UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica

Área de Tecnologia de Fermentações

**Ação de Enzimas de Origem Vegetal (Bromelina e Ficina)
sobre anticorpos produzidos por cavalos imunizados com
veneno de *Bothrops jararaca*.**

Rodolfo Ferreira Marques

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientador:
Prof. Dr. Marco Antonio Stephano

São Paulo

2016

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

Marques, Rodolfo Ferreira
M886a Ação de enzimas de origem vegetal (Bromelina e Ficina) sobre anticorpos produzidos por cavalos imunizados com veneno de *Bothrops jararaca* / Rodolfo Ferreira Marques. -- São Paulo, 2016.
59p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica.
Orientador: Stephano, Marco Antonio

1. Enzima : Biotecnologia I. T. II. Stephano, Marco Antonio, orientador.

620.8 CD

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica

Área de Tecnologia de Fermentações

**Ação de Enzimas de Origem Vegetal (Bromelina e Ficina)
sobre anticorpos produzidos por cavalos imunizados com
veneno de *Bothrops jararaca*.**

Rodolfo Ferreira Marques

Versão Original

São Paulo

2016

Rodolfo Ferreira Marques

Ação de Enzimas de Origem Vegetal (Bromelina e Ficina) sobre anticorpos produzidos por cavalos imunizados com veneno de *Bothrops jararaca*.

Comissão julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Prof. Dr. Marco Antonio Stephano
Orientador/Presidente

1º Examinador

2º Examinador

São Paulo, _____ de _____ de 2016

DEDICATÓRIA

À minha família, por me apoiarem nas minhas decisões em especial a minha Mãe, Dona Edina, por sempre permitir que eu abrisse minhas asas e voasse por onde eu aspirasse, porém, nunca deixando eu esquecer minhas referências.

Mãe, você é quem me inspira a ser sempre mais forte e determinado! A você sempre dedicarei minhas vitórias!

“Preservar é aprender

Aprender é praticar

Praticar é repetir

Repetir é vivenciar

Vivenciar é crise

Crise é prova

Prova é fortalecimento

Fortalecimento é criar no novo

Criar no novo é transformar

Transformar é início e fim ao mesmo tempo”

Rudolf Steiner

AGRADECIMENTOS

A DEUS, pela misericórdia e força.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo pela oportunidade de realização do curso de mestrado.

Ao Prof. Dr Marco Antonio Stephano, pela oportunidade de realização desta dissertação e por sua contribuição em minha formação científica.

Ao Prof. Dr Patrick Jack Spencer que, não somente por ter sido colaborador do trabalho como de praxe ocorrem em trabalhos científicos, mas durante todo o período que passei em seu laboratório, me auxiliou como se fosse seu orientando, discutindo cada técnica, cada resultado, realizando experimentos e me ajudando a escrever/discutir os resultados obtidos.

Fica aqui minha imensa gratidão por tudo!

Ao Prof Dr Wagner Quintilio, pela contribuição no trabalho compondo a banca de qualificação e pelo auxílio em minha formação científica desde muito antes do início do mestrado. Obrigado pela amizade, pelas caronas, pelas risadas, pelos puxões de orelha, por me deixar preocupado/ansioso com os prazos (rs) e por sempre me amparar.

Ao Tiago Roca e Angela Mattos que foram meus gestores na Garantia da Qualidade/Controle de Qualidade do Instituto Butantan e que me apoiaram na realização deste sonho.

A Marina, minha fiel amiga desde o primeiro dia de faculdade! Superamos tantos desafios juntos, que se fosse listar daria um livro. Obrigado por tudo!

Às minhas amigas e colegas de laboratório Tamara e Marcela pela amizade, auxílio nos experimentos e paciências nas horas de desabafo.

À Josana Kapronezai, que também contribuiu de forma impar em minha formação científica. Obrigado pela amizade e carinho.

À Ana Lisboa e Adriana Moreno, pela contribuição nos experimentos durante as etapas iniciais do projeto.

A aqueles, que são minha família e estiveram ao meu lado durante esta caminhada: Adriana, Bruno, Felipe, Fernando, Flavia, Hugo, Laís, Luciano, Tathi, Tiago, Vivi. Obrigado, Obrigado, Obrigado.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	I
LISTA DE FIGURAS	II
SÍMBOLOS E ABREVIACÕES.....	IV
RESUMO.....	V
ABSTRACT	VI
1. INTRODUÇÃO	7
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	9
2.1. Veneno botrópico	9
2.2. Soroterapia	10
2.3. Produção de Soros Antiofídicos	12
2.4. O Ácido Caprílico e a purificação de imunoglobulinas.....	14
2.5. Processamento de Imunoglobulinas.....	17
2.6. Enzimas Proteolíticas na Produção de Soros.....	20
3. OBJETIVOS	25
4. JUSTIFICATIVA	26
5. MATERIAIS E MÉTODOS	27
5.1. Obtenção do soro	27
5.2. Purificação do soro e fragmentos de IgG.	28

5.2.1. Purificação do plasma utilizando ácido caprílico	28
5.2.2. Purificação dos fragmentos de IgG por cromatografia de gel filtração ..	28
5.3. Determinação de teor de proteínas.	29
5.4. Eletroforese em gel de poliacrilamida.....	29
5.5. Western Blot	29
5.6. Digestão de imunoglobulinas purificadas utilizando Bromelina e Ficina.	30
6. RESULTADOS.....	32
6.1. Purificação do soro utilizando ácido caprílico.	32
6.1.1. Rendimento proteico do processo de purificação.	32
6.1.2. Eletroforese em gel de poliacrilamida.....	33
6.2. Primeira digestão enzimática.....	34
6.2.1. Quantificação proteica.	34
6.2.2. Eletroforese em gel de poliacrilamida.....	34
6.3. Segunda digestão enzimática.....	35
6.3.1. Quantificação proteica.....	35
6.3.2. Eletroforese em gel de poliacrilamida.....	36
6.4. Terceira digestão enzimática.....	36
6.4.1. Quantificação proteica.	37
6.4.2. Eletroforese em gel de poliacrilamida.....	37
6.4.3. Purificação por cromatografia de gel filtração.....	38
.....	39

6.4.4. Eletroforese em gel de poliacrilamida (pós cromatografia).....	40
6.4.5. Western Blotting	40
7. DISCUSSÃO E CONCLUSÃO	42
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Notificação de acidentes por serpentes do gênero Bothrops	10
Tabela 2 - Esquema de testes de digestão utilizando as enzimas Bromelina, Ficina e Pepsina.....	31
Tabela 3 - Quantificação proteica e rendimento do processo de purificação utilizando ácido caprílico	33
Tabela 4 - Quantificação proteica e rendimento do processo de purificação da primeira digestão enzimática.....	34
Tabela 5 - Quantificação proteica e rendimento do processo de purificação da primeira digestão enzimática.....	35
Tabela 6 - Quantificação proteica e rendimento do processo de purificação da terceira digestão enzimática.....	37

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Esquema básico de imunização de equinos	14
Figura 2 - Sequência esquemática do processo de precipitação pelo ácido caprílico	16
Figura 3 - Estrutura básica de uma imunoglobulina e os locais de ação das enzimas papaína e pepsina.....	18
Figura 4 - Ilustração de alguns possíveis tipos de fragmentos de anticorpos. .	20
Figura 5 - Esquema representativo da classificação das enzimas bromelina, ficina e pepsina	23
Figura 6 - Etapas de purificação do plasma. 1- Plasma bruto. 2- Plasma na etapa de termocoagulação. 3- Purificação com ácido caprílico. 4- Plasma após a purificação.	32
Figura 7: SDS-PAGE – Letra A: Marcador de peso molecular. Letra B: Plasma antes da purificação e Letra C: Plasma após a purificação.....	33
Figura 8 : SDS-PAGE primeira digestão enzimática - Imunoglobulina não digerida, B: Imunoglobulina digerida com Bromelina, C: Imunoglobulina digerida com Ficina	35
Figura 9 - Letras A e B representam os tempos de 6 e 8 horas, respectivamente, da digestão utilizando a enzima Bromelina. A letra C representa o marcador de peso molecular. D e E são os tempos de 6 e 8 horas da digestão utilizando Ficina.	36
Figura 10: SDS-PAGE terceira digestão enzimática – Letra A: Marcador de peso molécula, Letra B: imunoglobulinas digeridas com Bromelina e Letra C: Imunoglobulinas digeridas com Ficina.	37
Figura 11 - Cromatograma referente à purificação dos fragmentos de imunoglobulinas digeridos pela enzima Bromelina.....	38
Figura 12 - Cromatograma referente a purificação dos fragmentos de imunoglobulinas digeridos pela enzima Ficina.	39
Figura 13: SDS-PAGE pós cromatografia - Letra A: Marcador de peso molecular, Letra B: Soro purificado, Letra C e D: picos 1 e 2 respectivamente, coletados durante a purificação, referentes a digestão com a enzima bromelina, Letra E e F: Picos 1 e 2 coletados durante a purificação, referentes a digestão com a enzima ficina.	40

Figura 14: SDS-PAGE - Letra A: Marcador de peso molecular, Letra B: Soro purificado, Letra C e D: picos 1 e 2 coletados durante a purificação, referentes a digestão com a enzima bromelina, Letra E e F: Picos 1 e 2 coletados durante a purificação, referentes a digestão com a enzima ficina..... 41

SÍMBOLOS E ABREVIATÓES

%	Porcentagem
µm	Micrômetro
Da	Daltons
E/S	Enzima/substrato
F(ab') ₂	Fragmento de anticorpo composto pela cadeia pesada depois das pontes dissulfeto H-H intercadeia.
Fab -	Fragmento de anticorpo que contém a cadeia leve e os domínios V _H e C _{H1} da cadeia pesada
Fc	Fragmento do anticorpo que contém o restante das duas cadeias pesadas, cada uma contendo um domínio C _{H2} e C _{H3} IgG Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
KDa	Quilo Dalton
Min	Minutos
mL	Mililitro
mM	Minimolar
°C	Graus Celsius
OMS	Organização Mundial da Saúde
PBS	Solução salina tamponada com fosfato
pH	Potencial hidrogeniônico
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	Eletroforese em Gel de Poliacrilamida
SINAN	Sistema de Informação de Agravos de Notificações
SUS	Sistema Único de Saúde
TBS	Tampão Tris-Salina
TRIS	Hidroximetilaminometado
V	Volts
x g	Força relativa de Centrifugação

RESUMO

Marques, R.F **Ação de Enzimas de Origem Vegetal (Bromelina e Ficina) sobre anticorpos produzidos por cavalos imunizados com veneno de *Bothrops jararaca***. 2016. 59f. Dissertação (Mestrado), Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, 2016

Enzimas proteolíticas de origem vegetal têm sido amplamente empregadas em diversos estudos devido a sua capacidade de clivar anticorpos em fragmentos específicos, o que, para algumas aplicações, pode ser mais interessante do que a molécula de imunoglobulina como um todo.

