentration exceeds 30% of the free amines demonstrating activation of Th1 cells. Also he was demonstrated that the use of the toxic MPEG can be used to diminish or even though to eliminate the activity of poisons. Therefore during the carried through experiments it had a reduction of at the least of 50% of the toxicity.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

ITEM	DESCRIÇÃO	Página
Gráfico 1	Dose citotóxica 50% dos venenos conjugados ao mPEG e não conjugados	54
Gráfico 2	Porcentagem de citotoxicidade através da determinação de LDH	56
Gráfico 3	Determinação da atividade hemolítica indireta da fosfolipase A2	59
Gráfico 4	Monitoramento do ganho de peso de camundongos imunizados com veneno não conjugado e conjugado ao mPEG 2.000 e 5.000	60
Gráfico 5	Concentração sérica de creatina quinase em camundongos imunizados com veneno conjugado ao mPEG e não conjugado	62
Gráfico 6	Determinação dos títulos para IgM da resposta primária e secundária de soro de camundongos imunizados com veneno conjugado ao mPEG e não conjugado	66
Gráfico 7	Determinação dos títulos para IgG da resposta primária e secundária de soro de camundongos imunizados com veneno conjugado ao mPEG e não conjugado	67
Gráfico 8	Concentrações de IL-4 obtidas após a imunização secundária de camundongos com venenos conjugados ao mPEG e não conjugados	72
Gráfico 9	Concentrações de IL-5 obtidas após a imunização secundária de camundongos com venenos conjugados ao mPEG e não conjugados	72
Gráfico 10	Concentrações de IL-2 obtidas após a imunização secundária de camundongos com venenos conjugados ao mPEG e não conjugados	73
Gráfico 11	Concentrações de INF- γ obtidas após a imunização secundária de camundongos com venenos conjugados ao mPEG e não conjugados	73
Gráfico 12	Concentrações de TNF- α obtidas após a imunização secundária de camundongos com venenos conjugados ao mPEG e não conjugados	74
Gráfico 13	Atividade neutralizante da hemólise indireta por fosfolipase A2, do soro de coelho imunizado com venenos conjugados ao mPEG e não conjugado	76
Gráfico 14	Atividade neutralizante da citotoxicidade do soro de coelho imunizado com venenos conjugados e não conjugados	78
Figura 1	Ativação do metoxi-polietileno glicol	23

ITEM	DESCRIÇÃO	Página
Figura 2	Complexo ativado de monometoxi-polietileno glicol	23
Figura 3	Eletroforese de veneno de <i>Bothrops jararaca</i> não conjugado ao mPEG e não tratado com 2-mercaptoetanol, reconhecido por soro de coelho imunizado com venenos conjugados ao mPEG	80
Figura 4	Eletroforese de veneno de <i>Bothrops jararaca</i> não conjugado ao mPEG e tratado com 2-mercaptoetanol, reconhecido por soro de coelho imunizado com venenos conjugados ao mPEG	81
(1)	Formula linear do polietileno glicol	22
(2)	Formula para o cálculo da porcentagem de amina livre	35
(3)	Formula para o cálculo da porcentagem de morte celular	40
(4)	Formula para o cálculo da porcentagem de citotoxicidade	40

LISTA DE QUADROS

ITEM	DESCRIÇÃO	Página
Quadro 1	Protocolo de formulação do veneno peglado	35
Quadro 2	Esquema de diluição e distribuição dos venenos peglados em placas de 96 cavidades	37
Quadro 3	Esquema de diluição e distribuição dos venenos peglados em placas de 96 cavidades	38
Quadro 4	Esquema de diluição e distribuição dos venenos peglados em placas de 96 cavidades	38
Quadro 5	Esquema de imunização dos camundongos	44
Quadro 6	Esquema de hiperimunização dos coelhos	45
Quadro 7	Grau de sítios de amina conjugados ao mPEG	52
Quadro 8	Nível de significância da citotoxicidade em relação ao veneno não conjugado por determinação da dose citotóxica 50% (DC _{tx50})	54
Quadro 9	Nível de significância da citotoxicidade em relação ao veneno não conjugado através da porcentagem de citotoxicidade	56
Quadro 10	Nível de significância entre as diversas amostras de veneno conjugado e veneno não conjugado em relação ao controle na determinação da creatina quinase	63
Quadro 11	Valores de $P < 0,05$ para nível de significância da resposta imune primária para IgM de camundongos imunizados com veneno conjugado ao mPEG ou não, comparados por teste t de Student com o controle e a resposta ao veneno não conjugado	66

ITEM	DESCRIÇÃO	Página
Quadro 12	Valores de $P < 0,05$ para nível de significância da resposta imune secundária para IgM de camundongos imunizados com veneno conjugado ao mPEG ou não, comparados pelo teste t de Student com o controle e a resposta ao veneno não conjugado	67
Quadro 13	Valores de $P < 0,05$ para nível de significância da resposta imune primária para IgG de camundongos imunizados com veneno conjugado ao mPEG ou não, comparados pelo teste t de Student com o controle e a resposta ao veneno não conjugado	68
Quadro 14	Valores de $P < 0,05$ para nível de significância da resposta imune secundária para IgG de camundongos imunizados com veneno conjugado ao mPEG ou não, comparados pelo teste t de Student com o controle e a resposta ao veneno não conjugado	68
Quadro 15	Nível de significância para concentração de citocinas comparando a produção por linfócito de animais imunizados com veneno conjugado ao mPEG e veneno não conjugado.	74
Quadro 16	Análise de significância da inibição da hemólise comparando soros antivenenos entre os venenos conjugados ao mPEG com o veneno não conjugado	77
Quadro 17	Análise de significância da inibição da hemólise comparando soros antivenenos entre os venenos conjugados ao mPEG com o veneno não conjugado	78

LISTA DE ABREVIATURA

Abreviatura	Descrição
4-CN	4-cloro-naftol
4-IBB(CD137)	Molécula co-estimuladora de células NK
ADP	Adenosina difosfato
ADS	Sistema de fornecimento de antígeno
AIDS	Síndrome da imunodeficiência adquirida
APCs	Células apresentadoras de antígeno
ATP	Adenosina trifosfato
B7.1 (CD80)	Receptor 80 das células apresentadoras de antígeno
B7.2 (CD86)	Receptor 86 das células apresentadoras de antígeno
C3b	Componente C3b do sistema complemento
CCR7+	Receptor 7 de célula T de memória
CD 28	Receptor 28 de célula T
CD11c	Marcador de célula mielóide
CD19	Receptor 19 de linfócito B
CD21	Receptor 21 de linfócito B
CD23	Receptor 23 de linfócito B
CD27	Receptor 27 de células B ativadoras de antígeno
CD3	Receptor 3 de célula T
CD37	Receptor 37 de linfócito B
CD4+	Receptor 4 de linfócitos T auxiliar
CD40	Receptor 40 das células apresentadoras de antígeno
CD40L (CD154)	Ligante do receptor 40 das células T
CD62L	Receptor 62 ligante de célula T de memória
CD8+	Receptor de linfócito T citotóxico
CHO	Célula de ovário de hamster chinês
CK	Creatina quinase
CO ₂	Dióxido de carbono
CTLA - 4	Antígeno de linfócito T citotóxico 4
CTLs	Linfócito t citotóxico
DCC	1,3-diciclo-hexilcarbodiimida
DC-SIGN	Molécula de adesão de célula endotelial
DCtx50	Dose citotóxica 50%
DE ₅₀	Dose efetiva 50%
DEC-205	Receptor endocítico de fagocitose e processamento
DEH50	Dose efetiva hemolítica 50%
DL ₅₀	Dose letal 50%
DMF	Dimetilformamida
Fcε	Receptor para fração Fc da imunoglobulina E
Fcγ	Receptor para fração Fc da imunoglobulina G
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio

Abreviatura	Descrição
HCL	Ácido clorídrico
HIV-1	Vírus da Imunodeficiência Humana 1
ICAM -2	Receptor de célula endotelial
ICAM-1	Receptor de célula endotelial
ICAM-3	Receptor de célula endotelial
IDC _{tx} 50	Inibição da dose citotóxica 50%
IgD	Imunoglobulina D
IgM	Imunoglobulina M
IL-4	Interleucina 4
IL-5	Interleucina 5
IL-6	Interleucina 6
IL-10	Interleucina 10
IL-12	Interleucina 12
IL-13	Interleucina 13
IL-18	Interleucina 18
INF- α	Interferon alfa
INF- γ	Interferon gama
INF- β	Interferon beta
LDH	Lactato Desidrogenase
MALDI-MS	Espectrometria de massa a laser
MAP	Proteinoquinase ativada por mitógenos
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade
MPEG	Monometoxi polietileno glicol
NADP	Nicotinamida adenina nucleotídeo fosfato
NF κ B	Fator nuclear κ B
NHS	Hidroxisuccinimida
NK	Células <i>natural killer</i>
OMS	Organização mundial de saúde
OX40 (CD134)	Receptor de célula NK
PAMPs	Padrões moleculares associados a patógenos
PBS	Tampão fosfato salina
PEG	Polietileno glicol
PVDF	Polivinilidileno flurido
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	Eletroforese em poliacrilamida na presença de SDS
TAP	Proteína-transporte-associado
TCR	Receptor de antígeno de célula T
Th1	Células T auxiliar 1
Th2	Células T auxiliar 2
TLRs	Receptores <i>toll-like</i>
TNBS	Ácido sulfúrico trinitrobenzeno
TNF - α	Fator de necrose de tumor alfa

SUMÁRIO

ITEM	Página
Folha de rosto.....	i
Folha de aprovação.....	ii
Dedicatória.....	iii
Agradecimentos.....	iv
Epígrafe.....	v
Resumo.....	vi
Abstracts.....	vii
Lista de ilustrações.....	viii
Lista de quadros.....	ix
Lista de abreviaturas.....	x
Sumário.....	xi
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Imunidade.....	2
1.1.1. Imunidade inata.....	3
1.1.2. Imunidade adaptativa.....	5
1.1.2.1. Apresentação de antígeno.....	6
1.1.2.2. Células T.....	8
1.1.2.3. Células B.....	10
1.1.2.4. Memória imunológica.....	12
1.2. Adjuvantes.....	14

ITEM	Página
1.2.1. Função dos adjuvantes.....	16
1.2.2. Classificação.....	17
1.2.3. Mecanismo de ação.....	18
1.3. Monometoxi-polietileno glicol (mPEG).....	19
1.3.1. Propriedades do PEG.....	21
1.3.2. Ativação do PEG para conjugar a proteína.....	22
1.3.2.1. PEG succinimidil.....	22
1.3.2.2. Outros mPEG derivados.....	23
1.3.3. Caracterização do mPEG conjugado.....	24
1.3.4. Aplicação terapêutica do mPEG.....	25
1.3.5. Imunoreatividade de proteínas pegladas.....	26
1.3.6. Perspectivas futuras dos adjuvantes.....	27
1.4. Venenos como antígeno.....	28
2. OBJETIVO.....	32
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	33
3.1. Obtenção dos derivados ativados de mPEG.....	33
3.2. Obtenção do veneno.....	34
3.3. Modificação do veneno de <i>Bothrops jararaca</i> pelo mPEG.....	34
3.4. Verificação do grau de peglação do veneno.....	35
3.5. Determinação da toxicidade do veneno conjugado.....	36
3.5.1. Determinação da citotoxicidade.....	36

ITEM	Página
3.5.1.1. Células.....	36
3.5.1.2. Teste de citotoxicidade por contagem.....	37
3.5.1.3. Citotoxicidade por determinação de LDH.....	40
3.5.2. Toxicidade do veneno por hemólise indireta da fosfolipase A2...	41
3.5.3. Verificação do ganho de peso dos animais inoculados com veneno conjugado e veneno não conjugado.....	41
3.5.4. Avaliação de creatina quinase sérica em camundongos tratados com veneno conjugado ao mPEG e veneno não conjugado.....	42
3.6. Animais utilizados.....	42
3.7. Esquema de imunização.....	44
3.7.1. Camundongos.....	44
3.7.2. Coelhos.....	45
3.8. Avaliação da resposta imune em camundongos.....	46
3.8.1. Ensaio imunoenzimático para determinação do título antiveneno.....	46
3.8.2. Determinação da concentração de IL-4, IL-5, IL-2, INF- γ e TNF- α ..	46
3.8.2.1. Obtenção e cultura dos linfócitos.....	47
3.8.2.2. Determinação da concentração de citocinas em cultura celular	48
3.9. Avaliação da resposta imune em coelhos.....	48
3.9.1. Inibição da atividade hemolítica indireta da fosfolipase A2.....	48
3.9.2. Inibição da atividade citotóxica do veneno de <i>Bothrops jararaca</i>	49
3.10. Eletroforese de proteínas em gel de poliacrilamida e “immunoblotting”....	50
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	52
4.1. Grau de peglação do veneno.....	52

ITEM	Página
4.2. Determinação da toxicidade.....	53
4.2.1 Citotoxicidade pela sobrevivência celular.....	53
4.2.2. Método de citotoxicidade por determinação de LDH celular.....	55
4.2.3. Determinação da toxicidade por atividade da fosfolipase A2.....	58
4.2.4. Curva de crescimento dos animais imunizados.....	60
4.2.5. Determinação da creatina quinase (CK) em camundongos.....	61
4.3 Análise da atividade antigênica e imunogênica.....	65
4.3.1. Ensaio imunoenzimático para titulação de anticorpos antiveneno de <i>Bothrops jararaca</i> obtidos por diferentes antígenos de veneno pegado em camundongos.....	65
4.3.2 Determinação da concentração de citocinas.....	71
4.3.3. Inibição da atividade hemolítica da fosfolipase A2 do veneno de <i>Bothrops jararaca</i> por antivenenos provenientes de animais imunizados com veneno conjugado ao mPEG e não conjugado.....	76
4.3.4. Inibição da atividade citotóxica do veneno de <i>Bothrops jararaca</i> por antivenenos provenientes de coelhos imunizados com veneno conjugado ao mPEG e não conjugado.....	77
4.3.5. <i>Immunoblotting</i>	79
5. CONCLUSÕES.....	84
6. BIBLIOGRAFIA.....	85

1. INTRODUÇÃO

Estudos com imunobiológicos são freqüentemente empregados na identificação de novos antígenos e biofármacos. A resposta a antígenos é rotineiramente melhorada pela adequação dos diferentes adjuvantes, pelo número de doses aplicadas e pelas rotas de inoculação (LOFTHOUSE, 2002). Os adjuvantes são essenciais na indução e modificação da resposta imunológica. Contudo a variedade de substâncias existentes para tal finalidade, bem como os mecanismos pelos quais interagem com o sistema imunológico, são ainda pouco conhecidos (STORNI *et al.*, 2005).

Um denominador comum para muitos adjuvantes é a natureza particulada que, associada a um efeito de depósito, é responsável pelo sucesso do sistema de indução e manutenção da resposta imunológica, podendo ser ainda melhorada com a adição de imunoestimulantes. Se este primeiro requisito satisfizer a composição química do antígeno no sentido de decidir qual o tipo de resposta imunológica irá desenvolver (como, por exemplo: quais os isotipos de imunoglobulinas serão produzidos; quais citocinas serão secretadas e quais fenômenos poderão ser controlados através da combinação do antígeno com substâncias imunomoduladoras ou co-estimuladoras) então se tem definido o ideal de adjuvanticidade. A principal meta na atividade biológica do adjuvante é procurar fatores celulares e moleculares envolvidos na indução da imunidade e como estes podem influenciar a potência de um antígeno.

A obtenção de todas estas informações colabora para o desenvolvimento de novas vacinas ou favorece as propriedades de um imunógeno já existente, de modo a enriquecer as características que são necessárias para a resposta imune.

Os recentes avanços no controle do sistema de liberação *in vivo* de biofármacos aplicados nos estudos de adjuvanticidade, tais como microesfera, lipossomos e implantes, têm

fornecido novos conhecimentos e conseqüentemente contribuído para uma discussão sobre o modo pelo qual a liberação contínua de antígeno pode afetar o resultado de uma resposta imunológica. A maioria dos estudos sistemáticos tem se concentrado na utilização da resposta imunológica sempre num modelo em que se observa o balanço entre a imunidade e a tolerância. Abordando este ponto de vista, da liberação contínua de antígeno, o objetivo seria obter a aplicabilidade de utilização de uma única dose que pudesse induzir uma imunidade relativamente duradoura. Tal vantagem traria benefícios principalmente ao setor agropecuário com melhora significativa na prática de manejo de grandes concentrações de animais (PREIS; LANGER, 1979).

A aplicação de novos adjuvantes pode assegurar que imunógenos antes impróprios para induzir uma resposta imunológica adequada e apropriada possam ser usados para produção de vacinas e soros. Como a maioria dos estudos dos adjuvantes começou em animais de laboratório, não apresentando, portanto, uma aplicação imediata, se discute freqüentemente a importância de como a resposta imunológica pode ser modificada ou manipulada, levando às aplicações práticas e efetivas (ainda que tardiamente) com o desenvolvimento de novas vacinas (BOWERSOCK; MARTIN, 1999).

1.1. Imunidade

Diariamente, o organismo dos seres vivos fica exposto a patógenos, sejam microrganismos, toxinas ou quaisquer outros elementos estranhos, como pólen, ácaros e poeira. Este fato ocasionalmente leva ao aparecimento de doenças relacionadas. Muitos patógenos são detectados e destruídos poucas horas depois da entrada no organismo, através dos mecanismos inespecíficos de defesa do hospedeiro que não requerem um longo período de indução. Este é o mecanismo da imunidade inata.

Somente quando estes agentes externos são capazes de quebrar esta primeira barreira de defesa, uma resposta imune adaptativa se desenvolve, inclusive com geração de células efetoras específicas para o patógeno, induzindo a formação de outras células que atuem diretamente sobre ele, seja por secreção de anticorpos (células B) ou atividade citotóxica (células T CD8⁺) ou secreção de mediadores e moléculas efetoras (citocinas e quimiocinas).

Estas células efetoras morrem num período entre 10 a 14 dias após sua ativação e aquelas que vierem a sobreviver a este período se diferenciarão em plasmócitos produtores de anticorpos altamente reativos e em células de memória (B e T) que serão responsáveis pela perpetuação preventiva de novas invasões do mesmo patógeno.

1.1.1. Imunidade inata

A primeira linha de defesa do organismo contra elementos não próprios caracteriza-se por febre, secreções nas mucosas, secreções de mediadores químicos e células fagocíticas que reagem contra invasores de forma inespecífica e não instrutiva. Em particular, macrófagos e células dendríticas são ativos na eliminação de elementos estranhos por fagocitose, com subsequente apresentação de antígeno e geração da imunidade adaptativa.

O organismo, ao entrar em contato com o antígeno, normalmente defende-se de três modos: 1º) as células apresentadoras de antígeno engolfam partículas ou microrganismos inespecificamente (INABA *et al.*, 1993); 2º) os fagócitos são equipados com diversos receptores de superfície celular que têm capacidade de interagir e reconhecer elementos na superfície do patógeno. Alguns destes receptores, denominados lectina ligadas a manose, iniciam a ativação de complemento e têm capacidade de se ligarem a compostos sacarídeos da superfície de bactérias, vírus, protozoários ou outras substâncias com esta característica. Os receptores Fcγ (receptor para fração Fc da imunoglobulina G) e Fcε (receptor para fração Fc

da imunoglobulina E) complementam a fagocitose secundária por opsonização, facilitada por outras substâncias, como, por exemplo, o componente C3b do sistema complemento (SALLUSTO *et al.*, 1995). Um outro receptor fagocítico denominado “*scavenger*” (que se alimenta de resto celular) tem a capacidade de reconhecer polímeros aniônicos presentes nos patógenos (ACTON *et al.*, 1993); 3º) células fagocíticas podem preencher os seus vacúolos pinocíticos com substâncias solúveis (macropinocitose) (SALLUSTO; LANZAVECCHIA, 1994). Enquanto a fagocitose é comum em macrófagos e vários monócitos (células dendríticas, células de Kupffer, células de Langerhans, micróglia e outras), a macropinocitose mostra ser uma propriedade das células dendríticas e células B entre outras (ALPUCHE-ARANDA *et al.*, 1994; GOOSNEY; KNOECHEL; FINLAY, 1999).

Diferentemente dos receptores da imunidade adaptativa, os receptores da imunidade inata não são clonalmente distribuídos, ou seja, um determinado receptor fixo estaria presente sobre todas as células do mesmo tipo.

A superfície dos microrganismos contém os denominados Padrões Moleculares Associados a Patógenos (PAMP – *Pathogens Associated Molecular Patterns*) que, quando ligados aos receptores do sistema de imunidade inata, aumentam a velocidade da resposta, levando a uma expansão clonal rápida das células da resposta imune adaptativa (JANEWAY, 1989). A sinalização via receptor para PAMP foi descoberta originalmente em *Drosophila melanogaster* (HASHIMOTO; HUDSON; ANDERSON, 1988) e atualmente é conhecida como uma função essencial de defesa em plantas, insetos e vertebrados (TAKEDA; AKIRA, 2003). Os receptores celulares que modulam esta função são os Receptores *Toll-Like* (TLR - *Toll-Like Receptors*) cuja ativação determina uma resposta ao patógeno (JANSSENS; BEYAERT, 2003).

Nos mamíferos, já foram descritos 11 TLR que estimulam a transcrição de fatores, tais como Fator Nuclear κ B (NF κ B – Nuclear Factor κ B) e Proteinoquinase Ativada por

Mitógenos (MAP kinase - *mitogen-activated protein kinase*), levando a produção de importantes mediadores da imunidade inata como, por exemplo: Interleucina – 6 (IL-6), Interleucina - 12 (IL-12), Interleucina - 18 (IL-18), Interferon alfa (INF- α) e Interferon gama (INF- γ) (AKIRA, 2003). Concomitantemente, TLR sinalizam a indução de moléculas co-estimulatórias essenciais para incitar a resposta imune adaptativa como, por exemplo, B7.1 (CD80) e B7.2 (CD86), expressos na superfície das Células Apresentadoras de Antígeno (APCs – *Antigen Presenting Cells*). Na presença destas moléculas, as APC apresentam outras moléculas antigênicas para ativação de células T CD4+, iniciando-se assim a resposta imune adaptativa. A ausência de co-estimuladores leva normalmente a tolerância (SCHWARTZ, 2003). Apesar dos mecanismos de tolerância pela ausência de receptores B7 ainda não terem sido esclarecidos, sabe-se que o bloqueio destes com antagonistas, tais como IgD e Antígeno de Linfócito T Citotóxico 4 (CTLA-4 - *Cytotoxic T Lymphocyte Antigen 4*) ou anticorpos contra CD28, leva ao mecanismo de tolerância (ITO *et al.*, 2005)).

Estudos recentes sugerem que os vários TLR induzem diferentes respostas imunológicas, implicando em diferentes mecanismos de sinalização. O papel de produção das citocinas pode variar de acordo com os TLR envolvidos, influenciando a sucessão funcional das características da resposta imune adaptativa. Deste modo, a habilidade do sistema imune congênito em discriminar diferentes tipos de patógenos é usada para garantir um tipo apropriado de resposta imune adaptativa (YAMAMOTO *et al.*, 2002).

1.1.2. Imunidade adaptativa

A imunidade adaptativa é mediada e mantida por linfócitos B e T. Os linfócitos B se desenvolvem independentemente dos antígenos, na medula óssea, cuja maturação ocorre de forma progressiva. Cada etapa de desenvolvimento leva a uma expressão de receptores de

superfície diferente. Quando os linfócitos expressam moléculas de IgM em sua superfície migram para a corrente sangüínea. Por outro lado, uma diferenciação adicional existe nas células B ainda não ativadas (*naïve B cells*) que circulam em órgãos linfóides secundários (ex: linfonodos, baço e nódulos linfáticos): e estas expressam IgD na superfície, que possibilita interagir com antígenos. Já os linfócitos T se desenvolvem na medula óssea, porém, diferentemente das células B, migram para o timo e depois de se tornarem ativas dão origem às células T CD4⁺ e CD8⁺.

1.1.2.1. Apresentação de antígeno

Células dendríticas fagocitam antígenos nos tecidos periféricos e são ativadas ao migrarem para um órgão linfóide próximo. Conseqüentemente, estas células expressam altos níveis de moléculas co-estimulatórias e moléculas de adesão mediadoras das interações com células T inativas que estão continuamente re-circulando através destes tecidos (INGULLI *et al.*, 1997).

Observações recentes apontam para o fato de que ao chegar aos linfonodos as células dendríticas perdem sua habilidade de capturar novos antígenos. Por outro lado, estão capacitadas a apresentar anteriormente o antígeno fagocitado às células T. Macrófagos e células B que também possuem a capacidade de se ligarem a componentes antigênicos podem estimular a expressão de moléculas co-estimulatórias e atuar como APC (RUEDL; KOEBEL; KARJALAINEN, 2001).

Macrófagos são encontrados em muitas áreas dos linfonodos onde podem fagocitar ativamente partículas, prevenindo que estas alcancem a circulação sangüínea. As células B, por sua vez, se concentram nos folículos linfóides e são particularmente eficientes em absorver antígenos solúveis, tais como toxinas bacterianas, por ligação específica do antígeno

com as imunoglobulinas de superfície, porém são ineficientes para iniciar uma resposta imune adaptativa (MALOY *et al.*, 2001).

Dentro das células apresentadoras de antígenos, partículas proteicas fagocitadas são fragmentadas por proteases no interior dos endossomas, que contêm altas concentrações de moléculas do Complexo de Histocompatibilidade Principal (MHC – *Major Histocompatibility Complex*). Peptídeos antigênicos, quando expressos na superfície celular, se ligam com moléculas MHC classe-II antes de serem expostos na membrana celular e interagirem com receptores específicos das células T CD4⁺ (PIERRE *et al.*, 1997). Em contraste, a ativação de células T CD8⁺ é direcionada para reconhecer peptídeos junto a moléculas de MHC classe – I. Neste caso, uma parte estável da proteína a ser apresentada é sintetizada intracelularmente e degradada pelo proteossoma citolítico (SCHUBERT *et al.*, 2.000). Os fragmentos protéicos são depois interiorizados no retículo endoplasmático pelo complexo Proteína-Transporte-Associado (TAP – *Transport-Associated Protein*) para subsequentemente interagirem com as moléculas de MHC classe – I nos mecanismos TAP-dependente ou TAP-independente.

