

RENATO PAVAN ANDERLINI

EMPREGO DA SÍLICA NANOESTRUTURADA SBA-15 COMO ADJUVANTE NO
PROCESSO DE IMUNIZAÇÃO DE OVINOS JOVENS COM VENENO DE
Crotalus durissus terrificus TOTAL E IRRADIADO COM COBALTO 60.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Doenças Tropicais da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de Mestre em Doenças Tropicais.

Orientador: Prof. Dr. Benedito Barraviera

Co-orientador: Dr. Rui Seabra Ferreira Junior

Botucatu

2009

RENATO PAVAN ANDERLINI

EMPREGO DA SÍLICA NANOESTRUTURADA SBA-15 COMO ADJUVANTE NO
PROCESSO DE IMUNIZAÇÃO DE OVINOS JOVENS COM VENENO DE
Crotalus durissus terrificus TOTAL E IRRADIADO COM COBALTO 60.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Doenças Tropicais da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de Mestre em Doenças Tropicais.

Orientador: Prof. Dr. Benedito Barraviera

Co-orientador: Dr. Rui Seabra Ferreira Junior

Botucatu

2009

Trabalho desenvolvido no Centro de Estudos de Venenos e Animais Peçonhentos – CEVAP, UNESP, na Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – FMVZ, UNESP e no Laboratório de Moléstias Infecciosas e Parasitárias da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais Renato e Fúlvia, pela criação, educação, apoio, incentivo e amor durante toda minha vida. E simplesmente por serem eles, os meus pais.

Ao meu irmão Felipe, meu espelho de vida, por absolutamente tudo que ele representa nesse mundo pra mim.

À minha avó Ruth, pelo eterno companheirismo e carinho. Sentimentos que somente uma avó pode passar para uma pessoa.

À Flávia, minha namorada, companheira e amiga que, em todos os momentos, não deixou de acreditar em mim. Talvez sem ela o caminho não seria o mesmo.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Benedito Barraviera, pela orientação, dedicação e amizade e também pela oportunidade e todo conhecimento a mim oferecido.

Ao Dr. Rui Seabra Ferreira Junior pela co-orientação, auxílio em todas as etapas da pesquisa e pelo companheirismo e amizade nesse tempo.

Ao Dr. Patrick Jack Spencer - Pesquisador do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares - IPEN/CNEN SP.

Ao Dr. Oswaldo Augusto Brazil Esteves Sant'Anna – Pesquisador do Laboratório de Imunoquímica do Instituto Butantã - São Paulo.

A todos os funcionários da Manejo® Assessoria Agropecuária, pelo total esforço e apoio, em especial Fábio e Lúcio.

À Dra. Sueli Aparecida Calvi pelo auxílio na padronização das técnicas laboratoriais empregadas.

Ao Dr. Sony Dimas Bicudo por ceder o espaço para a manutenção dos animais durante o experimento.

Ao Prof. Dr. Roberto Calderon Gonçalves e aos residentes Hugo e Eric, pela dedicação e apoio.

Ao Prof. Dr. Júlio Lopes pelo apoio e orientação nas análises histopatológicas.

À residente Ana Paula pela realização das técnicas de análises histopatológicas.

À Profa. Dra. Silvia Barraviera, pela orientação durante o meu estágio obrigatório.

À Profa. Dra. Terezinha Peraçoli pela ajuda e disposição.

A todos os docentes do Departamento de Doenças Tropicais por contribuírem para a minha formação na pós-graduação.

À Solange Sako Cagliari, secretária do Departamento, pela ajuda e carinho.

Ao Jairo, tratador e amigo, pelo carinho com os animais e pelo serviço prestado.

A todos os funcionários do CEVAP pelo imenso suporte na conclusão desta etapa.

Ao estatístico Hélio Rubens, pelo imenso auxílio nas análises estatísticas.

Ao GAP – Grupo de Apoio à Pesquisa, pelos serviços prestados.

A todos aprimorandos e pós-graduandos do Departamento de Doenças Tropicais.

