

REGINALDO ALMEIDA DA TRINDADE

**ENCAPSULAÇÃO DAS PROTEÍNAS DO VENENO DE ABELHA EM
MICROESFERAS DE PLGA (POLIÉSTER DE ÁCIDO LÁCTICO-CO-
GLICÓLICO) PARA IMUNOTERAPIA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/Instituto Butantan/IPT, para obtenção do Título de Doutor em Biotecnologia.

Área de Concentração: Biotecnologia

Orientadora: Dra. Maria Helena Bueno da Costa

São Paulo
2010

RESUMO

Trindade RA. Encapsulação das proteínas do veneno de abelha em microesferas de PLGA (poliéster de ácido láctico-co-glicólico) para imunoterapia [tese (Doutorado em Biotecnologia)]. São Paulo (Brasil): Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2010.

A Imunoterapia com veneno (VIT) tradicional utiliza injeções do alérgeno veiculados em tampão ou adsorvido em $\text{Al}(\text{OH})_3$ em um processo caro e demorado. Portanto, novas estratégias para melhorar a segurança e a eficácia da VIT, como a redução do número injeções, são de interesse geral, e propiciará maior adesão do paciente e maiores benefícios sócio econômicos. As microesferas (MS) de ácido poli láctico-co-glicólico (PLGA) têm sido amplamente utilizadas no transporte de drogas e proteínas. Nesta tese, foi apresentado um estudo sistemático para o desenvolvimento de uma nova formulação do veneno de abelha (BV) encapsulado em MS-PLGA para VIT. Primeiramente, foi estudada a estabilidade das proteínas do BV durante o processo de microencapsulação. Foram utilizados métodos espectroscópicos e biológicos para determinar os efeitos dos íons da série de Hoffmeister como estabilizantes do BV durante a fase de emulsificação na presença de solvente orgânico. Houve uma correlação entre as diferentes soluções salinas e as alterações na solubilidade e nas conformações estruturais do BV. Foi observado que o conteúdo em α -hélice foi bastante estável, com reduzida agregação de proteína ou exposição de resíduos hidrofóbicos, e uma pequena mudança no ângulo diédrico S-S. A agregação do BV foi evitada em 20% pelo caotrópico MgCl_2 . Este sal, na concentração 40 mM, foi utilizado para preparar uma formulação BV-MS-PLGA estável com atividade biológica preservada. Seguidamente, foram empregados métodos físicos e bioquímicos para analisar e caracterizar as diferentes formulações BV-MS-PLGA. Obtiveram-se MS com eficiência de encapsulação entre 49-75% e que apresentaram perfis trifásicos de liberação do BV. As MS-PLGA de 34 kDa-COOH foram as mais adequadas para a VIT pois apresentaram uma liberação inicial pequena (20%) seguida de uma liberação lenta também durante a fase de menor degradação do polímero. Ainda que algumas mudanças estruturais tenham sido observadas no BV liberado, seu reconhecimento imunológico foi mantido. Finalmente, foram realizados ensaios *ex vivo* e *in vivo* para analisar a eficiência biológica destes sistemas de veiculação. As formulações evitaram as reações inflamatórias causadas pelo contato direto do BV com o organismo. Observou-se aumento da taxa de fagocitose das partículas contendo BV, proporcionando a entrega do alérgeno diretamente ao meio intracelular. Além disso, com o uso destas formulações foi possível estimular a produção de anticorpos anti-BV comparável à VIT tradicional com as seguintes vantagens: proteção do organismo contra os efeitos deletérios das toxinas presentes no BV e a redução do número de injeções necessárias para se produzir o mesmo efeito imunológico. Portanto, as MS-PLGA contendo BV são eficazmente superiores à VIT tradicional, e oferecem uma alternativa segura para a sua substituição.

Palavras-chave: Imunoterapia com veneno. Alergia. Microesferas biodegradáveis. Liberação controlada de proteínas. Microesferas de PLGA.

ABSTRACT

Trindade RA. Encapsulation of bee venom proteins within PLGA (polyester of lactide-co-glicolide acid) microspheres for Immunotherapy [PhD thesis (Biotechnology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2010.

Traditional venom immunotherapy (VIT) uses injections of the allergen in buffer or adsorbed on $\text{Al}(\text{OH})_3$, in an expensive and time consuming way. Therefore, new strategies to improve the safety and efficacy of VIT, as reduction of the injections, are of general interest, and they would provide better patient compliance and socio economic benefits. Microspheres (MS) prepared with poly lactic-co-glycolic acid (PLGA) have been widely used in drug and protein delivery. In this thesis, it was presented a systematic study to develop a new formulation of bee venom (BV) encapsulated within PLGA-MS for VIT. First, it was studied the stability of BV proteins during the microencapsulation process. Spectroscopic and biological methods were used to determine the effects of ions from Hoffmeister series as stabilizers of BV during its emulsification in the presence of organic solvent. There was a correlation between the different salt solutions and changes in the solubility and structural conformations of BV. It was observed that α -helix content was fairly stable, with minimal protein aggregation, few exposures of hydrophobic residues and small changes in the S-S dihedral angle. The BV aggregations were avoided in 20% by chaotropic MgCl_2 . This salt, in the concentration of 40 mM, was used to prepare stable BV-PLGA-MS formulations with preserved biological activity. Subsequently, we employed biochemical and physical methods for analyzing and characterizing the different BV-PLGA-MS formulations. Microspheres showed encapsulation efficiencies between 49-75%, and a triphasic release profiles of BV. The 34 kDa-PLGA-COOH-MS were most suitable for VIT since they presented a small initial release (20%) followed by a slow release, even lower during the polymer degradation. Although some structural changes were observed in the released BV, its immunological recognition was maintained. Finally, *ex vivo* and *in vivo* assays were performed to analyze the biological efficiency of these delivery systems. The formulations avoided the inflammatory reactions caused by direct contact of BV and organism. There was an increase in phagocytosis rate of particles containing BV, providing delivery of the allergen directly to the intracellular environment. Furthermore, these formulations could stimulate the production of anti-BV antibodies comparable to traditional VIT with the following benefits: protecting the organism against the deleterious effects of toxins present in BV and reducing the number of injections needed to produce the same immunological effect. Therefore, PLGA-MS containing BV are effectively superior to the VIT traditional and offer a safe alternative to its replacement.

Key words: Venom immunotherapy. Allergy. Biodegradable microspheres. Protein delivery. PLGA microspheres.

1 INTRODUÇÃO

1.1 A Imunoterapia com veneno (VIT)

Em países desenvolvidos, cerca de 20% da população sofre em decorrência das reações de hipersensibilidade do tipo I (mediada por IgE), que é o caso daquelas relacionadas aos venenos de modo geral. No caso do veneno de abelha (BV), existe uma estimativa que 0,8% a 5,0% dos indivíduos sofram com as reações sistêmicas seguidas às picadas de abelhas (Golden, 1989; Charpin et al., 1994). As manifestações clínicas mais comuns são: conjuntivite, asma e reações anafiláticas mais graves que podem levar à morte (Steen et al., 2005). Estes sintomas são todos iniciados pela desgranulação de mastócitos quando suas IgEs de superfície interagem de forma cruzada com o alérgeno em questão. Embora existam tratamentos que proporcionam alívios imediatos dos sintomas, o único que previne novas reações é a VIT (Venom Immunotherapy).

A VIT consiste de injeções repetidas de alérgenos específicos aos pacientes com condições sistêmicas mediadas por anticorpos da classe IgE, com o propósito de fornecer proteção contra sintomas alérgicos e reações inflamatórias associadas à exposição natural ao alérgeno. Outros termos têm sido empregados para a imunoterapia com alérgenos, tais como hipossensibilização ou dessensibilização alérgeno-específica. Ao agente alergênico terapêutico empregado é dado o termo de vacina de alérgeno (Li et al., 2003; Cox et al., 2007). A base imunológica da VIT consiste de uma mudança gradual do padrão da resposta imune contra o alérgeno, partindo de uma resposta predominantemente Th2, com produção maciça de IgE, para uma resposta Th1, com produção de IgG₁ e IgG₄ (Venarske e DeShazo, 2003; Till et al., 2004) (Figura 1).

Sabe-se que alguns passos são muito importantes para se alcançar a eficiência da VIT, a saber:

(1) *Deve-se evitar o tanto quanto possível a interação das IgE de superfície de mastócitos com o alérgeno*, a fim de que a reação alérgica não seja desencadeada. A reação alérgica é em efeito cascata e de reações cumulativas, ou

seja, quanto maior a liberação de mediadores químicos alérgicos no local, tais como a histamina, maior será a resposta inflamatória subsequente. Além disto, há uma regulação positiva na expressão de receptores para IgE (FC ϵ RI) nos mastócitos (Macglashan et al., 1999).

(2) *Os alérgenos devem ser rapidamente retirados do tecido, via fagocitose, por células apresentadoras de antígenos (APCs).* Isto facilitaria a indução da resposta imunológica via linfócito T, pois permitiria um estímulo constante contribuindo para a tolerância imunológica e para troca de resposta desejada sentido Th1. Esse evento de apresentação de antígeno pelas APCs possui tamanha importância que alguns estudos estão sendo realizados visando à administração de alérgenos por via intralinfática, de modo a estimular rapidamente uma resposta celular adequada via linfócito T sem a passagem pelos efeitos causados pela administração de alérgenos via subcutânea, ou seja, via mastócitos e basófilos teciduais (Martinez-Gomez et al., 2009).

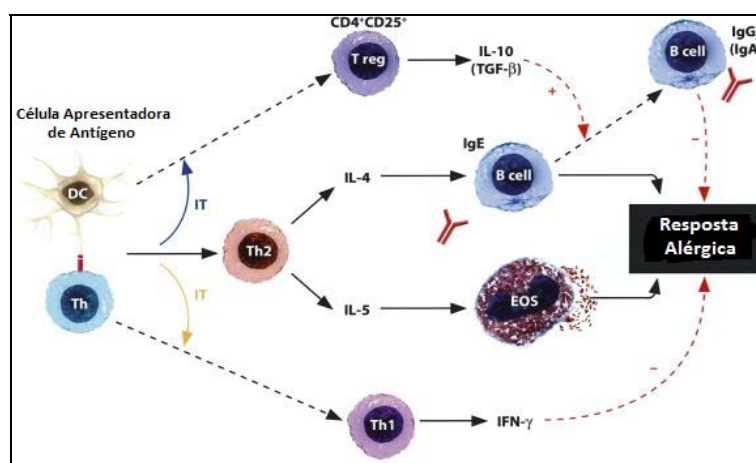


Figura 1 - Modulação da resposta imunológica no sentido Th1 como efeito da Imunoterapia (VIT).
Fonte: Adaptado de Till et al., 2004.

Apesar de a VIT tradicional ser um método de tratamento altamente eficaz (80-90% de prevenção para alergia ao BV), a sua indicação ainda é restrita aos casos mais graves de alergia e também aos pacientes que têm superexposição ao veneno (ex.: apicultores). Além disso, o custo do tratamento é alto e o tempo da VIT é extremamente longo, entre 3 e 5 anos (Muller, 1990; Muller e Mosbech, 1993; Golden et al., 1996). Estes fatos desestimulam a adesão do paciente ao tratamento.

Outra crítica que se faz à VIT é em razão dos efeitos colaterais como reações alérgicas sistêmicas graves seguidas às injeções (20-40% dos pacientes). Assim, a técnica ainda carece de melhoramentos no sentido de aumentar sua segurança e eficácia (Muller, 2003). Entre as novas propostas nesse campo, sugere-se:

1. Pré-medicação com anti-histamínicos (Berchtold et al., 1992; Brockow et al., 1997; Herman e Melac, 1996; Reimers et al., 2000);
2. Venenos alérgicos recombinantes (Dudler et al., 1992; Soldatova et al., 1998; Valenta e Kraft, 2002; Jilek et al., 2004; Valenta e Niederberger, 2007);
3. Imunoterapia com peptídeos epítomos específicos para receptores em linfócitos T (Dhillon et al., 1992; Carbalido et al., 1993; Kammerer et al., 1997);
4. Vacina de DNA (Spiegelberg e Raz, 2002; Jilek et al., 2001 e 2004; Karamloo et al., 2002; Martinez-Gómez et al., 2007).