No mecanismo dependente, o transporte e o processamento endossômico-citosol do antígeno são realizados pela sua degradação no fagossoma e sua retranslocação para o citosol mediante algumas proteínas do proteossoma. No modo TAP-independente, o mecanismo endossômico interage diretamente e o antígeno é degradado por proteases endossômicas, trocando de lugar com peptídeos ligados ao MHC classe-I, sendo este processo favorecido pelo baixo valor de pH nas vesículas endossômicas (CHEFALO; HARDING, 2001). Enquanto as células dendríticas podem operar por ambos os mecanismos, os macrófagos se mostram restritos ao modo TAP-independente (RUEDL *et al.*, 2002).

1.1.2.2. Células T

As células T não ativadas (*naïve T cells*) para serem estimuladas devem receber dois sinais das APC. O sinal I ocorre através da ligação do co-receptor CD3/TCR (receptor de célula T – *T cell receptor*) das células T com o peptídeo ligado ao próprio MHC. A expansão clonal ocorre através de um segundo co-estímulo (sinal II) o qual deve ser fornecido pela mesma APC sobre a qual as células T reconheceram o antígeno. As células apresentadoras de antígeno são as mais potentes ativadoras das células T imaturas, de modo que uma única célula é capaz de ativar ao redor de 100 a 1.000 células T (TIMARES; TAKASHIMA; JOHNSTON, 1998).

O sinal II é caracterizado pela presença da molécula da família B7, que é melhor representada pelas glicoproteínas CD80 e CD86. As ligações do CD28 com as células T através das moléculas B7 aumentam a produção de interleucina -2 (IL-2), que é o principal fator de crescimento para as células T. Em contraste, a inibição da ligação entre as moléculas B7 e CD28 reduz a resposta por células T (PEREZ *et al.*, 1997).

Várias outras moléculas co-estimulatórias, tais como CD137 (ou 4-1BB), CD134 (ou OX40) e CD27 e as citocinas IL-12, a interleucina – 1 beta (IL-1 β), INF $\alpha/\beta/\gamma$, bem como a densidade de moléculas de MHC expressas na superfície das APC, influenciam na amplitude da transdução do sinal (KOPF *et al.*, 1999; LANGENKAMP *et al.*, 2.000).

A célula T imatura ativada expressa uma grande quantidade de proteínas que contribuem para a sustentação ou modificação do sinal co-estimulatório que direciona a expansão e a diferenciação celular. Uma destas proteínas é o Ligante – CD40 (CD40L ou CD154), o qual tem como função transmitir sinais de ativação para células T e B pela ligação com o CD40 sobre a APC, que também acaba expressando moléculas da família B7, tornando-se um estímulo adicional para ativação de células T.

Células T CD4 imaturas podem se diferenciar, após a ativação, em células Th1 (*T helper 1 cell*) e Th2 (*T helper 2 cell*). A função efetora das células Th, considerada num âmbito geral, é controlar a resposta imune através da secreção e também através da expressão de moléculas de superfície, tal como CD40L para ativação de células B, APC, linfócitos T citotóxicos - CTL (CTL – *Citotoxic T Lymphocytes*) e outras células do sistema imunológico. As células Th1 estão associadas com a secreção de INF- γ , IL-12 e o Fator de Necrose Tumoral – alfa (TNF- α). As células Th2 produzem tipicamente Interleucina - 4 (IL-4), Interleucina - 5 (IL-5), Interleucina - 10 (IL-10) e Interleucina - 13 (IL-13).

A polarização da célula T CD4 depende da duração do estímulo antigênico e da concentração de citocinas no ambiente em que as células estão expostas (BIRD *et al.*, 1998). Sendo assim, os dois subtipos de células T CD4 podem sofrer uma inter-regulação. Uma vez estabelecido o predomínio de um dos subtipos é muito difícil trocar a resposta para outro subtipo.

Células T CD8 imaturas estão predestinadas a se tornarem efetoras para citotoxicidade. Quando estas proliferam passam a ter a capacidade de migrarem para o sítio de tecido inflamado, eliminando células infectadas por vírus e produzindo citocinas capazes de diminuir a replicação viral.

Certas observações têm demonstrado que células T CD8 necessitam passar por uma fase de diferenciação, tornando-se precursores dos CTL, ou seja, células T duplo positivo, que apresentam tanto moléculas CD4⁺ como CD8⁺ e que no timo passariam por uma seleção positiva ou negativa com recombinações dos genes das cadeias α e β do TCR (*T Cell Receptor* – Receptor de Células T) (ABBAS; LICHTMAN, 2003). Este modelo implica aceitar que somente as células T imaturas necessitam receber estímulo de ativação correto, pois células T filhas são capazes de se dividirem se diferenciando em CTL sem estímulo adicional, mantendo a sua função pré-programada, ou seja, após a ativação e multiplicação, as

células T CD8 passam a exercer sua função sem necessidade de estímulo adicional. Por outro lado, a proliferação pode, algumas vezes, ser separada da função efetora (STORNI *et al.*, 2003). Isto indica que a ativação de células T CD8, e em particular a sua diferenciação, pode depender também de fatores extrínsecos à célula. A resposta por CTL contra certos vírus, bem como para rejeição de tecido, demonstra requerer a presença de células T CD4 durante o início da ativação de células T CD8 imaturas. Nesta resposta, ambas as células T CD4 e CD8 imaturas devem reconhecer o antígeno relacionado sobre a superfície da mesma APC (RIDGE, DI ROSA & MATZINGER, 1998; SHEDLOCK; SHEN, 2003). Assim, uma resposta potente por CTL deve conter tanto epítomos para CD4 como para CD8 (JOHANSEN *et al.*, 2004).

1.1.2.3. Células B

Células B são responsáveis pelo reconhecimento de proteínas, na sua forma nativa, derivadas de patógenos. Elas podem interagir diretamente com vírus, bactérias e toxinas através de receptores de imunoglobulina, com um número infinito de sítios porém com uma única especificidade. Células B maduras expressam IgM e IgD, bem como várias outras moléculas acessórias (ex: CD19, CD21, CD23 e CD37). As imunoglobulinas de superfície, que servem como receptores de antígeno, atuam de dois modos distintos de ativação. No primeiro, as imunoglobulinas, uma vez ligadas ao antígeno, transmitem sinais diretamente para o interior da célula (Sinal 1). No segundo, as células fornecem os antígenos para sítios intracelulares, onde são digeridos e apresentados na superfície das células B como peptídeos associados às moléculas de MHC classe II. Este complexo pode ser reconhecido por células Th CD4 antígeno específico, estimulando a expressão de proteínas como CD40L (Sinal 2), levando as células B à proliferação e diferenciação em células secretoras de anticorpos: os

plasmócitos (BACHMANN *et al.*, 1993).

A formação de grupos de receptores de imunoglobulina com habilidade de reagir cruzadamente gera um fornecimento de forte sinal do tipo 1, que é um potente indutor de produção de IgM de célula B ativada. Um fornecimento menor e repetitivo de antígeno requer estímulos adicionais, como a presença de lipopolissacarídeos ou de TLR, e auxílio de células T CD4. As células Th são também cruciais para a hipermutação somática e a mudança do isotipo de imunoglobulina (MACLENNAN, 1994).

As ligações de reconhecimento antigênico por células B e células Th CD4 são predominantemente mediadas por células dendríticas apresentadoras de antígeno que levam a uma série de ativações, determinando hipermutação somática e produção específica de anticorpos (LIU *et al.*, 1989). Para antígenos complexos ou patógenos, as duas células nem sempre reconhecem a mesma proteína. Todavia, é necessário que o peptídeo reconhecido pela célula T seja fisicamente parte do antígeno reconhecido pela célula B, o qual pode conseqüentemente produzir peptídeo apropriado após a internalização do antígeno ligado ao receptor da célula B. Além de ser importante na regulação da resposta imune humoral (ex: manter a tolerância ao que é próprio), esse processo pode também reconhecer a fração que se liga aos receptores das células B no desenvolvimento da imunidade. O reconhecimento do complexo peptídeo-molécula de MHC classe II desencadeia a síntese de moléculas de ativação das células B pelas células Th2. Uma molécula importante e efetiva, envolvida em todas as fases da resposta por célula B, é o complexo CD40L e CD40 na superfície das células B (LEE *et al.*, 2003). CD40 e IL-4 são, de qualquer forma, sinérgicos na direção da expansão clonal que precede à produção de anticorpos (BANCHEREAU *et al.*, 1991). A IL-4 é secretada pelo Th2 e atua seletivamente sobre células B antígeno-específico.

As células B, após vários ciclos de proliferação, auxiliadas por mais citocinas derivadas de células Th2, IL-4, IL-5 e IL-6, diferenciam-se em plasmócitos secretores de

anticorpos. Outras células B podem se diferenciar em células B de memória. Porém uma grande discussão existe sobre a necessidade de antígeno para a sobrevivência, proliferação e desenvolvimento até plasmócito ou não das células B de memória (NARUYAMA; LAM; RAJEWSKY, 2.000).

Camundongos privados de células dendríticas foliculares maduras e de células B foliculares, quando adaptativamente transferidos com células B de memória, não puderam manter títulos elevados de anticorpos específicos. Este fato indicou a função das células dendríticas foliculares na apresentação do complexo antígeno-anticorpo no desenvolvimento do plasmócito a partir de células B de memória na proteção a patógeno mediada por anticorpos (KARRER *et al.*, 2.000). Mais recentemente, células B de memória mostram sobreviver a um longo período sem a presença de antígeno (NARUYAMA; LAM; RAJEWSKY, 2.000).

1.1.2.4. Memória imunológica

Memória imunológica, talvez seja a mais importante consequência da imunidade adaptativa. É a capacidade que tem o sistema imunológico de responder com maior brevidade e eficácia possíveis a um patógeno que já tenha sido apresentado previamente e se reflete na expansão clonal de uma população de linfócitos antígeno-específico.

A resposta por memória também difere qualitativamente da resposta primária. As características da produção de anticorpos na resposta secundária e subsequente diferem daquelas produzidas na resposta primária pelo mesmo antígeno, principalmente pelo *switch* das classes de anticorpos. Contudo, a principal diferença está na sua atividade responsiva por contato secundário com patógenos, caracterizada por secreção do perfil de citocinas, e expressão de outras proteínas efetoras, como, por exemplo, grangina B, perforina e ligante do

Fas (CD95L), na proporção de proliferação e na distribuição das células no organismo.

A memória específica é mantida por populações distintas de células de memória de longa vida. Têm surgido muitas discussões a respeito da sobrevivência e da duração das células de memória, principalmente em relação à sua dependência quanto à presença de antígenos residuais ou não (AHMED; GRAY, 1996).

As células B de memória passam pelo menos por um processo de hipermutação somática e mudança de isotipo de imunoglobulina (GRAY; SIEPMANN; WOHLLEBEN, 1994). Esta diferenciação no processo inicia-se tardiamente na resposta imune primária e ocorre nos centros germinativos. Células T CD4 induzem à diferenciação de células B imaturas em células de memória através do CD40L. O processo de diferenciação induzido por este sinal é irreversível, porém necessário e suficiente para induzir a formação de células B de memória (GRAY; DULLFORCE; JAINANDUNSING, 1994).

A geração de células B de memória é progressiva, iniciando-se tardiamente na fase de expansão da resposta imune primária, ou seja, bem depois do antígeno ter sido eliminado, em contraste com as células T, as quais são consideradas efetoras até todo antígeno ser consumido. No momento em que o antígeno é processado e eliminado, é que se define a existência das células B de memória. Estas, por sua vez, se multiplicam lentamente se não houver secreção de anticorpos. Porém, se as mesmas se encontrarem novamente com o patógeno, começam a se dividir em proporções crescentes e diferenciam-se em plasmócitos.

A ativação e divisão de células T podem promover diferentes tipos de estímulos e conduzir a diversos resultados funcionais. Células T de memória são freqüentemente encontradas em altas concentrações e reivindicam ativação distinta bem como possuem proteínas de superfície celular diferentes das células T efetoras.

Após imunização, o número de células T reativas aumenta significativamente multiplicando-se de 100 a 1.000 vezes em relação à freqüência inicial, aumentando

conseqüentemente os marcadores de superfície celular, os quais caracterizam as células T efetoras ou T imaturas.

Dois subtipos de células T de memória podem ser distinguidos, um denomina-se de célula T central de memória e outro célula T efetora de memória (SALLUSTO *et al.*, 1999). As células T centrais de memória mostram um fenótipo do tipo residente em linfonodo (*lymphnod-homing*), expressando em sua superfície moléculas CD62L e CCR7+. Estas sobrevivem longamente na ausência de antígeno e são capazes de reconhecer infecções sistêmicas do patógeno programado. Em contraste, células T efetoras de memória podem ser dependentes da presença de antígeno e tecido periférico de órgãos linfóides secundários. Produzem INF- γ e perforina protetoras de infecções periféricas e têm uma vida relativamente curta. Células T efetoras de memória provavelmente se originaram de células T efetoras (OPFEMAN; OBER; ASHTON-RICKARDT, 1999).

Na resposta imune individual, secundária e subsequente, todas as respostas imunes são mediadas unicamente por linfócitos de memória e não por linfócitos imaturos (STEVENSON *et al.*, 1999). Assim, seria importante conhecer a capacidade de indução das vacinas a uma resposta por memória e analisar a frequência e o fenótipo dos linfócitos centrais e efetores de memória gerados.

1.2. Adjuvantes

Os adjuvantes são essenciais na indução e modificação da resposta imune e por isto uma variedade de substâncias está disponível para esta finalidade. Contudo, os mecanismos pelos quais se podem explicar os fenômenos imunológicos dos adjuvantes são ainda pouco conhecidos (STORNI *et al.*, 2005).

O desenvolvimento de uma vacina ou antígeno requer primariamente a identificação

de frações imunológicas responsáveis pela proteção, isto é, o mecanismo imunológico efetivo responsável pela proteção contra doenças e subsequente a seleção de um antígeno capaz de obter a resposta adaptativa desejada. Uma vez que um apropriado antígeno foi identificado é essencial fornecê-lo eficientemente ao sistema imunológico do hospedeiro (DEGEN; JANSEN; SCHIJNS, 2003; SCHIJNS, 2003).

Tradicionalmente as vacinas são classificadas de várias formas, contudo uma classificação usual é a capacidade dos componentes vacinais se replicarem no hospedeiro ou não, ou seja, vacinas vivas atenuadas ou patógenos inativados, respectivamente. Na segunda categoria estão incluídas as vacinas derivadas de subunidades. Estas, por sua vez, são bem mais seguras do que os outros tipos de vacinas, porém, devido a sua fraca imunogenicidade, requisitam com frequência a utilização de adjuvantes de modo a obter uma resposta imune desejada. Na ausência de um adjuvante, uma carência da resposta imunológica pode ser grave, levando as células T imaturas antígeno-específico a reconhecer o antígeno não eficientemente, podendo levar a uma tolerância (MITCHISON, 1964).

Adjuvantes são definidos como um grupo de substâncias estruturalmente heterogêneas usadas para induzir ou aumentar a resposta imunológica a um antígeno (GUPTA *et al.*, 1993). Classicamente, exemplos conhecidos são sais de alumínio ou cálcio, emulsões, saponinas, blocos de polímeros não iônicos, derivados de lipopolissacarídeos, micobactérias e muitos outros, capazes de favorecer ou amplificar uma etapa particular dos eventos imunológicos e finalmente iniciar uma resposta mais eficiente. Os mecanismos moleculares e celulares *in vivo*, necessários para a geração da resposta imune efetora, que dependem também da cooperação de um adjuvante, ainda são pouco compreendidos principalmente no requerimento estrutural do que seria um adjuvante (MARCIANI, 2003; VILLINGER, 2003).

1.2.1. Função dos adjuvantes

Os adjuvantes podem ser utilizados para as seguintes finalidades: a) aumentar a imunogenicidade de um antígeno recombinante ou altamente purificado; b) reduzir a quantidade de antígenos ou o número de imunizações necessárias para uma imunidade protetora; c) aumentar a eficácia de uma vacina em recém-nascidos, idosos ou pessoas imunologicamente comprometidas; d) atuar como sistema de fornecimento de antígeno para estes serem absorvidos por mucosas (PETROVSKY; AGUILAR, 2004).

Muitos fatores estão envolvidos na resposta imune para que um adjuvante seja caracterizado. Entre estes fatores estão o antígeno, a espécie a ser vacinada, a via de administração e, provavelmente, o efeito adverso que pode causar. O adjuvante ideal é aquele que possui estabilidade, biodegradabilidade, baixo custo de produção que não tem como principal efeito adverso a indução de doenças auto-imunes e que produz uma apropriada resposta imune celular ou humoral.

O maior problema que pode ocorrer pela adição de um adjuvante numa formulação de vacina está na possibilidade de induzir reações adversas, que podem ser locais ou sistêmicas. As reações locais geralmente se caracterizam por dor, inflamação local, edema, necrose, linfadenopatia, granuloma, úlcera e a geração de abscessos estéreis. As reações sistêmicas incluem náuseas, febre, artrite, uveíte, eosinofilia, alergia, anafilaxia, toxicidade em órgãos específicos (fígado e pulmão) e imunotoxicidade (ex: liberação de citocinas imunossupressoras ou doenças auto-imunes) (ALLISON; BYARS, 1991; WATERS; TERRELL; JONES, 1986).

1.2.2. Classificação

Os adjuvantes podem ser classificados pela sua natureza química, origem ou propriedades físico-químicas (COX; COULTER, 1997). Porém, a classificação mais aceita baseia-se no seu modo de ação, que pode ser imunoestimulante ou baseado em um sistema de fornecimento antigênico (ADS - *antigen delivery system*) (MARCIANI, 2003).

Os imunoestimulantes referem-se à propriedade que este tipo de adjuvante possui em modificar a rede de citocinas (COX; COULTER, 1997), podendo resultar em um aumento da regulação de todo sistema imunológico, porém com mais frequência há predominância de alguma citocina em detrimento de outras.

Existem dois subtipos de células T $CD4^+$: Th1 e Th2. O subtipo Th1 responde tipicamente induzindo a ativação de células T $CD8^+$ e secretando principalmente $INF-\gamma$, IL-2 e IL-12, levando à uma resposta imune celular, ao passo que a ação do Th2 resulta na secreção de IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10, levando à resposta imune humoral (ROMAGNANI, 1991).

A seleção de um adjuvante imunomodulador apropriado não só conduz a um aumento da resposta imunológica como também pode determinar o isotipo de IgG. A resposta imune oscila totalmente em uma direção ou em outra. As oscilações mais notáveis são produzidas por sais de alumínio, onde há a predominância de células Th2 (> 90%) em relação a Th1 (MANCINO; OVARY, 1980) e endotoxina bacteriana e seus derivados (lipídio A e monofosforil lipídio A) que induzem uma resposta predominantemente por Th1 (JOHNSON; TOMAI, 1990).

Os adjuvantes que atuam como sistema de fornecimento (ADS) têm basicamente um denominador comum: são de natureza particulada. Em contraste com muitos antígenos solúveis, que são muitas vezes ignorados pelo sistema imune, as partículas são reconhecidas

como estranhas e também nocivas. Portanto, o ponto inicial quando se estipula um novo sistema de fornecimento de antígeno vacinal deve basear-se na estrutura da partícula que será requerida. Este tipo de adjuvante é freqüentemente obtido por agregação e formação de ligações entre proteínas antigênicas ou, convencionalmente, por adsorção ou precipitação do antígeno com sais de alumínio. Alternativamente o imunógeno pode ser quimicamente complexado à uma partícula carreadora (JEGERLEHNER *et al.*, 2002; WATANABE *et al.*, 2000), ou, ainda, sobre partículas parcialmente organizadas (KERSTEN; CROMMELIN, 2003; ZURBRIGGEN, 2003;). Qualquer tipo de partícula facilita o reconhecimento do antígeno por uma APC profissional de forma a aumentar totalmente ou parcialmente a concentração intracelular do antígeno.

1.2.3. Mecanismo de ação

Os adjuvantes podem atuar sob cinco formas diferentes: imunomodulação, apresentação, indução de CTL, direcionamento e geração de depósito. Contudo, estas cinco formas de ação estão hoje resumidas em dois modos: sistema de fornecimento e imunomodulação.

O conceito de localização em função da reatividade imunogênica está na razão de poucas células que capturam e transportam os antígenos para os linfonodos. As células dendríticas que estão residentes em todos os tecidos são as mais potentes ativadoras de células T. Elas migram para os tecidos linfóides secundários e apresentam antígenos que foram ingeridos originalmente nos sítios periféricos de infecção ou inoculação. Portanto, um adjuvante ideal para início da resposta deve preferencialmente direcionar o antígeno para as células dendríticas (ZINKERNAGEL *et al.*, 1997).

O direcionamento do antígeno para as células dendríticas pode ser feito por inoculação

do antígeno em regiões onde há maior concentração dessas células, como, por exemplo, na epiderme, onde existem células de Langerhans; ou direcionando o antígeno usando moléculas alvo, tais como marcador mielóide CD11c, molécula de adesão DC-SIGN, receptor endocítico de fagocitose e processamento de antígeno DEC-205; ou moléculas ICAM-1, ICAM-2 e ICAM-3, que são receptores de célula endotelial, complementar à célula T (ENGERING *et al.*, 2002; MAHNKE *et al.*, 2000). Com o mesmo propósito foi demonstrado também que CLT podem ser ativadas após uma única inoculação de antígeno, sem a necessidade de adjuvante específico, pois as células T CD4 quando ativadas ajudam a sinalizar através da molécula CD40.

Outro mecanismo de ação importante está na ligação de PAMP por TLR sobre as APC, levando a uma série de eventos e iniciando uma resposta adaptativa com amadurecimento destas, com aumento conseqüente da regulação de moléculas co-estimuladoras (ex: família B7) e migração para a drenagem linfática.

A ligação de TLR através de PAMP ou seus similares imunoestimulantes induz a produção de uma série de mediadores importantes para a resposta imune inata, cujas citocinas e quimiocinas produzem moléculas co-estimulatórias essenciais para indução da resposta imune adaptativa (STORNI *et al.*, 2003).

1.3. Monometoxi-polietileno glicol (mPEG)

O polietilenoglicol (PEG) é um polímero sintético biocompatível podendo ser utilizado como aditivo de medicamentos em xaropes, cremes, pomadas, comprimidos e como veículo de produtos injetáveis tanto de aplicação intramuscular quanto endovenosa. Soma-se a isto a possibilidade de obter este polímero com vários graus de polimerização, como, por exemplo, o PEG 80, que é líquido, ou o PEG 5.000, que é sólido na temperatura entre 20°C a 25°C

(DUCAN; SPREAFICO, 1994).

A inserção de grupamentos de polietilenoglicóis vem sendo amplamente utilizada para modificação química de cadeias de proteínas ou enzimas, alterando um pouco a sua atividade biológica. Este procedimento, ao mesmo tempo em que traz o benefício de manter parcialmente a atividade biológica da proteína ou enzima conjugada, diminui ou mesmo suprime as manifestações adversas, tais como hipersensibilidade, reações alérgicas moderadas e anafilaxias fatais, que ocorrem devido à sensibilização do organismo pela segunda inoculação de proteínas, inviabilizando os esquemas de tratamento (ABUCHOWSKI *et al.*, 1977). A inserção de grupamentos de polietilenoglicóis em cadeias de proteína é feita através de reações químicas empregando-se, para isto, derivados de polietilenoglicóis que reajam com proteínas em condições brandas de temperatura e pH (CALICETI; VERONESE; JONAK, 1999).

Os polietilenoglicóis utilizados, independentemente da massa molecular, são todos metoxilados em uma das extremidades, originando a sigla empregada MPEG-R, onde R pode representar uma OH ou COOH, conforme o caso (INADA *et al.*, 1994).

Outros polímeros já foram utilizados como adjuvante, tal como os copolímeros de acetato de etilenovinil, porém não foi levada em conta a adesão do polímero à proteína, ou, se isto aconteceu, poucos estudos de microestrutura demonstraram a sua incorporação nas proteínas (NIEMI *et al.*, 1985). Contudo, o tratamento de insulina e hormônios de crescimento pelo acetato de etilenovinil demonstrou que ambos os hormônios se tornaram resistentes à ação degradante no trato gástrico bem como aumentaram sua vida média de persistência nos organismos. A utilização de polímeros de acetato de etilenovinil aumentou substancialmente a resposta imune à ovoalbumina em camundongos isogênicos, porém esta resposta foi dependente da concentração do polímero e do seu tamanho (BROWN *et al.*, 1988).

O mPEG, até o presente momento, foi apenas utilizado como um bloqueador de sítios

antigênicos, impedindo o reconhecimento pelos anticorpos e também à degradação metabólica, aumentando assim a meia-vida de compostos protéicos através da resistência ao pH, à temperatura, e a ação de outras enzimas e diminuindo a secreção renal (JANECEK, 1993). Porém, o início do reconhecimento imunogênico de uma proteína se faz através do seu processamento em APC e da expressão dos sítios antigênicos junto às proteínas codificadas pelos genes do MHC tipo II. Deste modo, ocorre a ativação de linfócitos T, o que, por sua vez, ativa linfócitos B, fazendo que estes se diferenciem em plasmócitos e produzam anticorpos. Logo, apesar das proteínas tratadas com mPEG não serem reconhecidas pelos anticorpos alostericamente (ou seja, por impedimento de acesso ao seu sítio antigênico), este tem a capacidade de induzir uma resposta imunológica celular e humoral à proteína nativa quando comparada com a proteína sem tratamento (BROWN *et al.*, 1988).