Além disso, elas podem ser utilizadas diretamente no paciente no papel de um “fármaco” (Há exemplos da aplicação de enzimas no estudo de várias patologias como: doenças auto-imunes, traumáticas ou neurológicas), no auxílio de técnicas clínicas para a detecção de anticorpos e como ferramentas para a produção de soros.

Apesar de a utilização dessas enzimas ter grande importância e extensa aplicabilidade, o modo de ação das proteases não é bem compreendido. A ficina (encontrada nas figueiras) e bromelina (proveniente do abacaxi) são, por exemplo, enzimas que vem sendo exploradas em diversos trabalhos e demonstram capacidade de digerir anticorpos.

Neste projeto, propusemos verificar a atividade destas enzimas sobre anticorpos provenientes de equinos produção de fragmentos imunorreativos de imunoglobulina a partir de proteases de origem vegetal, diminuindo o risco potencial de transmissão de doenças de origem animal. Espera-se que os fragmentos gerados possam contribuir para diversos estudos de ordem clínica e para a produção de soros adequados contra as toxinas presentes nos venenos de animais.

As amostras de soro foram obtidas a partir da imunização dos cavalos pertencentes ao Instituto Butantan, com “pool” de veneno de serpente do gênero *Bothrops*. Esses anticorpos foram purificados utilizando ácido caprílico, digeridos por bromelina ou ficina e diafiltrados. Os resultados obtidos indicam a formação do fragmento de imunoglobulina F(ab)₂, como proposto no projeto, entretanto necessitando ainda de um delineamento experimental mais amplo a fim de otimizar o processo de digestão atingindo uma maior quantidade de fragmentos F(ab)₂.

Palavras-Chave: Ficina, Bromelina, Imunoglobulina, digestão enzimática.

ABSTRACT

Marques, R. F. **Vegetal Enzyme Action (Bromelain and Ficin) on antibodies produced by immunized horses with Bothrops pit viper venom.** 2016. 59f. Dissertação (Mestrado), Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, 2016

Proteolytic enzymes from vegetal origin have been largely employed in several studies due to its capacity to cleave antibodies into specific fragments, which for some applications, could be more relevant than the immunoglobulin molecule itself. Beyond that, they could be used directly into a patient playing the role of a “drug” (There are examples of enzyme application in studies of several pathologies such as autoimmune, traumatic and neurological diseases), in the aid of clinical techniques for antibodies detection and as tools for serum production.

Despite the fact that those enzymes have been of great importance and large applicability, its ease of access and ubiquity in nature, the protease mode of action is still not fully understood. Ficin (found in Fig trees) and Bromelain (found in pineapples) are, for example, enzymes that are being explored in an array of articles and demonstrate the capacity to digest antibodies.

In this project, we propose to verify the activity of such enzymes from vegetal origins over the antibodies obtained from equines in the production of immunoreactive fragments of immunoglobulin, lowering the potential risk of animal origin diseases transmission. It is hoped that the fragments generated can contribute to studies of clinical level and the production of proper serum against toxins present in animal poisons.

Plasma samples were obtained from horse immunization with a venom “pool” from *Bothrops* snakes at Instituto Butantan. These antibodies were purified using caprylic acid, digested by bromelain or ficin and purified again using chromatographic techniques. The results indicate the formation of an immunoglobulin fragment - F(ab)₂, however, more experiments are needed to optimize the digestive process in order to improve the reaction yield.

Keywords: Ficin, Bromelain, Immunoglobulin, enzymatic digestion.

1. INTRODUÇÃO

O Brasil é um dos países com maior diversidade de espécies de fauna e de flora de todo o mundo e possui uma riquíssima variedade de serpentes, contando com 361 espécies. Dentre estas, estão às serpentes do gênero *Bothrops*, pertencentes à família *Viperidae* e à subfamília *Crotalinae*, contendo espécies com elevada relevância em saúde pública. (TEIXEIRA, 2009)

Com a descoberta do princípio da imunização ativa artificialmente induzida e com a evidência de que o sangue dos animais imunizados continham anticorpos, que não só destruíam os agentes invasores, como apresentavam poder terapêutico e profilático, teve-se início à soroterapia antiofídica. Sendo assim, a soroterapia tem a finalidade de combater uma doença específica (no caso de doenças infecciosas) ou um agente tóxico específico (venenos ou toxinas). (ARAÚJO, 2008).

Vital Brazil, médico sanitaria, residindo em Botucatu em 1895, consciente do grande número de acidentes com serpentes peçonhentas no estado de São Paulo começou a realizar experimentos com venenos ofídicos. Baseando-se nos primeiros trabalhos com soroterapia, realizados por Calmette, (que iniciou a produção do primeiro soro antiofídico em 1894 na França, em Lille), desenvolvendo então estudos sobre soros contra o veneno de serpentes e descobrindo a sua especificidade, ou seja, que cada tipo de veneno ofídico requer soros específicos, preparados com o veneno obtido do mesmo gênero de serpente que causou o acidente. (ARAÚJO, 2008).

Os soros antiofídicos são constituídos de IgG, seja em sua forma integral ou também podendo ser utilizadas preparados contendo fragmentos Fab ou F(ab')₂. Em linhas gerais o processo de produção de um soro consiste na concentração das moléculas inteiras de IgG, onde os mesmos são fragmentados utilizando uma enzima (etapa aplicada para produção de fragmentos Fab ou F(ab')₂), purificados e envasados (THEAKSTON, WARRELL E GRIFFITHS, 2003) (DIAS DA SILVA et al., 1989).

Uma das etapas do processo produtivo, seja para a obtenção de um produto contendo IgG integral, ou uma de seus fragmentos (Fab ou F(ab')₂) é o fracionamento, que nada mais é que a separação das moléculas de IgG do restante das outras moléculas contidas no soro. Para esta etapa, usualmente

aplicam-se duas técnicas: precipitação com sulfato de amônio ou precipitação com ácido caprílico (THEAKSTON, WARRELL E GRIFFITHS, 2003). Durante os últimos anos, vários estudos realizados demonstraram que soros obtidos por fracionamento com ácido caprílico induzem menos reações adversas iniciais do que os obtidos através da utilização do sulfato de amônio. Além disso, eles mostraram segurança e perfis de eficácia semelhantes (Eursakun, Simsiriwong, Ratanabanangkoon 2012), (Simsiriwong, Eursakun, Ratanabanangkoon 2012).

Com base nas observações sobre as propriedades de precipitação de ácidos orgânicos (ácido caprílico), houve o desenvolvimento de metodologias seguras e bem definidas, onde tanto o fracionamento utilizando sulfato de amônio ou ácido caprílico, são reconhecidas e indicadas pelo guia oficial de produção de soros da OMS (Organização Mundial da Saúde) (WHO, 2011).

O presente trabalho visa a produção de soro antibotrópico contendo o fragmentos $F(ab')_2$, onde, para isto, são utilizadas enzimas de origem vegetal com capacidade de clivar o anticorpo na região da dobradiça (ponte de sulfeto) gerando o fragmento desejado.

Atualmente a enzima utilizada para a obtenção dos fragmentos $F(ab')_2$ é a pepsina, uma enzima de origem animal e pertencente à família da peptidases subclasse das aspártico endopeptidase.

Dentre as outras classificações das proteases, podemos citar as cisteína endopeptidase, que incluem as proteases vegetais como a papaína, actinidina e bromelina, proteases citosólicas ativadas pelo cálcio (calpaínas) e várias proteases de parasitas. Estas enzimas caracterizam-se pela presença de um resíduo de cisteína com um aminoácido básico adjacente (geralmente histidina) no sítio ativo. Sendo assim, como comprovado em alguns estudos, estas enzimas podem ser capazes de gerar fragmentos semelhantes aos que são obtidos utilizando a pepsina, porém minimizando o risco de carrear contaminantes patogênicos presentes em insumos de origem animal, como é o caso da pepsina. (BARRETT, 1994).

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Veneno botrópico

O Brasil é um dos países com maior diversidade de espécies de fauna e de flora de todo o mundo, e possui uma riquíssima variedade de serpentes contando com 361 espécies conhecidas. Dentre estas, estão as serpentes do gênero *Bothrops*, pertencentes à família *Viperidae* e à subfamília *Crotalinae*, contendo espécies com elevada relevância em saúde pública. (TEIXEIRA, 2009)

As peçonhas das serpentes do gênero *Bothrops* são as mais complexas dos venenos ofídicos, com 90% do seu peso seco constituído por uma mistura de variados peptídeos e proteínas farmacologicamente ativos que induzem uma grande diversidade de sintomas nos pacientes acidentados. Também estão presentes nos venenos, proteínas não tóxicas (WARRELL, 1996). Entre os componentes dos venenos ofídicos, destacam-se as metaloproteases, fosfolipases (PLA2), L-aminoácido oxidases (LAO), nucleases, serinoproteases (ARAÚJO, 2007).

A fração não proteica é composta por carboidratos, lipídios, metais (frequentemente associados à glicoproteínas e metaloproteínas), aminas biogênicas, nucleotídeos e aminoácidos livres, onde as funções de cada componente assim como suas interações no envenenamento humano ainda não estão totalmente esclarecidas (ARAÚJO, 2008).

Por possuir atividades proteolítica, coagulante e hemorrágica, esta mistura complexa de componentes potencialmente tóxicos é responsável por causar distúrbios da hemostasia, incluindo alterações na coagulação sanguínea e edema, além de miotoxicidade. A atividade coagulante é devido à ativação de protrombina e fator X pela fração tipo trombina (*trombin-like*), que promove a conversão direta do fibrinogênio em fibrina, levando a coagulação intravascular disseminada. (AZEVEDO-MARQUES et al. 2003). A atividade hemorrágica, é responsável por lesões na membrana basal dos capilares. O consumo de fatores pela coagulação intravascular disseminada, juntamente com alteração na função plaquetária, agrava o quadro de hemorragia (MELO et al. 2004).