Dentre essas novas propostas, e levando em consideração a dessensibilização contra alergia ao veneno de artrópodes, a única com eficiência clínica comprovada é a pré-medicação com anti-histamínicos. Porém, o que vale ressaltar aqui é que em se tratando especificamente do BV, é improvável que propostas que visem a dessensibilização utilizando codificantes ou proteínas isoladas e/ou purificadas sejam amplamente eficientes para todo e qualquer paciente alérgico ao veneno. Nesse caso, seria necessária a determinação específica de qual alérgeno, entre os diversos presentes no BV total, o paciente responderia, e assim a dessensibilização utilizaria apenas esse alérgeno, isso sem levar em consideração que o indivíduo poderia apresentar reações a mais de um alérgeno-específico.

Podemos observar a grande variedade de proteínas e peptídeos dos mais diversos pesos moleculares e ações biológicas (Silva et al., 2008) no BV (Tabela 1). Embora nem todos apresentem alergenicidade, ao menos cinco destas

moléculas são responsáveis pelas reações alérgicas, a saber: melitina, fosfolipase A₂, hialuronidase, fosfatase ácida, e o alérgeno C. Então é de suma importância que o indivíduo alérgico seja dessensibilizado com o extrato do veneno total, de modo a garantir que seu organismo responda adequadamente, independente da especificidade da alergia.

A composição do BV pode ser dividida em 3 grupos: moléculas de baixo peso molecular, grandes peptídeos e enzimas (O'Connor e Nelson, 1968; Shipolin et al., 1976). Dentre as de baixo peso molecular, destacam-se as amins biogênicas, que incluem principalmente a histamina, a dopamina, e a noradrenalina, as quais auxiliam o desencadeamento do processo inflamatório (Habermann, 1972).

O grupo dos grandes peptídeos inclui a melitina, a apamina e o peptídeo MCD (desgranulador de mastócitos). Dentre estes, a melitina é o principal, por que embora apresente baixa alergenicidade (Schmidt, 1995; Bergamo et al., 2000) constitui cerca de 50% do peso seco total do BV. A melitina desempenha importantes funções no desencadeamento nas reações alérgicas, principalmente por suas ações biológicas, tais como hemólise, citotoxicidade e cardiotoxicidade (Midoux et al., 1995; Riches et al., 2002; Sumikura et al., 2003; Chen et al., 2006). Acredita-se que a melitina seja a principal causa da morte por falha cardíaca em casos de picadas de abelhas em massa (Schmidt, 1995).

No grupo das enzimas, a principal representante é a fosfolipase A₂ (PLA₂), correspondendo a 12% do peso seco total do BV (O'Connor e Nelson, 1968, Shipolini et al., 1976). É também o principal alergênico, sendo, portanto, o mais importante fator desencadeador do processo anafilático (Schmidt, 1995). Além disso, possui uma importante ação miotóxica, gerando degeneração da musculatura esquelética (Gutiérrez e Ownby, 2003). Ataques de abelhas em massa causam uma série de alterações sistêmicas, sendo a rabdomiólise um fenômeno comum nestes casos devido à ação da PLA₂ (Franca et al., 1994).

Tabela 1 - Composição do veneno de abelha*.

Componente	Peso Molecular	Peso seco (%)	Toxicidade	Alergenicidade
Peso molecular inferior a 1 000 Da				
Feromônios (voláteis)	185	-	-	-
Histamina	111	1	Local	-
Dopamina	153	1	-	-
Noradrenalina	169	1	-	-
Aminoácidos	100- 200	1	-	-
Oligopeptídeos	200- 1000	14	-	-
Fosfolípidos	100- 400	5	-	-
Carboidratos	180	2	-	-
Grandes peptídeos (1000 - 5000 Da)				
Melitina	2840	50	Hiperálgia local, atividade lítica e de fusão em membranas biológicas, hemólise intravascular (Midoux et al., 1995; Riches et al., 2002; Sukimura et al., 2003; Chen et al., 2006);	+
Apamina	2038	2	Convulsões devido à sua neurotoxicidade e complicações respiratórias em camundongos (Janicki et al., 1985).	-
Peptídeo 401 ou Peptídeo- MCD	2593	2	Liberador de histamina (Gutiérrez e Ownby, 2003).	-
Tertiapina	2000	0.1	Liberador de histamina (Gutiérrez e Ownby, 2003).	-
Secapina	2660	0.5	-	-
Cardiopeptídeo		0.7	-	-
Enzimas				
Fosfolipase A2	19 000	12	Miotoxicidade (Gutiérrez e Ownby, 2003), hemólise intra-vascular (Midoux et al, 1995; Chen et al, 2006; Riches et al, 2002; Sukimura et al, 2003).	++++
Lisofosfolipase	22 000	1	Danos a membranas biológicas.	-
Hialuronidase	45- 50 000	2	Facilita a penetração dos constituintes do veneno no corpo (Habermann, 1972; Schmidt, 1995; Padavattan et al, 2007).	+++
α-Glicosidase	170 000	1	-	-
Esterases	-	1	-	-
Fosfatase ácida	49 000	1	-	++
Outros				
Adolapina	11 092	1	Analgesia, bloqueio do metabolismo do ácido hialurônico (Riches et al, 2002).	-
Inibidor de protease	9 000	0.8	-	-
Alérgeno C	105 000	1	-	+

* Fonte: Adaptado de Silva et al., 2008. Com permissão do autor.

Analisando em conjunto, o que nós propomos nessa tese é algo simples do ponto de vista terapêutico e técnico: a microencapsulação do BV em microesferas biodegradáveis (MS) de PLGA (ácido poli-láctico-co-glicólico). O uso de uma formulação de BV microencapsulado:

1. Possibilitaria reduzir o número de aplicações que o paciente receberia no decorrer do tratamento, em razão do efeito de liberação controlada desse tipo de carreador. As MS-PLGAs liberariam o BV em pequenas doses durante o tempo e isto simularia as múltiplas injeções da VIT tradicional.
2. Diminuiria a toxicidade primária do BV por evitar o contato direto do organismo com grandes quantidades de toxinas.
3. Se o intuito da VIT de sucesso é impedir o interação cruzada do antígeno com os anticorpos da classe IgE anti-veneno de abelha na superfície dos mastócitos, ou ao menos reduzir essa interação a níveis sub-estimulantes, a encapsulação do veneno em microesferas impediria esse contato direto e rápido. Isto evitaria as reações subseqüentes à desgranulação dos mastócitos.
4. O uso de MS biodegradáveis não introduziria no organismo nenhuma substância que pudesse ter efeito colateral ou desconhecido, visto que os produtos da sua degradação são prontamente metabolizados conforme será explicado adiante.

1.2 Microesferas de PLGA

Nos últimos 30 anos, as MS compostas de polímeros biodegradáveis e biocompatíveis têm sido amplamente estudadas como sistema de liberação controlada de proteínas e peptídeos, além obviamente de fármacos em geral. Por definição técnica, MS são formadas quando a substância encapsulada consiste de um líquido, solução, emulsão ou dispersão, e o tamanho das partículas estão compreendidas entre 1-100 μm de diâmetro (Saez et al., 2007).

Polímeros biodegradáveis e biocompatíveis, tais como polilático (PLA), poliglicólico (PGA), e seus co-polímeros (PLGA) têm sido os mais estudados para sistemas de liberação controlada para aplicação farmacológica na saúde humana e animal (Duran et al., 2006; Taluja et al., 2007). Entre estes, o PLGA (Figura 2) é o mais investigado, em parte devido a sua aprovação pelo FDA (Food and Drug Administration) (Taluja et al., 2007; Saez et al., 2007). Para exemplificar sua importância em termos de sistemas de liberação controlada, podemos citar o *Nutropin Depot*TM, recombinante do hormônio de crescimento (GH), a primeira aplicação de longa duração aprovada pelo FDA para utilização pediátrica em deficiências do hormônio de crescimento. Com esta formulação pôde-se reduzir para uma ou duas doses mensais para se alcançar o mesmo efeito da terapia convencional, na qual eram necessárias múltiplas doses semanais (Johnson et al., 1996). Alguns outros estudos também têm sido realizados para reverter vacinas de múltiplas doses em doses únicas, tais como antígeno vacinal da hepatite B (Feng et al., 2006).

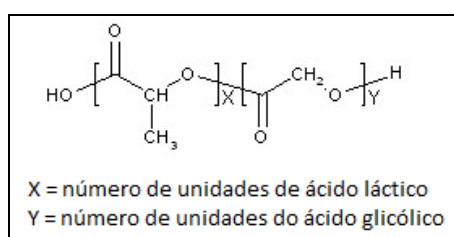


Figura 2 - Estrutura do poliéster de ácido láctico-co-glicólico.

Os PLGAs são poliésteres obtidos pela poli-condensação de hidroxiácidos, ou pela polimerização a partir da abertura do anel de suas respectivas lactonas (Figura 3) (Gilding e Reed, 1981).

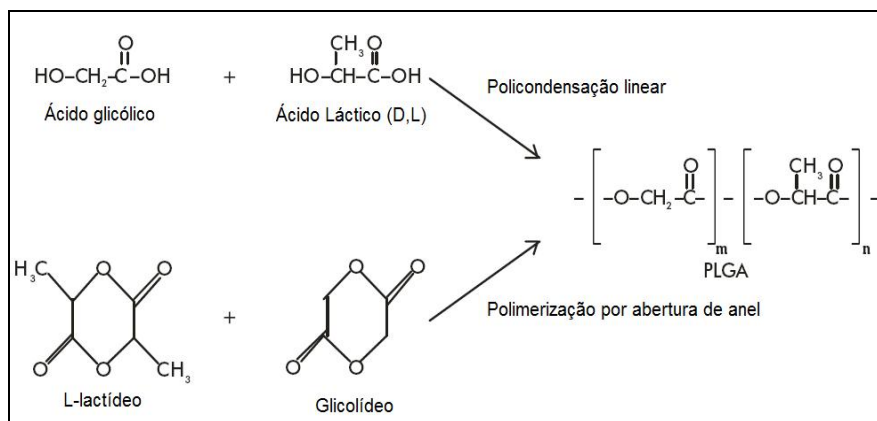


Figura 3 - Obtenção de poliésteres de PLGA.
 Fonte: Adaptado de Saez et al., 2007.

O termo biodegradável refere-se à hidrólise espontânea de suas ligações ésteres no contato com fluídos biológicos ou artificiais. Essa reação produz ácido láctico e glicólico (Figura 4A) os quais são completamente metabolizados no ciclo de Krebs produzindo água e CO₂ (Figura 4B) (Barbanti et al., 2005; Tamber et al., 2005). O termo biocompatível refere-se à carência de toxicidade (Athanasίου et al., 1996).

As variáveis que afetam a velocidade de liberação do encapsulado podem ser controladas pela velocidade de degradação do polímero. Por sua vez, o polímero é degradado de acordo com sua constituição (ex.: a relação entre os ácidos glicólico e láctico), peso molecular e terminação carboxila, a qual pode ser livre (-COOH) ou metilada (-COOCH₃). A morfologia e tamanho das MS também podem controlar a velocidade de saída do soluto encapsulado (Freiberg e Zhu, 2004). O interessante é que existe no mercado PLGAs de diferentes pesos moleculares e composições (L/G), os quais podem ser escolhidos de acordo com a aplicação desejada (Taluja et al., 2007).