1.3.1. Propriedades do PEG

São chamados de polietileno glicol os polímeros com mais de três etilenos. Eles possuem uma apresentação que vai desde um líquido translúcido até flocos hidrossolúveis, não volatilizam e são escorregadios. São utilizados como lubrificantes, veículos de medicamentos, solventes, adesivos e insumo nas indústrias de borracha, alimento, farmacêutica, cosmética, agricultura, têxtil, papel, petróleo, entre outras.

O peso molecular geralmente utilizado dos polietilenos glicóis para aplicação biomédica ou biotecnológica oscila entre 100 e 20.000 Da, com as seguintes aplicações: a) comportamento anfipático – solúvel em água, tolueno, 1,1,1-tricloroetano e benzeno e insolúvel em éter etílico e hidrocarbonetos alifáticos; b) não tóxicos com peso molecular acima de 1 kDa e polímeros de 4 kDa. Seguros quando administrado por via endovenosa em solução de 10% para ratos, cobaias, coelhos e macacos até a dose de 16g/Kg de peso vivo; c)

baixa imunogenicidade; d) fusão celular quando em altas concentrações; e) formação de dois sistemas de fase com solução aquosa e outra macromolécula, tal como dextran ou solução de sal concentrada; f) uso para precipitação de proteínas e ácidos nucleicos (KODERA *et al.*, 1998). A fórmula linear do Polietilenoglicol é:

1.3.2. Ativação do PEG para conjugar a proteína

As proteínas podem ser modificadas por uma série de derivados de PEG. Estas modificações são freqüentemente realizadas a partir do monometoxi-polietileno glicol (mPEG), o qual possui dois grupo hidroxila na molécula, responsável pela manipulação. As ligações covalentes de derivados de PEG ocorrem quando se ligam aos grupamentos amina na maioria das interações com proteínas, gerando os compostos anidra.

1.3.2.1. PEG succinimidil

Usando-se o método de Abuchowski e colaboradores (1984) e Harris (1985) o mPEG pode ser obtido a partir de uma reação com anidrido succínico. O produto resultante é colocado para reagir com NHS (éster N-hidroxisuccinimidil) na presença de DCC (diciclohexilcarbodiimida).

O produto obtido, isolado designado por SSPeg (succinimidril succinato), é preparado a partir de mPEG de diversos tamanhos de acordo com o interesse em aumentar o peso molecular das proteínas modificadas bem como manter a atividade biológica.

Estes componentes têm a propriedade de reagir com aminas de proteínas (venenos,

toxinas e enzimas) formando anidros de ligação covalente em tampões de pH entre 7,0 e 9,0 à temperatura ambiente, e desta maneira consegue-se manter a maior parte das funções das proteínas de interesse.

Figura 1 - Metoxi-PEG 5.000Succínico anidrido derivado succínico carboxil

Figura 2 - Complexo ativado (Mr = 5.000)

1.3.2.2. Outros mPEG derivados

Outros mPEG podem ser usados para complexação com proteínas: a) PEG-amino ácidos foram preparados com a introdução de uma norleucina ou grupos α e ϵ -amino de lisina e, por hidrólise ácida foi, introduzido um grupamento carboxil através da ativação do

NHS (YAMASAKI *et al.*, 1998); b) PEG-succinimidil carbonato, cujo grupamento hidroxil reage com um fosgene seguido por ativação com NHS, interage com proteínas em pH entre 7,0 e 10,0 (ZALIPSKY *et al.*, 1992); c) PEG-Triazina: o cloreto de cianúrico reage com o álcool primário do PEG tornando-o ativado e um dos cloros do anel de triazina promove a interação com a proteína (ONO *et al.*, 1991); d) PEG multivalente em forma de pente achatado tem aros de polímeros de PEG e anidrido maléico, o peso molecular pode chegar até 100.000 Da (KODERA *et al.*, 1992); e) derivados heterofuncionais de PEG que apresentam um terminal hidroxil para cada grupo específico, podendo reagir com a amina terminal e outro grupo com a carboxila terminal da proteína (NAGASAKI *et al.*, 1995).

1.3.3. Caracterização do mPEG conjugado

A observação do grau de modificação obtido por titulação colorimétrica de grupos amina não conjugados é uma das técnicas mais utilizadas devido a sua facilidade de operação (BALLICO; DRIOLI; BONORA, 2005). Esta técnica, todavia, não permite o conhecimento do número de cadeias poliméricas ligadas ao peptídeo ou à proteína. O PEG solubilizado é transparente, sem características de fluorescência e não detectável. Em função disto, muitos métodos têm sido empregados para a caracterização do grau de peglação de proteínas, entre os quais estão a iodinação do PEG, que é, porém, pouco sensível; cromatografia de gel permeação, que traz o problema da diferença hidrodinâmica entre o PEG e a proteína tornando-se difícil a caracterização através do tempo de retenção no processo cromatográfico; método colorimétrico pelo TNBS (COOK *et al.*, 1997) para determinar a concentração de grupamentos aminas livres na proteína, devendo ser ajustado à concentração inicial de proteína. Um método alternativo que tem sido empregado é a espectrometria de massa, porém é um teste qualitativo e não indica o grau de peglação. Outros testes utilizados,

Nota: Os termos peglado ou peglada e também peglação e seus plurais são as formas em português das palavras *peglated* e *peglation*.

mas sem sucesso, são: a eletroforese capilar, cromatografia de alta *performance* (HPLC) e a eletroforese em gel de poliacrilamida, todos com limitações em relação à carga, ao peso molecular e à hidrodinâmica da proteína peglada (VERONESI, 2001).

1.3.4. Aplicação terapêutica do mPEG

Proteínas pegladas têm sido extensivamente estudadas em relação à terapia de várias doenças como: câncer, inflamação, auto-imunidade, alergia e outras.

Quando enzimas são administradas diretamente em seres humanos com intuito medicamentoso, existe a possibilidade de que a enzima seja reconhecida com uma substância estranha desencadeando uma reação imunológica no paciente culminando com a produção de anticorpos específicos. A continuidade dessa aplicação pode causar uma resposta indesejada do sistema imunológico, do tipo anafilático, que pode ser fatal. Além disto, o sistema imunológico pode reduzir o tempo de eliminação da droga, fazendo que esta perca a sua função e a ação terapêutica. Estes problemas no uso de enzimas como fármacos podem ser reduzidos com a associação de mPEG às proteínas levando a uma série de benefícios, tais como: 1) manter a atividade enzimática; 2) reduzir a imuno-reatividade; 3) reduzir a imunogenicidade; 4) prolongar o tempo de eliminação e 5) induzir uma tolerância imunológica.

Atualmente, várias substâncias de natureza protéica pegladas são usadas em diversas terapias: asparaginase – utilizada no tratamento da leucemia; interleucina 2 - utilizada no tratamento de câncer e doenças infecto-contagiosas como hepatites e AIDS; antibióticos – utilizados como anticancerígenos, porém que possuem alta reação adversa ou baixa solubilidade, tal como a doxorubicina; outras enzimas, tais como para o tratamento congênito de deficiência enzimática a superóxido dismutase; a catalase como antiinflamatório; a

estreptoquinase, hirudinase e uroquinase utilizadas como antitrombótico e muitas outras aplicações biotecnológicas (CALICETI; VERONESE, 2003; HARRIS & CHESS, 2003; KODERA *et al.*, 1998).

1.3.5. Imunoreatividade de proteínas pegladas

Um dos primeiros trabalhos descritos, relativos à ação do mPEG na diminuição da antigenicidade e conseqüentemente da imunogenicidade, demonstrou que a estreptoquinase associada ao mPEG em pelo menos 8 grupamentos aminas levava a perda do reconhecimento por anticorpos anti-estreptoquinase. Porém a enzima manteve 33% da sua atividade biológica quando comparada com a mesma concentração de enzima sem estar conjugada (KOIDE; SUZUKI; KOBAYASHI, 1982).

Contudo, como não se conheciam as relações entre os subtipos de célula T CD4⁺ e a real função das células T CD8⁺, estas eram consideradas como células T supressoras e muitos trabalhos foram produzidos mostrando a capacidade da proteína peglada em conduzir a tolerância através de células CD8⁺ (CHEN, *et al.*, 1994; MOHAPATRA *et al.*, 1993; TAKATA *et al.*, 1990). Porém nenhum trabalho até o momento tem apresentado as relações entre células Th1 e Th2 e células CD8⁺.

Com isto, a imunogenicidade de proteínas pegladas tem se restringido apenas ao estudo da inibição da produção de anticorpos, bem como a inibição de anticorpos específicos nas doenças auto-imunes (ATASSI *et al.*, 1992; CALICETI; VERONESI, 2003; FUKUSHIMA *et al.*, 1999).

Apesar da maioria dos trabalhos apresentar dados de redução da reação entre anticorpos e proteínas quando conjugadas ao PEG, So e colaboradores (1999) demonstraram que a concentração de mPEG para ovalbumina e BCG pode ter um efeito adjuvante.

1.3.6. Perspectivas futuras dos adjuvantes

No momento há um processo intenso de pesquisas e desenvolvimento de novas vacinas no qual o princípio de governabilidade da proteção ao organismo é o sucesso da indução a uma resposta imunológica protetora e potente. À frente deste trabalho está a descoberta relacionada à presença de receptores nas células da imunidade inata, que reconhecem características e componentes padronizados sobre os patógenos. Com isto, gera-se uma nova perspectiva de identificação dos receptores existentes nos patógenos, capazes de ativarem a resposta imune inata levando a uma resposta antígeno-específica. Conseqüentemente, novas classes de adjuvantes estão surgindo, permitindo o controle da resposta imune, por vários mecanismos diferentes. Porém, a potencialidade destes novos adjuvantes necessita ser cuidadosamente averiguada, pois as suas reações sobre o sistema imunológico poderão determinar danos irreversíveis. Nesta seqüência, os adjuvantes que atuam como sistema de fornecimento podem apresentar uma função importante para a distribuição e administração do antígeno, de modo a interagir apropriadamente com células imunocompetentes, induzindo a resposta desejada.

Como nova perspectiva existe uma busca cada vez maior por adjuvantes que demonstrem uma seqüência de uso e que não levem a uma resposta inflamatória nociva ao organismo; habilitando o sistema imune a estimular uma imunidade inata e a induzir imunidade adaptativa com a formação de anticorpos e células de memória, atuando de forma a mimetizar, com antígenos recombinantes ou purificados, a resposta imune que o patógeno desencadearia (O'HAGAN; VALANTE, 2003).

1.4. Venenos como antígeno

A história da humanidade registra grande número de acidentes ofídicos, tanto em animais como em seres humanos, demonstrando tratar-se de um problema médico de considerável abrangência, tendo em vista que são responsáveis por mais de 40.000 mortes anuais de pessoas no mundo.

Frente a este panorama, a Organização Mundial de Saúde (OMS) tem incentivado os estudos na área de ofidismo, principalmente os relacionados às espécies agressoras responsáveis pelos acidentes mais freqüentes. Este incentivo recai, atualmente, em quatro pontos fundamentais: a) melhora do esquema de tratamento, mediante a padronização adequada de antivenenos, único tratamento de eficiência comprovada; b) produção de antivenenos de maior potência e especificidade e em condições rentáveis para os países do dito Terceiro Mundo; c) aprimoramento de técnicas que permitem o diagnóstico precoce do agente agressor, que levariam a um tratamento específico; d) aprimoramento de técnicas para a realização de estudos epidemiológicos em campo, para a obtenção de conhecimento claro e preciso da amplitude do problema (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1981).

No Brasil, os acidentes ofídicos sempre representaram uns dos principais problemas de saúde pública, porém, somente a partir de 1986, a notificação destes se tornou obrigatória. Assim, no período compreendido entre julho de 1986 a dezembro de 1993, ocorreram cerca de 152.400 acidentes, ou seja, em média 23.750 acidentes por ano, com as seguintes proporções, segundo a espécie envolvida: 62,21% por serpentes do gênero *Bothrops*; 6,19% pelo gênero *Crotalus*; 0,51% pelo gênero *Micrurus*; 2,11% pelo gênero *Lachesis*; e em 28,98% dos casos não houve informação sobre o gênero agressor (BRASIL, 1994).

Devido à larga distribuição das espécies de serpentes sobre todo território nacional e seu diferente habitat, estas podem possuir em seus venenos várias substâncias com atividades

biológicas, farmacológicas e químicas de natureza diversificada.

As principais atividades biológicas, originárias de toxinas específicas dos venenos de serpentes, em geral, são: hemorrágica, necrosante, desfibrinante, coagulante, hemolítica indireta, proteolítica, edemaciante e neurotóxica que, associadas, provocam quadro geral fisiopatológico que pode levar ao efeito letal e este último foi o que despertou maior interesse (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1981).

Os esquemas de imunização de eqüídeos utilizados atualmente são baseados em inoculações de doses subletais de venenos, estimulando o sistema imunológico a produzir anticorpos específicos para a espécie em propósito. Deste modo, os principais fenômenos biológicos, envolvidos na produção de anticorpos, estão ligados à resposta imunológica do animal utilizado e conseqüentemente aos mecanismos químicos e físicos para a purificação dos plasmas hiperimunes.

Pelo exposto, os venenos ofídicos evocam diversos efeitos fisiopatológicos através de uma ou mais substâncias e, sobre este ponto de vista, foram considerados como um mosaico de antígenos (NICOLLE; RAPHAEL, 1925). Porém, quando se analisa a composição do veneno de famílias diferentes, este conceito de mosaico não se aplica, pois certos fragmentos podem ter uma estrutura relativamente similar, ou não possuir qualquer semelhança (BAXTER; GALLICHIO, 1974). Deste modo, certo componente é largamente distribuído em várias espécies e outros são restritos a poucas espécies.

Vital Brazil (1901), na Faculdade de Farmácia de São Paulo, postulou sobre a especificidade dos soros antiofídicos, pois os soros provenientes da Europa, produzidos por Calmette, não neutralizavam a ação dos venenos das serpentes brasileiras. Demonstrou que, mesmo entre os venenos das serpentes encontradas na América do Sul, o soro anticrotálico não era capaz de neutralizar a ação letal dos venenos de *Bothrops jararaca* (BRAZIL, 1901). Muitos experimentos demonstram a presença de antígenos comuns nos venenos ofídicos de

diferentes famílias, gêneros ou espécies. Lamb e Hanna (1904) evidenciaram, pela primeira vez, por reação de precipitação entre venenos de *Naja naja* e veneno de *Echis carinatus*, a presença de componentes comuns, condição esta confirmada mais tarde por uma série de experimentos com venenos de outras espécies ou gênero de ofídios. Com os avanços das técnicas que demonstram as reações cruzadas entre os venenos, tais como a imunodifusão em gel de agarose (OUDIN, 1952), ELISA (ENGVALL; PERLMANN, 1972), muitos trabalhos demonstraram a composição ideal de antígenos para a produção de antivenenos (GRASSET; PONGRATZ; BRECHBUHLER, 1956; THEAKSTON; REID, 1979), pois a presença ou não de componentes comuns no veneno de espécies do mesmo gênero faz com que os venenos, de certas espécies, sejam indispensáveis, nas formulações antigênicas, enquanto outras se tornam redundantes.

Baseando-se nas possíveis reações cruzadas entre os venenos de serpentes existentes no Brasil, Dias da Silva e colaboradores (1989) contribuíram para a formulação do antígeno que é usado na imunização de eqüídeos para produção de soro antibotrópico. Do mesmo modo, o estudo da composição dos venenos elapídicos, para produção de soros, demonstrou que a mistura dos venenos de *Micrurus corallinus* e *Micrurus frontalis* foi considerada adequada para produzir anticorpos neutralizantes não só dos venenos específicos, como também os de *M. ibiboboca* e *M. spiix* (HIGASHI *et al.*, 1995).

Com a fosfolipase A2, que é um dos componentes da fração tóxica principal do veneno crotálico (crotoxina = crotapotina + fosfolipase A2), foram imunizado eqüinos cujos soros neutralizaram a atividade letal do veneno crotálico integral, conforme teste em camundongos (HIGASHI *et al.*, 1989). Como demonstrado por Santos e colaboradores (1988), a principal contribuição do estudo de Higashi e colaboradores (1989) foi a de possibilitar a indução da imunidade básica nos cavalos, os quais apresentaram reações locais ou sistêmicas menos intensas mesmo quando, posteriormente, receberam doses de veneno

crotálico integral.

A utilização das frações do veneno ou a formulação do antígeno a ser utilizado na produção de antivenenos é uma forma de melhorar a especificidade e a potência.

Muito pouco tem sido pesquisado da ação dos venenos sobre o sistema imunológico. Sabe-se, no entanto, que entre os fenômenos observados, no sistema imune, causados pelos venenos ofídicos, os que mais despertaram a atenção foram a atividade inflamatória e a imunossupressão induzida pelo Fator de Veneno de Cobra (Cobra Venom Factor – CVF). O CVF é uma proteína obtida do veneno de *Naja naja* que atua sobre o componente C3 do sistema complemento (COCHRANE; MÜLLER-EBERHARD; AIKIN, 1970). Os venenos da família Viperidae são altamente flogísticos, porém, grande parte dos estudos sobre a resposta inflamatória aos venenos é baseada em relatos clínicos e os trabalhos experimentais enfocam, principalmente, a atividade edematogênica (SAMPAIO *et al.*, 2001).

As características antigênicas dos venenos do gênero *Lachesis* não foram ainda estudadas profundamente, sabe-se, contudo, que há reação cruzada entre as toxinas das quatro subespécies (GUTIÉRREZ; ROJAS; CERDAS, 1987).

A composição complexa dos venenos ofídicos, a especificidade e a existência de subespécies, determinaram a necessidade do conhecimento das suas relações antigênicas sobre o sistema imunológico dos animais produtores de soro, tendo em vista que os soros heterólogos consistem no único tratamento confiável dos envenenamentos provocados por esses répteis. Sendo assim, cabe entender os mecanismos de ação do sistema imunológico e como ele pode interagir com os venenos ofídicos, tanto para produção de soros como para utilização de farmacoterapêuticos.

2. OBJETIVOS

O presente trabalho tem como objetivos:

1) obtenção de preparações de veneno de *Bothrops jararaca* conjugada ao mPEG que permitam observar:

- a) o grau de redução da toxicidade;
- b) os efeitos adjuvantes ou toleralizante sobre o sistema imunológico.

2) avaliar as inter-relações existentes entre as células Th1 e Th2 e a produção de anticorpos específicos para o veneno de *Bothrops jararaca* conjugado ao mPEG.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Obtenção dos derivados ativados de mPEG

Em escala milimolar, onde 30g de mPEG (Sigma®, St. Louis, MO, EUA) e o cloreto cianúrico (Merck®, Darmstadt, Alemanha) previamente dessecados foram postos a reagir em diferentes estequiometrias em meio de 150mL de benzeno azeotropado (Merck®, Darmstadt, Alemanha) e bicarbonato de sódio anidro (Nuclear®, São Paulo, Brasil) a refluxo, durante 40 horas na presença de corrente de nitrogênio (MATSUSHIMA *et al.*, 1980).

Após resfriamento, a suspensão foi filtrada em “büchner” ou equivalente e a camada benzênica obtida foi adicionada para precipitação do material e posterior filtração. Tal operação foi repetida cerca de cinco vezes, sendo que a referência é a ausência do cloreto cianúrico ou ácido cianúrico (YAMASAKI *et al.*, 1998).

Na fase seguinte, o produto obtido descrito acima foi tratado com ácido gama-amino butírico em solução tampão 0,1M de borato de sódio (Synth®, São Paulo, Brasil) pH 10, durante 12 horas a 10°C. Em seguida, o produto foi extraído com clorofórmio (Nuclear®, São Paulo, Brasil), secado sobre sulfato de sódio anidro, sendo o clorofórmio eliminado por vácuo em evaporador. A massa obtida foi cristalizada em 250mL de éter etílico (Vetec®, São Paulo, Brasil) por duas vezes.

O material cristalizado foi dissolvido em dimetilformamida (DMF) (Merck®, Darmstadt, Alemanha) e secado com peneira molecular tipo 3A juntamente com a n-hidroxisuccinimida (NHS) (Sigma®, St. Louis, MO, EUA). A esta mistura foi adicionada uma quantidade estequiométrica de DCC – 1,3-diciclo-hexilcarbodiimida (Sigma®, St. Louis, MO, EUA) (YAMASAKI *et al.*, 1998).

Após o isolamento e análise, o material estava pronto para ser complexado ao veneno

escolhido. A sua conservação foi feita em frascos de vidro em atmosfera de nitrogênio na temperatura entre 4°C a 8°C até a hora do uso.

Este procedimento foi realizado no Laboratório de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, obtendo-se os preparados de mPEG de 2.000 Da e 5.000 Da, com o auxílio do Prof. Dr. Bronislaw Polakiewicz.

3.2. Obtenção do veneno

O veneno de *Bothrops jararaca* foi requisitado junto a Seção de Herpetologia do Instituto Butantan. A obtenção do veneno foi feita por extração manual tradicionalmente usada. Os frascos de veneno foram então resfriados em banho de gelo e em seguida centrifugados a 3.000 rpm por 15 minutos a 4°C, para remoção de resíduos sólidos. Após a centrifugação, o veneno foi aliquotado no equivalente a 10mg por frasco e liofilizado (FURTADO; COLLETO; DIAS DA SILVA, 1991).

3.3. Modificação do veneno de *Bothrops jararaca* pelo mPEG

Em tubos de reação foram colocados 2,0mL de tampão 25mM de fosfato de sódio dibásico pH 7,2, com a concentração de 10mg de veneno de *Bothrops jararaca* e mais mPEG 5.000 ou mPEG 2.000 nas proporções propostas (QUADRO 1). Deixou-se a solução reagir por duas horas a 30°C e em seguida em câmara fria (8°C) por 16 horas. As misturas foram purificadas por filtração molecular em membrana de corte de 10kDa e 5kDa a fim de separar o veneno modificado dos mPEG livres. O veneno conjugado foi filtrado em membrana esterilizante com porosidade de 0,22µm.

QUADRO 1 - PROTOCOLO DE FORMULAÇÃO DO VENENO PEGLADO

	Tubo 1	Tubo 2	Tubo 3	Tubo 4	Tubo 5	Tubo 6	Tubo 7
Tampão (mL)	4,0	3,0	2,0	4,0	3,0	2,0	3,0
Concentração de veneno (mg)	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0
Volume (mL) de PEG, solução 10mg/mL	1,0	2,0	3,0	1,0	2,0	3,0	2,0
PEG/Proteína	0,1	0,2	0,3	0,1	0,2	0,3	0,2

NOTA: Nos tubos 1, 2 e 3 foram utilizados mPEG 2.000, nos tubos 4, 5 e 6 foram utilizados mPEG 5.000 e no tubo 7, mPEG 5.000 em tampão com 1,0M de Sulfato de Sódio.

3.4. Verificação do grau de peglação do veneno

O grau de peglação foi determinado por colorimetria, utilizando a técnica do ácido trinitrobenzeno sulfúrico (TNBS – *Trinitrobenzene sulfonic acid*) (HABEEB, 1966) que consiste em: 1,0mL de TNBS (Sigma®, St. Louis, MO, EUA), em 0,03M de tampão borato pH 9,3. 250µM foram adicionados a 0,4mL de veneno puro ou veneno conjugado na concentração de 2,5mg/mL. A solução foi diluída até 10mL com tampão borato pH 9,3, ou seja, mais 8,6mL de tampão. A solução foi agitada e mantida em repouso por 30 minutos em temperatura ambiente ($\pm 25^{\circ}\text{C}$). A leitura foi feita em espectrofotômetro a 421nm. O valor da absorbância do veneno não conjugado (A_{vt}) é igual a 100% de amina livre e os valores de absorbância referentes às amostras dos venenos conjugados (V_c) informa a quantidade de aminas livres capaz de reagir com o TNBS, calculado pela fórmula:

$$\% \text{Amina Livre} = \frac{V_c \times 100}{A_{vt}} \quad (2)$$

O grau de peglação foi calculado a partir da diferença entre os 100% das aminas livres do veneno não conjugado com a porcentagem de amina livre das amostras calculadas.

3.5. Determinação da toxicidade do veneno conjugado

Para o estudo de toxicidade do veneno foram comparados quatro testes distintos de toxicidade no intuito de diminuir o uso de animais de laboratório e apenas se comprovar a perda da atividade tóxica do veneno quando peglado. Para isto, foram utilizados três testes *in vitro*: citotoxicidade por contagem de célula (PATTERSON, 1979), citotoxicidade por determinação do lactato desidrogenase (LDH) (DECKER; LOHMANN-MATTHES, 1988) e atividade fosfolipase A2 através da hemólise indireta (GUTIERREZ *et al.*, 1988). E dois testes *in vivo*: determinação de creatina quinase sérica (CALIL-ELIAS *et al.*, 2002) e ganho de peso após o processo de imunização. Os mesmos animais ainda foram utilizados para verificação da resposta imune humoral (produção de anticorpos) e retirada de órgão linfóide para determinação de produção de interleucinas.

3.5.1. Determinação da citotoxicidade

3.5.1.1. Células

Células CHO (*Chinese Hamster Ovarian*) de baixa passagem (n° 39), ATCC® cat. n.° CCL-61, cultivadas em meio Eagle (Cultlab, São Paulo, Brasil) na concentração de $2,5 \times 10^5$ cels/mL.

Estas células foram cultivadas em frascos plásticos de 25cm² (Corning®, cat. n.° 3056, Acton, MA, EUA) de modo a obter em média $7,5 \times 10^5$ cels. /mL, após 48 horas de cultivo a 37°C em estufa com 5% CO₂.