O estudo do veneno de *Bothrops jararaca* permitiu o descobrimento da bradicinina e do Captopril (inibidor da enzima conversora da angiotensina, largamente utilizada no controle da hipertensão arterial, na insuficiência cardíaca congestiva e na doença arterial coronária) (FERREIRA, 1965).

2.2. Soroterapia

Atualmente a soroterapia é o único tratamento eficaz e comprovado para acidentes envolvendo animais peçonhentos e toxinas. A soroterapia consiste na aplicação de um soro constituído por um concentrado de anticorpos nos pacientes.

Segundo informações extraídas do Sistema de Informação de Agravos de Notificações – SINAN, no ano de 2013 foram notificados mais de vinte mil casos de acidentes com serpentes do gênero *Bothrops*. A tabela abaixo, demonstra de forma resumida, em quais os estados brasileiros ocorreram o maior número de acidentes no período mencionado.

Tabela 1 - Notificação de acidentes por serpentes do gênero Bothrops

Notificações por UF Notificação segundo Ano acidente						
Tipo Serpente : Bothrops						
Período: 2013						
AM	PA	MA	BA	MG	SP	Total
1.203	4.597	1.045	1.948	2.597	1.147	20.552

Fonte: <http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/tabnet/tabnet?sinannet/animaisp/bases/animaisbrnet.def> - Acesso em: 20/05/2015

A soroterapia tem a finalidade de combater uma doença específica (no caso de doenças infecciosas) ou um agente tóxico específico (venenos ou toxinas). Com a descoberta do princípio da imunização ativa artificialmente induzida e com a evidência que o sangue dos animais imunizados continha anticorpos, que não só destruíam os agentes invasores, como apresentavam poder terapêutico e profilático, teve início à soroterapia antiofídica. (ARAÚJO, 2008). Vital Brazil, médico sanitário, residindo em Botucatu em 1895, consciente do grande número de acidentes com serpentes peçonhentas no estado de São Paulo começou a realizar experimentos com venenos ofídicos.

Baseando-se nos primeiros trabalhos com soroterapia, realizados por Calmette, (que iniciou a produção do primeiro soro antiofídico em 1894 na França, em Lille), desenvolveu estudos sobre soros contra o veneno de serpentes, descobrindo a sua especificidade, ou seja, que cada tipo de veneno ofídico requer soros específicos, preparados com o veneno obtido do mesmo gênero de serpente que causou o acidente. (ARAÚJO, 2008).

Em 1901, Vital Brazil começou a produzir antivenenos mono e poli-específicos (soro antibotrópico, anticrotálico e antiofídico) no Instituto Soro terapêutico, localizado na Fazenda Butantan (BRAZIL, 1987).

Hoje, mais de um século depois, com algumas poucas modificações, a soroterapia como proposta por Calmette e Vital Brazil, ainda é o único tratamento específico contra os acidentes ofídicos.

Em 1989 pesquisadores do Instituto Butantan estudaram e desenvolveram o soro antibotrópico pentavalente, um produto capaz de neutralizar a ação das toxinas de cinco serpentes uma única apresentação, trazendo assim, uma série de benefícios tanto para o paciente quanto para o processo produtivo.

O protocolo de imunização e a definição das espécies do gênero *Bothrops* foram determinados a partir de estudos pré-clínicos elaborados por Dias da Silva e colaboradores (1989) e os resultados foram comprovados através de análises imunológicas, assim produzindo um soro capaz de neutralizar uma grande gama de venenos de serpentes pertencentes ao gênero *Bothrops* (DIAS DA SILVA et al., 1989).

O estudo foi definido selecionando as cinco espécies mais prevalentes no Brasil e atribuindo porcentagens de concentração de veneno para compor o pool utilizado para realizar a imunização dos cavalos. Entre eles estão: *B. jararaca* – 50%, *B. alternatus*, *B. moojeni*, *B. jararacuçu* e *B. neuwiedi*- 12,5 % cada. Para tal, foram realizados testes para detectar anticorpos específicos por técnicas imunoquímicas (ELISA, imunodifusão dupla radial e métodos quantitativos de precipitação) e provas biológicas (atividade hemolítica indireta e letalidade) (PINHO, PEREIRA 2001), (DIAS DA SILVA et al., 1989).

Atualmente o soro antibotrópico é produzido pelo Instituto Butantan-IB-(SP), pelo Instituto Vital IVB-(RJ) e pela Fundação Ezequiel Dias -FUNED-(MG). Os soros antiofídicos são disponibilizados gratuitamente a população

através do Sistema Único de Saúde – SUS, não sendo comercializados nem disponíveis na rede de hospitais privados. (ARAÚJO, 2008).

2.3. Produção de Soros Antiofídicos

Envenenamentos causados por mordidas de animais e picadas representam um problema público relevante em todo o mundo. No caso de ataques por serpentes, foi estimado que mais de 5 milhões de casos ocorrem por ano, sendo que 50.000-100.000 deles são fatais. Muitos outros animais, além das serpentes, também podem promover envenenamento, como por exemplo: escorpiões, aranhas, peixes, moluscos, celenterados e insetos. Além de morte, alguns envenenamentos também estão relacionados com danos permanentes no tecido local onde o indivíduo foi atacado, chegando inclusive a causar deficiências motoras, causando um grave problema de ordem social e econômica, sobretudo em países em desenvolvimento. Isto ocorre devido uma vasta gama de proteínas de várias estruturas, que possuem efeitos farmacológicos muito variados, consequentemente efeitos de diversas magnitudes (ARAÚJO, 2008).

Desde o desenvolvimento do primeiro antídoto no fim do século XIX, a administração parental de anticorpos ou fragmentos de anticorpos é a principal estratégia na terapia de envenenamentos induzidos por mordidas ou picadas de animais. As preparações de anticorpos são realizadas em muitos laboratórios ao redor do mundo a partir do plasma de animais, sobretudo equinos e ovinos (este último em menor proporção), imunizados com os venenos. Ou seja, os soros hiperimunes são preparações constituídas por anticorpos policlonais de origem heteróloga (GRIFFITHS.B.E. et al, 2008)

Os soros antiofídicos produzidos no Brasil, são constituídos por fragmentos $F(ab')_2$ de IgG equina, porém existem formulações que são constituídas de fragmentos $F(ab)$ ou a molécula inteira de IgG, onde os mesmos são concentrados, fragmentados (etapa aplicada para formação de fragmentos Fab ou $F(ab')_2$), purificados e envasados (THEAKSTON, WARRELL E GRIFFITHS, 2003) (DIAS DA SILVA et al., 1989).

A produção de soros antiofídicos no Brasil, ainda hoje é baseada nos métodos originalmente descritos por Vital Brazil em 1903, onde, cavalos são imunizados com uma formulação que é constituída pelo de veneno da serpente e de um adjuvante. Existem dois protocolos diferentes para a obtenção de soros hiperimunes. Os animais podem ser inoculados com veneno de uma ou mais espécies de serpentes, originando assim, soros mono ou poliespecíficos. Os soros poliespecíficos podem ser obtidos tanto pela imunização dos animais com uma mistura de venenos, quanto pela imunização dos animais com veneno de uma única espécie de serpente e posterior mistura de diferentes soros mono específicos, o que atualmente, é o mais utilizado. (ARAÚJO, 2008)

Outro aspecto a ser levado em conta é a grande variabilidade na composição dos venenos existentes entre animais da mesma espécie. Esta variação está relacionada com a distribuição geográfica, alimentação, sexo, idade das serpentes e época do ano em que é feita a coleta. Portanto a mistura de imunização deve incluir venenos de vários animais, procurando respeitar estas variações (CARDOSO, YAMAGUCHI E MOURA DA SILVA, 2003).

De forma geral, a produção dos soros hiperimunes é realizada de acordo com as seguintes etapas:

1. O veneno liofilizado (antígeno) é diluído e injetado no cavalo, em doses adequadas. Esse processo leva 40 dias e é chamado hiperimunização.
2. Após a hiperimunização, é realizada uma sangria exploratória, retirando uma amostra de sangue para medir o teor de anticorpos produzidos em resposta às injeções do antígeno.
3. Quando o teor de anticorpos atinge o nível desejado, é realizada a sangria final, retirando-se cerca de quinze litros de sangue de um cavalo de 500 kg em três etapas, com um intervalo de 48 horas.
4. No plasma (parte líquida do sangue) são encontrados os anticorpos. O soro é obtido a partir da purificação e concentração desse plasma.
5. As hemácias são devolvidas ao animal, através de uma técnica desenvolvida no Instituto Butantan, chamada plasmaferese. Essa técnica de reposição reduz os efeitos colaterais provocados pela sangria do animal.
6. No final do processo, o soro obtido é submetido a testes de controle de qualidade (FINGOLA, 2011).

O esquema abaixo ilustra de maneira simples o processo de imunização dos equinos para a produção de anticorpos contra o antígeno inoculado.

Figura 1 - Esquema básico de imunização de equinos

Disponível em: http://www.ninha.bio.br/biologia/cobra_veneno.html Acesso em: 05/04/2016

2.4. O Ácido Caprílico e a purificação de imunoglobulinas.

Vários métodos foram desenvolvidos para a produção/purificação de plasmas hiperimunes. Técnicas cromatográficas, tais como a afinidade e troca iônica, produzem um produto de alta qualidade, mas o custo em contra partida é bastante elevado e exige equipamento especializado, fazendo com que a utilização de outras vias sejam necessárias para se obter um produto puro e com bom rendimento (OTERO-PATÍÑO 2012).

Atualmente existem basicamente duas formas para se realizar o fracionamento de IgG integras ou para a fração $F(ab')_2$; a utilização do sulfato de amônio ou ácido caprílico. Durante os últimos anos, vários estudos realizados demonstraram que soros obtidos por fracionamento com ácido caprílico induzem menos reações adversas iniciais do que os obtidos através da utilização do sulfato de amônio. Além disso, as IgGs fracionadas por ambos os métodos mostraram segurança e perfis de eficácia semelhante tanto para antivenenos compostos por fragmentos $F(ab')_2$ obtidos a partir de diferentes fabricantes ou até mesmo produtos contendo IgG em sua forma integra (EURSAKUN,

SIMSIRIWONG, RATANABANANGKOON 2012), (SIMSIRIWONG, EURSAKUN, RATANABANANGKOON 2012).