Aos aprimorandos e pós-graduandos Ailton, Eduardo, Bruno, Luciana e Michelle por TUDO. Além da extrema ajuda e confiança, com muita compreensão mostraram-se verdadeiros e eternos amigos.

A todos estagiários que passaram pelo CEVAP durante esse tempo.

Ao Carlinhos, pelo auxílio no laboratório.

À CAPES pela concessão da bolsa, permitindo-me dar continuidade aos estudos.

À Faculdade de Medicina de Botucatu – FMB/UNESP.

Ao Centro de Estudos de Venenos e Animais Peçonhentos – CEVAP/UNESP

À Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – FMVZ/UNESP.

À Fundação para o Desenvolvimento da UNESP – FUNDUNESP.

À Fundação do Instituto de Biociências – FUNDIBIO/UNESP.

Ao Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – IPEN/CNEN, São Paulo.

Ao Biotério Central da UNESP, pelos camundongos utilizados no experimento.

A todos que fizeram parte do desenvolvimento deste trabalho.

Este trabalho recebeu apoio financeiro da Faculdade de Medicina de Botucatu, da FUNDUNESP – processo 00818/07-DFP, da FUNDIBIO e do CEVAP, Centro de Estudos de Venenos e Animais Peçonhentos – UNESP.

HOMENAGEM

Ao Professor Eduardo Lopes Elisiano, um memorável Mestre que, durante toda minha graduação, mostrou ser um verdadeiro educador e um grande pai. Com palavras sábias, tornou-me uma pessoa melhor.

“...um passo para trás, em certos momentos,
valem mais do que dois à frente...”

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
2. OBJETIVOS	14
2.1. Objetivos gerais	14
2.2. Objetivos específicos	14
3. MATERIAL E MÉTODOS	15
3.1. Material	15
3.1.1. Animais	15
3.1.2. Veneno	15
3.2. Métodos	15
3.2.1. Manejo dos ovinos	15
3.2.2. Irradiação do veneno	16
3.2.3. Coleta do material	16
3.2.3.1. Fezes	16
3.2.3.2. Sangue	17
3.2.4. Protocolo de hiperimunização	17
3.2.5. Exames laboratoriais	19
3.2.5.1. Exame parasitológico	19
3.2.5.2. Titulação de anticorpos pelo método do ensaio imunoenzimático (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay - ELISA)	19
3.2.6. Avaliação do crescimento e ganho de peso dos animais	21
3.2.7. Abate dos animais e inspeção sanitária	21
3.2.8. Exame histológico de rim	21
3.2.9. Determinação da atividade tóxica do veneno crotálico	22
3.2.10. Avaliação da capacidade de neutralização	22
3.2.11. Análise estatística	24
4. RESULTADOS	25
4.1. Exame parasitológico	25
4.2. Avaliação do título de anticorpos	25
4.3. Avaliação do crescimento e ganho de peso dos animais	31
4.4. Inspeção sanitária e análise de carcaças	34

4.5. Exame histológico dos rins	35
4.6. Determinação da atividade tóxica do veneno crotálico	36
4.7. Avaliação da capacidade de neutralização.....	37
4.8. Avaliação clínica dos animais	40
5. DISCUSSÃO	42
6. CONCLUSÕES	54
7. RESUMO	55
8. SUMMARY	56
9. REFERÊNCIAS.....	57
10. APÊNDICE	64

1. INTRODUÇÃO

As serpentes pertencem à Classe Reptilia, ordem Squamata e subordem Serpentes. São animais vertebrados, com corpo cilíndrico coberto por escamas. Não apresentam membros, pálpebras móveis nem ouvido externo (1,2).

São capazes de produzir substâncias por uma glândula sero-mucosa, inoculá-las por um aparelho especializado constituído de presas modificadas que permitem a injeção nos tecidos animais (3).

Os venenos das serpentes são misturas complexas, constituídas por diferentes proteínas e peptídeos biologicamente ativos. Além das variações que ocorrem entre diferentes espécies, relacionam-se com a idade, sexo, tipo de alimentação e seleção genética por isolamento geográfico. Pode haver diferenciação entre animais da mesma espécie (4-6).