3.5.1.2. Teste de citotoxicidade por contagem

Foram preparadas três placas de 96 cavidades (Corning®, cat. n°. 3628, Acton, MA, EUA) com células CHO 24 horas antes do início do teste, sendo que 100µl de $5,0 \times 10^5$ células/mL foram colocadas em cada cavidade, com exceção da primeira coluna da placa para leitura do branco. As placas foram incubadas em estufa a 36,5°C com 5% de CO₂.

Em outras três placas de 96 cavidades, limpas, foram feitas diluições seriadas e em triplicata dos venenos conjugados ao mPEG e veneno não conjugado em meio de Eagle na ausência de soro fetal bovino, conforme QUADROS 2, 3 e 4.

QUADRO 2 - ESQUEMA DE DILUIÇÃO E DISTRIBUIÇÃO DOS VENENO PEGLADOS EM PLACAS DE 96 CAVIDADES

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Branco	VPeg5.20 1,0mg	VPeg5.20 1,0mg	VPeg5.20 1,0mg	VPeg5.30 1,0mg	VPeg5.30 1,0mg	VPeg5.30 1,0mg	VPeg5.40 1,0mg	VPeg5.40 1,0mg	VPeg5.40 1,0mg	Controle (-)	Controle (+)
B	Branco	VPeg5.20 0,5mg	VPeg5.20 0,5mg	VPeg5.20 0,5mg	VPeg5.30 0,5mg	VPeg5.30 0,5mg	VPeg5.30 0,5mg	VPeg5.40 0,5mg	VPeg5.40 0,5mg	VPeg5.40 0,5mg	Controle (-)	Controle (+)
C	Branco	Vpeg5.20 0,25mg	Vpeg5.20 0,25mg	Vpeg5.20 0,25mg	Vpeg5.30 0,25mg	Vpeg5.30 0,25mg	Vpeg5.30 0,25mg	Vpeg5.40 0,25mg	Vpeg5.40 0,25mg	Vpeg5.40 0,25mg	Controle (-)	Controle (+)
D	Branco	VPeg5.20 0,125mg	VPeg5.20 0,125mg	VPeg5.20 0,125mg	VPeg5.30 0,125mg	VPeg5.30 0,125mg	VPeg5.30 0,125mg	VPeg5.40 0,125mg	VPeg5.40 0,125mg	VPeg5.40 0,125mg	Controle (-)	Controle (+)
E	Branco	VPeg5.20 0,0625mg	VPeg5.20 0,0625mg	VPeg5.20 0,0625mg	VPeg5.30 0,0625mg	VPeg5.30 0,0625mg	VPeg5.30 0,0625mg	VPeg5.40 0,0625mg	VPeg5.40 0,0625mg	VPeg5.40 0,0625mg	Controle (-)	Controle (+)
F	Branco	Vpeg5.20 0,031mg	Vpeg5.20 0,031mg	Vpeg5.20 0,031mg	Vpeg5.30 0,031mg	Vpeg5.30 0,031mg	Vpeg5.30 0,031mg	Vpeg5.40 0,031mg	Vpeg5.40 0,031mg	Vpeg5.40 0,031mg	Controle (-)	Controle (+)
G	Branco	VPeg5.20 0,016mg	VPeg5.20 0,016mg	VPeg5.20 0,016mg	VPeg5.30 0,016mg	VPeg5.30 0,016mg	VPeg5.30 0,016mg	VPeg5.40 0,016mg	VPeg5.40 0,016mg	VPeg5.40 0,016mg	Controle (-)	Controle (+)
H	Branco	VPeg5.20 0,008mg	VPeg5.20 0,008mg	VPeg5.20 0,008mg	VPeg5.30 0,008mg	VPeg5.30 0,008mg	VPeg5.30 0,008mg	VPeg5.40 0,008mg	VPeg5.40 0,008mg	VPeg5.40 0,008mg	Controle (-)	Controle (+)

NOTA: VPeg = Veneno de *Bothrops jararaca* peglado;
 5.20 = mPEG 5.000 com 20% de peglação;
 5.30 = mPEG 5.000 com 30% de peglação;
 5.40 = mPEG 5.000 com 40% de peglação.

QUADRO 3 – ESQUEMA DE DILUIÇÃO E DISTRIBUIÇÃO DOS VENENOS PEGLADOS EM PLACAS DE 96 CAVIDADES

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Branco	VPeg2.20 1,0mg	VPeg2.20 1,0mg	VPeg2.20 1,0mg	VPeg2.30 1,0mg	VPeg2.30 1,0mg	VPeg2.30 1,0mg	VPeg2.40 1,0mg	VPeg2.40 1,0mg	VPeg2.40 1,0mg	Controle (-)	Controle (+)
B	Branco	VPeg2.20 0,5mg	VPeg2.20 0,5mg	VPeg2.20 0,5mg	VPeg2.30 0,5mg	VPeg2.30 0,5mg	VPeg2.30 0,5mg	VPeg2.40 0,5mg	VPeg2.40 0,5mg	VPeg2.40 0,5mg	Controle (-)	Controle (+)
C	Branco	Vpeg2.20 0,25mg	Vpeg2.20 0,25mg	Vpeg2.20 0,25mg	Vpeg2.30 0,25mg	Vpeg2.30 0,25mg	Vpeg2.30 0,25mg	Vpeg2.40 0,25mg	Vpeg2.40 0,25mg	Vpeg2.40 0,25mg	Controle (-)	Controle (+)
D	Branco	VPeg2.20 0,125mg	VPeg2.20 0,125mg	VPeg2.20 0,125mg	VPeg2.30 0,125mg	VPeg2.30 0,125mg	VPeg2.30 0,125mg	VPeg2.40 0,125mg	VPeg2.40 0,125mg	VPeg2.40 0,125mg	Controle (-)	Controle (+)
E	Branco	VPeg2.20 0,0625mg	VPeg2.20 0,0625mg	VPeg2.20 0,0625mg	VPeg2.30 0,0625mg	VPeg2.30 0,0625mg	VPeg2.30 0,0625mg	VPeg2.40 0,0625mg	VPeg2.40 0,0625mg	VPeg2.40 0,0625mg	Controle (-)	Controle (+)
F	Branco	Vpeg2.20 0,031mg	Vpeg2.20 0,031mg	Vpeg2.20 0,031mg	Vpeg2.30 0,031mg	Vpeg2.30 0,031mg	Vpeg2.30 0,031mg	Vpeg2.40 0,031mg	Vpeg2.40 0,031mg	Vpeg2.40 0,031mg	Controle (-)	Controle (+)
G	Branco	VPeg2.20 0,016mg	VPeg2.20 0,016mg	VPeg2.20 0,016mg	VPeg2.30 0,016mg	VPeg2.30 0,016mg	VPeg2.30 0,016mg	VPeg2.40 0,016mg	VPeg2.40 0,016mg	VPeg2.40 0,016mg	Controle (-)	Controle (+)
H	Branco	VPeg2.20 0,008mg	VPeg2.20 0,008mg	VPeg2.20 0,008mg	VPeg2.30 0,008mg	VPeg2.30 0,008mg	VPeg2.30 0,008mg	VPeg2.40 0,008mg	VPeg2.40 0,008mg	VPeg2.40 0,008mg	Controle (-)	Controle (+)

NOTA: VPeg = Veneno de *Bothrops jararaca* peglado;
 2.20 = mPEG 2.000 com 20% de peglação;
 2.30 = mPEG 2.000 com 30% de peglação;
 2.40 = mPEG 2.000 com 40% de peglação.

QUADRO 4 – ESQUEMA DE DILUIÇÃO E DISTRIBUIÇÃO DOS VENENOS PEGLADOS EM PLACAS DE 96 CAVIDADES

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Branco	Ven.Int 1,0mg	Ven.Int 1,0mg	Ven.Int 1,0mg	VPegSS 1,0mg	VPegSS 1,0mg	VPegSS 1,0mg	N.U.	N.U.	N.U.	Controle (-)	Controle (+)
B	Branco	Ven.Int 0,5mg	Ven.Int 0,5mg	Ven.Int 0,5mg	VPegSS 0,5mg	VPegSS 0,5mg	VPegSS 0,5mg	N.U.	N.U.	N.U.	Controle (-)	Controle (+)
C	Branco	Ven.Int 0,25mg	Ven.Int 0,25mg	Ven.Int 0,25mg	VPegSS 0,25mg	VPegSS 0,25mg	VPegSS 0,25mg	N.U.	N.U.	N.U.	Controle (-)	Controle (+)
D	Branco	Ven.Int 0,125mg	Ven.Int 0,125mg	Ven.Int 0,125mg	VPegSS 0,125mg	VPegSS 0,125mg	VPegSS 0,125mg	N.U.	N.U.	N.U.	Controle (-)	Controle (+)
E	Branco	Ven.Int 0,0625mg	Ven.Int 0,0625mg	Ven.Int 0,0625mg	VPegSS 0,0625mg	VPegSS 0,0625mg	VPegSS 0,0625mg	N.U.	N.U.	N.U.	Controle (-)	Controle (+)
F	Branco	Ven.Int 0,031mg	Ven.Int 0,031mg	Ven.Int 0,031mg	VPegSS 0,031mg	VPegSS 0,031mg	VPegSS 0,031mg	N.U.	N.U.	N.U.	Controle (-)	Controle (+)
G	Branco	Ven.Int 0,016mg	Ven.Int 0,016mg	Ven.Int 0,016mg	VPegSS 0,016mg	VPegSS 0,016mg	VPegSS 0,016mg	N.U.	N.U.	N.U.	Controle (-)	Controle (+)
H	Branco	Ven.Int 0,008mg	Ven.Int 0,008mg	Ven.Int 0,008mg	VPegSS 0,008mg	VPegSS 0,008mg	VPegSS 0,008mg	N.U.	N.U.	N.U.	Controle (-)	Controle (+)

NOTA: Ven.Int = Veneno de *Bothrops jararaca* integral (não conjugado);
 VPeg SS = Veneno tratado com sulfato de sódio e tratado com mPEG 5.000 de modo a obter 30% de peglação;
 N.U. = Não Utilizado.

Das placas com células o meio de cultivo foi retirado após 24 horas de incubação. Já das placas que contêm as diluições seriadas de veneno, 100µl de cada diluição foram transferidos para as placas com células.

Foram adicionados 100µl de meio de Eagle para controles positivos (lise feita após a incubação do veneno com 10% de solução de dodecil sulfato de sódio – SDS, Nuclear®, São Paulo, Brasil), e 100µl para os controles negativos (permanência de 100% de células vivas). As placas foram colocadas em estufa a 37°C por 2 horas.

A seguir, foram retirados 75µl do meio de cultivo e controle para determinação de LDH e para determinação de 100% de morte celular foram adicionados 100µl de solução de SDS a 10% em meio Eagle no controle positivo por 5 minutos e em seguida retirados 75µl para determinação do LDH.

Os sobrenadantes de meio contendo venenos e controles foram desprezados e as células fixadas com 300µl acetona a 80% em água deionizada, a -20°C por 10 minutos. Em seguida, a acetona foi desprezada e a placa foi seca à temperatura ambiente. Foram adicionados 100µl/cavidade de solução azul de Evans 1:10.000 em PBS pH 7,2 menos na 1ª coluna. As placas foram mantidas na estufa a 37°C por 1 hora, sendo em seguida desprezado o corante e as placas lavadas uma vez com PBS por imersão.

Foram adicionados 100µl/cavidade de PBS com 10% de SDS para liberação do corante do interior das células. Após 30 minutos as placas foram avaliadas quanto à intensidade de cor em espectrofotômetro a 540nm.

A dose citotóxica 50% (DCtx₅₀) foi determinada através da análise de probitos considerando o logaritmo da dose versus a absorbância em 540nm. Determinadas as concentrações do veneno para cada repetição, foi obtida a média geométrica das triplicatas das amostras para determinação da concentração do efeito citotóxico. Para o cálculo da dose citotóxica 50% optou-se pela análise de probitos. Para a determinação da concentração

relativa de morte celular foi considerada a absorbância média dos controles, negativos 100% de células vivas ($Abs_{100\%}$) e a diferença de cada leitura (Abs_{am}) pelo controle positivo (0% de célula viva) (Abs_{pos}) multiplicado por 100, conforme a equação

$$\% \text{ de morte celular} = \frac{\overline{Abs_{am}} - \overline{Abs_{pos}}}{\overline{Abs_{100\%}}} \times 100 \quad (3)$$

3.5.1.3. Citotoxicidade por determinação de LDH Lactato Desidrogenase (*Citotoxicity Detection Kit* – LDH – Roche cat. n° 1 644 793 lote 0143/02, Mannheim, DE)

Amostras de material mencionadas no item anterior (3.5.1.2) foram distribuídas em tubos *eppendorf* e centrifugadas a 5.000 rpm por 15 minutos a 4°C, para remoção de células que poderiam encontrar-se no sobrenadante.

Após a centrifugação, 50µl de cada amostra em triplicata foram adicionadas nas placas de 96 cavidades para reação, durante 30 minutos à temperatura de 25°C, ao abrigo da incidência direta de luz, com o “kit” de LDH. O volume foi completado para 100µl com meio de Eagle sem soro fetal bovino.

Como controle positivo (100% de LDH) foi considerado o sobrenadante da cultura de célula tratada com 10% de SDS antes da coloração com azul de Evans (Abs_{pos}).

Para o controle negativo foi utilizado sobrenadante da cultura de célula não tratada com veneno ou com solução 10% de SDS (Abs_{neg}). Foi considerado como ruído da reação (“background”) o meio de Eagle sem soro fetal bovino.

Após a reação foi feita a leitura em espectrofotômetro de microplaca com comprimento de onda de 492nm (Abs_{am}).

O cálculo da porcentagem da citotoxicidade por dosagem de LDH foi determinado através da fórmula:

$$\% \text{ de citotoxicidade} = \frac{(Abs_{am} - Abs_{neg})}{(Abs_{pos} - Abs_{neg})} \times 100 \quad (4)$$

3.5.2 Toxicidade do veneno por hemólise indireta da fosfolipase A2 (GUTIERREZ et al., 1988)

A atividade hemolítica indireta é uma propriedade de alguns venenos de serpentes cuja fosfolipase A2, na presença da lecitina, forma uma hemolisina que interage com os eritrócitos de carneiro. Esta reação é dose dependente de fosfolipase A2.

Uma solução de PBS pH 7,2 aquecida a 56°C, contendo 0,8% de agarose, 1,2% de papa de hemácia de carneiro lavada, 1,2% de gema de ovo diluída 1:4 em solução fisiológica e 1% de cloreto de cálcio (Nuclear®, São Paulo, Brasil) a 0,01M foi depositada sobre placas plásticas de polipropileno transparentes de 135 X 80 mm, de modo a formar uma camada de 3 mm de espessura. Após o resfriamento, foram feitos 12 orifícios de 3 mm de diâmetro no gel, espaçados de 25 mm. Em cada orifício foram adicionados 15µl das diluições em PBS pH 7,2 (razão 2) do veneno de *Bothrops jararaca* conjugado ao mPEG ou não, com concentração inicial de 10mg/mL até $9,765 \times 10^{-3}$ mg/mL, e incubadas em câmara úmida por 18h. Após a incubação, foram medidos os diâmetros dos halos hemolíticos e plotados em um gráfico logaritmo da dose versus a área do halo de hemólise (mm²), de modo a se calcular a dose efetiva hemolítica 50% (DEH₅₀) pelo teste de probitos. Foi considerada como DEH₅₀ a dose que apresentou uma área de hemólise equivalente a 50% da área de hemólise máxima observada no experimento.

3.5.3. Verificação do ganho de peso dos animais inoculados com veneno conjugado e veneno não conjugado

Durante o processo de imunização dos camundongos os seus pesos foram determinados pelo menos 3 vezes a cada 2 dias e as médias de peso comparadas entre os quatro grupos de animais, assim discriminados: 1º grupo - controle negativo: animais que receberam apenas solução fisiológica; 2º grupo - controle positivo: animais que receberam

veneno não conjugado, 3º grupo: animais que receberam veneno conjugado com mPEG 2.000 a 30% e 4º - grupo: animais que receberam veneno conjugado com mPEG 5.000 a 30%.

3.5.4. Avaliação de creatina quinase sérica em camundongos tratados com veneno conjugado ao mPEG e veneno não conjugado

Camundongos (item 3.6) separados em nove grupos de dez animais, sendo cada animal imunizado (item 3.7) com veneno conjugado ao mPEG (7 preparações), veneno não conjugado e solução de PBS pH 7,2. Após 2 horas da inoculação os animais foram sangrados em 200µl pelo plexo venoso retro-orbital para determinação da creatina quinase individual.

Foi utilizado o “kit” da CELM® CK-NAQC cat. nº 0490 lote 910041, para a determinação da creatina quinase através da reação creatina fosfato mais Adenosina Difosfato (ADP) que se transforma em creatina mais Adenosina Trifosfato (ATP). O ATP, na presença de hexoquinase e glicose, se transforma em ADP mais glicose-6-fosfato e esta, por sua vez, na presença de NADP (Nicotinamida Adenina Nucleotídeo Fosfato) e Glicose-6-fosfato desidrogenase, se transforma em gluconato-6-fosfato mais NADP/H e uma molécula de hidrogênio.

Os resultados são expressos em Unidades Internacionais, que é a quantidade de catálise de conversão de 1µmol de NADPH por minuto a 25°C.

3.6 Animais utilizados

Foram utilizados camundongos *outbred* com peso de 20g ± 2, mantidos em ambiente com temperatura controlada entre 22°C a 25°C e umidade relativa do ar entre 60% a 70%, com renovação de 100% do ar circulante por hora. Durante o período de experimentação os animais receberam água e ração balanceada *ad libium*.

Foram utilizados 90 camundongos separados em 9 grupos de 10 animais. Cinco animais por grupo foram utilizados para a avaliação da creatina quinase sérica e, posteriormente, para determinação da resposta imune humoral secundária, e outros cinco foram utilizados para avaliação da resposta imune primária.

Após a obtenção de sangue através da punção do plexo venoso retro-orbital (ou sinus-orbital), os animais foram sacrificados com doses elevadas de anestésicos (Cloridrato de Xilasina, Rompum®, Bayer, 10mg/Kg associado ao Cloridrato de Quetamina, Ketalar®, União Química Farmacêutica, 200mg/Kg). Após constatada a morte, tiveram seus linfonodos subescapular e inguinais removidos para avaliação da produção de citocinas.

Neste trabalho também foram utilizados coelhos albinos para produção de soros hiperimunes. Foram utilizados nove coelhos pesando entre 1,5Kg a 1,8Kg. Mantidos separados em gaiola de alumínio apropriada para espécie com água e comida *ad libium*. Estes animais permaneceram por seis semanas no laboratório até que fosse cumprido o ciclo de hiperimunização (item 3.8).

Ao fim do experimento, os coelhos foram anestesiados com Cloridrato de Xilasina, Rompum®, Bayer, na concentração de 10mg/Kg e Cloridrato de Quetamina, Ketalar®, União Química Farmacêutica, na concentração de 50mg/Kg. Após serem verificados os sinais de sedação (diminuição do batimento cardíaco, diminuição dos movimentos respiratórios, ausência do reflexo palpebral e ausência do reflexo anal), os animais foram sangrados por punção cardíaca e obtido 50mL em média de sangue de cada animal. Após a coleta os animais ainda anestesiados foram sacrificados em câmara de CO₂.

3.7. Esquemas de imunização

3.7.1. Camundongos

Foram imunizados com doses subletais de veneno de *Bothrops jararaca* por via intraperitoneal, correspondendo à metade da Dose Letal 50% (DL₅₀) que é igual a 40µg de veneno por 20g de peso vivo de camundongo. Logo cada animal recebeu o equivalente a 20µg de veneno, seja ele conjugado ao mPEG ou não. O esquema de imunização está representado no QUADRO 5.

QUADRO 5 - ESQUEMA DE IMUNIZAÇÃO DOS CAMUNDONGOS

	1ª Prep. MPEG5/20	2ª Prep MPEG5/30	3ª Prep. MPEG5/40	4ª Prep. MPEG2/20	5ª Prep MPEG2/30.	6ª Prep. MPEG2/40	7ª Prep. MPEG5/SS	Controle (+) Veneno	Controle (-)
Dia 0	20µg 10 cam	20µg 10 cam	20µg 10 cam	20µg 10 cam	20µg 10 cam	20µg 10 cam	20µg 10 cam	20µg 10 cam	PBS 10 cam
Dia 0 2hs	Sangria 5 cam. CK	Sangria 5 cam CK	Sangria 5 cam CK	Sangria 5 cam CK	Sangria 5 cam CK	Sangria 5 cam CK	Sangria 5 cam CK	Sangria 5 cam CK	Sangria 5 cam CK
Dia 7	Sangria 5 cam.	Sangria 5 cam	Sangria 5 cam	Sangria 5 cam	Sangria 5 cam	Sangria 5 cam	Sangria 5 cam	Sangria 5 cam	Sangria 5 cam
Dia 14	20µg 5 cam.	20µg 5 cam.	20µg 5 cam.	20µg 5 cam.	20µg 5 cam.	20µg 5 cam.	20µg 5 cam.	20µg 5 cam.	PBS 5 cam
Dia 28	Sangria 5 cam	Sangria 5 cam	Sangria 5 cam	Sangria 5 cam	Sangria 5 cam	Sangria 5 cam	Sangria 5 cam	Sangria 5 cam	Sangria 5 cam

NOTA: Cam. = camundongo;

20µg = concentração de veneno em 0,5mL inoculados por via intraperitoneal.

CK = Creatinina Quinase.

MPEG = veneno conjugado ao mPEG.

5/20 = mPEG 5.000 com 20% de peglação do veneno de *B. jararaca*;

5/30 = mPEG 5.000 com 30% de peglação do veneno de *B. jararaca*;

5/40 = mPEG 5.000 com 40% de peglação do veneno de *B. jararaca*;

2/20 = mPEG 2.000 com 20% de peglação do veneno de *B. jararaca*;

2/30 = mPEG 2.000 com 30% de peglação do veneno de *B. jararaca*;

2/40 = mPEG 2.000 com 40% de peglação do veneno de *B. jararaca*;

5/SS = mPEG 5.000 com 30% de peglação em solução de Sulfato de Sódio.

Após a sangria os animais foram sacrificados e obtidos os linfonodos inguinais e subescapulares.

3.7.2 . Coelhos

Foram imunizados com doses crescentes das preparações de veneno de *Bothrops jararaca*, iniciando em 50µg/mL até a concentração de 200µg/mL. A via utilizada foi a intramuscular profunda interdigital. Durante as inoculações a contenção dos animais foi feita em caixas apropriadas de modo a garantir a segurança do animal e a do operador. O esquema de imunização está representado no QUADRO 6.

QUADRO 6 - ESQUEMA DE HIPERIMUNIZAÇÃO DOS COELHOS

	1ª Prep. MPEG5/20	2ª Prep MPEG5/30	3ª Prep. MPEG5/40	4ª Prep. MPEG2/20	5ª Prep MPEG2/30	6ª Prep. MPEG2/40	7ª Prep. MPEG5/SS	Controle (+) Veneno	Controle (-)
Dia 0	50µg/mL	50µg/mL	50µg/mL	50µg/mL	50µg/mL	50µg/mL	50µg/mL	50µg/mL	PBS
Dia 14	50µg/mL	50µg/mL	50µg/mL	50µg/mL	50µg/mL	50µg/mL	50µg/mL	50µg/mL	PBS
Dia 21	100µg/mL	100µg/mL	100µg/mL	100µg/mL	100µg/mL	100µg/mL	100µg/mL	100µg/mL	PBS
Dia 28	100µg/mL	100µg/mL	100µg/mL	100µg/mL	100µg/mL	100µg/mL	100µg/mL	100µg/mL	PBS
Dia 35	200µg/mL	200µg/mL	200µg/mL	200µg/mL	200µg/mL	200µg/mL	200µg/mL	200µg/mL	PBS
Dia 42	Sangria	Sangria	Sangria	Sangria	Sangria	Sangria	Sangria	Sangria	Sangria

NOTA: MPEG = veneno conjugado ao mPEG;

5/20 = mPEG 5.000 com 20% de peglação do veneno de *B. jararaca*;

5/30 = mPEG 5.000 com 30% de peglação do veneno de *B. jararaca*;

5/40 = mPEG 5.000 com 40% de peglação do veneno de *B. jararaca*;

2/20 = mPEG 2.000 com 20% de peglação do veneno de *B. jararaca*;

2/30 = mPEG 2.000 com 30% de peglação do veneno de *B. jararaca*;

2/40 = mPEG 2.000 com 40% de peglação do veneno de *B. jararaca*;

5/SS = mPEG 5.000 com 30% de peglação do veneno de *B. jararaca* em solução de Sulfato de Sódio

3.8. Avaliação da resposta imune em camundongos

3.8.1. Ensaio imunoenzimático para determinação do título antiveneno

Os títulos individuais de anticorpos contra os venenos de *Bothrops jararaca*, em camundongos, foram determinados pela técnica de reação imunoenzimática (ELISA) direta (ENGVAL, 1980). Microplacas de 96 cavidades (Corning® cat. n.º 3590, Acton, MA, EUA) foram sensibilizadas com veneno não conjugado, diluído em tampão carbonato-bicarbonato 0,1M, pH 9,6 na concentração de 10µg/mL. Foram colocados em cada cavidade 100µL de veneno e incubado durante uma noite a 4°C. Os sítios livres de cada cavidade foram bloqueados com 100µl, por duas horas à temperatura ambiente, com uma solução de gelatina a 1% em tampão carbonato-bicarbonato 0,1M, pH 9,6. Após a adição de 100µl das diluições em série (razão 2) dos soros de camundongo e incubação a 37°C por 2 horas, foi empregado anticorpo de cabra anti-IgG de camundongo conjugado à peroxidase (Sigma®, cat. n.º A3673, St. Louis, MO, EUA). Como substrato, foi utilizado O-phenylenediamine (Sigma®, cat n.º P9187, St. Louis, MO, EUA) e peróxido de hidrogênio a 0,03% (Nuclear®, São Paulo, Brasil). A reação foi interrompida após 15 minutos, pela adição de ácido sulfúrico a 2,5N, e a densidade óptica foi medida, usando-se um leitor de ELISA (Titertech® Spectronic) com filtro de 492nm. Os títulos foram obtidos através do processamento das densidades ópticas obtidas *versus* o logaritmo da diluição, de modo a se obter a dose efetiva 50% (DE₅₀) (LEINIKKI; PASSILA, 1977).