Os métodos baseados em precipitação com sulfato de amônio, tanto para a produção de IgG íntegra quanto para a fração F(ab')₂ geralmente provocam perda de rendimento e a possibilidade de formação de agregados (OTERO-PATIÑO 2012).

A metodologia utilizando ácido caprílico para a precipitação de proteínas séricas com exceção da IgG e tem sido desenvolvida e utilizada há muito tempo, existindo sobre ela, relatos de sua excelente performance com soros hiperimunes produzidos a partir da extração de plasma de cavalos, onde por um único passo de precipitação, ocorre a separação da IgG com alto grau de rendimento e sem interferência em suas atividades (OTERO-PATIÑO 2012).

As primeiras observações sobre suas aplicações na produção de soros hiperimunes, tanto na forma de IgG íntegra quanto na produção de fragmentos F(ab')₂ foi realizada por Dos Santos et al. (DOS SANTOS et al. 1989) (AL-ABDULLA, IBRAHIM, CASEWELL 2014). Porém, antes mesmo de sua aplicação na produção de soros hiperimunes, o ácido caprílico já vinha sendo utilizado no campo farmacêutico, onde em baixa concentração era classicamente utilizado para estabilizar a albumina humana comercial contra a desnaturação (MORAIS & MASSALDI 2012).

O ácido caprílico é um ácido saturado de oito carbonos e sua fórmula molecular é CH₃(CH₂)₆COOH (BRODSKY et al, 2012) e com base nas observações sobre as propriedades de precipitação de ácidos orgânicos de cadeia curta e média, houve o desenvolvimento de diversas metodologias.

Alguns pesquisadores utilizaram a capacidade de ácido caprílico para precipitar proteínas plasmáticas, principalmente a albumina, conseguindo manter praticamente intacta a fração de imunoglobulina (MORAIS & MASSALDI 2012).

Além disso, este processo é superior, em termos de maior rendimento, menor tempo de produção e uma menor formação de agregados de proteína quando comparado com a precipitação com sulfato de amônio (NUDEL, IÁCONO E CASCONI, 2012).

Devido à simplicidade do método e à pureza alcançada, algumas instituições dedicadas à produção de antiveneno adotaram esta tecnologia para

substituir ou complementar o processo tradicional baseado em precipitação com sulfato de amônio (MORAIS & MASSALDI 2012).

O mecanismo de ação de precipitação por ácido caprílico das proteínas séricas ainda não foi claramente estabelecida. É provável que as moléculas de ácido caprílico promovam a precipitação mediante os seguintes passos: as moléculas de ácido caprílico primeiro se ligam a locais específicos disponíveis da proteína, provocando assim alterações de conformação das moléculas, expondo novas regiões. Em seguida, as moléculas de ácido caprílico continuam a se incorporar nos locais originais e recém-criadas do complexo macromolecular na forma de estruturas semelhantes a micelas que criam pontes entre estes complexos, até que um fenômeno de cascata de precipitação ocorra (MORAIS & MASSALDI 2012).

Figura 2 - Sequência esquemática do processo de precipitação pelo ácido caprílico

Como a IgG sempre permanece solúvel, a perda de rendimento e a possibilidade de formação de agregados deste método são menores. A um pH baixo, a hidrofobicidade da porção de ácido caprílico domina e faz proteínas ácidas, tais como albumina (em sua maior parte) precipitar em solução. Anticorpos com pH básico tem carga suficiente para neutralizar esta hidrofobicidade e permanecem no sobrenadante (NUDEL, PERDOMÉNICO LÁCONO CASCONI 2012) (MORAIS & MASSALDI 2012).

2.5. Processamento de Imunoglobulinas

O processamento (clivagem) de imunoglobulinas para uso humano se faz necessário pois promove certas vantagens aos quais os fragmentos íntegros não possuem, como será melhor descrito no decorrer deste item.

No que tange a etapa de clivagem de imunoglobulinas, em alguns casos, a molécula de IgG não é indicada para a utilização em sua forma íntegra, pois pode acarretar reações adversas. Já seus fragmentos – Fab e $F(ab')_2$ – diminuem a ocorrência destas reações. A utilização dos fragmentos em separado é possível porque eles são estruturas termodinamicamente independentes e suas propriedades de ligação com o antígeno não são afetadas (TISCHENKO et al, 1982).

A porção Fc é fundamental nos estudos da ligação biológica ao receptor de Fc, mediando assim, a citotoxicidade celular anticorpo-dependente e a fixação do sistema complemento. O fragmento bivalente $F(ab')_2$ produzido pela digestão com pepsina e o fragmento monovalente Fab gerado pela digestão do anticorpo com papaína, são utilizados em estudos envolvendo a interação entre os sítios de ligação dos anticorpos com os antígenos; Os fragmentos $F(ab')_2$ e Fab de imunoglobulina IgG proporcionam a redução de interações não específicas causadas pela região Fc, diminuindo os impedimentos alostéricos e a imunogenicidade, que são elementos cruciais para um tratamento com baixo efeitos colaterais. (BELENKY, WASK-ROTTER, SOMMER 2003).

De maneira geral a ativação do sistema complemento é extremamente desvantajosa pois propicia riscos ao paciente que está sob tratamento. O processo de ativação ocorre rapidamente após influência de um estímulo específico, seguindo uma cascata de auto-amplificação. As três vias principais

de ativação são: a clássica, a alternativa e a da lectina. A via clássica é ativada quando anticorpos IgG ou IgM se ligam a antígenos (vírus, bactérias, toxinas ou auto-antígenos) formando imunocomplexos, fazendo parte da resposta imune específica (ABBAS, 2005). Dependendo da proporção da ativação do sistema complemento (que está diretamente ligado a concentração de IgG circulantes no organismo) podem ocorrer reações adversas gravíssimas, levando inclusive o paciente ao choque anafilático e consequentemente podendo leva-lo ao óbito (FLANAGAN e JONES, 2004).

Figura 3 - Estrutura básica de uma imunoglobulina e os locais de ação das enzimas papaína e pepsina.

A molécula é composta por duas cadeias peptídicas “pesadas” e duas “leves” e tem dois locais de ligação ao antígeno. VL e VH denotam regiões variáveis de cadeia leve e pesada, respectivamente. CH1, CH2 e CH3 são

regiões “constantes” na cadeia “pesada”; CL é uma região “constante” da cadeia “leve”; -CHO representa porções de carboidrato ligados ao fragmento Fc.

Segundo Milenic e colaboradores, existem diversos tipos de fragmentos de IgG ativos que e que podem ser obtidos através de digestões. Os nomes (nomenclatura) e estruturas de fragmentos de IgG típicas são ilustradas no diagrama a seguir e resumidas abaixo.

- Fragmentos F(ab')₂

Fragmentos F(ab')₂ (110.000 dalton) contêm duas regiões de ligação ao antígeno unidas na região da dobradiça através de pontes dissulfeto.

- Fragmentos Fab'

Fragmentos Fab' (55.000 daltons) podem ser formados pela redução de fragmentos F(ab')₂. O fragmento Fab' contém um grupo sulfidril livre que pode ser alquilado ou utilizado na conjugação com uma enzima, toxina ou outra proteína de interesse.

- Fragmentos Fab

Fab (50.000 daltons) é um fragmento monovalente que é produzido a partir de IgG, consistindo em regiões VH, CH1 e VL, CL, unidas por uma ligação de dissulfeto intramolecular.

- Fragmentos Fv

Fv (25.000 daltons) é o menor fragmento produzido a partir de IgG, que contém um local de ligação ao antígeno completo. Fragmentos Fv têm as mesmas propriedades de ligação e características de ligação tridimensionais semelhantes ao Fab. As cadeias VH e VL dos fragmentos Fv são mantidos juntos por interações não-covalentes. Estas cadeias tendem a dissociar-se após diluição, por isso têm sido desenvolvidos métodos para reticular as cadeias através de glutaraldeído, de dissulfeto intermolecular ou um ligante peptídico.

- Fragmentos "rIgG"

"rIgG" refere-se à redução de IgG (75.000 daltons) ou meia-IgG. É o produto da redução seletiva apenas das ligações de dissulfeto da região da dobradiça. Embora várias ligações dissulfeto ocorrem em IgG, aqueles na região da dobradiça são mais acessíveis e mais fáceis de reduzir, especialmente com agentes redutores suaves, como 2-mercaptoetilamina (2-MEA).

- Fragmentos Fc

Fc (50.000 daltons) fragmentos que contêm a região CH2 e CH3 e parte da região da dobradiça e são mantidas juntos por uma ou mais ligações dissulfeto e interações não covalentes. Fragmentos Fc são produzidos a partir da fragmentação de IgG,. O termo Fc é derivado da capacidade destes fragmentos de anticorpo para cristalizar. Fragmentos Fc são gerados inteiramente a partir da região constante da cadeia pesada de uma imunoglobulina. O fragmento Fc não pode se ligar ao antígeno, mas é responsável pelas funções efetoras dos anticorpos, tais como a fixação do complemento (MILENIC, 1989).

Figura 4 - Ilustração de alguns possíveis tipos de fragmentos de anticorpos.

2.6. Enzimas Proteolíticas na Produção de Soros

Os meios como são produzidos os soros variam entre os laboratórios. Em função da massa molecular da molécula neutralizante, três tipos de produtos estão disponíveis:

- Soros de IgG, nos quais toda a molécula de imunoglobulina é purificada através de técnicas de precipitação com sulfato de amônio ou ácido caprílico;
- Soros de $F(ab')_2$, obtidos pela digestão enzimática da molécula de IgG com a enzima pepsina seguido por precipitação com sulfato de amônio.

- Soros de Fab, preparados por digestão enzimática da molécula de IgG com papaína, produzindo o fragmento monovalente Fab (FLANAGAN, JONES, 2004).

Alguns produtores incluem passos adicionais de purificação (como cromatografia de troca iônica ou de afinidade) com o objetivo de obterem produtos com maior pureza e segurança, como é o caso do Instituto Butantan (FLANAGAN, JONES 2004).