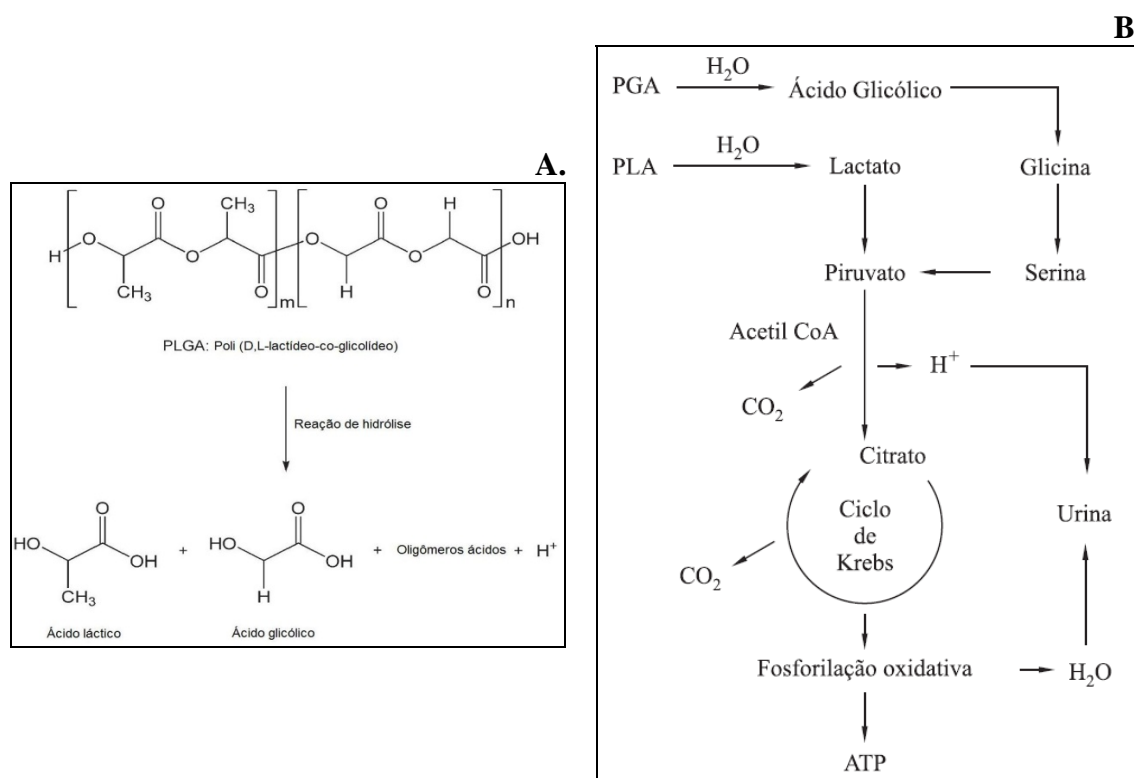


Figura 4 - A. Hidrólise do PLGA. B. Biometabolização via ciclo de Krebs.
Fonte: Adaptação de Barbanti et al., 2005.

Polímeros hidrofílicos (PGAs, ou PLGAs com terminações carboxila livres) facilitam a entrada de água na matriz das MS e conseqüentemente aumentam a velocidade de degradação da matriz e, consecutivamente, a velocidade de liberação do encapsulado. Já os polímeros mais hidrofóbicos (PLAs ou PLGAs com terminações carboxila metiladas) aumentam o tempo de residência dos solutos dentro da matriz polimérica porque a entrada de água necessária para a hidrólise é dificultada. Assim, a modulação da proporção de cada ácido presente, em casos de co-polímeros (PLGAs), controla para uma liberação mais lenta ou mais rápida do soluto (Jiang e Schwendeman, 2001; Bilati et al., 2005). Quanto maior for o peso molecular do polímero, também maior será o seu tempo de degradação e mais longo será o tempo de liberação do encapsulado. O perfil de liberação dos solutos encapsulados em MS-PLGA também depende, por sua vez, de fatores intrínsecos ao próprio soluto (Blanco e Alonso, 1998; Rouse et al., 2007).

Proteínas encapsuladas em MS-PLGA são comumente liberadas seguindo um padrão trifásico. Inicialmente ocorre uma fase de “burst” (que é a

liberação ocorrida logo após as MS serem reidratadas). Essa liberação se dá nas primeiras horas de incubação. As proteínas que são liberadas nessa fase são aquelas que se encontram na superfície e nos poros mais superficiais das MS e saem por difusão. O perfil de liberação geral juntamente com os dois principais fatores que suportam essa liberação, difusão e erosão, é mostrado na Figura 5. Num segundo momento, ocorre uma fase de liberação lenta, que é dependente da hidrólise do polímero (degradação), que, portanto levará à liberação das proteínas retidas nas cavidades mais internas das MS, essa é a fase de maior influência do tipo de polímero utilizado na preparação das microsferas, como já citado anteriormente. A terceira fase ocorre após a erosão quase que completa do polímero, onde a liberação do restante das proteínas retidas volta a ocorrer de uma forma mais rápida (Hora et al., 1990; Cohen et al., 1991; Tamada e Langer, 1993; Göepferich, 1996; Saez et al, 2007).

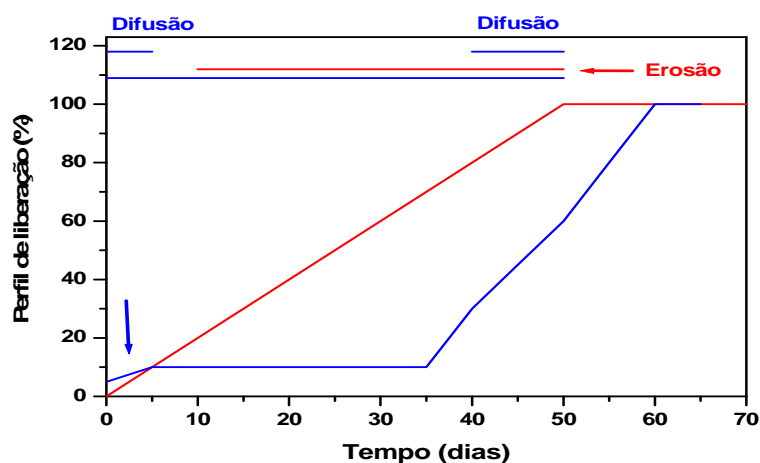


Figura 5 - Perfis de liberação de solutos de MS-PLGA. O perfil trifásico está em azul e o contínuo está em vermelho.

Nesta tese, propusemos trabalhar com polímeros de diferentes massas molares e regiões carbóxi-terminais, a saber, polímero de 12 kDa, 34 kDa, e 63 kDa, com carbóxi-terminal livres (COOH) ou metilados (COOCH₃). Deste modo foi possível estudar a influência destas variáveis na liberação do BV.

São empregadas várias técnicas para a produção de MS contendo peptídeos e proteínas:

1. Método de emulsão simples (S/O/W), onde a proteína é diretamente dissolvida no solvente orgânico (Griebenow e Klibanov, 1996).

2. Método da suspensão, que envolve uma fina dispersão da proteína (previamente dissolvida em um excipiente sólido) em um solvente orgânico (Johnson e Herbert, 2003)

3. Método da dupla emulsão ($W_1/O/W_2$) (Langer, 1990). Este método é também conhecido como técnica da dupla emulsificação com evaporação do solvente. Nesse método o PLGA dissolvido em um solvente orgânico (geralmente CH_2Cl_2) é emulsificado em um meio aquoso. Essa dupla emulsão resultante é então agitada, sob baixa rotação, para evaporação do solvente. Após a precipitação do polímero são formadas MS sólidas contendo o encapsulado (Figura 6A) (Langer, 1990).

Esse método tem sido preferencialmente utilizado principalmente por permitir a encapsulação de compostos hidrofílicos. Entretanto quando se trata de proteínas ou peptídeos algumas considerações devem ser ressaltadas. Há formação de interfaces solvente orgânico/proteína ou solvente orgânico/solução aquosa que desestabilizam as proteínas resultando em adsorção, desnaturação e subsequente agregação (Figura 6B). A agregação também pode ser causada pelo contato hidrofóbico entre PLGA e proteína durante o próprio processo de fabricação das MS (Figura 6).

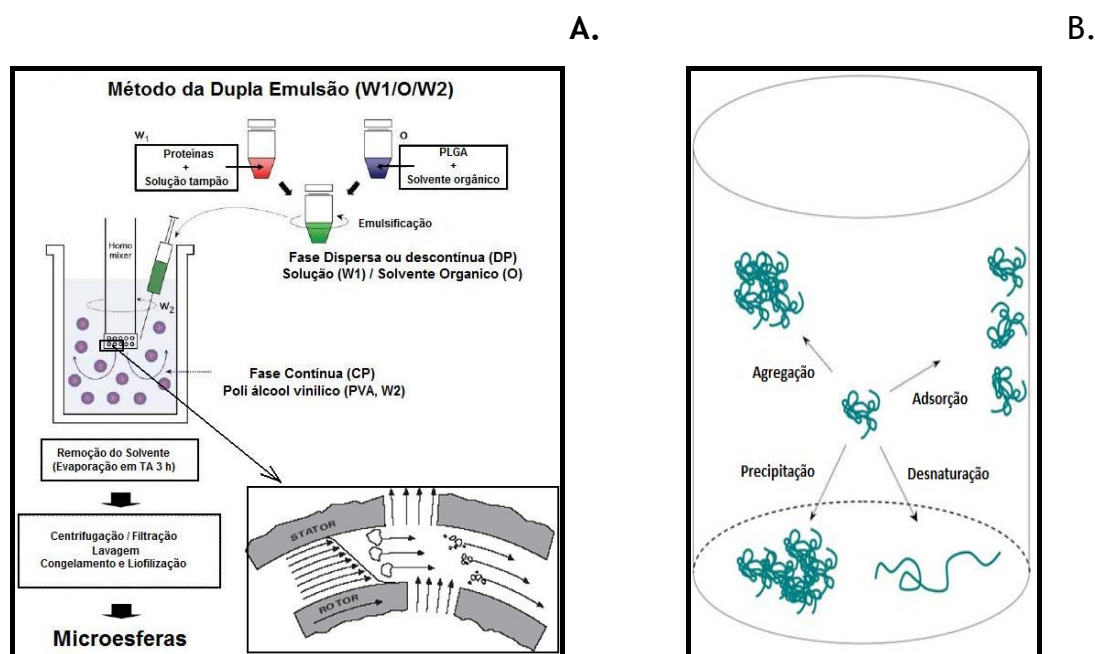


Figura 6 - Esquema de preparo das microesferas de PLGA pelo método da dupla emulsão W₁/O/W₂ (A) e efeitos deletérios pós-encapsulação (B).

Fonte: Adaptado de Namur et al., 2007 e Taluja et al., 2007.

Diante disso, e para amenizar esses efeitos deletérios sobre a proteína têm sido criadas algumas estratégias para protegê-las como: modificações do método; uso de aditivos de diferentes classes e modificações químicas.

Dentre as modificações do método de preparo, podemos citar sucintamente a substituição da homogeneização pela sonicação ou agitação em vortex (Morlock et al., 1997; Zambaux et al., 1999). Outra possibilidade é eliminar a fase da primeira emulsão dissolvendo as proteínas diretamente na fase orgânica juntamente com o polímero, esse processo é chamado de sólido/óleo/água (s/o/w) (Castellanos et al., 2001). Em teoria, a proteína quando dissolvida no solvente orgânico demonstra menor flexibilidade do que em soluções mistas de solvente orgânico/água, levando à preservação das estruturas secundárias e, portanto menor desnaturação, mas para isso a proteína precisa ser liofilizada antes da microencapsulação e esse processo por si só poderá desestabilizar a molécula (Griebenow e Klibanov, 1996). Outra tentativa para se minimizar a interação do soluto na interface água/solvente orgânico é o congelamento da fase aquosa antes da primeira emulsificação seguido por pulverização do material congelado e emulsificação sob baixas temperaturas. Esta técnica tem mostrado bons resultados

na microencapsulação de DNA plasmidial e do próprio GH (Johnson et al., 1997; Ando et al., 1999; Cleland et al., 2001). Resumindo, do ponto de vista tecnológico, não há mais nenhum obstáculo técnico para encapsulação de proteínas em MS-PLGA.

Para se evitar ou minimizar as degradações das proteínas durante ou após o processo de microencapsulação, podem-se usar como estratégias de melhoramentos na formulação: 1. Mudar os componentes da formulação de forma a se obter a estabilidade desejada; ou 2. Mudar o processo de microencapsulação. O esquema 1 descreve cada etapa do processo da dupla emulsão para a produção de MS-PLGA. De forma sucinta, o processo de microencapsulação de proteínas pode ser dividido em 6 etapas (de 1 a 6) até a degradação do polímero (etapa 6) onde ocorre a liberação do soluto.

A **etapa 1** tem sido descrita como a que causa mais desnaturações e agregações. A emulsificação submete a proteína a altas pressões; gradientes de temperaturas; forças de cisalhamento; possibilidades de oxidação e à ação de radicais livres. Com o cisalhamento da fase aquosa aumentam-se as interfaces hidrofóbicas (o que é uma grande desvantagem do método) que levam à adsorção da proteína, seguidas por desenovelamento e agregação (Xing et al., 1996; Sah, 1999 a e b; Weert et al., 2000; Diwan e Park, 2001; Pérez et al., 2002b; Castellanos et al., 2002; Pérez-Rodrigues et al., 2003; Wei et al., 2007).