No mundo existem aproximadamente 3.000 espécies distribuídas em 465 gêneros e 25 famílias. No Brasil, existem cerca de 358 espécies, sendo 54 consideradas peçonhentas, entre elas 27 elapídeos e 27 viperídeos, e 304 não-peçonhentas (7,8).

As 54 espécies de serpentes peçonhentas brasileiras encontram-se divididas em quatro gêneros: *Bothrops*, *Crotalus*, *Micrurus* e *Lachesis*. Estas serpentes são responsáveis por cerca de 15 acidentes a cada 100.000 habitantes por ano. Aproximadamente 150.000 mortes ocorrem no mundo todo anualmente, segundo a Organização Mundial de Saúde (9-12).

Gutiérrez et al (13) descrevem o descaso das autoridades públicas nacionais e internacionais em relação ao ofidismo. Estes consideram os acidentes por animais peçonhentos o mais negligenciado problema de saúde pública do século 21.

Entre os principais gêneros responsáveis pelo ofidismo no Brasil, as do gênero *Bothrops* são responsáveis por 87,5% dos acidentes causados, seguida pelas do gênero *Crotalus*, (9,2%), *Lachesis* (2,7%) e *Micrurus* (0,6%) (10).

As serpentes do gênero *Crotalus* causam aproximadamente 2.000 acidentes por ano, no Brasil. O veneno crotálico é composto por enzimas, toxinas e peptídeos e possui ação neurotóxica, nefrotóxica, hemolítica e hepatotóxica (9,14).

Para o tratamento dos acidentes, são administrados por via parenteral soros heterólogos monovalentes ou polivalentes produzidos a partir do processo de hiperimunização de eqüinos. Estes são considerados o único tratamento para os envenenamentos. Entretanto, as reações à soroterapia são originadas pela ação de proteínas heterólogas eqüinas, dando origem à reações de hipersensibilidade do tipo I e III. Em função destes dados, novos processos de hiperimunização e o uso de animais alternativos vêm sendo estudados por diversos pesquisadores com o intuito de contornar esse problema (15-24).

Landon e Smith (25) citam os eqüinos como os principais animais soroprodutores, porém defendem o uso de ovinos, uma vez que estes são excelentes produtores de resposta imune humoral. Ainda, consideram estes animais dóceis, de fácil manejo e de menor custo.

Sjostrom et al (17), comparando o soro produzido em cavalos com o obtido em ovinos relataram que os anticorpos desenvolvidos em ovelhas mostraram-se mais efetivos, além de apresentar maior concentração de anticorpos específicos. Observou-se também que a subclasse IgG_T observada nos eqüinos não foi detectada nos ovinos. Apesar desta ser uma imunoglobulina altamente protetora, é uma das principais causadoras de reações adversas quando da soroterapia em pacientes acidentados.

Dessa maneira, os ovinos vêm sendo empregados atualmente com freqüência em processos de hiperimunização e na produção de antivenenos, substituindo os eqüinos. A vantagem de seu uso está na eficiência do soro produzido sem a ocorrência de reações de hipersensibilidade e no baixo custo quando comparado com os eqüinos (15-25).

A minimização dos custos gerados na soroprodução também depende da tecnologia empregada em todas as etapas envolvidas na produção dos soros antiofídicos (26-28).

Por outro lado, com Clissa et al (29), o processo de hiperimunização é considerado altamente prejudicial, reduzindo de uma maneira geral a sobrevivência do animal. Com base nessas informações, estes autores utilizaram a radiação gama como ferramenta destoxificante das proteínas constituintes dos venenos. Esse processo resulta em alterações físico-químicas e estruturais inativando algumas atividades biológicas destas proteínas.

A radiação gama é uma radiação eletromagnética cujas características são a alta energia associada à ausência de massa. Possui elevado poder de penetração e capacidade de promover ionizações e excitações no meio onde se propaga (30).