3.8.2. Determinação da concentração de IL-4, IL-5, IL-2, INF-γ e TNF-α

Estas citocinas foram determinadas a partir de cultura de linfócito obtidos dos

linfonodos subescapular e inguinal dos camundongos imunizados com diversa preparações de veneno conjugado ao mPEG 2.000 e ao mPEG 5.000.

3.8.2.1. Obtenção e cultura dos linfócitos

Os animais sacrificados com dosagem tóxica de anestésico (cloridrato de xilasina associado ao cloridrato de quetamina) tiveram os seus linfonodos subescapular e inguinal extraídos por procedimento cirúrgico, em capela de fluxo laminar.

Para cinco animais de cada grupo imunizados, foi obtido um “pool” de linfonodos e estes foram colocados em homogeneizador previamente esterilizado ao qual foram adicionados 15mL de meio RPMI 1640 (Cultilab, Brasil) para obtenção das suspensões celulares. Em seguida, em tubos de 15mL, os materiais foram centrifugados a 1.500rpm por 15 minutos a 4°C. O sobrenadante foi desprezado e as células ressuspensas em 10,5 mL de meio RPMI suplementado com L-glutamina (216µg), 0,05mM de 2-mercaptoetanol, 10mM de HEPES e 5% de soro fetal bovino.

As suspensões foram mantidas em banho de gelo por 10 minutos para deposição de grumos. Após este período foram transferidos 10 mL para outro tubo e a contagem das células viáveis foi realizada em câmara de Neubauer com corante azul de Evans.

As suspensões celulares obtidas foram distribuídas em placas de 24 cavidades nas concentrações de 5×10^6 células/cavidade no volume de 0,5 mL, em triplicata.

As células das diferentes suspensões foram cultivadas em meio de RPMI adicionados de preparações de veneno conjugado ou não ao mPEG na concentração de 30µg/mL num volume de 0,5 mL durante 48 horas em estufa de CO₂ umidificada.

Em seguida, as células foram centrifugadas a 1.500 rpm por 10 minutos a 4°C e os sobrenadantes coletados, aliquotados e congelados a -20°C para posterior dosagem de

citocinas.

Como controle negativo foi utilizada suspensão de cultura de linfócitos de animais não imunizados com qualquer tipo de veneno e não estimulados com nenhuma outra substância.

3.8.2.2. Determinação da concentração de citocinas em cultura celular

A determinação das citocinas IL-4, IL-5, IL-2, INF- γ e TNF- α foi realizada em “kits” para ensaio imunoenzimático quantitativo (Assay Designs, TiterZyme® EIA, cat. n.º 90043, 90044, 90042, 90049 e 90047, Ann Arbor, MI, EUA).

A partir das culturas de linfócito de camundongos, 50 μ l de meio de cultivo de células, congeladas, estimuladas com respectivo antígeno ou com concanavalina A, foram postas a reagir com o “kit” para determinação quantitativa de citocinas.

Os resultados foram expressos em pg/mL de amostra e foi realizada análise estatística pelo método de comparação entre duas médias, de modo a verificar as diferenças significativas entre os diversos tratamentos do veneno. Para comparação das duas médias foi usado o método *t* de Student.

3.9. Avaliação da resposta imune em coelhos

3.9.1. Inibição da atividade hemolítica indireta da fosfolipase A2

Após a determinação da DEH₅₀, foram feitas diluições seriadas (razão 2) em PBS pH 7,2 dos soros de coelhos a serem testados. Adicionou-se 100 μ L da solução de veneno com 2 vezes a concentração da DEH₅₀, de modo que, quando fossem adicionados os soros dos animais em diluições seriadas, a concentração final de veneno fosse igual à concentração

obtida para a DEH_{50} . A mistura (veneno + soro) permaneceu por 30 minutos a 37°C em repouso e, em seguida, 15µl de cada diluição foram colocados nos orifícios da placa de hemólise. As placas foram incubadas em câmara úmida a 37°C por 18hs. Os diâmetros dos halos de hemólise foram medidos para se determinar a dose neutralizante por método de probitos.

3.9.2. Inibição da atividade citotóxica do veneno de *Bothrops jararaca*

Através do cultivo de células CHO (como no item 3.5.1.1), doses citotóxicas do veneno de *Bothrops jararaca* foram neutralizadas por soro de coelho hiperimunizados.

Ao se determinar a $DCtx_{50}$ para o veneno não conjugado, utilizou-se esta como dose desafio num valor três vezes maior do que a $DCtx_{50}$. Esta concentração foi mantida fixa e misturada com diluições seriadas dos soros de coelhos imunizados com sete preparações diferentes de veneno conjugado ao mPEG. Como controle positivo foi considerado o soro do coelho imunizado com veneno não conjugado e como controle negativo o soro de coelho imunizado apenas com PBS.

A determinação da inibição da citotoxicidade foi realizada através da concentração de células viáveis coradas com azul de Evans. Após a ruptura da célula com solução a 10% de SDS em meio de Eagle foi feita avaliação da intensidade de corante nas placas de 96 cavidades. Quanto maior a intensidade do corante maior o valor de absorbância a 540nm e, conseqüentemente, maior o efeito neutralizante citotóxico do soro do coelho.

A quantidade de veneno neutralizada pelo soro (IDC_{50} – inibição da dose citotóxica 50%) foi obtida através da análise de probitos, igualmente determinada no item 3.5.1.2.

3.10. Eletroforese de proteínas em gel de poliacrilamida e “immunoblotting”

Para este ensaio, 30µg de veneno de *Bothrops jararaca* foram dissolvidos em tampão de amostra acrescido de 2,5% de dodecil sulfato de sódio (SDS), 22,5% de 2-mercaptoetanol, 10% de glicerol, tampão tris-HCL 0,5M, pH 6,8 e azul de bromofenol a 0,5%. O veneno foi aquecido por 5 minutos em banho de água fervente. Outra amostra foi preparada do mesmo modo, porém sem a presença de 2-mercaptoetanol e sem aquecimento em água fervente. Foram assim obtidos dois géis de eletroforese, um com o veneno reduzido pelo 2-mercaptoetanol e outro sem que o veneno fosse reduzido.

O veneno reduzido foi submetido à eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) a 17%, enquanto que o veneno não reduzido foi submetido ao mesmo ensaio porém com concentração de poliacrilamida a 12%. Ambos os géis apresentavam 1mm de espessura, com sistema tampão descontínuo, segundo Laemmli (1970) e Studier (1993). Após a eletroforese, as frações de proteína foram transferidas para membranas de polivinilidileno flureto (PVDF – polivinyletilene fluride), com porosidade de 0,45mm, (Millipore®, EUA) numa cuba de transferência a 200mA por 2hs em tampão Tris-base 48mM, glicina 39mM, 0,037% de SDS e 20% de metanol, bloqueadas com leite em pó desnatado (Leite Mólico, Nestlé, Brasil) a 5% em tampão Tris-HCl, pH 7,4, por 2 horas. Após o bloqueio, a membrana de PVDF foi cortada em tiras de 0,5cm de espessura e cada tira foi colocada na presença dos soros de coelhos imunizados com veneno conjugado com mPEG, ou com veneno não conjugado ou ainda soro normal de coelho. As frações protéicas foram reveladas com IgG de cabra anti-IgG de coelho conjugada a peroxidase (Pierce®, cat. n.º 31463 Rockford, EUA) diluídos 1:1000, em tampão Tris-HCL com 0,5% de leite desnatado e deixado em contato com as fitas de PVDF por 2 horas à temperatura ambiente ($\pm 25^{\circ}\text{C}$). Após cada incubação, as fitas foram lavadas com quatro trocas de tampão Tris-HCL. Em seguida, as fitas foram postas

a reagir com 4-cloro-naftol (4-CN) (Sigma®, St. Louis, EUA) na proporção de 60µl de 4-CN, na concentração de 3mg/mL em metanol (Merck®, Rio de Janeiro, Brasil), para 5,4mL de tampão Tris-HCL, pH 7,5 com 60µL de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) 30 Vol. (Nuclear®, São Paulo, Brasil). A reação foi interrompida por lavagem das fitas com água corrente com pelo menos 0,1% de cloro ativo. Em seguida as tiras de PVDF com os *blots* foram secas, e fotografadas e analisadas para o reconhecimento das frações protéicas do veneno de *Bothrops jararaca* reduzido e não reduzido.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Grau de peglação do veneno

Após análise colorimétrica pelo TNBS foram determinadas as porcentagens de aminas pegladas em relação ao veneno não conjugado.

QUADRO 7 - GRAU DE SÍTIOS DE AMINA CONJUGADO AO MPEG

Produto	Porcentagem de peglação	Denominação
mPEG 2.000 - 0,1 mL Tubo 1	19,6%	MPEG2/20
mPEG 2.000 - 0,2 mL Tubo 2	28,3%	MPEG2/30
mPEG 2.000 - 0,3 mL Tubo 3	39,6 %	MPEG2/40
mPEG 5.000 - 0,1 mL Tubo 4	20,3%	MPEG5/20
mPEG 5.000 - 0,2 mL Tubo 5	31,2%	MPEG5/30
mPEG 5.000 - 0,3 mL Tubo 6	40,7%	MPEG5/40
mPEG 5.000 - 0,2 mL Tubo 7 com Sulfato de Sódio	32,5%	MPEG5/SS

NOTAS: MPEG = veneno conjugado ao mPEG;

5/20 = mPEG 5.000 com 20% de peglação do veneno de *B. jararaca*;

5/30 = mPEG 5.000 com 30% de peglação do veneno de *B. jararaca*;

5/40 = mPEG 5.000 com 40% de peglação do veneno de *B. jararaca*;

2/20 = mPEG 2.000 com 20% de peglação do veneno de *B. jararaca*;

2/30 = mPEG 2.000 com 30% de peglação do veneno de *B. jararaca*;

2/40 = mPEG 2.000 com 40% de peglação do veneno de *B. jararaca*;

5/SS = mPEG 5.000 com 30% de peglação do veneno de *B. jararaca* em solução de Sulfato de Sódio.

A determinação do grau de peglação das proteínas é essencial para medir a intensidade residual da atividade biológica da proteína, pois diversos autores descreveram a correlação entre o nível de peglação, atividade biológica e imunogenicidade de biofármacos (MATSUSHIMA *et al.*, 1996; SO *et al.*, 1999).

Apesar do método de TNBS ser usado extensivamente para determinação de aminos livres, derivadas de lisina, este método se mostrou sempre superdimensionado quando comparado a outros métodos mais sofisticados, tais como eletroforese capilar, espectrometria de massa a laser (MALDI-MS – *matrix-assisted laser desorption/ionization-mass spectrometry*) e Raman espectrometria (BULLOCK *et al.*, 1997). Ou seja, os resultados obtidos pelo método de TNBS sempre resultam em maior quantidade de aminos de lisina livres do que complexadas ao mPEG quando comparados a outros testes para a mesma finalidade. Contudo, é um método prático e que necessita de pouca sofisticação, dando uma noção comparativa da presença de mPEG associada a proteína.

4.2. Determinação da toxicidade

4.2.1. Citotoxicidade pela sobrevivência celular

As doses citotóxicas para o número total de células foram calculadas através da análise de probitos (FINNEY, 1971) que determinaram a concentração de veneno responsável pela diminuição de 50% do número total de células. Para esta determinação foi calculada a média geométrica dos resultados da absorbância das três repetições de cada diluição de veneno testada e relacionadas com o controle negativo, ou seja, 100% de sobrevivência celular. O número de probitos (número plotado no eixo da abscissa para cálculo da dose efetiva 50%) é calculado a partir da divisão da média da absorbância de cada diluição pela média da absorbância do controle negativo multiplicado por 100. Após a determinação da porcentagem relativa para cada diluição o número de probitos é obtido pela tabela descrita por Finney.

Os resultados obtidos estão no GRÁFICO 1 e no QUADRO 8.

GRÁFICO 1 – DOSE CITOTÓXICA 50% DOS VENENOS CONJUGADOS AO MPEG E NÃO CONJUGADOS

QUADRO 8 – NÍVEL DE SIGNIFICÂNCIA DA CITOTOXICIDADE EM RELAÇÃO AO VENENO NÃO CONJUGADO POR DETERMINAÇÃO DA DOSE CITOTÓXICA 50% (DCTX₅₀)

TRATAMENTO	Intervalo de P
MPEG2/20	0,001 < P < 0,01
MPEG2/30	0,001 < P < 0,01
MPEG2/40	P < 0,001
MPEG5/20	0,001 < P < 0,01
MPEG5/30	P < 0,001
MPEG5/40	P < 0,001
MPEG5/SS	0,001 < P < 0,01

NOTA: MPEG = veneno conjugado ao mPEG.

5/20 = mPEG 5.000 com 20% de peglação do veneno de *B. jararaca*;

5/30 = mPEG 5.000 com 30% de peglação do veneno de *B. jararaca*;

5/40 = mPEG 5.000 com 40% de peglação do veneno de *B. jararaca*;

2/20 = mPEG 2.000 com 20% de peglação do veneno de *B. jararaca*;

2/30 = mPEG 2.000 com 30% de peglação do veneno de *B. jararaca*;

2/40 = mPEG 2.000 com 40% de peglação do veneno de *B. jararaca*;

5/SS = mPEG 5.000 com 30% de peglação do veneno de *B. jararaca* em solução de Sulfato de Sódio.

O resultado acima demonstra claramente a redução da atividade citopática do veneno para a célula CHO quando peglado. Esta diminuição da concentração celular pode ter ocorrido em função do veneno de *Bothrops jararaca* ter uma atividade proteolítica sobre a matriz celular. Deste modo, o veneno em si não teria uma ação citotóxica, mas sim uma ação proteolítica (BULTRONA; THELESTAMB; GUTIÉRREZ, 1993). Contudo, a ação proteolítica sobre a matriz celular também é um parâmetro de toxicidade ou atividade biológica que, tudo indica, perdeu significativamente a atividade citopática ou de descolamento celular em função do grau de peglação que o veneno recebeu. Observa-se também que não houve diferença significativa entre os tamanhos de mPEG utilizado. Nos mesmos graus de peglação houve uma redução semelhante da atividade citopática quando comparado apenas o mPEG 2.000 e o mPEG 5.000.

Para determinar a atividade citotóxica do veneno é necessário determinar a concentração ou pelo menos a proporção de LDH livre no meio de cultura após o tratamento.

4.2.2. Método de citotoxicidade por determinação de LDH celular

O LDH é uma enzima citoplasmática presente em todas as células, é rapidamente detectável em sobrenadantes de meio de cultivo após a lise da membrana celular. Não existe LDH no veneno das serpentes (SZEKERES; PACSA; PEJTSIK, 1981).

Os resultados obtidos estão demonstrado no GRÁFICO 2 e no QUADRO 9.

GRÁFICO 2 – PORCENTAGEM DE CITOTOXICIDADE ATRAVÉS DA DETERMINAÇÃO DE LDH

QUADRO 9 – NÍVEL DE SIGNIFICÂNCIA DA CITOTOXICIDADE EM RELAÇÃO AO VENENO NÃO CONJUGADO ATRAVÉS DA PORCENTAGEM DE CITOTOXICIDADE

TRATAMENTO	Intervalo de P em relação ao veneno não conjugado
MPEG2/20	0,001 < P < 0,01
MPEG2/30	P < 0,001
MPEG2/40	P < 0,001
MPEG5/20	0,001 < P < 0,01
MPEG5/30	0,001 < P < 0,01
MPEG5/40	P < 0,001
MPEG5/SS	P < 0,001

NOTA: MPEG = veneno conjugado ao mPEG;

5/20 = mPEG 5.000 com 20% de peglação do veneno de *B. jararaca*;

5/30 = mPEG 5.000 com 30% de peglação do veneno de *B. jararaca*;

5/40 = mPEG 5.000 com 40% de peglação do veneno de *B. jararaca*;

2/20 = mPEG 2.000 com 20% de peglação do veneno de *B. jararaca*;

2/30 = mPEG 2.000 com 30% de peglação do veneno de *B. jararaca*;

2/40 = mPEG 2.000 com 40% de peglação do veneno de *B. jararaca*;

5/SS = mPEG 5.000 com 30% de peglação do veneno de *B. jararaca* em solução de Sulfato de Sódio.

De modo similar ao que foi observado na citotoxicidade por sobrevivência celular, a concentração de LDH também foi reduzida significativamente nos venenos tratados com as diversas formulações de mPEG. Contudo, não foi observada diferença de citotoxicidade em função do tamanho do mPEG (2.000Da ou 5.000Da) bem como no tratamento com sulfato de sódio.

A metodologia de dosagem do LDH tem sido amplamente empregada para estudo da toxicidade de medicamentos, cosméticos, alimentos, meio ambiente, morte de células em biorreator, enfim uma série de estudos que deixaram de usar animais de laboratório (COURJAULT *et al.*, 1993).

Os ensaios de citotoxicidade se tornaram uma ferramenta adequada para viabilizar testes de substâncias sobre as quais não se conhecia o efeito patológico. Isto porque os ensaios com animais de laboratório vêm se tornando cada vez mais restritos em função da conscientização ética do bem-estar dos mesmos. O teste de citotoxicidade não substituirá aqueles realizados com animais de laboratório, porém direcionará a utilização dos ensaios *in vivo* reduzindo o número de animais de laboratório.

A citotoxicidade do veneno de *Bothrops jararaca* já foi demonstrada em diversos experimentos (COLLARES-BUZATO; DE PAULA LE SUEUR; DA CRUZ-HOFLING, 2002; LOMONTE *et al.*, 1999). Porém os primeiros trabalhos (CHAIM-MATYAS; OVADIA, 1987; LOMONTE *et al.*, 1993) demonstraram que a contagem de células como único fator de determinação da citotoxicidade não era o melhor método. A medida da citotoxicidade por contagem celular baseia-se, principalmente, no número de células vivas que permaneceu aderente à placa de cultivo. Todavia, enzimas proteolíticas do veneno atuam sobre a matriz de adesão celular provocando o seu deslocamento, efeito semelhante à tripsina, (*trypsin-like*), porém mantêm as células vivas (BORKOW; GUTIERREZ; OVADIA, 1995).

Estes mesmos autores fizeram a proposta de se determinar a concentração de LDH e verificaram que somente altas concentrações de veneno são indutoras do efeito citopático.

No presente trabalho utilizou-se as duas metodologias de determinação da citotoxicidade. Uma baseada na contagem celular modificada em laboratório de cultura de célula do Instituto Butantan, de modo a obter uma maior precisão dos resultados. O Azul de Evans, que tem a propriedade de corar somente células vivas, foi usado logo após o período de utilização do veneno. Em seguida, com as células já fixadas pela acetona, foram rompidas com SDS 10%, liberando o corante do citoplasma celular cuja concentração foi lida em espectrofotômetro a 540nm.

Desta forma, os resultados obtidos foram comparados com uma outra metodologia, a de dosagem de enzimas citoplasmáticas (LDH). Estes resultados demonstram que os venenos conjugados ao mPEG diminuíram ou perderam a sua atividade citotóxica.

4.2.3. Determinação da toxicidade por atividade da fosfolipase A2

A fosfolipase A2 dos venenos de serpentes possui uma vasta atividade biológica, principalmente a de promover a instabilidade nas membranas celulares propiciando a penetração de outras enzimas na célula. A fosfolipase A2 de baixo peso molecular constitui uma família de proteínas que hidrolisam o fosfolipídio na presença de cálcio liberando ácidos graxos e lisofosfolipídios. A fosfolipase A2 é responsável pela liberação, no organismo, do ácido aracdônico, responsável pela biossíntese de diversos mediadores lipídicos da inflamação, tais como prostaglandinas, protaciclina, tromboxano, leucotrienos entre outros. A fosfolipase A2 dos venenos de serpentes leva a uma necrose muito rápida do músculo esquelético. Sendo assim, determinar a atividade da fosfolipase A2 em venenos pode ser importante na interpretação do mecanismo fisiopatológico do mesmo (TEIXEIRA *et al.*,

2003). No presente trabalho a atividade fosfolipase A2 foi determinada através da ação hemolítica indireta (resultados apresentados no GRÁFICO 3).

GRÁFICO 3 – DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE HEMOLÍTICA INDIRETA DA FOSFOLIPASE A2

Os resultados encontrados demonstram que o mPEG, independente do tamanho, foi capaz de reduzir a atividade hemolítica indireta mediada pela fosfolipase A2 e que o grau de peglação influencia drasticamente na perda da atividade biológica, sugerindo que provavelmente tenha ocorrido uma neutralização alostérica da enzima, em razão do preenchimento das aminos pelo mPEG.

Este mecanismo também foi observado quando enzimas de uso terapêutico foram tratadas com mPEG, porém apesar da redução da atividade enzimática, estas não eram mais reconhecidas por anticorpos específicos e se tornaram resistentes a degradações causadas pelo meio ambiente (HE; ZHANG; HE, 2.000).

4.2.4. Curva de crescimento dos animais imunizados

É importante, quando se usa animal de laboratório, acompanhar o ganho de peso durante o período que este permanece em experimento. Este monitoramento tem dois objetivos: 1º - validar o experimento em relação a qualquer interferência ambiental, de modo que o ganho de peso possa ter sido prejudicado por doenças inaparentes (ex: verminose, ectoparasito ou vírus da hepatite murina); 2º - verificar a interferência experimental em si, pois certos hormônios, citocinas e vias de imunização, podem levar a uma acentuada perda de peso devida a produção de TNF e IL-1, ou seja, são mecanismos caquetizante em função do experimento. A curva de ganho de peso está plotada no GRÁFICO 4.

GRÁFICO 4 – MONITORAMENTO DO GANHO DE PESO DE CAMUNDONGOS IMUNIZADOS COM VENENO NÃO CONJUGADO E CONJUGADO EM 30% DE MPEG 2.000 E MPEG 5.000

Com este resultado pode-se observar que existe uma perda de peso inicial dos animais que receberam veneno não conjugado ao mPEG, enquanto que os animais que receberam o

veneno peglado apresentaram ganho de peso normal. Isto pode ocorrer em função da ativação do ácido aracdônico *in vivo*, desencadeando no animal que recebeu veneno não conjugado uma reação inflamatória que pode levar a uma perda de peso. Para identificar se realmente houve algum mecanismo tóxico ou até mesmo fisiopatológico nos animais imunizados é imprescindível a determinação da concentração da creatina quinase sérica, de modo a demonstrar a possível atividade miotóxica do veneno de *Bothrops jararaca*.

Em relação à perda de peso verificado nos animais submetidos à imunização, não existe correlação entre este fenômeno e a toxicidade, visto que diversos processos inflamatórios com a expressão de citocinas caquetizantes poderiam levar ao mesmo efeito. Mas o que se pode notar, porém sem nenhuma afirmação da causa, é que os venenos peglados não levaram a perda de peso inicial, como ocorreu com os animais que receberam veneno não conjugado ao mPEG.

4.2.5. Determinação da creatina quinase (CK) em camundongos

Todos os métodos descritos foram desenvolvidos *in vitro*, porém para demonstrar a diminuição da toxicidade de veneno conjugado ao mPEG, principalmente no que se refere a sua atividade miotóxica, foi determinada a concentração de CK sérica nos camundongos imunizados, pois o veneno de *Bothrops jararaca* possui atividade mionecrótica, e esta atividade pode ser monitorada pela concentração sanguínea de CK. Contudo, a presença de fração que exerça atividade miotóxica direta como encontradas em outros venenos de *Bothrops*, tais como: *B. jararacussu*, *B. moojeni*, *B. newiedi* e *B. pradoi*; parece existir em baixa concentração no veneno de *B. jararaca* (MOURA DA SILVA *et al.*, 1991). Apesar disto, o veneno de *Bothrops jararaca* possui uma atividade miotóxica razoável, pois os níveis

de CK séricos são variáveis e acredita-se que neste caso específico a miotoxicidade seja causada pela isquemia e, conseqüentemente, leve à lesão tecidual (FERREIRA *et al.*, 1992).

A creatina quinase é uma enzima localizada dentro do citoplasma do músculo estriado, a sua função é de formação de ATP a partir da creatina fosfato mais ADP. Contudo, quando encontrada no soro, indica que houve ruptura do sarcolema, membrana que envolve o citoplasma da célula muscular, demonstrando que houve lesão muscular.

Os resultados obtidos estão expressos no GRÁFICO 5 e QUADRO 10.

GRÁFICO 5 – CONCENTRAÇÃO SÉRICA DE CREATINA QUINASE EM CAMUNDONGOS IMUNIZADOS COM VENENO CONJUGADO AO MPEG E NÃO CONJUGADO

QUADRO 10 - NÍVEL DE SIGNIFICÂNCIA ENTRE AS DIVERSAS AMOSTRAS DE VENENO CONJUGADO E VENENO NÃO CONJUGADO EM RELAÇÃO AO CONTROLE NA DETERMINAÇÃO DA CREATINA QUINASE

AMOSTRA	Valor de P em referência ao controle
Veneno Não Conjugado	$P < 0,001$
MPEG2/20	$0,01 < P < 0,05$
MPEG2/30	$0,06 < P < 0,07$
MPEG2/40	$0,4 < P < 0,5$
MPEG5/20	$0,01 < P < 0,05$
MPEG5/30	$0,09 < P < 0,1$
MPEG5/40	$0,4 < P < 0,5$
MPEG5/SS	$0,2 < P < 0,3$

NOTA: MPEG = veneno conjugado ao mPEG.