Na **etapa 2** podem ocorrer aumentos de temperaturas e de possibilidades de oxidação (Weert et al., 2000). Na **etapa 3**, os fenômenos de evaporação do solvente, precipitação do polímero e encapsulação de microgotículas contendo o soluto ocorrem *in tandem*. Nesta fase, parte da proteína adsorvida externamente às microesferas é lavada. Na **etapa 5**, as proteínas podem ainda sofrer danos de desnaturação causados por abaixamento de temperatura e desidratação (Carpenter et al., 1994).

Na **etapa 6**, a proteína encapsulada em MS-PLGA é liberada para o meio durante a degradação da matriz polimérica. Internamente são formados microambientes ácidos por causa da liberação dos ácidos láctico e glicólico componentes do PLGA (Namur et al., 2004; Jiang et al., 2005b). A degradação da matriz polimérica ocorre durante todo o tempo, mas, a erosão só ocorre após certo

grau de degradação. Na erosão da matriz são liberados os oligômeros de PLGA que podem retardar a liberação da proteína adsorvida a ele ou mesmo impedir estericamente a liberação do soluto (Namur, 2007).

[Etapa 1]: $\text{CH}_2\text{Cl}_2 + \text{PLGA (O)} + \text{Proteína (A}_1) \rightarrow \text{Emulsificação} \rightarrow \text{emulsão primária (A}_1/\text{O)}$
[Etapa 2]: $(\text{A}_1/\text{O}) + \text{ácido polivinílico (PVA, que é a fase A}_2) \rightarrow \text{Emulsificação} \rightarrow \text{emulsão secundária (A}_1/\text{O)/A}_2$
[Etapa 3]: $(\text{A}_1/\text{O)/A}_2 \rightarrow \text{Evaporação do solvente} \rightarrow \text{precipitação do polímero} \rightarrow \text{encapsulação do soluto na matriz de PLGA}$
[Etapa 4]: Microesferas contendo o soluto e com algumas moléculas do soluto adsorvidas externamente (MS) \rightarrow lavagens
[Etapa 5]: MS livres de soluto adsorvido externamente \rightarrow congelamento \rightarrow desidratação
[Etapa 6]: Degradação do polímero e erosão da matriz de PLGA \rightarrow liberação da proteína encapsulada

Esquema 1 - Etapas do processo de produção de MS de PLGA pelo método de dupla emulsão.
Fonte: Namur, 2007. Com permissão do autor).

Neste contexto, o uso de aditivos em processos de microencapsulação tem sido mais extensivamente estudado e representa a estratégia mais empregada para alcançar a estabilização das proteínas terapêuticas (Meinel et al., 2001). A hipótese mais sustentável e bem aceita para explicar a estabilização das proteínas em solução aquosa por esses aditivos é a chamada *hidratação preferencial das proteínas*. A proteína em um ambiente aquoso está em equilíbrio entre suas formas, nativa e desnaturada. Sabendo que a ligação direta de um estabilizador à proteína não é termodinamicamente favorável, esses estabilizadores são excluídos da proteína. Assim, a proteína fica preferencialmente hidratada e se renatura à sua forma nativa (Wang, 1999). São usados como estabilizadores açúcares, sais, aminoácidos e polióis (Wang, 1999). Outros mecanismos de estabilização podem também estar envolvidos, principalmente por suas propriedades de superfície e interações eletrostáticas (Bilati et al., 2005), alguns destes serão citados com maiores detalhes a seguir:

1. Co-dissolução de outros aditivos protéicos com a proteína de interesse: a proteína mais estudada para essa aplicação tem sido a albumina. O efeito protetor da albumina sobre a desnaturação e agregação da proteína de interesse ocorre, provavelmente, pelas suas propriedades superficiais. Acredita-se

que a albumina ocupe as interfaces e/ou recubra a proteína terapêutica do contato com o solvente orgânico ou com a superfície hidrofóbica (Johansen et al., 1998 a e b; Meinel et al., 2001). Embora a eficiência dessa adição protéica sobre a estabilização da proteína de interesse tenha sido demonstrada em diversas ocasiões durante o processo de encapsulação, seu uso em formulações terapêuticas sofre algumas restrições, principalmente do ponto de vista imunológico, já que outro potencial antígeno estará sendo administrado ao organismo (Raghuvanshi et al., 1998). Além disso, outras complicações nas subseqüentes caracterizações da proteína principal de interesse pós-encapsulação poderiam surgir por consequência deste outro componente heterólogo ao processo (Bilati et al., 2005).

2. Aumento da concentração da proteína de interesse: nesse caso, mantendo-se a mesma área interfacial, desta forma, ainda que parte da proteína seja adsorvida às interfaces formadas, outra parte bastante significativa é ainda encapsulada. Essa estratégia é eficiente para algumas proteínas usadas como modelo de encapsulação, tais como anidrase carbônica e BSA (Lu et al., 1995), lisozima de clara de ovo (Perez et al., 2002a), e hormônio de crescimento humano (GH) (Cleland e Jones, 1996). Esse método pode ser utilizado quando se tem disponíveis quantidades grandes da proteína de interesse, o que nem sempre é viável, em termos biotecnológicos e financeiros.

3. Adição de açúcares: trealose e o manitol têm sido bastante empregados com sucesso em algumas formulações, tais como IFN- γ e GH após a emulsificação (Cleland e Jones, 1996), enquanto pouca ou nenhuma proteção em outras, tais como lisozima e IGF-I (Fator de crescimento I "insulin-like") (Meinel et al., 2001). Outros Açúcares também vêm sendo testados, tais como sacarose e maltose, com resultados semelhantes aos anteriores (Van de Weert et al., 2000; Pérez-Rodríguez et al., 2003). As ciclodextrinas também têm sido utilizadas como estabilizantes. O mecanismo protetor sugerido para esses oligossacarídeos é complexo e pouco compreendido (Uchida et al., 1998; Youan et al., 1999; Meinel et al., 2001).

4. Surfactantes: estes compostos têm a habilidade de diminuir a tensão superficial das soluções protéicas e de prevenir adsorções ou agregações às superfícies hidrofóbicas. Os surfactantes não-iônicos são preferencialmente

utilizados, enquanto os iônicos são evitados porque podem se ligar a grupos presentes nas proteínas e levar a desnaturação (Bilati et al., 2005). Os mais estudados são: polisorbatos (moléculas anfipáticas, com porção hidrofílica e hidrofóbica de proporções variadas) (Van de Weert et al., 2000); poloxamer (moléculas formadas por polioxietileno-polioxipropileno) (Sturesson e Carlfors, 2000) e dodecil sulfato de sódio (SDS) (Kwon et al., 2001).

5. Polímeros: a conjugação das proteínas com o polietileno glicol (PEG) (Figura 7) é a modificação química mais utilizada para protegê-las. O principal mecanismo envolvido nessa proteção é baseado na hipótese de que a PEGuilação possa aumentar a estabilidade física da proteína. Além disto, durante o processo de microencapsulação, o PEG evitaria as interações interfaciais proteína-proteína e proteína-PLGA (Taluja et al., 2007). A maior estabilidade apresentada pela lisozima-PEGuilada, e a menor adsorção à superfície do PLGA quando comparada a sua isoforma nativa parece ser um bom exemplo da eficiência dessa modificação (Diwan e Park, 2001).

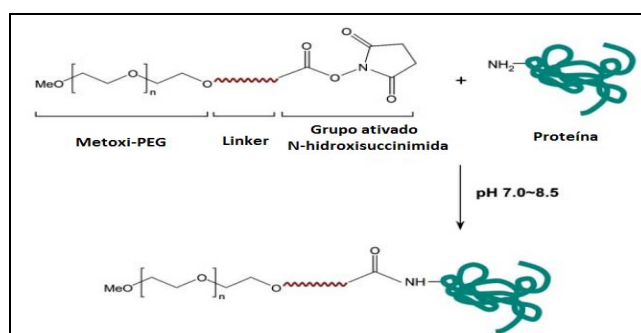


Figura 7 - Esquema geral da PEGuilação.
Fonte: Adaptado de Taluja et al., 2007.

6. Adição de sais: estes podem ser utilizados durante o processo de microencapsulação para se aumentar a preferência da proteína pela fase aquosa. Além disto, também podem ser utilizados para minimizar a degradação ácido-dependente durante a liberação da proteína encapsulada em MS-PLGA (Park et al., 1998; Li et al., 2001). Estes aditivos são dissolvidos na solução aquosa ou ressuspenso no solvente orgânico. Por exemplos, bicarbonato de cálcio melhora o perfil de liberação da insulina e diminui a dimerização covalente da insulina não liberada (Shao e Bailey, 1999); o cloreto de sódio, embora tenha melhorado o perfil

de liberação, provoca uma extensa desnaturação no NGF (*Nerve Growth Factor*) liberado das MS-PLGA (Pean et al., 1998); o hidróxido de magnésio ($Mg(OH)_2$) e o carbonato de zinco também têm sido estudados para aumentar a estabilidade das proteínas frente ao processo de microencapsulação (Zhu e Schwendeman, 1999). Entretanto, temos que ter em mente que aumento de solubilidade e estabilidade da proteína são fatores bem diferentes. O fato de aumentar a solubilidade de uma dada proteína no processo de sua microencapsulação em MS-PLGA nem sempre corresponde a uma forma nativa da molécula.

Nesta tese, por estar sendo proposta a microencapsulação do BV que é composto de um conjunto de proteínas e peptídeos (Tabela 1), optou-se por não se adicionar outra proteína exógena ao “sistema BV”. Então, propomos o estudo de um *meio salino* adequado, que melhor protegesse essas proteínas e peptídeos dos efeitos deletérios inerentes ao processo de microencapsulação. Também é razoável pensar que o mais relevante é partir de uma formulação já estabilizada na etapa 1 (Esquema 1). Para isto, decidiu-se usar os tradicionais sais da série de Hoffmeister, em razão dos seus conhecidos efeitos sobre a solubilidade das proteínas (Moreira et al., 2006; Namur et al., 2009; Rescia et al, 2010).

Resumindo o que foi descrito até agora temos que, a VIT é um método seguro e de escolha para a dessensibilização de pacientes alérgicos ao BV. Entretanto, a VIT é um processo longo e de alto custo. A microencapsulação em MS-PLGA foi usada para diminuir a toxicidade do BV e/ou o número de doses necessárias para a dessensibilização. O método de preparação das MS-PLGA pode induzir perdas e danos estruturais na proteína. A hipótese de trabalho foi a de que estes danos poderiam ser sanados através da adição de co-solutos protetores. Uma vez caracterizadas as partículas, foram realizados ensaios biológicos para a escolha da melhor formulação de BV em MS-PLGA. Toda a construção da hipótese desta tese está resumida nos objetivos.

6 CONCLUSÕES

As proteínas do BV durante o processamento

Foi possível manter a integridade das proteínas do BV durante o processo de microencapsulação, reduzindo os danos inerentes ao próprio processo através da utilização do sal caotrópico Mg^{2+} na concentração de 40 mM.

A utilização de pré-ensaios de microencapsulação com diferentes soluções salinas propicia uma ótima alternativa para se estudar e manter as características conformacionais das proteínas de interesse sem a necessidade de modificações químicas.

As microesferas de PLGA vazias e contendo o BV

Produziram-se microesferas esféricas, com superfícies lisas, mas, porosas em todas as preparações. A porosidade foi independente do Mn ou do tipo de terminação carboxila dos PLGAs estudados. A morfologia das MS produzidas foi independente da presença de BV nas preparações. Obtiveram-se MS com distribuição de tamanho polidisperso, tendo, entretanto um tamanho predominante na faixa de 19 mm a 33 mm. Os tamanhos das partículas foram independentes das terminações carboxilas ou das massas molares dos PLGAs utilizados. A presença do BV induziu um aumento no tamanho das partículas de MS. Este efeito de aumento do tamanho foi mais evidente nas partículas produzidas com PLGA carboxi-terminais livres.