Classificada como uma radiação ionizante, atravessa qualquer tipo de matéria removendo elétrons da camada periférica dos átomos, resultando na formação de pares de íons positivos e negativos. Este tipo de radiação eletromagnética pode ainda levar a uma excitação onde elétrons das camadas externas dos átomos absorvem energia suficiente para atingir o estado energético mais alto, permanecendo associados ao átomo e emitindo energia sob a forma de luz visível ou ultravioleta (31).

O emprego da radiação gama produzida por Cobalto-60 (^{60}Co) vem demonstrando excelentes resultados na atenuação da toxicidade dos venenos, sendo capaz de diminuí-la, sem alterar seu potencial imunogênico (32-36).

Além do veneno, os adjuvantes de Freund também se apresentam como um problema no processo de hiperimunização de animais. Apesar de apresentarem boa resposta quando associados aos antígenos, levam ao desenvolvimento de diversas reações adversas com formação de granulomas, abscessos e necrose tecidual (34-36).

Neste sentido, os pesquisadores do mundo todo procuram novos adjuvantes para poder melhorar o nível de resposta imunológica e atenuar os efeitos colaterais tanto nos humanos como nos animais. Mercuri et al (37). recentemente descreveram um novo adjuvante denominado sílica nanoestruturada SBA-15 para o uso em processos de hiperimunização. Esta foi descrita pela primeira vez como um adjuvante efetivo na indução de resposta de anticorpos. Estes autores utilizaram a sílica nanoestruturada SBA-15 como adjuvante para induzir a

resposta imune humoral contra veneno de serpente do gênero *Micrurus* em camundongos. Demonstraram em diferentes linhagens de camundongos ótima ação adjuvante, pois promove resposta imune superior ou similar à ação do adjuvante incompleto de Freund.

A sílica não desenvolve reações no local de aplicação e tem excelente propriedade ativadora de células apresentadoras de antígenos. A estrutura desta substância apresenta-se na forma hexagonal com poros altamente ordenados. É sintetizada em meio ácido utilizando-se como agente direcionador de estrutura um copolímero tribloco, o poli[óxido de etileno]-poli[óxido de propileno]-poli[óxido de etileno] [EO20PO70EO20]. Este pode auto-agregar-se com espécies de silicatos para formar essa sílica porosa (37,38).

Por fim, a proposta da presente pesquisa foi dar continuidade a um estudo que vem se desenvolvendo em Botucatu há alguns anos. Este busca animais alternativos para a produção de antivenenos, formas de atenuar estes antígenos para amenizar o sofrimento dos animais e agora o estudo de um adjuvante recém sintetizado. Procurou-se, portanto, estabelecer um protocolo de hiperimunização para a produção de antivenenos.

Desta forma, o uso de ovinos jovens como alternativa de animais soroprodutores, a irradiação do veneno como ferramenta destoxificante e a busca de um novo adjuvante justificam plenamente a presente pesquisa.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivos gerais

O objetivo do presente trabalho foi o de avaliar o emprego da sílica nanoestruturada SBA-15 como adjuvante no processo de hiperimunização de ovinos jovens com veneno de *Crotalus durissus terrificus* nativo e irradiado com ^{60}Co .

2.2. Objetivos específicos

- Avaliar o perfil imunológico decorrente da hiperimunização dos ovinos jovens, mediante a utilização do adjuvante incompleto de Freund, hidróxido de alumínio e sílica nanoestruturada SBA-15 associados ao veneno de *Crotalus durissus terrificus* em sua forma nativa ou irradiada com ^{60}Co , utilizando a técnica de ensaio imunoenzimático – ELISA;
- Avaliar a clínica dos animais antes, durante e após o processo de hiperimunização e os possíveis efeitos adversos causados pelos adjuvantes e pelo veneno crotálico;
- Comparar o crescimento e o ganho de peso dos animais entre os diferentes grupos após o processo de hiperimunização;
- Avaliar as carcaças por meio da inspeção sanitária e aprovar para consumo humano;
- Avaliar a toxicidade do veneno de *Crotalus durissus terrificus* utilizado no processo de hiperimunização dos ovinos jovens e no teste da capacidade de neutralização;
- Avaliar a capacidade de neutralização do soro obtido por meio do processo de hiperimunização dos ovinos jovens com veneno de *Crotalus durissus terrificus* nativo e irradiado com ^{60}Co ;