5/20 = mPEG 5.000 com 20% de peglação do veneno de *B. jararaca*;

5/30 = mPEG 5.000 com 30% de peglação do veneno de *B. jararaca*;

5/40 = mPEG 5.000 com 40% de peglação do veneno de *B. jararaca*;

2/20 = mPEG 2.000 com 20% de peglação do veneno de *B. jararaca*;

2/30 = mPEG 2.000 com 30% de peglação do veneno de *B. jararaca*;

2/40 = mPEG 2.000 com 40% de peglação do veneno de *B. jararaca*;

5/SS = mPEG 5.000 com 30% de peglação do veneno de *B. jararaca* em solução de Sulfato de Sódio.

O mPEG tem sido aplicado para a redução da toxicidade de substâncias terapêuticas de origem biológica, principalmente antibióticos, anticancerígenos e antivirais (HE *et al.*, 1999; TSUTSUMI *et al.*, 2.000). O emprego do mPEG na destoxificação de substâncias é conhecido desde 1992, quando começou a ser utilizado em produtos anticancerígenos (YOKOYAMA *et al.*, 1993).

Recentemente, a tricosantina, produto extraído da *Trichosanthes kirilowii*, foi peglada de modo a estender o seu tempo de ação farmacológica (HE *et al.*, 1999). Entre suas atividades terapêuticas, a tricosantina é utilizada para induzir aborto terminal, controlar a gravidez ectópica, tratar de coriocarcinoma e, mais recentemente, como bloqueador da replicação do HIV-1 (MCGRATH *et al.*, 1989). A tricosantina é relativamente tóxica e induz efeitos adversos bastante acentuados em humanos. A peglação possibilitou a redução da dose

terapêutica demonstrada através da perda da toxicidade. Esta redução se deu em parte pelo aumento da meia-vida no organismo da tricosantina peglada, conseqüentemente, com a perda relativa da toxicidade houve uma diminuição da dose tornando-se uma droga segura sob o ponto de vista de reação adversa.

Resultados semelhantes foram observados *in vivo* nos camundongos, com veneno de *Bothrops jararaca*, quando determinada a concentração da creatina quinase sérica, cujo aumento na corrente sangüínea indica um processo de necrose muscular ou fenômeno isquêmico. A diminuição e perda da atividade hemolítica, as quais estão relacionadas com a perda da atividade da fosfolipase A2 do veneno quando conjugado ao mPEG, parecem ser proporcionais ao grau de peglação, ou seja, existe uma redução de 50% da atividade hemolítica indireta para os venenos com 20% de aminos pegladas, 95% da atividade hemolítica indireta para os venenos com 30% de aminos pegladas e 100% da atividade hemolítica indireta com os venenos com 40% de aminos pegladas. Logo, do ponto de vista de perda da toxicidade, tantos os ensaios *in vitro* como *in vivo* demonstraram que a peglação é responsável pela diminuição ou até mesmo a perda da ação fisiopatológica do veneno, seja por diminuir a atividade miotóxica ou por diminuir a atividade isquêmica causada por formação de trombos vasculares.

Neste trabalho os resultados demonstram que o mPEG tem a propriedade de reduzir ou até mesmo eliminar a toxicidade do veneno de *Bothrops jararaca* o qual possui uma série de proteínas com propriedades físico-químicas e fisiopatológica diversificadas.

As principais atividades biológicas dos venenos se originam de toxinas específicas e têm propriedades de causar os seguintes efeitos: hemorragia, necrose, coagulação, hemólise, incoagulabilidade sangüínea, edema, distúrbio neural e outras que, quando associadas, podem levar à morte (WHO, 1981).

4.3. Análise da atividade antigênica e imunogênica

Os resultados encontrados neste trabalho não divergem daqueles encontrados nas referências científicas, a não ser por informações adicionais que esclarecem os fenômenos de tolerância e adjuvantividade induzidos pelo mPEG.

Proteínas com potencial farmacológico têm sido amplamente utilizadas, tendo sido sua primeira aplicação em 1920 com a insulina de origem bovina. Contudo, a imunogenicidade das proteínas de origem não humana fez com que a utilização desse potencial terapêutico fosse reduzida, principalmente pelas reações adversas encontradas, bem como o curto período de ação terapêutica (HEMELING *et al.*, 2004).

O uso do mPEG vem se destacando justamente por ser uma substância relativamente inerte no organismo humano. Quando associado a proteína heterólogas diminui as suas reações adversas, aumenta o seu poder terapêutico, amplia o período de utilização e diminui o número ou concentração das doses (BALLICO; DRIOLLI; BONORA, 2005; LEE *et al.*, 2005; YUN *et al.*, 2005).

4.3.1. Ensaio imunoenzimático para titulação de anticorpos antiveneno de *Bothrops jararaca* obtidos por diferentes antígenos de veneno peglado em camundongos

O primeiro estudo de antigenicidade realizado foi a determinação da resposta imune humoral de camundongos imunizados com venenos conjugados ao mPEG. Para isto, foi utilizado ensaio imunoenzimático o qual determinou o título médio 50% .

Os resultados estatísticos estão representados através dos GRÁFICOS 6 e 7 e nos QUADROS 11, 12, 13 e 14, que representam os índices de significância dos títulos obtidos nas respostas primária e secundária em relação ao controle e ao veneno não conjugado.

GRÁFICO 6 – DETERMINAÇÃO DOS TÍTULOS PARA IgM DA RESPOSTA PRIMÁRIA E SECUNDÁRIA DE SORO DE CAMUNDONGOS IMUNIZADOS COM VENENO CONJUGADO AO MPEG E NÃO CONJUGADO

QUADRO 11 – VALORES DE $P < 0,05$ PARA NÍVEL DE SIGNIFICÂNCIA DA RESPOSTA IMUNE PRIMÁRIA PARA IgM DE CAMUNDONGOS IMUNIZADOS COM VENENO CONJUGADO AO MPEG OU NÃO, COMPARADOS POR TESTE t DE STUDENT COM O CONTROLE E A RESPOSTA AO VENENO NÃO CONJUGADO

Resposta Primária para IgM	CONTROLE(-)	Veneno não Conjugado
CONTROLE (-)		0,001 < P < 0,01
Veneno não Conjugado	0,001 < P < 0,01	
MPEG2/20	0,001 < P < 0,01	0,2 < P < 0,3
MPEG2/30	0,001 < P < 0,01	0,001 < P < 0,01**
MPEG2/40	P = 0,5	0,001 < P < 0,01**
MPEG5/20	0,001 < P < 0,01	0,1 < P < 0,2
MPEG5/30	0,001 < P < 0,01	0,01 < P < 0,05**
MPEG5/40	0,2 < P < 0,3	0,001 < P < 0,01**
MPEG5/SS	0,001 < P < 0,01	0,05 < P < 0,06

NOTA: ** diferença significativa para baixo, ou seja, os venenos conjugados ao mPEG tiveram uma resposta significativamente menor que o veneno integral.

QUADRO 12 – VALORES DE $P < 0,05$ PARA NÍVEL DE SIGNIFICÂNCIA DA RESPOSTA IMUNE SECUNDÁRIA PARA IgM DE CAMUNDONGOS IMUNIZADOS COM VENENO CONJUGADO AO MPEG OU NÃO, COMPARADOS PELO TESTE t DE STUDENT COM O CONTROLE E A RESPOSTA AO VENENO NÃO CONJUGADO

Resposta Secundária para IgM	CONTROLE(-)	Veneno não Conjugado
CONTROLE (-)		0,01 < P < 0,05
Veneno não Conjugado	0,01 < P < 0,05	
MPEG2/20	0,01 < P < 0,05	0,01 < P < 0,05
MPEG2/30	0,01 < P < 0,05	0,01 < P < 0,05**
MPEG2/40	0,2 < P < 0,3	0,2 < P < 0,3
MPEG5/20	0,001 < P < 0,01	0,001 < P < 0,01
MPEG5/30	0,01 < P < 0,05	0,001 < P < 0,01**
MPEG5/40	0,2 < P < 0,3	0,01 < P < 0,05**
MPEG5/SS	0,01 < P < 0,05	0,2 < P < 0,3

NOTA: ** diferença significativa para baixo, ou seja os venenos conjugados ao mPEG tiveram uma resposta significativamente menor que o veneno integral.

GRÁFICO 7 – DETERMINAÇÃO DOS TÍTULOS PARA IgG DA RESPOSTA PRIMÁRIA E SECUNDÁRIA DE SORO DE CAMUNDONGOS IMUNIZADOS COM VENENO CONJUGADO AO MPEG E NÃO CONJUGADO

QUADRO 13 – VALORES DE $P < 0,05$ PARA NÍVEL DE SIGNIFICÂNCIA DA RESPOSTA IMUNE PRIMÁRIA PARA IgG DE CAMUNDONGOS IMUNIZADOS COM VENENO CONJUGADO AO MPEG OU NÃO, COMPARADOS PELO TESTE t DE STUDENT COM O CONTROLE E A RESPOSTA AO VENENO NÃO CONJUGADO

Resposta Primária para IgG	CONTROLE(-)	Veneno não Conjugado
CONTROLE (-)		$0,001 < P < 0,01$
Veneno não Conjugado	$0,001 < P < 0,01$	
MPEG2/20	$0,01 < P < 0,05$	$0,4 < P < 0,5$
MPEG2/30	$0,01 < P < 0,05$	$0,1 < P < 0,2$
MPEG2/40	$0,1 < P < 0,2$	$0,001 < P < 0,01^{**}$
MPEG5/20	$0,001 < P < 0,01$	$0,3 < P < 0,4$
MPEG5/30	$0,001 < P < 0,01$	$0,3 < P < 0,4$
MPEG5/40	$P = 0,5$	$0,001 < P < 0,01^{**}$
MPEG5/SS	$0,001 < P < 0,01$	$0,3 < P < 0,4$

NOTA: ** diferença significativa para baixo, ou seja os venenos conjugados ao mPEG tiveram uma resposta significativamente menor que o veneno integral.

QUADRO 14 – VALORES DE $P < 0,05$ PARA NÍVEL DE SIGNIFICÂNCIA DA RESPOSTA IMUNE SECUNDÁRIA PARA IgG DE CAMUNDONGOS IMUNIZADOS COM VENENO CONJUGADO AO MPEG OU NÃO, COMPARADOS PELO TESTE t DE STUDENT COM O CONTROLE E A RESPOSTA AO VENENO NÃO CONJUGADO

Secundária IgG	CONTROLE(-)	Veneno não Conjugado
CONTROLE (-)		$0,001 < P < 0,01$
Veneno não Conjugado	$0,001 < P < 0,01$	
MPEG2/20	$0,001 < P < 0,01$	$0,001 < P < 0,01$
MPEG2/30	$0,001 < P < 0,01$	$0,01 < P < 0,05$
MPEG2/40	$0,3 < P < 0,4$	$0,001 < P < 0,01^{**}$
MPEG5/20	$0,001 < P < 0,01$	$0,001 < P < 0,01$
MPEG5/30	$0,001 < P < 0,01$	$0,1 < P < 0,2$
MPEG5/40	$P = 0,5$	$0,001 < P < 0,01^{**}$
MPEG5/SS	$0,001 < P < 0,01$	$0,01 < P < 0,05$

NOTA: ** diferença significativa para baixo, ou seja os venenos conjugados ao mPEG tiveram uma resposta significativamente menor que o veneno integral.

Os efeitos imunológicos encontrados neste trabalho já foram, de certa forma, descritos, porém não caracterizados. Isto é devido ao fato de, na maioria das referências existentes, só terem sido observados os fenômenos de tolerância para as proteínas pegladas de uso terapêutico (ATASSI *et al.*, 1992; CALICETI; VERONESE, 2003; CALICETI; VERONESE; JONAK, 1999; CHEN *et al.*, 1994; FUKUSHIMA *et al.*, 1999; MOHAPATRA *et al.*, 1993; TAKATA *et al.*, 1990). A maioria destes trabalhos apenas comprovou que a concentração de anticorpos era bem menor do que se esperava quando são utilizadas proteínas heterólogas como fármacos. Ou, ainda, alguns destes trabalhos isolaram e clonaram células imunossupressoras, em função de não conhecerem os mecanismos de interação entre células Th1 e Th2.

A produção de anticorpos foi mais acentuada com venenos conjugados ao mPEG em baixo grau de substituição da amina (MPEG2/20 e MPEG5/20) do que com o veneno não conjugado. Por outro lado, um alto grau de substituição da amina (MPEG2/40 e MPEG5/40) ocasionaria uma redução significativa na formação de anticorpos específicos contra o veneno de *Bothrops jararaca*. Apesar da maioria das referências descreverem este fenômeno da ausência de anticorpos aos antígenos peglados, So e colaboradores (1999) demonstraram que a ovoalbumina, quando peglada com 17% dos seus sítios de amina ocupados, apresentou efeito adjuvante.

Alguns polímeros podem ser usados como carreadores efetivos de proteínas e no desenvolvimento de sistemas de fornecimento de vacinas biodegradáveis e biocompatíveis como lipossomos, microesferas, nanopartículas ou polímeros sintéticos solúveis. Todos estes polímeros têm recebido considerável atenção pois podem ser adaptados para interagir com um antígeno particular através da suas características físico-químicas e imunogênicas (RIHOVA, 2002).

Como mencionado anteriormente, a interação dos peptídeos com o MHC classe-II ocorre subsequente após a acidificação dos endossomos, onde estão contidos os antígenos, levando à fusão com o lisossomo. Quando ocorre o bloqueio destas acidificações a apresentação de antígeno fica comprometida, podendo inclusive ser bloqueada. Fármacos, tais como a cloroquina, utilizada no tratamento da malária, aumentam o pH nos vacúolos e inibem a apresentação de antígenos que sofreram endocitose. Contudo, o sistema de fornecimento antigênico, que participa da acidificação do endossoma, proporciona a interação deste com o MHC classe-II. Este é um mecanismo pelo qual as nanopartículas e micropartículas de poli(lactato-co-glicólico) agem. Os resíduos ácidos monoméricos do lactato ou glicólico ou oligômeros solúveis são responsáveis pela liberação de próton dentro do endossoma durante a erosão do polímero, o qual inicia a apresentação do MHC classe – II (CHEFALO; HARDING, 2001).

De outro ponto de vista, formulações farmacêuticas que contêm polímeros ou excipientes básicos (ex: quitosana, etileno imina, colágeno, poli-fosfatos, alguns substitutos das ligninas e dextran, como também lipídios aniônicos e surfactantes) podem promover a propriedade “scavenger”, bem como limitar a apresentação do antígeno pelo MHC classe-II. De fato, o quitosano tem sido mostrado como promotor da resposta por citocinas de Th1 e apresentação do antígeno com a classe I do MHC (STRONG; CLARK; REID, 2002).

Outro mecanismo envolvido para antígenos indutores da tolerância refere-se à concepção de fornecimento de vacinas. Sabe-se que a duração do estímulo antigênico é essencial para estimular células T não estimuladas (naïve) e células T efectoras. O fato é que células T não estimuladas requerem uma sinalização prolongada, ao redor de 20hs até 3 dias, enquanto as células T efectoras necessitam de apenas 1 hora de estimulação antigênica, enquanto que estímulos prolongados induzem a morte de células T efectoras (LOFTHOUSE, 2002).

Com base nesta afirmativa, os resultados da presente pesquisa demonstram que um alto grau de peglação pode levar a um sistema contínuo de fornecimento de estímulo antigênico, já que a degradabilidade das proteínas pegladas está diminuída, ou seja, o tempo de biodisponibilidade no organismo está aumentado. Contudo, o equilíbrio do fornecimento é essencial ao sucesso da produção de anticorpos ou ao sucesso de indução da tolerância, pois altos níveis de ativação de células T e uma alta frequência de expressão de complexos MHC-peptídeo geralmente são seguidos por anergia das células T (SWITZER *et al.*, 1998).

Soares e colaboradores (2002) demonstraram que a L-asparaginase peglada apresenta um acentuado aumento da estabilidade em pH ácido (pH 3,5), indicativo de um aumento de resistência estrutural em pH onde naturalmente a molécula seria desnaturada. Isto poderia explicar o fato de que o aumento da peglação seria responsável por um aumento no tempo de processamento antigênico dentro do endossoma em função da sua resistência ao pH ácido.

4.3.2. Determinação da concentração de citocinas

Para entender os mecanismos de controle da resposta imunológica, foram determinadas as concentrações das IL-4 e IL-5 para conhecer o desempenho de linfócitos Th2 e IL-2, TNF- α e INF- γ para a ativação de linfócito Th1. Os resultados se encontram nos GRÁFICOS 13, 14, 15, 16 e 17 e no QUADRO 15.

GRÁFICO 8 - CONCENTRAÇÕES DE IL-4 OBTIDAS APÓS A IMUNIZAÇÃO SECUNDÁRIA DE CAMUNDONGOS COM VENENOS CONJUGADOS AO MPEG E NÃO CONJUGADOS

GRÁFICO 9 - CONCENTRAÇÕES DE IL-5 OBTIDAS APÓS A IMUNIZAÇÃO SECUNDÁRIA DE CAMUNDONGOS COM VENENOS CONJUGADOS AO MPEG E NÃO CONJUGADOS

GRÁFICO 10 – CONCENTRAÇÕES DE IL-2 OBTIDAS APÓS A IMUNIZAÇÃO SECUNDÁRIA DE CAMUNDONGOS COM VENENOS CONJUGADOS AO MPEG E NÃO CONJUGADOS

GRÁFICO 11 – CONCENTRAÇÕES DE INF- γ OBTIDAS APÓS A IMUNIZAÇÃO SECUNDÁRIA DE CAMUNDONGOS COM VENENOS CONJUGADOS AO MPEG E NÃO CONJUGADOS

GRÁFICO 12 – CONCENTRAÇÕES DE TNF- α OBTIDAS APÓS A IMUNIZAÇÃO SECUNDÁRIA DE CAMUNDONGOS COM VENENOS CONJUGADOS AO MPEG E NÃO CONJUGADOS

QUADRO 15 – NÍVEL DE SIGNIFICÂNCIA PARA CONCENTRAÇÃO DE CITOCINAS COMPARANDO A PRODUÇÃO POR LINFÓCITO DE ANIMAIS IMUNIZADOS COM VENENO CONJUGADO AO MPEG E VENENO NÃO CONJUGADO

Veneno	IL - 4	IL - 5	IL-2	INF - γ	TNF - α
MPEG2/20	0,01 < P < 0,05	P < 0,001	0,001 < P < 0,01	0,001 < P < 0,01	0,001 < P < 0,01
MPEG2/30	0,1 < P < 0,2	0,1 < P < 0,2	0,5 < P < 0,6	0,001 < P < 0,01	0,001 < P < 0,01
MPEG2/40	P < 0,001	P < 0,001	0,001 < P < 0,01	0,001 < P < 0,01	P < 0,001
MPEG5/20	0,01 < P < 0,05	0,01 < P < 0,05	0,001 < P < 0,01	0,001 < P < 0,01	0,001 < P < 0,01
MEPEG5/30	0,1 < P < 0,2	0,001 < P < 0,01	0,09 < P < 0,1	0,01 < P < 0,05	0,001 < P < 0,01
MPEG5/40	0,001 < P < 0,01	0,001 < P < 0,01	P < 0,001	0,001 < P < 0,01	P < 0,001
MEPEG5/SS	0,001 < P < 0,01	0,001 < P < 0,01	0,1 < P < 0,2	0,01 < P < 0,05	0,01 < P < 0,05

NOTA: MPEG = veneno conjugado ao mPEG.

5/20 = mPEG 5.000 com 20% de peglação de veneno de *B. jararaca*;

5/30 = mPEG 5.000 com 30% de peglação de veneno de *B. jararaca*;

5/40 = mPEG 5.000 com 40% de peglação de veneno de *B. jararaca*;

2/20 = mPEG 2.000 com 20% de peglação de veneno de *B. jararaca*;

2/30 = mPEG 2.000 com 30% de peglação de veneno de *B. jararaca*;

2/40 = mPEG 2.000 com 40% de peglação de veneno de *B. jararaca*;

5/SS = mPEG 5.000 com 30% de peglação de veneno de *B. jararaca* em solução de Sulfato de Sódio.

Pelos dados apresentados, para MPEG2/20 e MPEG5/20 foram encontrados os mesmos resultados e também se observou um aumento na concentração de IL-4 e IL-5 (atividade Th2). Porém, uma produção menor de INF- γ , IL-2 e TNF- α (atividade Th1). Todavia, os venenos com maior grau de peglação mostraram justamente o contrário, ou seja, diminuição na produção de IL-4 e IL-5 e aumento expressivo nas IL-2, INF- γ e TNF- α . Estes resultados demonstram que a introdução de material sintético no organismo afeta diferentes sistemas, incluindo o sistema de defesa. Polímeros sintéticos têm uma capacidade limitada no favorecimento de produção de anticorpos ou indução a uma resposta imune celular contra um determinado antígeno (SHIBATA *et al.*, 2001; SORIMACHI, *et al.*, 1999; UENO *et al.*, 2002), principalmente na ativação ou supressão das células NK (*Natural Killer*) e macrófagos (RIHOVA, 2002).

Os resultados encontrados permitem concluir que realmente com o aumento do grau de peglação e do tamanho do polímero há uma diminuição da resposta imune humoral, porém devido principalmente ao aumento das citocinas responsáveis pela ativação das células Th1 (IL-2, INF- γ e TNF- α). Deste modo, existe a possibilidade da quantidade de peglação interferir na acidificação do endossoma. Ou ainda que apesar do balanço Th1/Th2 poder ser manipulado, o veneno de *Bothrops jararaca* pode não ser o melhor modelo de estudo, pois sua atividade proteolítica pode hidrolizar o próprio antígeno. Moore e colaboradores (1995) demonstraram que antígenos solúveis do HIV, quando encapsulados em microesferas, induziram a resposta imune por linfócito T citotóxicos (CTL) e que resposta similar foi conseguida com ovoalbumina. Já os lipossomas induzem a uma variedade de resposta imune, pois quando no seu interior há alérgenos a indução é em função das células Th1, porém, quando usado antígenos de *Leishmania* a resposta é predominantemente Th2.

4.3.3. Inibição da atividade hemolítica da fosfolipase A2 do veneno de *Bothrops jararaca* por antivenenos provenientes de animais imunizados com veneno conjugado ao mPEG e não conjugado

Após a determinação da atividade hemolítica do veneno de *Bothrops jararaca*, foi determinada a atividade inibidora da hemólise pelos soros dos coelhos imunizados com vários antígenos de veneno conjugado e não conjugado. A inibição da atividade hemolítica indireta não representa uma total soroneutralização da atividade letal, apenas é mensurado a atividade neutralizante da fosfolipase A2. Os resultados estão expressos no GRÁFICO 13 e no QUADRO 16.

GRÁFICO 13 – ATIVIDADE NEUTRALIZANTE DA HEMÓLISE INDIRETA POR FOSFOLIPASE A2, DO SORO DE COELHO IMUNIZADO COM VENENOS CONJUGADOS AO MPEG E NÃO CONJUGADOS

NOTA: MPEG = veneno conjugado ao mPEG;

5/20 = mPEG 5.000 com 20% de peglação do veneno de *B. jararaca*;

5/30 = mPEG 5.000 com 30% de peglação do veneno de *B. jararaca*;

5/40 = mPEG 5.000 com 40% de peglação do veneno de *B. jararaca*;

2/20 = mPEG 2.000 com 20% de peglação do veneno de *B. jararaca*;

2/30 = mPEG 2.000 com 30% de peglação do veneno de *B. jararaca*;

2/40 = mPEG 2.000 com 40% de peglação do veneno de *B. jararaca*;

5/SS = mPEG 5.000 com 30% de peglação do veneno de *B. jararaca* em solução de Sulfato de Sódio.

QUADRO 16 – ANÁLISE DE SIGNIFICÂNCIA DA INIBIÇÃO DA HEMÓLISE COMPARANDO SOROS ANTIVENENOS ENTRE OS VENENOS CONJUGADOS AO MPEG COM O VENENO NÃO CONJUGADO

Antígeno	Veneno
MPEG2/20	$0,001 < P < 0,01$
MPEG2/30	$0,4 < P < 0,5$
MPEG5/20	$0,01 < P < 0,05$
MEPG5/30	$0,2 < P < 0,3$
MPEG5/SS	$0,01 < P < 0,05$

Pela análise dos resultados, observa-se que quanto maior o grau de peglação do veneno de *Bothrops jararaca*, menor é a resposta imune humoral e, ainda, que um menor grau de peglação exibe um efeito adjuvante maior. Porém, o mais interessante é o fato da obtenção de altos títulos de anticorpo no animal imunizado com veneno de *Bothrops jararaca* conjugado ao mPEG 5.000, na presença de sulfato de sódio. Com isto, conclui-se que é possível direcionar a resposta imune humoral tratando o antígeno com concentrações elevadas de sal, de modo que este exponha os seus sítios hidrofóbicos para serem peglados, de maneira que os anticorpos possam ser dirigidos para epítomos hidrofílicos que se localizam no interior da molécula.

4.3.4. Inibição da atividade citotóxica do veneno de *Bothrops jararaca* por antivenenos provenientes de coelhos imunizados com veneno conjugado ao mPEG e não conjugado

Uma vez determinada a dose citotóxica 50%, verificou-se a atividade inibidora da citotoxicidade pelos soros de camundongos imunizados com veneno conjugado ao mPEG e veneno não conjugado. Os resultados estão expressos no GRÁFICO 14 e no QUADRO 17.