As MS-PLGA-COOH encapsularam mais BV do que seus pares MS-PLGA-COOCH₃. As eficiências de encapsulação ficaram entre 49 e 75%.

Entre as MS produzidas com uma mesma massa molar, a velocidade de degradação do polímero (-COOCH₃) metilado foi menor do que a de seu par (-COOH) livre (de mesmo peso molecular). A presença de BV não interferiu na cinética e nem nos perfis de degradações das diferentes MS-PLGA.

A liberação do BV das diferentes formulações foi controlada tanto por difusão quanto pela degradação das partículas (erosão).

Observaram-se mudanças de conformação do BV liberado, caracterizado pela exposição de Trp ao meio, principalmente naquele liberado das partículas produzidas com MS-PLGA-COOCH₃. Isto comprova o já tradicional fenômeno descrito de que a conformação de proteínas é dependente do pH do meio. Entretanto, apesar das mudanças de conformações observadas no BV, todas mantiveram as suas estruturas imunologicamente reconhecidas.

A eficiência biológica do sistema

As MS contendo BV foram mais eficientes quanto à fagocitose inespecífica por células apresentadoras de antígenos.

As MS foram eficientes veiculadoras das proteínas do BV no organismo sem causar as reações inflamatórias características da presença do BV livre no tecido.

Observou-se que a produção de imunoglobulinas da classe IgG₁ e IgG_{2a} foram mais acentuadas quando o BV foi administrado encapsulado em MS-PLGA e não provocou nenhuma reação anafilática nos animais tratados.

O BV quando encapsulado em MS permitiu uma importante redução no número de injeções administradas quando comparado ao BV livre em PBS, elicitando uma quantidade de anticorpos neutralizantes equivalentes.

Com base nestes resultados verificou-se que o objetivo desta tese foi alcançado, ou seja, propor uma formulação segura para a administração de alérgenos altamente deletérios para o organismo sensibilizado, realizando sua encapsulação em microesferas biodegradáveis de PLGA. Produziram-se anticorpos específicos em quantidades equivalentes àquelas produzidas com o tratamento tradicional com a redução expressiva de 2/3 no número de injeções às quais os animais em tratamento deveriam ser submetidos.

REFERENCIAS¹

Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. Cellular and Molecular Immunology. 6th. ed. Philadelphia: Saunders WB Company; 2009.

Akane T, Hiroshi M. Establishment of allergic animal models. Allergy Pract. 2000;265:741-745.

Akdis CA, Blesken T, Akdis M. Role of interleukin 10 in specific immunotherapy. J Clin Invest. 1998;102(1):98-106.

Almeida-Silva V, Takata CS, Sant'anna OA, Lopes AC, De Araujo PS, Bueno da Costa, MH. Enhanced Liposomal Vaccine Formulation and Performance: Simple Physicochemical and Immunological Approaches. J Liposome Res. 2006;16:215-227.

Ando S, Putnam D, Pack DW, Langer R. PLGA microspheres containing plasmid DNA: preservation of supercoiled DNA via cryopreparation and carbohydrate stabilization. J Pharm Sci. 1999;88:126-130.

Annand RR, Kontoyianni M, Penzotti JE, Dudler T, Lybrand TP, Gelb MH. Active Site of Bee Venom Phospholipase A2: The Role of Histidine-34, Aspartate-64 and Tyrosine-87. Biochemistry. 1996;35:4591-4601.

Arakawa T, Philo JS, Kita Y. Kinetic and Thermodynamic Analysis of Thermal Unfolding of Recombinant Erythropoietin. Biosci Biotechnol Biochem. 2001;65(6):1321-1327.

Athanasίου KA, Niederauer GG, Agrawal CM. Sterilization, toxicity, biocompatibility and clinical applications of polylactic acid/polyglycolic acid copolymers. Biomaterials. 1996;17:93-102.

Aubert-Pouessel A, Venier-Julienne MC, Clavreul A, Sergent M, Jollivet C, Montero-Meneia CN, Garcion E, Bibby DC, Menei P, Benoit JP. In vitro study of GDNF release from biodegradable PLGA microspheres. J Control Release. 2004;95:463-475.

Azevedo-Marques MM, Ferreira DB, Costa RS. Rhabdomyonecrosis experimentally induced in wistar rats by africanized bee venom. Toxicon. 1992;30(3)344-348.

Baker RW. Controlled Release of Biologically Active Agents. New York: John Wiley and Sons; 1987.

¹ De acordo com:

Barbanti SH, Zavaglia CAC, Duek EAR. Polímeros Bioreabsorvíveis na Engenharia de Tecidos. *Polímeros*. 2005;15(1):13-21.

Barichello JM, Morishita M, Takayama K, Nagai T. Encapsulation of Hydrophilic and Lipophilic Drugs in PLGA Nanoparticles by the Nanoprecipitation Method. *Drug Dev Ind Pharm*. 1999;25(4):471-476.

Bauduin P, Nohmie F, Touraud D, Neueder R, Kunz W, Ninham BW. Hofmeister specific-ion effects on enzyme activity and buffer pH: Horseradish peroxidase in citrate buffer. *J Mol Liq*. 2006;123:14-19.

Berchtold E, Maibach R, Muller U. Reduction of side effects from rush immunotherapy with bee venom by pretreatment with terfenadine. *Clin Exp Allergy*. 1992;22:59-65.

Bergamo FMM, De Biase F, Sakate M. Ataque de abelhas africanizadas: o que fazer? *Rev Cães & Gatos*. 2000;88.

Bilati U, Allémann E, Doelker E. Strategic approaches for overcoming peptide and protein instability within biodegradable nano- and microparticles. *Eur J Pharm Biopharm*. 2005;59:375-388.

Blanco MD, Alonso MJ. Protein encapsulation and release from poly(lactide-co-glycolide) microspheres: effect of the protein and polymer properties and of the co-encapsulation of surfactants. *Eur J Pharm Biopharm*. 1998;45:285-294.

Blanco MD, Alonso MJ. Development and characterization of protein-loaded poly(lactide-co-glycolide) nanospheres. *Eur J Pharm Biopharm*. 1997;43:287-294.

Blanco-Prieto MJ, Besseghir K, Orsolini P. Importance of the test medium for the release kinetics of a somatostatin analogue from poly(D,L-lactide-co-glycolide) microspheres. *Int J Pharm*. 1999;184:243-250.

Blanco-Prieto MJ, Campanero MA, Besseghir K, Heimgatnere F, Gander B. Importance of single or blended polymer types for controlled in vitro release and plasma levels of a somatostatin analogue entrapped in PLA/PLGA microspheres. *J Control Release*. 2004;96:437-448.

Blondelle SE, Houghten RA. Hemolytic and antimicrobial activities of the twenty-four individual omission analogues of mellitin. *Biochemistry*. 1991;30:4671-4678.

Bortolatto J, Borducchi E, Rodriguez D, Keller AC, Faquim-Mauro F, Bortoluci KR, Mucida D, Gomes E, Christ A, Schnyder-Candrian S, Schnyder B, Ryffelz B, Russo M. Toll-like receptor 4 agonists adsorbed to aluminium hydroxide adjuvant attenuate ovalbumin-specific allergic airway disease: role of MyD88 adaptor molecule and interleukin-12/interferon-g axis. *Clin Exp Allergy*. 2008;38:1668-1679.

Brandhonneura N, Chevanne F, Vié V, Frisch B, Primault R, Le Potier MF, Le Corre P. Specific and non-specific phagocytosis of ligand-grafted PLGA microspheres by macrophages. *Eur J Pharm Sci.* 2009;36:474-485.

Brockow k, Kiehn M, Riethmuller C. Efficacy of antihistamine pretreatment in the prevention of adverse reactions to Hymenoptera immunotherapy: a prospective, randomized, placebo-controlled trial. *J. Allergy Clin Immunol.* 1997;100:458-463.

Broering JM, Bommarius AS. Evaluation of Hofmeister effects on the kinetic stability of proteins. *J Phys Chem B.* 2005;109:20612-20619.

Boström M, Williams DRM, Niham BW. Specific ion effects: why the properties of lysozyme in salt solutions follow a Hoffmeister series. *Biophys J.* 2003;85:686-694.

Bueno da Costa MH, Sant'anna AO, De Araujo PS, Sato RA, Quintilio W, Silva LVN, Matos CRT, Raw I. Conformational stability and antibody response to the 18 kDa heat shock protein formulated into different vehicles. *Appl Biochem Biotechnol.* 1998;73:18-28.

Cai C, Mao S, Germershaus O, Schaper A, Rytting E, Chen D, Kissel T. Influence of morphology and drug distribution on the release process of FITC-dextran-loaded microspheres prepared with different types of PLGA. *J Microencapsul.* 2009;26(4):334-345.

Carballido J, Carballido M, Kagi M. T cell epitope specificity in human allergic and non allergic subjects to bee venom phospholipase A2. *J Immunol.* 1993;150:3582-3591.

Carpenter JF, Petrelski SJ, Anchordoguy TJ, Arakawa T. Interactions of stabilizers with proteins during freezing and drying. In: Cleland JJ and Langer R, editors. *Formulation and delivery of proteins and peptides.* Washington: American Chemical Society; 1994. p.120-133.

Casado JA, Merino J, Cid J, Subirá ML, Sanchez-Ibarrola A. The type of interaction with Fc γ R in human monocytes determines the efficiency of the generation of oxidative burst. *Immunology.* 1994;83:148-154.

Castellanos IJ, Cruz G, Crespo RC, Griebenow K. Encapsulation-induced aggregation and loss in activity of γ -chymotrypsin and their prevention. *J Control Release.* 2002;81:307-319

Castellanos IJ, Carrasquillo KG, Lopez JD, Alvarez M, Griebenow K. Encapsulation of bovine serum albumin in poly(lactide-co-glycolide) microspheres by the solid-in-oil-in-water technique. *J Pharm Pharmacol.* 2001;53:167-178.

Cavagnol RM. The pharmacological effects of hymenoptera venoms. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 1977;17:479-98.

Chang AC, Gupta RK. Stabilization of tetanus toxoid in poly (D,L-lactic-co-glycolic acid) microspheres for the controlled release of antigen. *J Pharm Sci.* 1996;85:129-132.

Charpin D, Birnbaum J, Vervloet D. Epidemiology of Hymenoptera allergy. *Clin Exp Allergy.* 1994;24:1010-1015.

Chen YN, Li KC, Li Z, Shang GW, Liu ZM, Lu JW, Zhang IH, Gao GD, Chen J. Effects of bee venom peptidergic components on rat pain-related behaviors and inflammation. *Neuroscience.* 2006;138:631-640.

Cleland JL, Duenas ET, Park A, Daugherty A, Kahn J, Kowalski J, Cuthbertson A. Development of poly(D,L-lactide-coglycolide) microsphere formulations containing recombinant human vascular endothelial growth factor to promote local angiogenesis. *J Control Release.* 2001;72:13-24.

Cleland JL, Jones AJ. Stable formulations of recombinant human growth hormone and interferon-g for microencapsulation in biodegradable microspheres. *Pharm Res.* 1996;13:1464-1475.

Cohen S, Yoshioka T, Lucarelli M, Hwang L, Langer R. Controlled delivery system for proteins based on poly (lactic-glycolic acid) microspheres. *Pharm Res.* 1991;8:713-720.

Collins KD. Ions from the Hofmeister series and osmolytes: effects on proteins in solution and in the crystallization process. *Methods.* 2004;34:300-311.

Cox L, Li JT, Nelson H, Lockey R. Allergen immunotherapy: A practice parameter - second update. *J Allergy Clin Immunol.* 2007;120(3):S25-85.

Crotts G, Park TG. Stability and release of bovine serum albumin encapsulated within poly(D,L-lactide-coglycolide) microparticles. *J Control Release.* 1997;44:123-134.

Crotts, G, Sah H, Park, TG. Adsorption determines in-vitro release rate from biodegradable microspheres: Quantitative analysis of surface area during degradation. *J Control Release.* 1997;47:101-111.

Cui F, Cun D, Tao A, Yang M, Shi K, Zhao M, Guan Y. Preparation and characterization of melittin-loaded poly (dl-lactic acid) or poly (dl-lactic-co-glycolic acid) microspheres made by the double emulsion method. *J Control Release.* 2005;107:310-319.