Devido às suas diferentes massas moleculares, esses três tipos de soros possuem diferentes perfis farmacocinéticos. Os fragmentos Fab e F(ab)₂ possuem o maior volume de distribuição e atingem rapidamente componentes extra vasculares. Antagonicamente, as moléculas de IgG possuem menor volume de distribuição e maior meia-vida, apresentando menor circulação pelos espaços intersticiais do corpo. Em ambos os casos, a eliminação dos fragmentos de anticorpos e da IgG íntegra, ocorre através da filtração glomerular (FLANAGAN e JONES, 2004).

Para serem eficazes, os soros devem preencher alguns requisitos:

- (1) Alta afinidade às toxinas mais relevantes do veneno a ser neutralizado, a fim de promover uma forte neutralização da sua toxicidade.
- (2) Perfil farmacocinético compatível com aquele do veneno a ser neutralizado. Assim, por exemplo, para venenos cujos principais efeitos tóxicos são induzidos por toxinas de baixo peso molecular, rápida difusão e grande volume de distribuição, um antídoto com as mesmas características deve ser utilizado.
- (3) Manutenção de elevados índices de anticorpo no plasma (BRASIL, 1987).

A complexidade dos venenos, muitos dos quais possuem toxinas tanto de alto peso molecular quanto de baixo peso molecular, com diferentes alvos e mecanismos de ação, torna a seleção de um perfil farmacocinético de soro uma tarefa muito difícil e controversa. Devido a esta complexidade, alguns soros podem incluir uma mistura de fragmentos Fab e moléculas de IgG ou F(ab')₂. Por esse motivo, a escolha da enzima adequada para clivar a molécula de IgG é parte fundamental da produção dos soros (GUTIERREZ, LEÓN, LOMONTE 2003) (GUTIÉRREZ, OWNBY 2003).

A decisão das características ótimas de um soro em particular depende da análise detalhada da farmacocinética do veneno a ser neutralizado, bem

como da compreensão dos mecanismos e tempo de ação das toxinas deste veneno (GUTIERREZ, LEÓN, LOMONTE 2003).

Enzimas diferentes produzem resultados bastante distintos. A pepsina, por exemplo, nem sempre produz fragmentos imunorreativos. Em um estudo em que ela foi utilizada para gerar fragmentos Fab a partir de anticorpos monoclonais de rato, ovelha, cabra e anticorpos policlonais de ratos, seguido de uma redução utilizando 2-mercaptoetanol, houve uma taxa de 50% de sucesso na geração de fragmentos Fab funcionais: O método de fragmentação e digestão utilizado foi bem-sucedido na produção de fragmentos funcionais Fab em anticorpos de ovelha anti-*Bacillus anthracis* e em anticorpos policlonais de ratos anti-ricina. Entretanto, fracassou no caso do anticorpo policlonal de cabra anti-*Yersinia pestis* e para o anticorpo monoclonal de rato anti-ricina (GAUCI, ALDERTO 2001).

Nos ensaios de RBC (Rede Brasileira de Calibração), onde as enzimas papaína, bromelina e ficina foram utilizadas para aumentar a reatividade dos anticorpos sanguíneos, a reatividade observada no ensaio de SPRCA (*solid-phase RBC adherence*) para as três enzimas é muito similar. Os resultados falso-positivos obtidos com o tratamento enzimático são muito baixos, sendo que a ficina parece produzir melhores resultados (LEACH, AUBUCHON 2002).

As enzimas pepsina, bromelina e ficina mostram diferentes capacidades de fragmentação para o anticorpo monoclonal de rato IgG1 e os fragmentos obtidos possuem diferentes estabilidades e imunorreatividades. A pepsina gera bons resultados de digestão, entretanto podendo ser descontínuos, sua reatividade varia desde a produção de pequenos fragmentos inativos até a total falta de capacidade de digerir imunoglobulina. A atividade da pepsina é fortemente dependente do pH e a imunorreatividade dos fragmentos obtidos não é sempre conservada. A bromelina e, em particular, a ficina, geram bons resultados. A digestão é estável e todos os anticorpos monoclonais são, em geral, reduzidos à $F(ab')_2$ em tempo e volume de produção compráveis, porém, os fragmentos de $F(ab')_2$ obtidos com a ficina possuem uma imunorreatividade mais conservada (MARIANI et al, 1991).

Os modos de ação das enzimas proteolíticas de origem vegetal – incluindo papaína, bromelina e ficina - parecem ser múltiplos e ainda não são muito bem definidas, entretanto, elas têm sido utilizadas experimentalmente e em práticas

podendo ser utilizadas diretamente no paciente no papel de um “fármaco” (Há exemplos da aplicação de enzimas no estudo de várias patologias como: doenças auto-imunes, traumáticas ou neurológicas), no auxílio de técnicas clínicas para a detecção de anticorpos e como ferramentas para a produção de soros. (LEACH, AUBUCHON, 2002)

De acordo com o comitê de nomenclatura da união internacional de bioquímica e biologia molecular (NC-IUBMB Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology) as enzimas Bromelina e Ficina pertencem às classes das hidrolases, subclasses das peptidases organizadas em um grupo denominado de cisteína endopeptidases, enquanto a enzima Pepsina, que também pertence as peptidases se diferencia da Bromelina e Ficina quanto ao grupo em que estão organizados, pertencendo às aspártico endopeptidases. A figura abaixo ilustra como estas enzimas estão organizadas.

Figura 5 - Esquema representativo da classificação das enzimas bromelina, ficina e pepsina

A bromelina foi identificada por Marcano em 1891 e é uma das enzimas proteolíticas encontradas no abacaxi. (LIANHONG et al, 2011). Bromelina é um nome coletivo para todas as enzimas proteolíticas encontradas nos tecidos, incluindo o tronco, frutas e folhas da planta da família do abacaxi *Bromeliaceae*.

O isolamento de enzimas de abacaxi e seu estudo foram investigados desde 1894 (DEVAKATE et al 2008).

O interesse contínuo na bromelina se dá por suas inúmeras aplicações na indústria alimentar, bem como em medicina e farmacologia e, portanto, muitos estudos visam obter bromelina em sua forma mais purificada. (DEVAKATE et al 2008). A enzima encontra-se ativa em pH na faixa de 4,5 e 7,5, com temperatura entre 35°C a 45°C e possui peso molecular de 33.200 Da.

Já a ficina é proveniente do Figo, extraída a partir do látex da espécie *Ficus*. As informações disponíveis indicam que ficina aparentemente tem muitas propriedades comuns com papaína (uma cisteíno-protease obtida da fruta *Carica papaya*) pepsina como, por exemplo, especificidade pelo mesmo substrato, atividade esterase, reações transpeptidase e ativação por agentes de redução. A enzima possui peso molecular de 25.000 Da e sua atividade ótima ocorre na faixa de pH de 5,0 a 7,5 e temperatura de 50°C a 55°C (DEVARAJ et al. 2010).

No que tange a segurança na utilização de insumos de origem animal, por exemplo, foram descobertos de maneira acidental a presença de agente adventício em vacinas, que inclusive eram licenciadas, isso na década de 50, apresentando desde então questões que levam a grandes discussões entre as autoridades reguladoras de todo o mundo (Petricciani et al, 2014) (McClenahan, Krause e Uhlenhaut, 2011).

Embora haja a adesão as melhorias contínuas de Boas Práticas de Fabricação e “Quality by Design” pelas indústrias produtoras de Imunobiológicos, bem como o advento de tecnologias cada vez mais sensíveis para a detecção de agentes adventícios, os processos produtivos ainda correm riscos de contaminantes, principalmente quando são utilizados insumos de origem animal, demonstrando a necessidade de substituição destes. (Burnouf et al, 2004), (Petricciani et al, 2014), Gilliland et al, 2012).

3. OBJETIVOS

Analisar a atividade biológica de anticorpos provenientes de equinos após sua digestão com as enzimas de origem vegetal - bromelina e ficina.

Verificar a imunoreatividade destes anticorpos após a digestão enzimática sob a perspectiva em sua capacidade de reagir contra veneno antibotrópico.

4. JUSTIFICATIVA

Diferentes enzimas produzem resultados distintos na digestão de um mesmo anticorpo e uma mesma enzima gera fragmentos diferentes ao clivar anticorpos diferentes. Como a variedade de anticorpos existentes na natureza é muito grande, um *screening* para definir a enzima que produz fragmentos mais imunorreativos ao digerir um determinado anticorpo é extremamente necessário para futuras aplicações de natureza terapêutica.

Enzimas de origem vegetal são ideais para a realização deste *screening* porque são facilmente encontradas, relativamente fáceis de serem extraídas e, sobretudo, sua utilização diminui o risco de transmissão de doenças de origem animal, uma vez que atualmente são utilizados nos processos produtivos enzimas extraídas de substratos animais.

O estudo mais detalhado das enzimas proteolíticas pode proporcionar novas técnicas para a produção de soros (sobretudo anti-tóxicos e anti-peçonhentos), a partir de enzimas diferentes – não apenas a pepsina e a papaína podem ser testadas. Novas enzimas podem produzir soros a partir de fragmentos de IgG de menor peso molecular e, conseqüentemente, com melhor capacidade de difusão, o que é muito interessante, visto que assim, a dose de soro ministrada poderia ser menor, o que diminuiria o risco de um choque anafilático.

A aplicação de enzimas de origem vegetal na produção de soros hiperimunes concilia a tentativa de obtenção de fragmentos $F(ab')_2$ com maior atividade com a diminuição do risco de contaminação por vírus derivados de substratos de origem animal.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1. Obtenção do soro

Para a obtenção do soro a partir do sangue de cavalos, os mesmos foram previamente imunizados com o “pool” de veneno de serpentes do gênero *Bothrops* seguindo os protocolos de imunização do Instituto Butantan. Após o período preconizado, foi realizada a coleta do sangue em bolsa apropriada e a coagulação ocorreu durante uma hora à temperatura ambiente. Uma vez formados os coágulos, estes foram removidos das bolsas e depois a amostra foi mantida a 4°C.