GRÁFICO 14 - ATIVIDADE NEUTRALIZANTE DA CITOTOXICIDADE DO SORO DE COELHO IMUNIZADO COM VENENOS CONJUGADOS AO MPEG E NÃO CONJUGADOS

QUADRO 17 - ANÁLISE DE SIGNIFICÂNCIA DA INIBIÇÃO DA CITOTOXICIDADE COMPARANDO SOROS ANTIVENENOS ENTRE OS VENENOS CONJUGADOS AO MPEG COM VENENO NÃO CONJUGADO

Antígeno	Veneno
MPEG2/20	0,01 < P < 0,05
MPEG2/30	0,4 < P < 0,5
MPEG5/20	0,06 < P < 0,07
MEPG5/30	0,3 < P < 0,4
MPEG5/SS	0,01 < P < 0,05

Do mesmo modo que foi observado na inibição da hemólise indireta por fosfolipase A2, a atividade neutralizante da citotoxicidade por anticorpos específicos somente foi encontrada em preparações de baixo grau de peglação.

Este resultado também demonstra que proteínas complexas, mesmo que pegladas, apresentam epítomos internos e com características hidrofóbicas. Esta característica é acentuada no veneno conjugado ao mPEG na presença de sulfato de sódio, o qual nesta condição expõe os sítios hidrofóbicos das proteínas. Ao analisar todas as características antigênicas e imunogênicas deste tratamento nota-se que a produção de citocinas e de anticorpos é muito próxima à produzida pelo veneno não conjugado, porém os anticorpos oriundos do antígeno MPEG5/SS são mais efetivos nas atividades inibitórias da citotoxicidade e da hemólise por fosfolipase A2.

4.3.5 Immunoblotting

Para se avaliar o grau de reconhecimento antigênico dos venenos peglados, foram realizadas hiperimunização em coelhos. Para esta hiperimunização foi utilizado como antígeno tanto venenos com diferentes graus de peglação como veneno não conjugado.

É indispensável, em uma hiperimunização para produção de soro capaz de neutralizar as atividades fisiopatológicas do veneno, o estudo da sua capacidade de reconhecer epítomos antigênicos. O “immunoblotting” é um teste no qual se pode observar, dentro de uma mistura de proteínas antigênicas, quais as frações que foram reconhecidas. No presente experimento o intuito foi de se descobrir quais frações do veneno integral (não conjugado) seriam reconhecidas por soros de animais imunizados com veneno em diversos graus de peglação. A utilização de veneno não conjugado serviu para obtenção de um controle positivo da atividade

antigênica do veneno de *B. jararaca*. E como controle negativo foi utilizado o soro de um animal inoculado com PBS.

Os resultados estão na Figura 1 e Figura 2.

FIGURA 3 – ELETROFORESE DE VENENO DE *BOTHROPS JARARACA* NÃO CONJUGADO AO MPEG E NÃO TRATADO COM 2-MERCAPTOETANOL, RECONHECIDO POR SORO DE COELHO IMUNIZADO COM VENENOS CONJUGADOS AO MPEG

NOTAS: A –Soro de Coelho Antiveneno de *B. jararaca* MPGE2/20;
 B –Soro de Coelho Antiveneno de *B. jararaca* MPEG2/30;
 C –Soro de Coelho Antiveneno de *B. jararaca* MPEG2/40;
 D –Soro de Coelho Antiveneno de *B. jararaca* MPGE5/20;
 E –Soro de Coelho Antiveneno de *B. jararaca* MPEG5/30;
 F –Soro de Coelho Antiveneno de *B. jararaca* MPEG5/40;
 G –Soro de Coelho Antiveneno de *B. jararaca* MPEG5/SS;
 H –Soro normal de coelho;
 I –Soro de Coelho Antiveneno de *B. jararaca* não conjugado.

FIGURA 4 - ELETROFORESE DE VENENO DE *BOTHROPS JARARACA* NÃO CONJUGADO AO MPEG E TRATADO COM 2-MERCAPTOETANOL, RECONHECIDO POR SORO DE COELHO IMUNIZADO COM VENENOS CONJUGADOS AO MPEG

NOTAS: A –Soro de Coelho Antiveneno de *B. jararaca* MPGE2/20;
 B –Soro de Coelho Antiveneno de *B. jararaca* MPEG2/30;
 C –Soro de Coelho Antiveneno de *B. jararaca* MPEG2/40;
 D –Soro de Coelho Antiveneno de *B. jararaca* MPGE5/20;
 E –Soro de Coelho Antiveneno de *B. jararaca* MPEG5/30;
 F –Soro de Coelho Antiveneno de *B. jararaca* MPEG5/40;
 G –Soro de Coelho Antiveneno de *B. jararaca* MPEG5/SS;
 H –Soro normal de coelho;
 I –Soro de Coelho Antiveneno de *B. jararaca* não conjugado.

Pela análise do *imunoblotting* observa-se que o veneno não reduzido, ou seja, não tratado com 2-mercaptoetanol, foi reconhecido pelos antivenenos obtidos de coelhos hiperimunizados tanto com veneno conjugado ao mPEG como com veneno não conjugado. Contudo, a diferença é vista nos seguintes casos: antiveneno imunizado com veneno peglado por volta de 20% reconhece mais frações antigênicas do que peglados a 30% e 40%, inclusive

observa-se fração de baixo peso molecular que não foi reconhecida pelo antiveneno do animal imunizado com veneno não conjugado (veneno integral). Observa-se também que os antivenenos obtidos com a imunização de conjugados com mPEG 2.000 reconhecem mais frações do que os antivenenos obtidos com a imunização dos conjugados mPEG 5.000 nas mesmas concentrações. O antiveneno obtido a partir do animal imunizado com veneno peglado a 30% em meio de sulfato de sódio reconheceu as mesmas frações que o antiveneno proveniente do animal imunizado com veneno não conjugado. Isto se deve a peglação dos epítomos internos das proteínas que compõem o veneno, levando ao reconhecimento dos determinantes antigênicos externos das diversas proteínas.

Porém, ao se analisar o *immunoblotting* no qual o veneno de *Bothrops jararaca* foi reduzido, o seja, que foi tratado com 2-mercaptoetanol, verificou-se a existência de uma variabilidade do reconhecimento das frações. Quando o veneno é reconhecido pelos antivenenos provenientes dos animais que receberam veneno conjugado ao mPEG 2.000, percebe-se que os graus de peglação de 20% e 30% reconhecem o mesmo número de frações antigênicas enquanto que o antiveneno do animal que recebeu veneno conjugado com 40% de mPEG 2.000 reconheceu outras frações diferentes. Já o reconhecimento do veneno com os antivenenos de animais imunizado com mPEG 5.000, tanto o grau de peglação de 20% como o de 40% reconheceram as mesmas frações, já o antiveneno do animal imunizado com 30% de peglação do veneno, que reconheceu as mesmas frações com grau de intensidade maior.

Para finalizar, o antiveneno proveniente do animal imunizado com 30% de veneno peglado em meio de sulfato de sódio reconheceu mais frações do que qualquer outro antiveneno, inclusive do antiveneno do animal que só recebeu veneno não conjugado.

Estas variações podem até ser consideradas variações individuais se resultados semelhantes não fossem observados na soroneutralização da citotoxicidade e da inibição da hemólise pela fosfolipase A2. O *immunoblotting* foi um teste conclusivo quanto ao mecanismo

de estudo da antigenicidade dos venenos conjugados e sua interpretação, mesmo com as variações apresentadas, concorda com os outros resultados observados.

5. CONCLUSÕES

A primeira conclusão e a mais importante é que o mPEG pode ser utilizado como adjuvante de veneno na imunização de cavalos para a produção de soros hiperimunes, propiciando as seguintes vantagens: 1ª) diminuição da toxicidade do veneno em pelo menos 50%; 2ª) diminuição de efeitos adversos, em função do mPEG apresentar menor reatividade do que outros adjuvantes; 3ª) o soro dos animais hiperimunizados reconheceu todas as proteínas do veneno, inclusive peptídeos de baixo peso molecular, bem como neutralizou os efeitos fisiopatológicos mais importante do veneno de *Bothrops jararaca*.

Outras conclusões importantes ressaltam alguns resultados já encontrados, mas se destacam: 1º) a imunomodulação no balanço Th1/Th2 encontrado em função do grau de peglação. Isto reflete a possibilidade de direcionamento da resposta imune, tanto para humoral como para celular, fazendo da complexação com mPEG um excelente meio de direcionamento da resposta imune; 2º) o direcionamento da resposta imune humoral no veneno tratado com sulfato de sódio durante o processo de peglação demonstra a possibilidade de direcionamento de epítomos antigênicos.

Como perspectivas futuras ficam as seguintes propostas: 1º) estudar o mPEG como adjuvante caracterizado pelo fornecimento de antígeno associado a outros adjuvantes imunomoduladores, tais como saponina ou lipopolissacarídeos (LPS); 2º) direcionar o epítopo de proteína que se deseja processar e apresentar pelas APC ao sistema imunológico, principalmente se a vacina é recombinante; 3º) estudar o mPEG como fator de tolerância para doenças auto-imunes ou para reações de hipersensibilidade do tipo I em função do mecanismo de tolerância induzida pelo grau mais elevado de peglação.

6. BIBLIOGRAFIA

ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H. **Celular and Molecular Immunology**. 5th ed., Philadelphia, Saunders Ed., p. 562, 2003.

ABUCHOWSKI, A.; KAZO, G.M.; VERHOEST, C.R. JR; VAN ES, T.; KAFKEWITZ, D.; NUCCI, M.L.; VIAU, A.T.; DAVIS, F.F. Cancer therapy with chemically modified enzymes. I. Antitumor properties of polyethylene glycol-asparaginase conjugates. **Cancer Biochemistry Biophysics**, London, v. 7, p. 175 - 186, 1977.

ACTON, S.; RESNICK, D.; FREEMAN, M.; EKKEL, Y.; ASHKENAS, J.; KRIEGER, M. The collagenous domains of macrophage scavenger receptors and complement component C1q mediate their similar, but not identical, binding specificities for polyanionic ligands. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 268, p. 3530 – 3537, 1993.

AHMED, R.; GRAY, D. Immunological memory and protective immunity: understanding their relation. **Science**, Washington, v. 272, p. 54 – 60, 1996.

AKIRA, S. Mammalian Toll-like receptors. **Current Opinion in Immunology**, London, v. 15, p. 5 – 11, 2003.

ALLISON A.C.; BYARS, N.E. Immunological adjuvants: desirable properties and side-effects. **Molecular Immunology**, Oxford, v. 28, p. 279 – 284, 1991.

ALPUCHE-ARANDA, C.; RACOOSIN, C.; SWANSON, J.; MILLER, S. Salmonella stimulate macrophage macropinocytosis and persist within spacious phagosomes. **Journal of Experimental Medicine**, New York, v. 179, p. 601 – 608, 1994.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **Interpretação estatística de dados – Técnicas de estimação e testes relacionados às médias e variâncias**. NB 1252, p. 53, 1989.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **Informação e documentação – Citações em documentos – Apresentação**. NBR 10520, p. 7, 2002.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **Informação e documentação – Referências – Elaboração**. NBR 6023, p. 24, 2002.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **Informação e documentação – Trabalhos acadêmicos – Apresentação**. NBR 14724, p. 6, 2002.

ATASSI, M.Z.; RUAN, K.H.; JINNAI, K.; OSHIMA, M.; ASHIZAWA, T. Epitope-specific suppression of antibody response in experimental autoimmune myasthenia gravis by a monomethoxypolyethylene glycol conjugate of a myasthenogenic synthetic peptide. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 89, p. 5852 – 5856, 1992.

BACHMANN, M.F.; ROHRER, U.H.; KUNDIG, T.M.; BURKI, K.; HENGARTNER, H.; ZINKERNAGEL, R.M. The influence of antigen organization on B cell responsiveness. **Science**, Washington, v. 262, p. 1448 – 1451, 1993.

BALLICO, M.; DRIOLI, S.; BONORA, G. MultiPEGs: High molecular weight multifunctional poly(ethylene glycol)s assembled by a dendrimer-like approach. **European Journal of Organic Chemistry**, Easton, v. 1, p. 2064 – 2073, 2005.

BANCHEREAU, J.; DE PAOLI, P.; VALLE, A.; GARCIA, E.; ROUSSET, F. Long-term human B cell lines dependent on interleukin-4 and antibody to CD40. **Science**, Washington, v. 251, p. 70 – 72, 1991.

BAXTER, E.H.; GALLICHIO, H.A. Cross-neutralization by tiger snake (*Notechis scutalus*) antivenin and sea snake (*Enhydrina schistosa*) antivenene against several sea snake venoms. **Toxicon**, Oxford, v. 12, p. 273-278, 1974.

BIRD, J.J.; BROWN, D.R.; MULLEN, A.C.; MOSKOWITZ, N.H.; MAHOWALD, M.A.; SIDER, J.R.; GAJEWSKI, T.F.; WANG, C.R.; REINER, S.L. Helper T cell differentiation is controlled by cell cycle. **Immunity**, Cambridge, v. 9, p. 229 – 237, 1998.

BORKOW, G.; GUTIERREZ, J.M.; OVADIA, M. In vitro activity of BaH1, the main hemorrhagic toxin of *Bothrops asper* snake venom on bovine endothelial cells. **Toxicon**, Oxford, v. 33, p.1387-1391, 1995.

BOWERSOCK, T.L.; MARTIN, S. Vaccine delivery to animals. **Advance in Drug Delivery Reviews**, Amsterdam, v. 38, p. 167 – 194, 1999.

BRASIL, Ministério da Saúde. Centro Nacional de Epidemiologia, Coordenação de Controle de Zoonoses e Animais Peçonhentos. Programa Nacional de Controle de Acidentes por Animais Peçonhentos. **Distribuição de Casos Confirmados e Notificados de 1986 a 1993**, Brasília, Fundação Nacional de Saúde, p. 36, 1994.

BROWN, J.H.; JARDETZKY, T.; SAPER, M.A.; SAMRAOVI, B.; BJORKMAN, P.J.; WILEY, D.C. - Ahypothetical model of the foreign antigen binding site of classe II histocompatibility molecules. **Nature**, London, v. 332, p. 845-850, 1988.

BULLOCK, J.; CHOWDHURY, S.; SEVERDIA, A.; SWEENEY, J.; JOHNSTON, D.; PACHLA, L. Comparison of results of various methods used to determine the extent of modification of methoxy polyethylene glycol 5.000-modified bovine cupric-zinc superoxide dismutase. **Analytical Biochemistry**, Orlando, v. 254, p. 254 – 262, 1997.

BULTRÓNA, E.; THELESTAMB, M.; GUTIÉRREZ, J.M. Effects on cultured mammalian cells of myotoxin III, a phospholipase A2 isolated from *Bothrops asper* (terciopelo) venom. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research**, Amsterdam, v. 1179, p. 253 – 259, 1993.

CALICETI, P.; VERONESE, F.M. Pharmacokinetic and biodistribution properties of poly(ethylene glycol)-protein conjugates. **Advanced Drug Delivery Reviews**, Amsterdam, v. 55, p. 1261 – 1277, 2003.

CALICETI, P.; VERONESE, F.M.; JONAK, Z. Immunogenic and tolerogenic properties of monomethoxypoly(ethylene glycol) conjugated proteins. **Il Farmaco**, Pavia, v. 54, p. 430 – 437, 1999.

CALIL-ELIAS, S.; THATTASSERY, E.; MARTINEZ, A.M.B.; MELO, P.A. Effect of perimuscular injection of *Bothrops jararacussu* venom on plasma creatine kinase levels in mice: influence of dose and volume. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, São Paulo, v. 35, p. 1233 – 1235, 2002.

CHAIM-MATYAS, A.; OVADIA, M. Cytotoxic activity of various snake venoms on melanoma, B16F10 and chondrosarcoma. **Life Science**, Oxford, v. 40, p. 1601 - 1607, 1987.

CHEFALO, P.J.; HARDING, C.V. Processing of exogenous antigens for presentation by class I MHC molecules involves post-Golgi peptide exchange influenced by peptide-MHC complex stability and acid pH. **Journal of Immunology**, Baltimore, v. 167, p. 1274 – 1282, 2001.

CHEN, Y.; TAKATA, M.; MAITI, P.K.; MOHAPATRA, S.; MOHAPATRA, S.S.; SEHON, A.H. The suppressor factor of T suppressor cells induced by tolerogenic conjugates of ovalbumin and monomethoxypolyethylene glycol is serologically and physicochemically related to $\alpha\beta$ heterodimer of T cell receptor. **Journal of Immunology**, Baltimore, v. 152, p. 3 – 11, 1994.

COCHRANE, C.G.; MÜLLER-EBERHARD, H.J.; AIKIN, B.S. Depletion of plasma complement *in vivo* by a protein of cobra venom its effect on various immunologic reactions. **Journal of Immunology**, Baltimore, v. 105, p. 55-69, 1970.

COLLARES-BUZATO, C.B.; DE PAULA LE SUEUR, L.; DA CRUZ-HOFLING, M.A. Impairment of the cell-to-matrix adhesion and cytotoxicity induced by *Bothrops moojeni* snake

venom in cultured renal tubular epithelia. **Toxicology Applied Pharmacology**, New York, v. 181, p. 124 – 132, 2002.

COOK, A.D.; PAJVANI, U.B.; HRKACH, J.S.; CANNIZZARO, S.M.; LANGER, R. Colorimetric analysis of surface reactive amino groups on poly(lactic acid-co-lysine):poly(lactic acid) blends. **Biomaterials**, Guilford, v. 18, p. 1417 – 1424, 1997.

COURJAULT, F.; LEROY, D.; COQUERY, L.; TOUTAIN, H. Platinum complex-induced dysfunction of cultured renal proximal tubule cells. A comparative study of carboplatin and transplatin with cisplatin. **Archives of Toxicology**, Berlin, v. 67, p. 338 - 346, 1993.

COX, J.C.; COULTER, A.R. Adjuvants – a classification and review of their modes of action. **Vaccine**, Amsterdam, v. 15, p. 248 – 256, 1997.

DECKER, T; LOHMANN-MATTHES, M.L. A quick and simple method for the quantitation of lactate dehydrogenase release in measurements of cellular cytotoxicity and tumor necrosis factor (TNF) activity. **Journal of Immunological Methods**, Amsterdam, v. 15, p. 61 – 69, 1988.

DEGEN, W.G.; JANSEN, T.; SCHIJNS, V.E. Vaccine adjuvant technology: from mechanistic concepts to practical application. **Expert Review of Vaccines**, London, v. 2, p. 327 – 335, 2003.

DIAS DA SILVA, W.; GUIDOLIN, R.; RAW, I.; HIGASHI, H.G.; CARICATI, C.P.; MORAIS, J.F.; LIMA, M.L.S.R.; YAMAGUCHI, I.K.; NISHIKAWA, A.K.; STEPHANO, M.A.; MARCELINO, J.R.; PINTO, J.R.; SANTOS, M.J. Cross-reactivity of horse monovalente antivenoms to venoms of ten Bothrops species. **Memórias do Instituto Butantan**, São Paulo, v. 51, p. 153-168, 1989.

DUNCAN, R.; SPREAFICO, F. Polymer conjugates. Pharmacokinetic considerations for design and development. **Clinical Pharmacokinetics**, New York, v. 27, p. 290-306, 1994.

ENGERING, A.; GEIJTENBEEK, T.B.; VAN VLIET, S.J.; WIJERS, M.; VAN LIEMPT, E.; DEMAUREX, N.; LANZAVECCHIA, A.; FRANSEN, J.; FIGDOR, C.G.; PIGUET, V.; VAN KOOYK, Y. The dendritic cell-specific adhesion receptor DC-SIGN internalizes antigen for presentation to T cell. **Journal of Immunology**, Baltimore, v. 168, p. 2118 – 2126, 2002.

ENGVALL, E. - Enzyme Immunoassay ELISA and EMIT. In: VAN VUNAKIS, H. AND LANGONE, J.J. **Methods of Enzymology - Immunochemical Techniques Part A**, New York, Academic Press, v. 70, p. 419 – 438, 1980.

ENGVALL, E.; PERLMANN, P. Enzyme-linked immunosorbent assay, Elisa. 3. Quantitation of specific antibodies by enzyme-labeled anti-immunoglobulin in antigen-coated tubes. **Journal of Immunology**, Baltimore, v. 109, p. 129-135, 1972.

FERREIRA, M.L.; MOURA DA SILVA, A.M.; FRANCA, F.O.; CARDOSO, J.L.; MOTA, I. Toxic activities of venom from nine Bothrops species and their with lethality and necrosis. **Toxicon**, Oxford, v.30, p. 1603 – 1608, 1992.

FINNEY, D.J. **Probit analysis**. 3rd Ed. Cambridge University Press, Cambridge, p. 333, 1971.

FUKUSHIMA, A.; NISHINO, K.; YOSHIDA, H. TAKATA, M.; UENO, H. Supression of induction of experimental immune mediated blepharoconjunctivitis by tolerogenic conjugates of the antigen and monomethoxypolyethylene glycol. **The British Journal of Ophthalmology**, London, v. 83, p. 973 – 979, 1999.

FUNDAÇÃO IBGE. **Normas de apresentação tabular**. 3.ed. Rio de Janeiro, p. 62, 1993.

FURTADO, M.F.; COLLETO, G.M.D.D.; DIAS DA SILVA, W. Controle de qualidade dos venenos animais e dos correspondentes venenos. I. Padronização dos métodos de ensaio das atividades bioquímicas e farmacológicas dos venenos de algumas espécies do gênero Bothrops e crotalus usando amostras secas a temperatura ambiente ou liofilizadas. **Memórias do Instituto Butantan**, São Paulo, v. 53, p. 149 – 159, 1991.

GOOSNEY, D.; KNOEHEL, D.; FINLAY, B. Enteropathogenic *E. coli*, *Salmonella* and *Shigella*: Masters of host cell cytoskeletal explotation. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 5, p. 216 – 223, 1999.

GRASSET, E; PONGRATZ, E.; BRECHBUHLER, T. Analyse immunochimique des constituants des venis de serpents por la methode de precipitation en milieu gelifie. **Annales de Institute Pasteur**, Paris, v. 91, p. 162-186, 1956.

GRAY, D.; DULLFORCE, P.; JAINANDUNSING, S. Memory B cell development but not germinal center formation is paired by *in vivo* blockade of CD40-CD40 ligand interaction. **Journal of Experimental Medicine**, New York, v. 180, p. 141 – 155, 1994.

GRAY, D.; SIEPMANN, K.; WOHLLEBEN, G. CD40 ligation in B cell activation, isotype switching and memory development. **Seminars in Immunology**, Philadelphia, v.6, p. 303 - 310, 1994.

GUTA, R.K.; RELYVELD, E.H.; LINDBLAD, E.B.; BIZZINI, B; BEM-EFRAM, S.; GUPTA, C.K. Adjuvants — a balance between toxicity and adjuvantcity. **Vaccine**, Amsterdam, v. 11, p. 293 –306, 1993.

GUTIÉRREZ, J.M.; AVILA, C.; ROJAS, E; CERDAS, L. An alternative in vitro method for testing the potency of the polyvalent antivenom produced in Costa Rica. **Toxicon**, Oxford, v. 26, p. 411 – 413, 1988.

GUTIÉRREZ, J.M.; ROJAS, G.; CERDAS, L. Ability of a polyvalent antivenom to neutralize the venom of *Lachesis muta melanocephala*, a new Costa Rican subspecies of the Bushmaster. **Toxicon**, Oxford, v. 25, p. 713-720, 1987.

HABEEB, A.F.S.A. Determination of free amino groups in proteins by trinitrobenzenesulfonic acid. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 14, P. 328 – 336, 1966.

HARRIS, J.M. Synthesis of polyethylene glycol derivative. **Journal of Macromolecular Science Review Part C**, New York, v. 25, p. 325 – 373, 1985.

HARRIS, J.M.; CHESS, R.B. Effect of pegylation on pharmaceuticals. **Nature Review Drug Discovery**, London, v. 2, p. 214 – 221, 2003.

HASHIMOTO, C.; HUDSON, K.L.; ANDERSON, K.V. The toll gene of *Drosophila*, required for dorsal-ventral embryonic polarity, appears to encode a transmembrane protein. **Cell**, Cambridge, v. 52, p. 269 – 279, 1988.

HE, X.H.; SHAW, P.C.; XU, L.H.; TAM, S.C. Site-directed polyethylene glycol modification of trichosanthin: effects on its biological activities, pharmacokinetics, and antigenicity. **Life Science**, Oxford, v. 64, p. 1163 – 1175, 1999.

HE, Z.; ZHANG, Z; HE, M. Kinetic study of thermal inactivation for native and methoxypolyethylene glycol modified trypsin. **Process Biochemistry**, Barking, v. 35, p. 1235 – 1240, 2000.

HERMELING, S.; CROMMELIN, D.J.A.; SCHELLEKENS, H.; JISKOOT, W. Structure-Immunogenicity relationships of therapeutic proteins. **Pharmaceutical Research**, Stuttgart, v. 21, p. 897 – 903, 2004.

HIGASHI, H.G.; GUIDOLIN, R.; CARICATI, C.P.; FERNANDES, I.; MARCELINO, J.R.; MORAIS, J.F.; YAMAGUCHI, I.K.; STEPHANO, M.A.; DIAS DA SILVA, W.; TAKEHARA, H.A. Antigenic cross-reactivity among components of Brazilian Elapidae snake venoms. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, São Paulo, v. 28, p. 767-771, 1995.

HIGASHI, H.G.; GUIDOLIN, R.; NISHIKAWA, A.K.; YAMAGUCHI, I.K.; STEPHANO, M.A.; SANTOS, M.J.; DIAS DA SILVA, W.; UEDA, C.M.M. Produção de anticorpos antiveneno total de *Crotalus durissus terrificus* em cavalos por fosfolipase A2. **Memórias do Instituto Butantan**, São Paulo, v. 51, p. 91-100, 1989.

INABA, K.; INABA, M.; NAITO, M.; STEINMAN, R.M. Dendritic cells progenitors phagocytose particulates, including bacillus Calmette-Guerin organisms, and sensitize mice to mycobacterium antigens *in vivo*. **The Journal of Experimental Medicine**, New York, v. 178, p. 479 – 488, 1993.