De Lima PRM, Brochetto-Braga MR, Chaud-Netto J. Proteolytic activity of africanized honeybee (*Apis mellifera*: hymenoptera, apidae) venom. *J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis.* 2000;6(1).

Dér A, Kelemen L, Fábián L, Taneva SG, Fodor E, Páll T, Cupane A, Cacace MG, Ramsden JJ. Interfacial water structure controls protein conformation. *J Phys Chem B*. 2007;111:5344-5350.

Dhillon M, Roberts C, Nunn T, Kuo M. Mapping T cell epitopes on phospholipase A2: the major bee venom allergen. *J Allergy Clin Immunol*. 1992;90:42-51.

Diwan M, Park TG. Pegylation enhances protein stability during encapsulation in PLGA microspheres. *J Control Release*. 2001;73:233-244.

Diwan M, Park TG. Stabilization of recombinant interferon- α by pegylation for encapsulation in PLGA microspheres. *Int J Pharm*. 2003;252:111-122.

Dos Santos DF, Nicolete R, De Souza PRM, Bitencourt CS, Dos Santos Junior RR, Bonato VLD, Silva CL, Faccioli LH. Characterization and in vitro activities of cell-free antigens from *Histoplasma capsulatum*-loaded biodegradable microspheres. *Eur J Pharm Sci*. 2009;38:548-555.

Dudler T, Chen W, Wang S. High-level expression in *E.coli* and rapid purification of enzymatically active honey bee venom phospholipase A2. *Biochem Biophys Acta*. 1992;1165:201-210.

Duran L, Mattoso, LHC, Morais PC. Nanotecnologia: introdução, preparação e caracterização de nanomateriais e exemplos de aplicação. São Paulo: Artliber; 2006.

Eisenbarth SC. Use and limitations of alum-based models of allergy. *Clin Exp Allergy*. 2008;38:1572-1575.

Faisant N, Akiki J, Siepmann F, Benoit JP, Siepmann J. Effects of the type of release medium on drug release from PLGA-based microparticles: Experiment and theory. *Int J Pharm*. 2006;314:189-197.

Falabella CA, Jiang H, Frame MD, Chen W. In Vivo Validation of Biological Responses of bFGF Released from Microspheres Formulated by Blending Poly-Lactide-co-Glycolide and Poly(ethylene glycol)- Grafted-Chitosan in Hamster Cheek Pouch Microcirculatory Models. *J Biomat Sci*. 2009;20:903-922.

Feng L, Qi XR, Zhou XJ, Maitani Y, Wang SC, Jiang Y. Pharmaceutical and immunological evaluation of a single-dose hepatitis B vaccine using PLGA microspheres. *J Control Release*. 2006;112:35-42.

Fischer S, Uetz-von Allmen E, Waeckerle-Men Y, Groettrup M, Merkle HP, Gander B. The preservation of phenotype and functionality of dendritic cells upon phagocytosis of polyelectrolyte-coated PLGA microparticles. *Biomaterials*. 2007;28:994-1004.

Franca FOS, Benvenuti LA, Fan HW, Santos DR, Hain SH, Picchi-Martins FR, Cardoso JLC, Kamiguti AS, Theakston RDG, Warrell DA. Severe and fatal mass attacks by

killer bees (Africanized honey bees- *Apis mellifera scutellata*) in Brazil: clinicopathological studies with measurement of serum venom concentrations. *Q J Med.* 1994;87:269-282.

Freiberg S, Zhu XX. Polymer microspheres for controlled drug release. *Int J Pharm.* 2004;282:1-18.

Freitas DS, Spencer PJ, Vassão RC, Abrahão-Neto J. Biochemical and biopharmaceutical properties of PEGylated uricase. *Int J Pharm.* In press.

Fu K, Pack DW, Klibanov AM, Langer R. Visual evidence of acidic environment within degrading poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) microspheres. *Pharm Res.* 2000;17:100-106.

Georgieva D, Greunke K, Genov N, Betzel C. 3-D Model of the bee venom acid phosphatase: Insights into allergenicity. *Biochem Biophys Res Commun.* 2009;378:711-715.

Gilding PAR, Reed AM. Biodegradable polymers for use in surgery polyglycolic/poly(lactic) homo and copolymers 2. *in vitro Degradation. Polymer.* 1981;22:467-479.

Gleich GJ, Zimmermann EM, Henderson LL. Effect of immunotherapy on immunoglobulin E and immunoglobulin G antibodies to ragweed antigens: a six-year prospective study. *J Allergy Clin Immunol.* 1982;70(4):261-271.

Golden DB, Kwitrovich KA, Kagey-Sobotka A, Valentine MD, Lichtenstein LM. Discontinuing venom immunotherapy: outcome after five years. *J Allergy Clin Immunol.* 1996;97:579-587.

Golden DB. Epidemiology of allergy to insect venoms and sting. *Allergy Proc.* 1989;10:103-107.

Gómez S, Gamazo C, San Roman B, Grau A, Espuelas S, Ferrer M, Sanz ML, Irache JM. A novel nanoparticulate adjuvant for immunotherapy with *Lodinium perenne*. *J Immunol Methods.* 2009;348:1-8.

Göpferich A. Mechanisms of polymer degradation and erosion. *Biomaterials.* 1996;17(2):103-114.

Griebenow K, Klibanov AM. On protein denaturation in aqueous-organic mixtures but not in pure organic solvents. *J Am Chem Soc.* 1996;118:11695-11700.

Grizzi I, Garreau H, Li S, Vert M. Hydrolytic degradation of devices based on poly(DL-lactic acid) size-dependence. *Biomaterials.* 1995;16:305-311.

Gutiérrez JM, Ownby CL. Skeletal muscle degeneration induced by venom phospholipases A2: insights into the mechanisms of local and systemic myotoxicity. *Toxicon.* 2003;42:915-931.

Habermann E, Jentsch J. Sequenzanalyse des Melittins aus den tryptischen und peptischen Spaltstücken. Hoppe Seylers Z Physiol Chem. 1967;348:37-50.

Habermann E. Bee and wasp venoms: the biochemistry and pharmacology of their peptides and enzymes are reviewed. Science. 1972;177:314-322.

Haverman R, Wolff K. The protein nature of bee and crotalus poison. Biochem Z. 1937;290:354-59.

Herman D, Melac M. Effect of pretreatment with cetirizine on side effects from rush-immunotherapy with honey bee venom. Allergy. 1996;51:68.

Hernandez RM, Igartua M, Gascon AR, Calvo MB, Pedraz JL. Influence of shaking and surfactants on the release of bsa from plga microspheres. Eur J Drug Metab Pharmacokinet. 1998;23:92-96.

Hilbert AK, Fritzsche U, Kissel T. Biodegradable microspheres containing influenza A vaccine: immune response in mice. Vaccine. 1999;17:1065-1073.

Hinds KD, Campbell KM, Holland KM, Lewis DH, Piche CA, Schmidt PG. PEGylated insulin in PLGA microparticles: *In vivo* and *in vitro* analysis. J Control Release. 2005;104:447-460.

Hirota K, Hasegawa T, Nakajima T, Inagawa H, Kohchi C, Soma G, Makino K, Terada H. Delivery of rifampicin-PLGA microspheres into alveolar macrophages is promising for treatment of tuberculosis. J Control Release. In press.

Hora MS, Rana RK, Nunberg JH, Tice TR, Gilley RM, Hudson ME. Release of human serum albumin from poly(lactide-co-glycolide) microspheres. Pharm Res. 1990;7:1190-1194.

Itri R, Caetano W, Barbosa LRS, Baptista MS. Effect of Urea on Bovine Serum Albumin in Aqueous and Reverse Micelle Environments Investigated by Small Angle X-Ray Scattering, Fluorescence and Circular Dichroism. Braz J Phys. 2004;34(1):58-63.

Jaganathan KS, Vyas SP. Strong systemic and mucosal immune responses to surface-modified PLGA microspheres containing recombinant Hepatitis B antigen administered intranasally. Vaccine. 2006; 24:4201-4211.

Janicki P, Gumulka SW, Krzascik P, Habermann E. The effects of apamin in rats with pretrigeminal or high spinal transection of the central nervous system. Toxicon. 1985;23(6):993-996.

Jeannin P, Lecoanet S, Delneste Y. IgE versus IgG4 production can be differentially regulated by IL-10. J Immunol. 1998;160(7):3555-3561.

Jiang G, Kang F, Singh J, De Luca PP. Protein extraction from plga microspheres using peg: protein content determination and stability assessment. The AAPS Journal (Abstract 001991), 2002.

Jiang HL, Jin JF, Hu JF, Zhu KJ. Improvement of protein loading and modulation of protein release from poly(lactide-co-glycolide) microspheres by complexation with proteins with polyanions. *J Microencapsul.* 2005a;21(6):615-624.

Jiang W, Gupta RK, Deshpande MC, Schwendeman SP. Biodegradable poly (lactic-co-glycolic acid) microparticle for injectable delivery of vaccine antigens. *Adv Drug Deliv Rev.* 2005b;57:391-410.

Jiang W, Schwendeman SP. Stabilization and controlled release of bovine serum albumin encapsulated in poly(D,L-lactide) and poly(ethylene glycol) microsphere blends. *Pharm Res.* 2001;18:878-885.

Jilek S, Barbey C, Spertini F, Corthesy B. Antigen independent suppression of the allergic immune response to bee venom phospholipase A2 by DNA vaccination in CBA/J mice. *Immunology.* 2001;166:3612-3621.

Jilek S, Walter E, Merkle HP, Corthesy B. Modulation of allergic response in mice by using biodegradable poly(lactide-co-glycolide) microspheres. *J Allergy Clin Immunol.* 2004;114:943-950.

Johansen P, Corradin G, Merkle HP, Gander B. Release of tetanus toxoid from adjuvants and PLGA microspheres: How experimental set-up and surface adsorption fool the pattern. *J Control Release.* 1998a;56:209-217.

Johansen P, Gander B, Merkle HP, Sesardic D. Ambiguities in the preclinical quality assessment of microparticulate vaccines. *TIBTECH* 2000b;18:203-211.

Johansen P, Men Y, Audran R, Corradin G, Merkle HP, Gander B. Improving stability and release kinetics of microencapsulated tetanus toxoid by co-encapsulation of additives. *Pharm Res.* 1998b; 15:1103-1109.

Johansen P, Men Y, Merkle HP, Gander B. Revisiting PLA/PLGA microspheres: an analysis of their potential in parenteral vaccination. *Eur J Pharm Biopharm.* 2000a;50:129-46.

Johansen P, Tamber H, Merkle HP, Gander B. Diphtheria and tetanus toxoid microencapsulation into conventional and end-group alkylated PLA/PLGAs. *Eur J Pharmacol Biopharmacol.* 1999;47:193-201.

Johnson OL, Cleland JL, Lee HJ, Charnis M, Duenas E, Jaworowicz W, Shepard D, Shahzamani A, Jones AJS, Putney SD. A month-long effect from a single injection of microencapsulated human growth hormone. *Nat Med.* 1996;2:795-799.

Johnson OL, Herbert P. Long-Acting protein formulations - ProLease Technology. In: Rathbone MJ, Hadgraft J, Roberts MS, editors. *Modified-release drug delivery technology.* New York: Marcel Dekker; 2003.

Johnson OL, Jaworowicz W, Cleland JL, Bailey L, Charnis M, Duenas E, Wu C, Shepard D, Magil S, Last T, Jones AJ, Putney SD. The stabilization and

encapsulation of human growth hormone into biodegradable microspheres. *Pharm Res.* 1997;14:730-735.

Jutel M, Akdis M, Budak F. IL-10 and TGF- β cooperate in regulatory T cell response to mucosal allergens in normal immunity and specific immunotherapy. *Eur J Immunol.* 2003;33:1205-1214.

Kammerer R, Kettner A, Chvatko Y. Delineation of PLA2 epitopes using short or long overlapping synthetic peptides: interest for specific immunotherapy. *Clin Exp Allergy.* 1997;27:1016-1026.

Karamloo F, Schmid-Grendelmeier P, Kussebi F. Gene recombination of major bee venom allergen fragments as a novel vaccine for allergen specific immunotherapy. *Allergo J.* 2002;11:379-384.

Kelly SM, Jess TJ, Price NC. How to study proteins by circular dichroism. *Biochim Biophys Acta.* 2005;1751:119-139.