5.2. Purificação do soro e fragmentos de IgG.

5.2.1. Purificação do plasma utilizando ácido caprílico

A purificação foi realizada com 10mL de amostra utilizando a metodologia descrita em M. C. dos Santos et al (1989), com modificações e seguiu-se as seguintes etapas:

- a) A amostra foi aquecida a 56°C por 15min em seguida centrifugado a 900 x g por 10min.
- b) Após a centrifugação o pH foi ajustado para 5,0 com ácido acético a 0,5M.
- c) Foi adicionado ácido caprílico a uma concentração de 8,7% no volume final de amostra, o ácido foi adicionado em etapa única e ficou sob agitação durante 30min em temperatura ambiente.
- d) Após esta etapa a amostra foi novamente centrifugada a 11.000 x g por 15min, o sobrenadante foi retirado e filtrado em membrana de 45 µm (Millipore®).
- e) Após a centrifugação e filtração do sobrenadante, o pH da amostra foi ajustado para 7,0 com NaOH 0,1N, de modo a neutralizar o ácido caprílico.
- f) Como última etapa as amostras foram diafiltradas em tubos de filtração molecular com capacidade de 15mL e membrana com "Cut off" de 50.000Da (Millipore®).
- g) As amostras foram filtradas em membrana de 0,45 µm (Millipore®) e armazenada em frascos de vidro sob refrigeração entre 2°C e 8°C.

5.2.2. Purificação dos fragmentos de IgG por cromatografia de gel filtração

A separação das frações de imunoglobulinas foi realizada utilizando o sistema Akta Purifier 100 (GE Healthcare), com coluna Superdex 200 10/300 GL (GE Healthcare) e eluição por fluxo constante de bicarbonato de amônio 50 mM pH 0,45 mL/min. A amostra foi manualmente injetada, sendo 400 µg cada corrida, em um volume máximo de 400 µL. O conteúdo eluído foi monitorado por UV, em comprimento de onda 280 nm e os picos foram coletados automaticamente de acordo com o perfil cromatográfico. Após a coleta das frações as amostras foram liofilizadas para subseqüentes análises.

5.3. Determinação de teor de proteínas.

A concentração proteica das amostras de plasma em suas etapas de processamento/digestão foi determinada através da leitura em espectrofotômetro Nanodrop ND-200 (Thermo Scientific). Onde 2 µL de amostras foram aplicados em duplicatas para determinação da média.

5.4. Eletroforese em gel de poliacrilamida.

Para os testes realizados foram utilizadas amostras das etapas citadas acima, em uma massa de 7,5 µg/amostra para coloração de prata.

A eletroforese foi realizada em gel de poliacrilamida 10% e gel de empilhamento a 3%. Em todas as amostras adicionou-se o tampão de amostra: Tris 50 mM, pH 6,8, glicerol 10%, SDS 10%, azul de bromofenol 0,008 mg/mL. Como padrão de peso molecular foi utilizado marcador page ruler prestained protein ladder Prec; (Thermo Scientific, EUA) em cada gel. A corrida de separação foi realizada em 90V até a saída do corante azul de bromofenol do gel.

A coloração do gel foi realizada utilizando o kit PlusOne Silver Staining Kit (GE Healthcare) de acordo com as instruções do fabricante.

5.5. Western Blot

A eletroforese foi realizada em gel de poliacrilamida 8% e gel de empilhamento a 3%. Foram adicionados 5 µg de proteína de cada amostra.

Em todas as amostras adicionou-se o tampão de amostra: Tris 50 mM, pH 6,8, 25 mM, glicerol 10%, SDS 10%, azul de bromofenol 0,008 mg/mL. Como padrão de peso molecular foi utilizado marcador page ruler prestained protein ladder Prec; (Thermo Scientific, EUA) em cada gel.

A corrida de separação das IgGs e seus fragmentos foi realizada em 90V até a saída do corante de bromofenol do gel. Após a eletroforese realizou-se a transferência semi-úmida (0,85 mA/cm² durante 1 hora) para membrana de nitrocelulose (Amersham Bioscience®). Na transferência para a membrana foi utilizado tampão glicina (glicina 39 mM, tris base 48 mM, SDS 0,037% e metanol

20%). Após a transferência, a membrana foi lavada três vezes com tampão tris-salina (TBS) contendo 0,1% tween 20 durante cinco minutos, e incubada por 1 hora em solução de bloqueio contendo 3% de leite em pó desnatado (Molico, Nestlé) diluído em TBS. Após o bloqueio de reações inespecíficas, a membrana foi incubada com veneno botrópico na concentração 200 µg/mL e diluídos 1:4000 em TBS + 1% Tween sob leve agitação, a temperatura ambiente por 90 min. Em seguida a membrana foi incubada com o soro antibotrópico de coelho, partindo de uma concentração de 1,5mg de proteína por mL na diluição de 1:5000, sendo incubado *overnight* em temperatura ambiente, sob leve agitação. Após este período a membrana foi novamente lavada com TBS + 1% tween e em seguida foi adicionado o anticorpo secundário comercial anti-imunoglobulina (IgG) de coelho conjugado com peroxidase (Sigma-Aldrich Co. LLC), diluído 1:5000 em TBS + 1% tween, sob agitação leve por 90 min. em temperatura ambiente. Após esta etapa a membrana foi novamente lavada com TBS + 1% tween, e a revelação foi feita pela adição de 50 mL de TBS contendo 25 µL de peróxido de hidrogênio 30% e 16 mg de Diaminobenzidina (DAB)

5.6. Digestão de imunoglobulinas purificadas utilizando Bromelina e Ficina.

Partindo da amostra de soro contendo 500 µg/mL de proteína, foram utilizadas as concentrações de enzimas determinadas segundo (MARIANI et al, 1990) na proporção 1:50 e 1:30 E/S para bromelina (EC 3.4.22.32) (Sigma Chemicals, St Louis, MO.) e ficina (EC 3.4.22.3) (Sigma Chemicals, St Louis, MO.) respectivamente para execução do processo de digestão.

Ambas as amostras foram diluídas para o volume final de 5,0 mL, contendo assim, aproximadamente 2,5 mg de proteínas do soro purificado e mantidas as mesmas condições de pH e temperatura (7,0 e 37°C) em tampão Tris-HCl, pH 7,0 e adicionado L-cisteína para concentração final de 50mM, 4mM e 1mM.

Após a amostra ter a temperatura estabilizada foram adicionadas as enzimas nas proporções mencionadas acima e o processo de digestão ocorreu durante 1 hora (no primeiro experimento) e em 8 horas nos demais. Após este período foi adicionado inibidor enzimático (Protease Inhibitor Cocktails – Sigma-Aldrich) na concentração de 1:10.

Após o término da digestão as amostras foram centrifugadas utilizando o sistema de diafiltração em sistema de filtração com “Cut off” de 50.000Da (Millipore ®).

Ao término da diafiltração as amostras foram armazenadas sob refrigeração a -20°C.

A tabela abaixo demonstra de forma resumida as condições dos experimentos realizados.

Tabela 2 - Esquema de testes de digestão utilizando as enzimas Bromelina, Ficina e Pepsina

	Bromelina				Ficina			
	pH	Temp	Conc. cisteína	Tempo	pH	Temp.	Conc. cisteína	Tempo
Digestão 1	7,0	37°C	0	1h	7,0	37°C	0	1h
Digestão 2	7,0	37°C	50mM/mL	8h	7,0	37°C	50mM/mL	8h
Digestão 3	7,0	37°C	1mM/mL	8h	7,0	37°C	1mM/mL	8h

6. RESULTADOS

6.1. Purificação do soro utilizando ácido caprílico.

Nas figuras de 6 (abaixo) é possível observar as modificações das características físicas (aspecto e cor) do soro sob o processo de purificação. A figura 6 mostra o soro sem qualquer tipo de alteração. Primeiramente o soro passa pela etapa de termocoagulação onde é possível observar a formação de turvação tendo como principal fator a desnaturação de fibrina. A adição do ácido caprílico torna a amostra leitosa. A finalidade do ácido caprílico nesta etapa é a precipitação de diversas proteínas que não as imunoglobulinas. Por fim, após todos os processos descritos no item 5.2, pode-se observar a amostra límpida e a confirmação da etapa de purificação é demonstrada pela eletroforese.

Figura 6 - Etapas de purificação do plasma. 1- Plasma bruto. 2- Plasma na etapa de termocoagulação. 3- Purificação com ácido caprílico. 4- Plasma após a purificação.

6.1.1. Rendimento proteico do processo de purificação.

O processo de purificação elimina diversos tipos de proteínas de não interesse, sendo assim, através da quantificação de proteína nas etapas citadas na tabela abaixo, é possível observar o rendimento em volume, concentração proteica e porcentagem de rendimento das etapas analisadas.

Tabela 3 - Quantificação proteica e rendimento do processo de purificação utilizando ácido caprílico

<i>Etapas</i>	<i>Concentração proteica (mg/mL)</i>	<i>Rendimento proteico (%)</i>
Soro bruto	82,02	100
Soro purificado	34,93	42,58

6.1.2. Eletroforese em gel de poliacrilamida.

A avaliação das etapas de purificação foi realizada através da eletroforese, onde é demonstrada a redução de impurezas contidas no soro no concluir das etapas de purificação.

Figura 7: SDS-PAGE – Letra A: Marcador de peso molecular. Letra B: Plasma antes da purificação e Letra C: Plasma após a purificação.

Após a obtenção de do soro purificação foi dado início aos processos de digestão enzimática seguindo os protocolos descritos acima.

6.2. Primeira digestão enzimática.

A digestão das imunoglobulinas ocorreu seguindo os parâmetros conforme descrito no item 5.6 e a escolha destes parâmetros se fizeram com o intuito de mimetizar o processo que ocorre na rotina dos processos de produção de soros hiperimunes, apenas alterando a enzima utilizada.

6.2.1. Quantificação proteica.

A quantificação proteica da digestão pelas duas enzimas foi realizada em 3 etapas diferentes, destaca abaixo.

Tabela 4 - Quantificação proteica e rendimento do processo de purificação da primeira digestão enzimática

Enzima	Etapa	Volume (mL)	Resultado (mg/mL)
Bromelina	Pré-digestão	5	2,57
	Soro digerido	5	2,45
	Pós-diafiltrado	5	2,29
Ficina	Pré-digestão	5	2,66
	Soro digerido	5	2,67
	Soro diafiltrado	5	2,12

6.2.2. Eletroforese em gel de poliacrilamida.

A eletroforese foi realizada conforme as condições descritas no item 5.4, a fim de analisar o processo de digestão enzimática e o produto da reação após as amostras serem expostas às condições previamente citadas no item 5.6.