INADA, Y.; MATSUSHIMA, A.; HIROTO, M.; NISHIMURA, H.; KODERA, Y. Modification of proteins with polyethylene glycol derivatives. **Methods of Enzymology**, New York, v. 242, p. 65 – 90, 1994.

INGULLI, E.; MONDINO, A.; KHORUTS, A.; JENKINS, M.K. *In vivo* detection of dendritic cell antigen presentation to CD4(+) T cells. **The Journal of Experimental Medicine**, New York, v. 185, p. 2133 – 2141, 1997.

ITO, T.; UENO, T.; CLARKSON, M.R.; YUAN, X.; JUREWICZ, M.M.; YAGITA, H.; AZUMA, M.; SHARPE, A.H.; AUCHINCLOSS, H. JR.; SAYEGH, M.H.; NAJAFIAN, N. **Journal of Immunology**, Baltimore, v. 174, p. 6648 – 6656, 2005.

JANECEK, S. Does the increased hydrophobicity of the interior and hydrophilicity of the exterior of an enzyme structure reflect its increased thermostability? **International Journal of Biological Macromolecules**, Guildford, v. 15, p. 317 – 318, 1993.

JANEWAY, C.A. Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. **Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology**, Woodbury, v. 54, p. 429-436, 1989.

JANSSENS, S.; BEYAERT, R. Role of toll-like receptors in pathogen recognition. **Clinical of Microbiology Reviews**, Washington, v.16, p. 637 – 646, 2003.

JEGERLEHNER, A.; TISSOT, A.; LECHNER, F.; SEBBEL, P.; ERDMANN, T.; KUNDIG, T.; BACHI, T.; STORNI, T.; JENNINGS, G.; PUMPENS, P.; RENNER, W.A.; BACHMANN, M.F. A molecular assembly system that renders antigens of choice highly repetitive for induction of protective B cell response. **Vaccine**, Amsterdam, v. 20, 3104 – 3112, 2002.

JOHANSEN, P.; STAMOU, P.; TASCAN, R.E.; LOWRIE, D.B.; STOKINGER, B. CD4 T cells guarantee optimal competitive fitness of CD8 memory T cells. **European Journal of Immunology**, Weinheim, v. 34, p. 91 – 97, 2004.

JOHNSON, A.G.; TOMAI, M.A. A study of the cellular and molecular mediators of the adjuvant action of a nontoxic monophosphoryl lipid A. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, New York, v. 256, p. 567 – 579, 1990.

KARRER, U.; LOPEZ-MARIA, C.; OXENIUS, A.; ODERMATT, B.; BACMANN, M.F.; KAINKE, U.; BLUETHMANN, H.; HENGARTNER, H.; ZINKERNAGEL, R.M. Antiviral B cell memory in the absence of mature follicular dendritic cell networks and classical germinal centers in TNFR1 $-/-$ mice. **Journal of Immunology**, Baltimore, v. 164, p. 768 – 778, 2.000.

KERSTEN G.F.; CROMMELIN D.J. Liposomes and ISCOMs. **Vaccine**, Amsterdam, v. 21, p. 915 – 920, 2003.

KODERA, Y.; MATSUSHIMA, A.; HIROTO, M.; NISHIMURA, H.; ISHII, A.; UENO, T.; INADA, Y. Pegylation of proteins and bioactive substances for medical and technical applications. **Progress in Polymer Science**, Pittsburgh, v. 23, p. 1233 – 1271, 1998.

KODERA, Y.; TANAKA, H.; MATSUSHIMA, A.; INADA, Y. Chemical modification of L-asparaginase with a comb-shaped copolymer of polyethylene glycol derivative and maleic anhydride. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, New York, v. 15, p. 144 – 148, 1992.

KOIDE, A.; SUZUKI, S.; KOBAYASHI, S. Preparation of polyethylene glycol-modified streptokinase with disappearance of binding ability towards anti-serum and retention of activity. **Federation of European Biochemical Societies Letters**, Amsterdam, v. 143, p. 73 – 76, 1982.

KOPF, M.; RUEDL, C.; SCHMITZ, N.; GALLIMORE, A.; LEFRANG, K.; ECABERT, B.; ODEMATT, B.; BACHMANN, M.F. OX40-deficient mice are defective in Th cell proliferation but are competent in generating B cell and CTL responses after virus infection. **Immunity**, Cambridge, v. 11, p. 699 – 708, 1999.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, London, v.15, p. 680 – 685, 1970.

LAMB, G.; HANNA, W. Specificity of antivenomous sera. **Scientific Memories by officers of the medical and Sanitary Departmente of the Government of India**, Nova Dheli, v. 10, p. 1-25, 1904.

LANGENKAMP, A.; MESSI, M.; LANZAVECCHIA, A.; SALLUSTO, F. Kinetics of dendritic cell activation: impact on priming of TH1, TH2 and nonpolarized T cells. **Nature Immunology**, New York, v. 1, p. 311-316, 2.000.

LEE, B.O.; MOYRON-QUIROZ, J.; RANGEL-MORENO, J.; KUSSER, K.L.; HARTSO, L.; SPRAGUE, F.; LUND, F.E.; RANDALL, T.D. CD40, but not CD154, expression on B cells is necessary for optimal primary b cell responses. **Journal of Immunology**, Baltimore, v. 171, p. 5707 – 5717, 2003.

LEE, S.H.; LEE, S.; YOUN, Y.S.; NA, D.H.; CHAE, S.Y.; BYUN, Y.; LEE, K.C. Synthesis, characterization, and pharmacokinetic studies of pegylated glucagon-like peptide-1. **Bioconjugate Chemistry**, Washington, v. 16, p. 377 – 382, 2005.

LEINIKKI, P.O.; PASSILA, S. Quantitative, semiautomated, enzyme-linked immunosorbent assay for viral antibodies. **The Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 136, p. 294 – 299, 1977.

LIU, Y.J.; JOSHUA, D.E.; WILLIAMS, G.T.; SMITH, C.A.; GORDON, I. C.; MACLENNAN, I.C. Mechanism of antigen-driven selection in germinal centres. **Nature**, London, v. 342, p. 929 – 931, 1989.

LOFTHOUSE, S. Immunological aspects of controlled antigen delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, Amsterdam, v. 54, p. 863-870, 2002.

LOMONTE, B.; ANGULO, Y.; RUFINI, S.; CHO, W. GIGLIO, J.R., OHNO, M. DANIELE, J.J.; GEOGHEGAN, P.; GUTIERREZ, J.M. Comparative study of the cytotoxic activity of myotoxic phospholipase A2 on mouse endothelial (tEnd) and skeletal muscle (C2C12) cells in vitro. **Toxicon**, Oxford, v. 37, p. 145 – 158, 1999.

LOMONTE, B.; GUTIERREZ, J.M.; ROMERO, M.; NUNEZ, J.; TARKOWSKI, A.; HANSON, L.A. Na MTT-based method for the *in vivo* quantification of myotoxic activity of snake venoms and its neutralization by antibodies. **Journal of Immunology Method**, Amsterdam, v.161, p. 231 – 237, 1993.

MACGRATH, M.S.; HWANG, K.M.; CALDWELL, S.E.; GASTON, I.; LUK, K.C.; WU, P.; NG, V.L.; CROWE, S.; DANIELS, J.; MARSH, J.; DEINHART, T.; LEKAS, P.V.; VENNARI, J.C.; YEUNG, H.W.; LIFSON, J.D. GLQ223: an inhibitor of human immunodeficiency virus replication in acutely and chronically infected cells of lymphocyte and mononuclear phagocyte lineage. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 86, p. 2844 – 2848, 1989.

MACLENNAN, I.C. Germinal center. **Annual Reviews of Immunology**, Palo Alto, v. 12, p. 117 – 139, 1994.

MAHNKE, K.; GUO, M.; LEE, S.; SEPULVEDA, H.; SWAIN, S.L.; NUSSENZWEIG, M.; STEINMAN R.M. The Dendritic Cell Receptor for Endocytosis, DEC-205, Can Recycle and Enhance Antigen Presentation via Major Histocompatibility Complex Class II-positive Lysosomal Compartments. **The Journal of Cell Biology**, New York, v. 151, p. 673 – 684, 2000.

MALOY, K.J.; ERDMANN, I.; BASCH, V.; SIERRO, S.; KRAMPS, T.A.; ZINKERNAGEL, R.M.; OEHEN, S.; KUNDIG, T.M. Intralymphatic immunization enhances

DNA vaccination. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 98, p. 3299 – 3303, 2001.

MANCINO, D.; OVARY, Z. Adjuvant effects of amorphous silica and aluminium hydroxide on IgE and IgG1 antibody production in different inbred mouse strains. **International Archives of Allergy and Applied Immunology**, Basel, v. 61, p. 253 – 258, 1980.

MARCIANI, D.J. Vaccine adjuvants: role and mechanisms of action in vaccine immunogenicity. **Drug Discovery Today**, Kidlington, v. 8, p. 934 – 943, 2003.

MATSUSHIMA, A.; KODERA, Y.; HIROTO, M.; NISHIMURA, H.; INADA, Y. Biogomjugates of proteins and polyethylene glycol: potent tools in biotechnological processes. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, Amsterdam, v.2, p. 1 -17, 1996.

MATSUSHIMA, A.; NISHIMURA, H.; ASHIHARA, Y.; YOKOTA, Y.; INADA, Y. Modification of *E. coli* asparaginase with 2,4 bis(o-methoxypolyethylene glycol)-6-chloro-s-triazine (activated Peg2); disappearance of binding ability towards anti-serum and retention of enzymic activity. **Chemistry Letters**, Tokyo, v. 7, p. 773 – 776, 1980.

MITCHISON, N.A. Induction of immunological paralysis in two zones of dosage. **Proceedings of the Royal Society of London Series B**, London, v. 161, p. 275 – 292, 1964.

MOHAPATRA, S.; CHEN, Y.; TAKATA, M.; MOHAPATRA, S.S.; SEHON, A.H. Analysis of T-cell receptor $\alpha\beta$ chains of CD8⁺ suppressor T cells induced by tolerogenic conjugates of antigen and monomethoxypolyethylene glycol. **Journal of Immunology**, Baltimore, v. 151, p. 688 – 698, 1993.

MOORE, A.; MCGUIRK, P.; ADAMS, S.; JONES, W.C.; MCGEE, J.P.; O'HAGAN, D.T.; MILLS K.H. Immunization with a soluble recombinant HIV protein entrapped in biodegradable microparticles induces HIV-specific CD8⁺ cytotoxic T lymphocytes and CD4⁺ Th1 cells. **Vaccine**, Amsterdam, v. 13, p. 1741 – 1749, 1995.

MOURA DA SILVA, A.M.; DESMOND, H.; LAING, G.; THEAKSTON, R.D. Isolation and comparison of myotoxins isolated from venoms of different species of Bothrops snakes. **Toxicon**, Oxford, v. 29, p. 713 – 723, 1991.

NAGASAKI, Y.; KUTSUNA, T.; IJIMA, M.; KATO, M.; KATAOKA, K.; KITANO, S.; KADOMA, Y. Formyl-ended heterobifunctional poly(ethylene oxide): synthesis of poly(ethylene oxide) with a formyl group at one end and a hydroxyl group at the other end. **Bioconjugate Chemistry**, Washington, v. 6, p. 231 – 233, 1995.

NARUYAMA, M.; LAM, K.P.; RAJEWSKY, K. Memory B-cell persistence is independent of persisting immunizing antigen. **Nature**, London, v. 407, p. 636 – 642, 2000.

NICOLLE, M.; RAPHAEL, A. Elements de microbiologie générale et d'immunologie. Doin Ed., Paris, p. 268, 1925.

NIEMI, S.M.; FOX, J.G.; BROW, L.R.; LANGER, R. Evaluation of ethylene-vinyl acetate copolymer as a non-inflammatory alternative to Freund's complete adjuvant in rabbits. **Laboratory Animal Science**, Memphis, v. 35. p. 609 – 612, 1985.

O'HAGAN, D.T.; VALIANTE, N.M. Recent advances in the discovery and delivery of vaccine adjuvants. **Nature Review Drug Discovery**, London, v. 2, p. 727 – 735, 2003.

ONO, K.; KAI, Y.; MAEDA, H.; SAMIZO, F.; SAKURAI, K.; NISHIMURA, H.; INADA, Y. Selective synthesis of 2,4-bis(O-methoxypolyethylene glycol)-6-chloro-s-triazine as a protein modifier. **Journal of Biomaterial and Science Polymer Edition**, Utrech, v. 1, p. 61-65, 1991.

OPFEMAN, J.T.; OBER, B.T.; ASHTON-RICKARDT, P.G. Linear differentiation of cytotoxic effectors into memory T lymphocytes. **Science**, Washington, v. 283, p. 1745 – 1748, 1999.

LOUDIN, J. Specific precipitation in gel and its application to immunochemical analysis. In: CORCORAN, A.C. **Methods in Medical Research**. Year Book Publishers Inc., Chicago, v. 5, p. 543, 1952.

PATTERSON Jr., M.K. Measurement of Growth and viability of cells in culture. In: JAKOBY, W.B.; PASTAN, I.H. Cell Culture. **Methods in Enzymology**, Orlando, v. 58, p. 141 – 152, 1979.

PEREZ, V.L.; VAN PARIJS, L.; BIUCKIANS, A.; ZHENG, X.X.; STROM, T.B.; ABBAS, A.K. Induction of peripheral T cells tolerant *in vivo* requires CTLA-4 engagement. **Immunity**, Cambridge, v. 6, p. 411 – 417, 1997.

PETROVSKY, N.; AGUILAR, J.C. Vaccine adjuvants: current state and future trends **Immunology and Cell Biology**, Adelaide, v. 82, p. 488 – 496, 2004.

PIERRE, P.; TURLEY, S.J.; GATTI, E.; HULL, M.; MELTZER, J.; MIRZA, A.; INABA, K.; STEINMAN, R.M.; MELLMAN, I. Developmental regulation of MHC class II transport in mouse dendritic cells. **Nature**, London, v. 388, p. 787 – 792, 1997.

PREIS, I.; LANGER, R. A single-step immunization by sustained antigen release. **Journal of Immunology Methods**, Amsterdam, v. 28, p. 193 – 197, 1979.

RIDGE, J.P.; DI ROSA, F.; MATZINGER, P. A conditioned dendritic cell can be a temporal bridge between a CD4⁺ T-helper and a T-killer cell. **Nature**, London, v. 393, p. 474 – 478, 1998.

RIHOVA, B. Immunomodulating activities of soluble synthetic polymer-bond drugs. **Advance Drug Delivery Review**, Amsterdam, v. 54, p. 653 – 674, 2002.

ROMAGNANI, S. Human TH1 and TH2 subsets: doubt no more. **Immunology Today**, Amsterdam, v. 12, p. 256 – 257, 1991.

RUEDL, C.; KOEBEL, P.; KARJALAINEN, K. *In vivo*-matured Langerhans cells continue to take up and process native proteins unlike *in vitro*-matured counterparts. **Journal of Immunology**, Baltimore, v. 166, p. 7178 – 7182, 2001.

RUEDL, C.; STORNI, T.; LECHNER, F.; BACHI, T.; BACHMANN, M.F. Cross-presentation of virus-like particles by skin-derived CD8(-) dendritic cells: a disoensable role for TAP. **European Journal of Immunology**, Weinheim, v. 32, p. 818 – 825, 2002.

SALLUSTO, F.; CELLA, M.; DANIELI, C.; LANZAVECCHIA, A. Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartment: downregulation by cytokines and bacterial products. **The Journal of Experimental Medicine**, Amsterdam, v. 182, p. 389 – 400, 1995.

SALLUSTO, F.; LANZAVECCHIA, A. Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor alpha. **The Journal of Experimental Medicine**, Amsterdam, v. 179, p. 1109 – 1118, 1994.

SALLUSTO, F.; LENIG, D.; FORSTER, R.; LIPP, M.; LANZAVECCHIA, A. Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials effector functions. **Nature**, London, v. 401, p. 708 – 712, 1999.

SAMPAIO, S.C.; SOUSA-E-SILVA, M.C.; BORELLI, P.; CURI, R.; CURY, Y. *Crotalus durissus terrificus* snake venom regulates macrophage metabolism and function. **Journal of Leukocyte Biology**, New York, v. 70, p. 551-558, 2001.

SANTOS, M.C.; DINIZ, C.R.; PACHECO, M.A.; DIAS DA SILVA, W. - Phospholipase A2 injection in mice induces immunity against the lethal effects of *Crotalus durissus terrificus* venom. **Toxicon**, Oxford, v. 26, p. 207-213, 1988.

SCHIJNS, V.E. Mechanisms of vaccine adjuvant activity: initiation and regulation of immune responses by vaccine adjuvants. **Vaccine**, Amserdam, v. 21, p. 829 – 306, 2003.

SCHUBERT, U.; ANTON, L.C.; GIBBS, J.; NORBURY, C.C.; YEWDELL, J.W.; BENNINK, J.R. Rapide degradation of a large fraction of newly synthesized proteins by proteasomes. **Nature**, London, v. 404, p. 770 – 774, 2000.

SCHWARTZ, R.H. T cell anergy. **Annual Review in Immunology**, Palo Alto, v. 21, p. 305 – 334, 2003.

SHEDLOCK, D.J.; SHEN, H. Requirement for CD4 T cell help in generating functional CD8 T cell memory. **Science**, Washington, v. 300, p. 337 – 339, 2003.

SHIBATA, Y.; HONDA, I.; JUSTICE, J.P.; VAN SCOTT, M.R.; NAKAMURA, R.M.; MYRVIK, Q.N. Th1 adjuvant N-acetyl-D-glucosamine polymer up-regulate Th1 immunity but down-regulate Th2 immunity against a mycobacterial protein (MPB-59) in interleukin-10-knockout and wild-type mice. **Infection and Immunity**, Washington, v. 69, p. 6123 – 6130, 2001.

SO, T.; ITO, H.; TSUJIHATA, Y.; HIRATA, M.; UEDA, T.; IMOTO, T. The molecular weight ratio of monomethoxypolyethylene glycol (mPEG) to protein determines the immunotolerogenicity of mPEG proteins. **Protein Engineering**, Oxford, v. 12, p. 701 – 705, 1999.

SOARES, A.L.; GUIMARÃES, G.M.; POLAKIEWICZ, B.; PITOMBO, R.N.M.; ABRAHÃO-NETO, J. Effects of polyethylene glycol attachment on physicochemical and biological stability of E. Coli L-asparaginase. **International Journal of Pharmaceutics**, Netherlands, v. 237, p. 163 – 170, 2002.

SORIMACHI, K.; AKIMOTO, K.; HATTORI, Y.; IEIRI, T.; NIWA, A. Secretion of TNF- α , IL-8 and nitric oxide by macrophage activated with polyanions, and involvement of interferon- γ in regulation of cytokine secretion. **Cytokine**, San Diego, v. 11, p. 571 – 578, 1999.

STEVENSON, P.G.; BELZ, G.T.; CASTRUCCI, M.R.; ALTMAN, J.D.; DOHERTY, P.C. A gamma-herpesvirus sneaks through a CD8(+) T cell response primed to a lytic-phase epitope. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 96, p. 9281 – 9286, 1999.

STORNI, T.; KÜNDIG, T.M.; SENTI, G.; JOHANSEN, P. Immunity in response to particulate antigen-delivery systems. **Advanced Drug Delivery Reviews**, Amsterdam, v. 57, p. 333 – 355, 2005.

STORNI, T.; RUEDL, C.; RENNER, W.A.; BACHMANN, M.F. Innate immunity together with duration of antigen persistence regulate effector T cell induction. **The Journal of Immunology**, Baltimore, v. 171, p. 795 – 801, 2003.

STRONG, P.; CLARCK, H.; REID, K. Intranasal application of chitin microparticles down-regulation symptoms of allergic hypersensitivity to *Dermatophagoides pteronyssinus* and *Aspergillus fumigatus* in murine models of allergy. **Clinical and Experimental Allergy**, Oxford, v. 32, p. 1794 – 1800, 2002.

STUDIER, F.W. Slab-gel electrophoresis. **Trends in Biochemistry Science**, Amsterdam, v. 25, p. 588 - 590, 2.000.

SWITZER, S.K.; WALLNER, B.P.; BRINER, T.J.; SUNSHINE, G.H.; BOURQUE, C.R.; LUQMAN, M. Bolus injection of aqueous antigen leads to a high density of T-cell-receptor ligand in the spleen, transient T cell activation and anergy induction. **Immunology**, Oxford, v. 94, p. 513 – 522, 1998.

SZEKERES, J.; PACSA, A.S.; PEJTSIK, B. Measurement of lymphocyte cytotoxicity by assessing endogenous alkaline phosphatase activity of the target cells. **Journal of Immunological Methods**, Amsterdam, v. 40, p.151 – 154, 1991.

TAKATA, M.; MAITI, P.K.; KUBO, R.T.; CHEN, Y.; HOLFORD-STREVEENS, V.; RECTOR, E.S.; SEHON A.H. Cloned suppressor T cells derived from mice tolerized with conjugates of antigen and monomethoxypolyethylene glycol. **Journal of Immunology**, Baltimore, v. 145, p. 2846 – 2853, 1990.

TAKEDA, K.; AKIRA, S. Toll receptors and pathogen resistance. **Cellular Microbiology**, Oxford, v. 5, p. 143 – 153, 2003.

TEIXEIRA, C.F.; LANDUCCI, E.C.; ANTUNES, E.; CHACUR, M.; CURY, Y. Inflammatory effects of snake venom myotoxic phospholipases A2. **Toxicon**, Oxford, v. 42, p. 947 - 962, 2003.

THEAKSTON, R.D.G; REID, H.A. Enzyme-like immunosorbent assay (ELISA) in assessing antivenom potency. **Toxicon**, Oxford, v. 17, p. 510-515, 1979.

TIMARES, L.; TAKASHIMA, A.; JOHNSTON, S.A. Quantitative analysis of the immunopotency of genetically transfected dendritic cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 95, p. 13147 – 11152, 1998.

TSUTSUMI, Y.; ONDA, M.; NAGATA, S.; LEE, B.; KREITMAN, R.J.; PASTAN, I. Site-specific chemical modification with polyethylene glycol of recombinant immunotoxin anti-Tac(Fv)-PE38(LMB-2) improves antitumor activity and reduces animal toxicity and immunogenicity. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 97, p. 8548 – 8553, 2.000.

UENO, T.; OHTAWA, K.; KIMOTO, Y.; SAKURAI, K.; KODERA, Y.; HIROTO, M.; MATSUSHIMA, A.; NISHIMURA, H.; INADA, Y. Polyethylene glycol-modified concanavalin A as an effective agent to stimulate ant-tumor cytotoxicity. **Cancer Detection and Prevention**, Oxford, v. 24, p. 100 – 106, 2002.

VERONESE, F.M. Peptide and protein PEGylation: a review of problems and solutions. **Biomaterials**, Guilford, v. 22, p. 405 – 417, 2001.

VILLINGER, F. Cytokines as clinical adjuvants: how far are we? **Expert Review of Vaccines**, London, v. 2, p. 317 – 326, 2003.

VITAL BRAZIL, O. History of the primordia of snake-bite accident serotherapy. **Memórias do Instituto Butantan**, São Paulo, v. 49, p. 7-20, 1987.

WATANABE, M.; NAGAI, M.; FUNAISHI, K.; ENDOH, M. Efficacy of chemically cross-linked antigens for acellular pertussis vaccine. **Vaccine**, Amsterdam, v. 19, p. 309 – 313, 2000.

WATERS, R.V.; TERRELL, T.G.; JONES, G.H. Uveitis induction in the rabbit by muramyl dipeptides. **Infection and Immunology**, Washington, v. 51, p. 816 – 825, 1986.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Progress in the characterization of venoms and standardization of antivenoms**, WHO Offset Publication, 58, Geneva, p. 44, 1981.

YAMAMOTO, M.; SATO, S.; HEMMI, H.; SANJO, H.; UEMATSU, S.; KAISHO, T.; HOSHINO, K.; TAKEUCHI, O.; KOBAYASHI, M.; FUJITA, K.; TAKEDA, K.; AKIRA, S. Essential role for TIRAP in activation of the signaling cascade shared by TLR2 and TLR4. **Nature**, London, v. 420, p. 324 – 329, 2002.

YAMASAKI, M.; OKABE, M.; SUZAWA, T.; YOKOO, Y. New Peg2 type polyethylene glycol derivatives for protein modification. **Biotechnology Techniques**, Amsterdam, v. 12, p. 751 – 754, 1998.

YOKOYAMA, M.; SUGIYAMA, T.; OKANO, T.; SAKURAI, Y.; NAITO, M.; KATAOKA, K. Analysis of micelle formation of an adriamycin-conjugated poly(ethylene glycol)-poly(aspartic acid) block copolymer by gel permeation chromatography. **Pharmaceutical Research**, New York, v. 10, p. 895 – 899, 1993.

YUN, Q.; CHEN, T.; ZHANG, G.; BI, J.; MA, G. & SU, Z. Novel polyethylene glycol derivative suitable for the preparation of mono-PEGylated protein. **Biotechnology Letters**, Dordrecht, v. 27, p. 213 – 217, 2005.

ZALIPSKY, S.; SELTZER, R.; MENON-RUDOLPH, S. Evaluation of a new reagent for covalent attachment of polyethylene glycol to proteins. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, San Diego, v. 15, p. 100 – 114, 1992.

ZINKERNAGEL, R.M.; EL, S.; AICHELE, P.; OEHEN, S.; KUNDIG, T.; HENGARTNER, H. Antigen localization regulates immune responses in a dose- and time-dependent fashion: a geographical view of immune reactivity. **Immunology Review**, Palo Alto, v. 156, p. 199 – 209, 1997.

ZURBRIGGEN R. Immunostimulating reconstituted influenza virosomes. **Vaccine**, Amsterdam, v. 21, p. 921 – 924, 2003.