Kim TH, Lee H, Park TG. Pegylated recombinant human epidermal growth factor (rhEGF) for sustained release from biodegradable PLGA microspheres. *Biomaterials.* 2002;23:2311-2317.

Kindt TJ, Goldsby RA, Osborne BA, Kuby J. *Kuby Immunology.* 6th. ed. New York: Freeman and Company; 2007.

Kostanski JW, DeLuca PP. A Novel In Vitro Release Technique for Peptide-Containing Biodegradable Microspheres. *AAPS PharmSciTech.* 2000;1(1):4.

Kubes P, Kerfoot SM. Leukocyte recruitment in the microcirculation: the rolling paradigm revisited. *News Physiol Sci.* 2001;16:76-80.

Kunz W, Henle J, Ninham BW: 'Zur Lehre von der Wirkung der Salze' (about the science of the effect of salts): Franz Hofmeister's historical papers. *Curr Opin Colloid Interface Sci.* 2004;9:19-37.

Kwon YM, Baudys M, Knutson K, Kim SW. In situ study of insulin aggregation induced by water-organic solvent interface. *Pharm Res.* 2001;18:1754-1759.

Langer R. New methods of drug delivery. *Science.* 1990;249:1527-1533.

Leberman R. The Hoffmeister series and ionic strength. *FEBS J.* 1991;284:193-294.

Lee SS, Kiserow DJ, McGown LB. Enzyme Solubilization in a Reversed Micellar Microreactor with a Bile Salt Cosurfactant. *J Colloid Interface Sci.* 1997;193:32-40.

Li JT, Lockey RF, Bernstein IL, Portnoy JM, Nicklas RA. Allergen immunotherapy: a practice parameter. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2003;90:1-40.

Li X, Deng X, Huang Z. In Vitro Protein Release and Degradation of Poly-dl-lactide-poly(ethylene glycol) Microspheres with Entrapped Human Serum Albumin:

Quantitative Evaluation of the Factors Involved in Protein Release Phases. *Pharm Res.* 2001;18(1):117-124.

Li XM, Schofield BH, Huang CK, Kleiner GI, Sampson HA. A murine model of IgE-mediated cow's milk hypersensitivity. *J Allergy Clin Immunol.* 1999;103:206-214.

Lo Nostro P, Ninham BW, Lo Nostro A, Pesavento G, Fratoni L, Baglioni P. Specific ion effects on the growth rates of *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Phys Biol.* 2005;2:1-7.

Lomonte B, Gutiérrez JM. La actividad proteolítica de los venenos de serpientes de Costa Rica sobre la caseína. *Rev Biol Trop.* 1983;31(1):37-40.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951;193:265-275.

Lu W, Park TG. Protein release from poly(lactic-co-glycolic acid) microspheres: protein stability problems. *PDA J Pharm Sci Technol.* 1995;49:13-19.

MacGlashan DJr, Lichtenstein L M, McKenzie-White J, Chichester K, Henry AJ, Sutton BJ, Gould, H J. Upregulation of FcεRI on human basophils by IgE antibody is mediated by interaction of IgE with FcεRI. *J Allergy Clin Immunol.* 1999;104:492-498.

Mader K, Bittner B, Li Y, Wohlauf W, Kissel T. Monitoring microviscosity and microacidity of the albumin microenvironment inside degrading microparticles from poly(lactide-co-glycolide) (PLG) or ABA-triblock polymers containing hydrophobic poly(lactide-co-glycolide) A blocks and hydrophilic poly(ethyleneoxide) B blocks. *Pharm Res.* 1998;15:787-793.

Makino K, Arakawa M, Kondo T. Preparation and in vitro degradation properties of polylactide microcapsules. *Chem Pharm Bull (Tokyo).* 1995;33:1195-1201.

Markovic-Housley Z, Miglierini G, Soldatova L, Rizkallah PJ, Müller U, Schirmer T. Crystal Structure of Hyaluronidase: a Major Allergen of Bee Venom. *Structure.* 2000;8:1025-1035.

Martinez-Gómez JM, Fischer S, Csaba N, Kiindg TM, Merkle HP, Gander B, Johansen P. A protective allergy vaccine based on CPG and protamine-containing PLGA microspheres. *Pharm Res.* 2007;24:1927-1935.

Martínez-Gómez JM, Johansen P, Erdmann I, Senti G, Cramer R, Kündig TM. Intralymphatic injections as a new administration route for allergen-specific immunotherapy. *Int Arch Allergy Immunol.* 2009;150:59-65.

Meinel L, Illi OE, Zapf J, Malfanti M, Peter MH, Gander B. Stabilizing insulin-like growth factor-I in poly(D,L-lactide-co-glycolide) microspheres. *J Control Release.* 2001;70:193-202.

Menezes MC, Leme AFP, Melo RL, Silva CA, Casa MD, Bruni FM, Lima C, Lopes-Ferreira M, Camargo ACM, Fox JW, Serrano SMT. Activation of leukocyte rolling by the cysteine-rich domain and the hyper-variable region of HF3, a snake venom hemorrhagic metalloproteinase. *FEBS Lett.* 2008;582:3915-3921.

Midoux P, Mayer R, Monsigny M. Membrane permeabilization by α -helical peptides: a flow cytometry study. *Biochim Biophys Acta.* 1995;1239:249-256.

Moreira LA, Bostromb M, Ninhamc BW, Biscaia EC, Tavares FW. Hofmeister effects: Why protein charge, pH titration and protein precipitation depend on the choice of background salt solution. *Coll Surf A: Physicochem Eng Aspects.* 2006;282:457-463.

Mori A, Thomas P, Tagaya Y, Lijima H, Grey H, Ishizaka K. Epitope specificity of bee venom phospholipase A2-specific suppressor T cells which produce antigen-binding glycosylation inhibiting factor. *Int Immunol.* 1993;5(8):833-842.

Morlock M, Koll H, Winter G, Kissel T. Microencapsulation of rh-erythropoietin, using biodegradable poly(D,L-lactide-co-glycolide): protein stability and the effects of stabilizing excipients. *Eur J Pharm Biopharm.* 1997;43:29-36.

Muller UR, Mosbech H. Position paper: Immunotherapy with Hymenoptera venoms. *Allergy.* 1993;48:37-46.

Muller UR. Insect sting allergy: clinical picture, diagnosis and treatment. Stuttgart/New York: Gustav Fischer Verlag, 1990.

Muller UR. Recent developments and future strategies for immunotherapy of insect venom allergy. *Curr Opin Allergy Clin Immunol.* 2003;3:299-303.

Muthu MS. Nanoparticles based on PLGA and its co-polymer: an overview. *Asian J Pharm.* 2010;3(4):266-273.

Namur JAM, Cabral-Albuquerque ECM, Quintilio W, Santana MHA, Politi MJ, De Araujo PS, Lopes AC, Bueno da Costa MH. Poly-lactide-co-glycolide Microparticle Sizes: A Rational Factorial Design and Surface Response Analysis. *J Nanosci Nanotechnol.* 2006;6:2403-2407.

Namur JAM, Takata CS, Araujo PS, Bueno da Costa MH. Hoffmeister series ions protect diphtheria toxoid from structural damages at solvent/water interface. *Materials.* 2009;2:765-775.

Namur JAM, Takata CS, Moro AM, Politi MJ, De Araujo PS, Cuccovia IM, Bueno da Costa MH. Lactic acid triggers, in vitro, thiomersal to degrade protein in the presence of PLGA microspheres. *Int J Pharm.* 2004;273:1-8.

Namur, J.A.M. Toxóide diftérico: nova roupagem para uma vacina tradicional [Tese]. São Paulo: Instituto de Química da Universidade de São Paulo; 2007.

Newman KD, Elamanchili P, Kwon GS, Samuel J. Uptake of poly (D,L-lactic-co-glycolic acid) microspheres by antigen-presenting cells in vivo. *J Biomed Mater Res.* 2002;60:480-486.

Nicolete R, Lima KM, Junior JMR, Baruffia MD, Medeiros AI, Bentley MVLB, Silva CL, Faccioli LH. *In vitro* and *in vivo* activities of leukotriene B4-loaded biodegradable microspheres. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 2007;83:121-129.

Nicolete R, Rius C, Piqueras L, Jose PJ, Sorgi CA, Soares EG, Sanz MJ, Faccioli LH. Leukotriene B4-loaded microspheres: a new therapeutic strategy to modulate cell activation. *BMC Immunol.* 2008;9:36-47.

O'Connor R, Nelson DA. The venom of the honeybee (*Apis mellifera*): free amino acids and peptides. *Can J Biochem.* 1968;46(10):1221-1226.

Padavattan S, Schirmer T, Schmidt M, Akdis C, Valenta R, Mittermann I, Soldatova L, Slater J, Mueller U, Markovic-Housley Z. Identification of a B-cell Epitope of Hyaluronidase, a Major Bee Venom Allergen, from its Crystal Structure in Complex with a Specific Fab. *J Mol Biol.* 2007;368:742-752.

Pandit SS, Hase DP, Bankar MM, Patil AT, Gaikwad NJ. Ketoprofen-loaded Eudragit RSPO microspheres: An influence of sodium carbonate on in vitro drug release and surface topology. *J Microencapsul.* 2009;26(3):195-201.

Park TG, Lee HY, Nam YS. A new preparation method for protein loaded poly(D,L-lactic-co-glycolic acid) microspheres and protein release mechanism study. *J Control Release.* 1998;55:181-191.

Patterson J, Stayton PS, Li X. *In situ* characterization of the degradation of plga microspheres in hyaluronic acid hydrogels by optical coherence tomography. *IEEE Trans Medical Imaging.* 2009;28(1):74-81.

Pean JM, Venier-Julienne MC, Boury F, Menei P, Denizot B, Benoit JP. NGF release from poly(D,L-lactide-coglycolide) microspheres. Effect of some formulation parameters on encapsulated NGF stability. *J Control Release.* 1998;56:175-187.

Pérez C, Castellanos I, Costantino H, Al-Azzam W, Griebenow K. Recent trends in stabilizing protein structure upon encapsulation and release from bioerodible polymers. *J Pharm Pharmacol.* 2002b;54:301-313.

Pérez C, De Jesus P, Griebenow K. Preservation of lysozyme structure and function upon encapsulation and release from poly(lactic-co-glycolic) acid microspheres prepared by the water-in-oil-in-water method. *Int J Pharm.* 2002a; 248:193-206.

Pérez C, Griebenow K. Effects of salts on lysozyme stability at the water-oil interface and upon encapsulation in poly (lactic-co-glycolic) acid microspheres. *Biotechnol Bioeng.* 2003;82(7):825-832.

Perez-Rodriguez C, Montano N, Gonzalez K, Griebenow K. Stabilization of a-chymotrypsin at the CH₂Cl₂/water interface and upon water-in-oil-in-water encapsulation in PLGA microspheres. *J Control Release*. 2003;89:71-85.

Petrushina I, Tran M, Sadzikava N, Ghochikyan A, Vasilevko V, Agadjanyan MG, Cribbs DH. Importance of IgG2c isotype in the immune response to b-amyloid in amyloid precursor protein/transgenic mice. *Neurosci Lett*. 2003;338:5-8.

Pinna MC, Bauduin P, Touraud D, Monduzzi M, Ninham BW, Kunz W. Hofmeister effects in biology: effect of choline addition on the salt-induced super activity of horseradish peroxidase and its implication for salt resistance of plants. *J Phys Chem B*. 2005;109:16511-16514.

Poulsen, OM. Animal models for the study of allergy. In: Hau, J, editor. *Handbook of Laboratory Animal Science: Animal models*. 1st. ed. Boca Raton: CRC Press; 1994.

Prior S, Gander B, Blarer N, Merkle HP, Subirá ML, Irache JM, Gamazo C. In vitro phagocytosis and monocyte-macrophage activation with poly(lactide) and poly(lactide-co-glycolide) microspheres. *Eur J Pharm Sci*. 2002;15:197-207.

Quintilio W, Sato RA, Da Silveira AM, Barratt G, Fattal E, Bueno da Costa MH. Microquantification of proteins with low chromophore content. *Biotech Techniques*. 1997;11(9):697-700.

Raghuvanshi RS, Goyal S, Singh O, Panda AK. Stabilization of dichloromethane-induced protein denaturation during microencapsulation. *Pharm Dev Technol*. 1998;3:269-276.