Para este procedimento foram utilizadas amostras em duas concentrações diferentes (3ug e 5ug) com o intuito de avaliar em qual delas é possível observar resultados mais expressivos.

Figura 8 : SDS-PAGE primeira digestão enzimática - Imunoglobulina não digerida, B: Imunoglobulina digerida com Bromelina, C: Imunoglobulina digerida com Ficina

6.3. Segunda digestão enzimática.

A segunda digestão foi realizada também como previsto no item 5.6, onde ocorreram alterações no protocolo no que tange ao tempo de digestão e adição de L-cisteína, que foi acrescida por possuir função redutora, assim otimizando o processo de digestão.

6.3.1. Quantificação proteica

A quantificação proteica da digestão pelas duas enzimas foi realizada em 3 etapas diferentes, destacas abaixo.

Tabela 5 - Quantificação proteica e rendimento do processo de purificação da primeira digestão enzimática

Enzima	Etapa	Volume (mL)	Resultado (mg/mL)
Bromelina	Pré-digestão	5	2,55
	Pós-digestão	5	2,32
	Pós-diafiltrado	5	2,01
Ficina	Pré-digestão	5	2,53
	Soro digerido	5	2,27
	Soro diafiltrado	5	1,90

6.3.2. Eletroforese em gel de poliacrilamida

A eletroforese foi realizada conforme as condições descritas no item 5.4, a fim de analisar o processo de digestão enzimática e o produto da reação após a amostra ser exposta as condições previamente citadas no item 5.6. Foi possível observar que os fragmentos formados não corresponderam aos esperados pelo grupo. Aparentemente, houve redução das pontes dissulfeto intercadeias uma vez que foi observada uma banda correspondente ao fragmento rIgG. Tal fato pode ser atribuído a um excesso de L-cisteína.

Figura 9 - Letras A e B representam os tempos de 6 e 8 horas, respectivamente, da digestão utilizando a enzima Bromelina. A letra C representa o marcador de peso molecular. D e E são os tempos de 6 e 8 horas da digestão utilizando Ficina.

6.4. Terceira digestão enzimática.

Esta terceira digestão seguiu-se igualmente a segunda, apenas alterando a concentração de L-cisteína, como apresentado no item 5.6 mediante os resultados apresentados a seguir. Esta alteração mudou o perfil de digestão das enzimas, fazendo com que os fragmentos obtidos tivesse um peso molecular característico de fragmentos $F(ab)'_2$, fazendo com que fosse o protocolo adotado

pelo grupo e dando seguimento as análises para a avaliação dos fragmentos gerados.

6.4.1. Quantificação proteica.

A quantificação proteica foi realizada somente em 2 etapas neste experimento pois o mesmo não foi dialisado após a digestão, isso por que foi notado que há uma perda razoável de proteínas quando as amostras são submetidas ao processo de diálise.

Tabela 6 - Quantificação proteica e rendimento do processo de purificação da terceira digestão enzimática

<i>Enzima</i>	<i>Etapa</i>	<i>Volume (mL)</i>	<i>Resultado (mg/mL)</i>
Bromelina	Pré-digestão	5	2,10
	Soro digerido	5	1.04
Ficina	Pré-digestão	5	2,10
	Soro digerido	5	1.06

6.4.2. Eletroforese em gel de poliacrilamida

A eletroforese seguiu conforme as demais anteriores, apresentando resultado compatível com que o grupo esperava. A partir deste resultado foi dado início às demais análises com a finalidade de avaliar a imunoreatividade dos fragmentos gerados.

Figura 10: SDS-PAGE terceira digestão enzimática – Letra A: Marcador de peso molécula, Letra B: imunoglobulinas digeridas com Bromelina e Letra C: Imunoglobulinas digeridas com Ficina.

6.4.3. Purificação por cromatografia de gel filtração

A purificação por gel filtração foi realizada como descrito no item 5.2.3 e os picos foram coletados nos seguintes volumes, tanto para as amostras de imunoglobulinas digeridas pela enzima bromelina quanto pela enzima ficina:

- Pico 1: 11,5 a 12,5 mL
- Pico 2: 15,0 a 16,0 mL
- Pico 3: 18,0 a 21,0 mL

Figura 11 - Cromatograma referente à purificação dos fragmentos de imunoglobulinas digeridos pela enzima Bromelina.

Figura 12 - Cromatograma referente a purificação dos fragmentos de imunoglobulinas digeridos pela enzima Ficina.

Após as coletas dos picos, os mesmos foram congelados a -80°C por 30min e em seguida levados ao liofilizador até que fosse observado a formação do “pellet” de proteína.

6.4.4. Eletroforese em gel de poliacrilamida (pós cromatografia)

Após a purificação dos fragmentos de imunoglobulinas digeridas, as amostras foram liofilizadas e resuspendidas em PBS. Foi realizada uma nova eletroforese para avaliar a eficiência do processo de separação dos fragmentos. É possível observar que mesmo coletando os picos de forma a minimizar a contaminação cruzada entre imunoglobulinas digeridas e imunoglobulinas não digeridas, é possível constatar que o processo não foi eficiente ao ponto de realizar a separação efetiva entre estas duas populações.

Figura 13: SDS-PAGE pós cromatografia - Letra A: Marcador de peso molecular, Letra B: Soro purificado, Letra C e D: picos 1 e 2 respectivamente, coletados durante a purificação, referentes a digestão com a enzima bromelina, Letra E e F: Picos 1 e 2 coletados durante a purificação, referentes a digestão com a enzima ficina.

6.4.5. Western Blotting

O western blotting, que foi realizado conforme o item 5.5, teve como objetivo verificar se as propriedades de ligação com os antígenos do veneno antibotrópico se mantiveram conservadas. O mesmo confirma que apesar das amostras não estarem completamente purificadas, ambas possuem sua região de ligação com o antígeno preservadas, assim nos levando a constatar que o processo de digestão não afetou as características de imunoreatividade dos fragmentos de imunoglobulinas.

Figura 14: SDS-PAGE - Letra A: Marcador de peso molecular, Letra B: Soro purificado, Letra C e D: picos 1 e 2 coletados durante a purificação, referentes a digestão com a enzima bromelina, Letra E e F: Picos 1 e 2 coletados durante a purificação, referentes a digestão com a enzima ficina.

7. DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

Atualmente, no Brasil, a metodologia empregada no processo de produção de soros hiperimunes utiliza sulfato de amônio, como método de purificação, que é utilizado para precipitação de proteínas que não as imunoglobulinas e a pepsina, uma enzima de origem suína utilizada na fragmentação dos anticorpos para a retirada da porção Fc, este sendo responsável pela ligação do sistema complemento podendo causar diversas reações alérgicas, chegando inclusive a quadros de choque anafilático e óbito.

Segundo o “Guidelines for the Production, Control and Regulation of Snake Antivenom Immunoglobulins” publicado pela Organização Mundial da saúde (WHO, 2011), tanto o método de precipitação por sulfato de amônio quanto o de precipitação por ácido caprílico, são reconhecidos e bem descritos.

Optamos pela técnica de precipitação por ácido caprílico por se tratar de um método mais rápido, eficiente e de melhor rendimento para a obtenção de anticorpos, segundo as referências bibliográficas estudadas e o próprio guia da OMS.

Com este método foi possível obter preparados de IgG mais puros do que o método por sulfato de amônio, já que as operações unitárias utilizadas na produção são mais complexas do que as utilizadas para a purificação com ácido caprílico.

Em todas as etapas dos experimentos executados, seja no processo de purificação, seja no processo de digestão, foram realizadas as dosagens de proteínas, como forma de indicativo do rendimento dos processos digestivos.

A purificação ocorreu da forma esperada, reduzindo a concentração de proteínas plasmáticas sem atividade para o veneno, assim fazendo com que obtivéssemos uma amostra onde a maior concentração de proteínas que possuem massa molecular de aproximadamente 150 kDa ficassem preservadas para serem utilizadas nas demais etapas propostas, como observados nas eletroforeses realizadas.

Foram realizadas digestões como descrito no item 5.6, a fim de se obter preparados de anticorpos digeridos pelas enzimas Bromelina e Ficina.

Dentre os protocolos adotados, pudemos constatar que os dois primeiros procedimentos resultaram na não digestão das imunoglobulinas ou gerando fragmentos que não fossem compatíveis com os esperados pelo grupo.

O terceiro protocolo de digestão foi o que apresentou melhores resultados, gerando fragmentos com peso molecular equivalente aos fragmentos $F(ab)'_2$ e dando início as demais análises com o intuito de averiguar as propriedades de ligação com o veneno botrópico.

Um resultado bastante positivo foi observado na técnica de western blotting, mostrando que as propriedades imunorreativas do fragmento se mantiveram inalteradas após o processo digestivo, evidenciando a possibilidade de aplicação de ambas as enzimas como ferramenta no processo de clivagem de imunoglobulinas.

Observando os cromatogramas, podemos ressaltar que a ficina apresentou uma maior eficiência no processo digestivo em relação à bromelina, nas condições estabelecidas no experimento, mostrando vantagem no que tange a proporção de imunoglobulinas digeridas dentro do protocolo estabelecido.

Propomos como melhoria dois principais pontos: A otimização do processo digestivo, com o intuito de gerar uma proporção maior de imunoglobulinas digeridas, fazendo com que o rendimento do processo seja maior/mais eficiente. Para isso podendo ser alterado os parâmetros de pH, temperatura, tempo de digestão e concentração da enzima. O segundo ponto é o processo de purificação destes fragmentos, o grupo se propôs a executar outras metodologias, entretanto estas também necessitam de um tempo relativamente extenso para que se consiga definir o melhor protocolo, que gere um custo/benefício compatível com o processo. Uma alternativa que o grupo está desenvolvendo é a purificação por cromatografia de afinidade utilizando uma coluna revestida de cobre, pois é sabido que a mesma possui aplicação na separação de fragmentos de imunoglobulinas e baixo custo.