Reimers AR, Hari Y, Muller U. Reduction of side-effects from ultrarush immunotherapy with honeybee venom by pretreatment with fexofenadine: a double-blind, placebo-controlled trial. *Allergy*. 2000;55:484-488.

Rescia VC, Ramos HR, Takata C, Araujo OS, Bueno da Costa, MH. Diphtheria toxoid conformation in the context of its nanoencapsulation within liposomal particles sandwiched by Chitosan. *J Liposome Res*. In press.

Riches, K.J.; Gillis, D. e James, R.A. An autopsy approach to bee sting-related deaths. *Pathology*. 2002;34:257-262.

Roberts MJ, Bentley MD, Harris JM. Chemistry for peptide and protein PEGylation. *Adv Drug Deliv Rev*. 2002;54:459-476.

Rouse JJ, Mohamed F, van der Walle CF. Physical ageing and thermal analysis of PLGA microspheres encapsulating protein or DNA. *Int J Pharm*. 2007;339:112-120.

Royer B, Varadaradjalou S, Saas P. Inhibition of IgE-induced activation of human mast cells by IL-10. *Clin Exp Allergy*. 2001;31(5):694-704.

Ruzgas TA, Kazlauskas AV, Razumas VJ, Kulys JJ. Adsorption of heme-containing peptides on silicon surfaces. *J Colloid Interface Sci*. 1992;154:97-103.

Saez V, Hernández JR, Peniche C. Microspheres as delivery systems for the controlled release of peptides and proteins. *Biotechnol Appl.* 2007;24:108-116.

Sah H. A New Strategy To Determine the Actual Protein Content of Poly(lactide-co-glycolide) Microspheres. *J Pharm Sci.* 1997;86(11):1315-1318.

Sah H. Protein behavior at the water/methylene chloride/water interface. *J Pharm Sci.* 1999a;88:1320-1325.

Sah H. Stabilization of proteins against methylene chloride/water interface induced denaturation and aggregation. *J Control Release.* 1999b;58:143-151.

Sah HK, Toddywala R, Chien YW. The influence of biodegradable microcapsule formulations on the controlled release of a protein. *J Control Release.* 1994;30:201-211.

Sandor M, Ensore D, Weston P, Mathiowitz E. Effect of protein molecular weight on release from micron-sized PLGA microspheres. *J Control Release.* 2001;76:297-311.

Sasiak AB, Bolgiano B, Crane DT, Hockley DJ, Corbel MJ, Sesardi D. Comparison of in vitro and in vivo methods to study stability of PLGA microencapsulated tetanus toxoid vaccines. *Vaccine.* 2001;19:694-705.

Schmidt JO. Toxinology of venoms from the honeybee genus *apis*. *Toxicon.* 1995;33(7):917-927.

Sert M, Tetiker T, Paydas S. Rhabdomyolysis and acute renal failure due to honeybee stings as an uncommon cause. *Nephron.* 1993;65:647.

Shao PG, Bailey LC. Stabilization of pH-induced degradation of porcine insulin in biodegradable polyester microspheres. *Pharm Dev Technol.* 1999;4:633-642.

Sharif S, O'Hagan DT. A comparison of alternative methods for the determination of the levels of protein entrapped in poly (lactide-co-glycolide) microparticles. *Int J Pharm.* 1995;115:259-263.

Shi L, Caulfield MJ, Chern RT, Wilson RA, Sanyal G, Volkin DB. Pharmaceutical and immunological evaluation of a single-shot hepatitis B vaccine formulated with PLGA microspheres. *J Pharm Sci.* 2002;91(4):1019 - 1035.

Shipolini R, Callewaert G, Cottrell R, Doonan S, Vernon C, Banks B. Phospholipase A from bee venom. *Eur J Biochem.* 1971;20:459-468.

Shipolini RA, Gauldie J, Hanson JM, Rumjanek FD, Vernon CA. The peptide components of bee venom. *Eur J Biochem.* 1976;61(2):369-376.

Siepmann J, Göpferich A. Mathematical modeling of bioerodible polymeric drug delivery systems. *Adv Drug Deliv Rev.* 2001;48:229-247.

Silva TC, Moura SP, Ramos HR, De Araujo OS, Bueno da Costa MH. Design of a Modern Liposome and Bee Venom Formulation for the Traditional VIT-Venom Immunotherapy. *J Liposome Res.* 2008;18:353-368.

Silva TC. Imunoterapia com veneno de abelhas encapsulado em lipossomas: um desafio nanotecnológico [Dissertação]. São Paulo: Departamento de Clínica Médica da Universidade Federal de São Paulo; 2008.

Silverstein SC, Steinman RM, Cohn ZA. Endocytosis. *Annu Rev Biochem.* 1977;46:669-722.

Soldatova L, Cramer R, Gmachl M, Kemeny DM, Schmidt M, Weber M, Mueller UR. Superior biologic activity of the recombinant bee venom allergen hyaluronidase expressed in baculovirus-infected insect cells as compared with *Escherichia coli*. *J. Allergy Clin Immunol.* 1998;101:691-698.

Spiegelberg H, Raz E. DNA-based approaches to the treatment of allergies. *Curr Opin Mol Ther.* 2002;4:64-71.

Steen CJ, Janniger CK, Schutzer SE, Schuwartz RA. Insect sting reactions to bees, wasps, and ants. *Int J Dermatol.* 2005;44:91-94.

Sturesson C, Carlfors J. Incorporation of protein in PLG-microspheres with retention of bioactivity. *J Control Release.* 2000;67:171-178.

Suh SJ, Kim KS, Kim MJ, Chang YC, Lee SD, Kim MS, Kwon DY, Kim CH. Effects of bee venom on protease activities and free radical damages in synovial fluid from type II collagen-induced rheumatoid arthritis rats. *Toxicol In Vitro.* 2006;20:1465-1471.

Sumikura OK, Andersen AM, Drewes L, Arendt-Nielsen A. Comparison of hyperalgesia and neurogenic inflammation induced by melittin and capsaicin in humans. *Neurosci Lett.* 2003;337:147-150.

Tabata Y, Ikada Y. Phagocytosis of Polymer Microspheres by Macrophages. *Advances in Polymer Science (book series).* vol. 94;1990.

Tabata Y, Ikada Y. Protein precoating of polylactide microspheres containing a lipophilic immunopotentiator for enhancement of macrophage phagocytosis and activation. *Pharm Res.* 1989;6(4):296-301.

Taluja A, Youn YS, Bae YH. Novel approaches in microparticulate PLGA delivery systems encapsulating proteins. *J Mater Chem.* 2007;17:4002-4014.

Tamada J, Langer R. Erosion mechanism of hydrolytically degradable polymers. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1993;90:552-556.

Tamber H, Johansen P, Merkle HP, Gander B. Formulation aspects of biodegradable polymeric microspheres for antigen delivery. *Adv Drug Deliv Rev.* 2005;57:357-376.

Terra, RMS. Análise conformacional da melitina por dinâmica molecular e caracterização dos efeitos do peptídeo na função plaquetária [Dissertação]. Porto Alegre: Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2006.

Tietz NW. Clinical guide to laboratory tests. 3rd. ed. Philadelphia: Saunders WB Company; 1995.

Till SJ, Durham SR. Immunologic Responses to Subcutaneous Allergen Immunotherapy. In: Lockey RF, Ledford DK. Allergens and allergen immunotherapy. New York: Informa Healthcare USA, Inc.; 2008.

Till SJ, Francis JN, Nouri-Aria K, Durham SR. Mechanisms of immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol*. 2004;113:1025-34.

Tilstra L, Mattice WL. The B sheet \leftrightarrow coil transition of polypeptides, as determined by circular dichroism. In: Fasman GD. Circular dichroism and the conformational analysis of biomolecules. New York and London: Plenum Press; 1996.

Torres AI, Boisdron-Celle M, Benoit JP. Formulation of BCNU-loaded microspheres: influence of drug stability and solubility on the design of the microencapsulation procedure. *J Microencapsul*. 1996;13(1):41-51.

Torres R, Picado C, Mora F. Descubriendo el asma de origen alérgico a través del ratón. Un repaso a la patogenia de los modelos de asma alérgica en el ratón y su similitud con el asma alérgica humana. *Arch Bronconeumol*. 2005;41(3):141-52.

Tournoy KG, Kips JC, Pauwels RA. Endogenous interleukin-10 suppresses allergen-induced airway inflammation and nonspecific airway responsiveness. *Clin Exp Allergy*. 2000;30(6):775-783.

Tsai T, Mehta RC, DeLuca PP. Adsorption of peptides to poly(D,L-lactide-co-glycolide): 1. Effect of physical factors on the adsorption. *Int J Pharm*. 1996a;127:31-42.

Tsai T, Mehta RC, DeLuca PP. Adsorption of peptides to poly(D,L-lactide-co-glycolide): 2. Effect of solution properties on the adsorption. *Int J Pharm*. 1996b;127:43-52.

Uchida T, Shiosaki K, Nakada Y, Fukada K, Eda Y, Tokiyoshi S, Nagareya N, Matsuyama K. Microencapsulation of hepatitis B core antigen for vaccine preparation. *Pharm Res*. 1998;15:1708-1713.

Valenta R, Kraft D. From allergy structure to new forms of allergen specific immunotherapy. *Curr Opin Immunol*. 2002;4:718-727.

Valenta R, Niederberger V. Recombinant allergens for immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol*. 2007;119:826-830.

Van de Weert M, Hoehstetter J, Hennink WE, Crommelin DJ. The effect of a water/organic solvent interface on the structural stability of lysozyme. *J Control Release*. 2000;68:351-359.

Van Ree R, Van Leeuwen WA, Dieges PH. Measurement of IgE antibodies against purified grass pollen allergens (Lol p 1, 2, 3 and 5) during immunotherapy. *Clin Exp Allergy*. 1997;27(1):68-74.

Venarske D, deShazo RD. Molecular mechanisms of allergic disease. *South Med J*. 2003;96:1049-1054.

Vert M, Li S, Garreau H. More about the degradation of LA/GA-derived matrixes in aqueous media. *J Control Release*. 1991;16:15-26.

Visscher GE, Pearson JE, Fong JW, Argentieri GJ, Robison RL, Maulding HV. Effect of particle size on the in vitro and in vivo degradation rates of poly (D,L-lactide-co-glycolide) microcapsules. *J Biomed Matter Res*. 1988;22:733-746.

Waeckerle-Men Y, Groettrup M. PLGA microspheres for improved antigen delivery to dendritic cells as cellular vaccine. *Adv Drug Deliv Rev*. 2005;57:475-482.

Walter E, Dreher D, Kok M, Thiele L, Kiama SG, Gehr P. Hydrophilic poly(DL-lactide-co-gylcolide) microspheres for the delivery of DNA to human-derived macrophages and dendritic cells. *J Control Release*. 2001;76:149-168.

Wang W. Instability, stabilization, and formulation of liquid protein pharmaceuticals. *Int J Pharm*. 1999;185:129-188.

Weert M, Hoehstetter J, Hennink WE, Crommelin DJA. The effect of water/organic solvent interface on the structural stability of lysozyme. *J Control Release*, 2000;68:351-359.

Wei G, Lu LF, Lu WY. Stabilization of recombinant human grow hormone against emulsification-induced aggregation by Pluronic surfactants during microencapsulation. *Int J Pharm*. 2007;338:125-132.

Westgard JO, Lahmeyer BL, Birnbaum ML. Use of the Du pont "Automatic Clinical Analyzer" in Direct Determination of Lactic Acid in Plasma Stabilized with sodium Fluoride. *Clin Chem*. 1972;18:1334-8.

Wierenga RK. The TIM-barrel fold: a versatile framework for efficient enzymes. *FEBS Lett*. 2001;492:193-198.

Wischke C, Zimmermann J, Wessinger B, Schendler A, Borchert HH, Peters JH, Nesselhut T, Lorenzenc DR. Poly(I:C) coated PLGA microparticles induce dendritic cell maturation. *Int J Pharm*. 2009;365:61-68.

Xing DKL, Cranet DT, Bolgiano B, Corbel MJ, Jones C, Sesardic D. Physico-chemical and immunological studies on the stability of free and microsphere-encapsulated tetanus toxoid in vitro. *Vaccine*. 1996;14:1205-1213.