Como análise complementar, realizaremos o teste de ELISA comparando os fragmentos gerados por ambas as enzimas frente ao soro referência do mercado, com a finalidade de comparar sua capacidade de neutralizar o veneno botrópico.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H. *Imunologia celular e molecular*, 5. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005. p.576

AL-ABDULLA, IBRAHIM.; CASEWELL N. R.; J. Landon Single-reagent one-step procedures for the purification of ovine IgG, F(ab')₂ and Fab antivenoms by caprylic acid. *Journal of Immunological Methods* v.402, p.15-22 2014.

ARAÚJO A.S. Produção de antiveneno botrópico em ovos de galinha. Dissertação de Mestrado em Ciência Animal, Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG. 57p. 2007.

ARAÚJO, H.P. Avaliação das metodologias oficiais in vivo e desenvolvimento de metodologia de inibição da citotoxicidade in vitro para a determinação da potência do soro antibotrópico. 2008. 211p. Tese (Doutorado em Vigilância Sanitária) – Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Rio de Janeiro. 2008.

AZEVEDO-MARQUES, M. M.; CUPO, P.; HERING, S. E. Envenomation caused by poisonous animals: Poisonous snakes. *Medicina*, v.36, n.1, p.480-489, 2003.

BARRETT, A. J. Classification of peptidases. *Methods in Enzymology*, n.244, p.1-15, 1994

BELENKY A. S.; WASK-ROTTER. E.; SOMMER M.J. Absence of Protein G-Fc Interaction in Ficin-Derived Mouse IgG₁ Digests. *Journal Of Immunoassay & Immunochemistry*, v. 24, n.3, p. 311-318, 2003.

BRASIL. Farmacopéia Brasileira. Soro Antibotrópico. *Immunosera ad usum humanum* 5a ed. parte II. São Paulo: Atheneu, 2010.

BRAZIL, O.V. History of the primordial of snakebite accident serotherapy. *Memórias do Instituto Butantan*, v.49, n.1, p.7-20, 1987.

BRODSKY, Y.; ZHANG, C.; YIGZAW, Y.; VEDANTHAM, G. Caprylic Acid Precipitation Method for Impurity Reduction: An Alternative to Conventional Chromatography for Monoclonal Antibody Purification. *Biotechnology and Bioengineering*, v.109, p.2989-2599, 2012.

BUCHHOLZ, K.; KASCHE, V.; BORNSCHEUER, U.T. Biocatalysts and enzyme technology. Wiley-VCH, Weinheim. p.40-46, 2005.

BURNOUF T. et al. Assessment of the viral safety of antivenoms fractionated from equine plasma. *Biologicals*. v.32; p.115-128; 2004.

CARDOSO, D.F.; YAMAGUCHI, I.K.; MOURA DA SILVA, A.M. Produção de soros antitoxinas e perspectivas de modernização por técnicas de biologia molecular. In: Cardoso, J.L.C (Coord.) *Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes*. São Paulo: Sarvier. p.367-379. 2003.

DEVAKATE, R.V.; PATIL, V.V.; WAJE, S.S.; THORAT B.N.; Purification and drying of bromelain. *Separation and Purification Technology*. v. 64, p.259–264, 2009.

DEVARAJ, K.B.; KUMAR P.R.; PRAKASH, V. Comparison of activity and conformational changes of ficin during denaturation by urea and guanidine hydrochloride. *Process Biochemistry*, v.46 p.458–464 2011.

DIAS DA SILVA, et al. Crossreactivity of horse monovalent antivenoms to venoms of ten species of *Bothrops* species. *Memórias do Instituto Butantan*, v.51, p.153-168, 1989.

DOS SANTOS et al. Purification of F(ab')₂ anti-snake venom by caprylic acid: a fast method for obtaining IgG fragments with high neutralization activity, purity and yield. *Toxicon*. v. 27, p.297-3031, 1989

EURSAKUN, S.; SIMSIRIWONG, P.; RATANABANANGKOON. Studies on the fractionation of equine antivenom IgG by combinations of ammonium sulfate and caprylic acid. *Toxicon* v.60, p.1022–1029, 2012

FERREIRA, S.H. A bradykinin – potentiating factor (BPF) present in the venom of *Bothrops jararaca*. *British Journal of Pharmacology and Chemotherapy*, v. 24, p.163- 169, 1965.

FINGOLA, F.F. Validação do ensaio de endotoxina bacteriana (LAL) para o soro antibotrópico pelo método cromogênico cinético. 2011. 79p. Dissertação (Mestrado Profissional) - Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Rio de Janeiro. 2011

FLANAGAN, R. J.; JONES, A. L. Fab antibody fragments: some applications in clinical toxicology. *Drug Saf.*, v. 27, p.1115-1133, 2004.

GAUCI P.J.; ALDERTO M.R. Pepsin Digestion Antibodies to Produce Functional Antigen-Binding Fragments (Fab): A Scientific Fantasy?" DTSO Aeronautical and Maritime Research Laboratory, DTSO-TR-1189. 2001

GILLILAND S. M.; et al.; Investigation of porcine circovirus contamination in human vaccines. *Biologicals*. v.40; p.270-277; 2012.

GUTIÉRREZ J.M.; LEÓN G.; LOMONTE B. Pharmacokinetic-Pharmacodynamic Relationships Of Immunoglobulin Therapy for Envenomation. *Clin. Pharmacokinet*, v.42, p.721-741, 2003.

GUTIÉRREZ, J.M.; OWNBY, C.L. Skeletal muscle degeneration induced by venom phospholipases A2: insights into the mechanisms of local and systemic myotoxicity. *Toxicon*, v.42, p.915-931, 2003.

GRIFFITHS.B.E.; SEDDIK A.P.; STEPHANO M.A., GUTIÉRREZ J.M. et al. Assessment Of the Viral Safety Of Antivenoms Fractionated From Equine Plasma. *Biologicals*, v.32, p.115-128, 2004.

LEACH M.F.; AUBUCHON J.P. Use of Enzyme Treatment to Enhance Reactivity of HLA and Platelet-Specific Antibodies in Solid-Phase RBC Adherence Assays. *Transfusion*, v.42, p.476-480, 2002.

LEUNG-TOUNG, R; LI, W.; KARIMIAN, T.F. Thiol-dependent enzymes and their inhibitors: a Review. *Current Medicinal Chemistry*, v.9, p.979-1002, 2002.

LIANHONG, Y. et al. Preparative purification of bromelain (EC 3.4.22.33) from pineapple fruit by highspeed counter-current chromatography using a reverse-micelle solvent system. *Food Chemistry*. v.129, p.925–932, 2011.

MARIANI, C.; CAMAGNA, M.; TARDITI, L.; SECCAMANI, E. A new enzymatic method to obtain high-yield F(ab)₂ suitable for clinical use from mouse IgG1. *Molecular Immunology*. v.28, p.69-77, 1991.

MCCLENAHAN, D.S.; KRAUSE R.P.; UHLENHAUT C. Molecular and infectivity studies of porcine circovirus in vacines. *Vaccine* v.29; p.4745– 4753; 2011

MELO, M. M.; SILVA JUNIOR, P. G. P.; LAGO, L. A. et al. Envenenamento botropico. *Cadernos técnicos de Veterinária e Zootecnia*. n.44, p.59-79, 2004.

MILENIC, D.E., et al. Comparison of methods for the generation of immunoreactive fragments of a monoclonal antibody (B72.3) reactive with human carcinomas. *J. Immunol. Meth.* n.120, p.71-83, 1989.

MORAIS, V.; MASSALDI, H. A model mechanism for protein precipitation by caprylic acid: Application to plasma purification. *International Union of Biochemistry and Molecular Biology, Inc.* v.59, p. 50-54, 2012.

MORAIS, V.; MASSALDI, H. Effect of pepsin digestion on the antivenom activity of equine immunoglobulins. *Toxicon* v.46; p.876–882; 2005.

NUDEL, B. C.; PERDOMÉNICO C.; IÁCONO R.; CASCONI, O. Optimization by factorial analysis of caprylic acid precipitation of non-immunoglobulins from hyperimmune equine plasma for antivenom preparation. *Toxicon*, v.59, p.68-73, 2012.

OTERO-PATÍÑO, R. Comparative study of the efficacy and safety of two polyvalent, caprylic acid fractionated [IgG and F(ab')₂ antivenoms, in Bothrops asper bites in Colombia. *Toxicon* v.59, p.344–355, 2012.

PETRICCIANI J. et al. Adventitious agents in viral vaccines: Lessons learned from 4 case studies. *Biologicals*. v.42; p.223-236; 2014.

PINHO, F.M.; PEREIRA, I.D. Ofidismo. *Rev. Assoc. Med. Bras.*, v.47, p.24-29, 2001

SAJID, M.; McKERROW, J.H. Cysteine proteases of parasitic organisms. *Molecular and Biochemical Parasitology*, n.120, p.1-21, 2002.

SIMSIRIWONG, P.; EURSAKUN, S.; RATANABANANGKOON, K. A study on the use of caprylic acid and ammonium sulfate in combination for the fractionation of equine antivenom F(ab')₂. *Biologicals* v.40 p.338-344, 2012.

TEIXEIRA, S.S. Caracterização funcional e estrutural de uma fosfolipase A2 ácida isolada do veneno de *Bothrops pirajai*". 2009. 95p Tese (Mestrado em Toxicologia) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto. 2009.

THEAKSTON, R.D.G.; WARRELL, D. A.; GRIFFITHS, E. Report of a WHO workshop on the standardization and control of antivenoms. *Toxicon*, v.41, p.541-557, 2003.

TISCHENKO V.M., ZAVYALOV P., MEDGYESI V.A., et al. A Thermodynamic Study of Cooperative Structures in Rabbit Immunoglobulin. *European Journal of Biochemistry* v.126, p.517-521, 1982.

ZAIA D. A. M.; ZAIA C. T. B. V.; LICHTIG J. Determinação de proteínas totais via espectrofotometria: vantagens e desvantagens dos métodos existentes
QUÍMICA NOVA, p.21 v.6, 1998.

WARRELL, D.A. Clinical features of envenoming from snake bites. In: BON, C.; GOYFFON, M. (Eds.). Envenomings and their treatments. Lyon: Fondation Marcel Mérieux, p.63-76, 1996.

WEIL, J. Bioquímica Geral 2ªEd. Fundação Calouste Gulbenkian. Lisboa.
2000. 787p.

WHO. Guidelines for the Production, Control and Regulation of Snake Antivenom Immunoglobulins. WHO Offset Publication, 2011, 141p.