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material

3.1.1. Animais

Foram utilizados 24 ovinos machos, com idades compreendidas entre 61 e 98 dias, da raça Suffolk, mantidos no Laboratório de Estudos em Biotecnologia da Reprodução da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Botucatu - UNESP. Os animais foram obtidos por intermédio da Manejo® Assessoria Agropecuária com apoio do Departamento de Doenças Tropicais e Diagnóstico por Imagem da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP.

Além disso, foram utilizados camundongos Swiss, machos e fêmeas, com pesos entre 18 e 22 gramas. Os animais foram obtidos do Biotério Central da UNESP e mantidos no Centro de Estudos de Venenos e Animais Peçonhentos da UNESP – CEVAP, Campus de Botucatu.

3.1.2. Veneno

Foi utilizado um “pool” de veneno extraído de serpentes adultas da espécie *Crotalus durissus terrificus* mantidas no serpentário do Centro de Estudos de Venenos e Animais Peçonhentos da UNESP - CEVAP, Campus de Botucatu. O veneno foi liofilizado e mantido a -20°C até o momento de sua utilização.

3.2. Métodos

3.2.1. Manejo dos ovinos

Os animais foram mantidos em quatro baias contendo seis animais cada. A alimentação deu-se à base de ração farelada oferecida duas vezes ao dia além de feno, sal mineral e água ad libitum. A limpeza do local foi feita diariamente.

Todos os animais foram submetidos a um exame clínico, coleta de fezes para exame parasitológico e pesagem antes do início do experimento. Após esses procedimentos, todos receberam uma dose única de 0,5mL/25Kg do vermífugo Moxidectina à 1% (Cydectin®). A pesagem dos animais foi repetida a cada 14 dias e o exame clínico foi realizado diariamente.

3.2.2. Irradiação do veneno

Após o procedimento de extração, o veneno de *Crotalus durissus terrificus* foi liofilizado e mantido em freezer a -20°C. Parte deste foi submetido à radiação gama por meio de uma fonte de ^{60}Co (Gama Cell 220, Atomic Energy Agency of Canadá), disponível no Centro de Tecnologia das Radiações do Departamento de Aplicações de Técnicas Nucleares do Instituto de Pesquisa Energéticas e Nucleares – IPEN/CNEN-SP, localizado no Campus da Universidade de São Paulo – USP. As alíquotas liofilizadas foram diluídas com solução salina e submetidas à fonte de ^{60}Co , com uma taxa de dose de 5,25 KGy/h, em uma dose de 2.000 Gy e concentração de 2 mg/mL. A irradiação das amostras ocorreu sempre na presença de oxigênio, à temperatura ambiente e de forma homogênea e ininterrupta (39).

3.2.3. Coleta do material

3.2.3.1. Fezes

Foram coletadas amostras de fezes da ampola retal de todos os ovinos com o uso de luvas de procedimento. O material coletado foi armazenado em caixa isotérmica e enviado ao Laboratório de Análises Clínicas da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da UNESP – FMVZ, Campus de Botucatu, para a realização do exame parasitológico avaliando-se ovos por grama de fezes (OPG).

3.2.3.2. Sangue

Foram colhidas amostras individuais de sangue de todos os animais 14 dias após cada inoculação, por meio de punção da veia jugular com seringa plástica descartável de 20mL e agulha hipodérmica (0,7X25mm). O material foi acondicionado em tubo Falcon, sem anticoagulante, e levado diretamente para o Laboratório de Pesquisa da Área de Doenças Tropicais da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP, para centrifugação a 4500 rpm durante 15 minutos. O soro obtido das amostras foi armazenado em freezer -20°C em tubos eppendorf de 1mL para posterior análise pela técnica de ensaio imunoenzimático (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay - ELISA).

3.2.4. Protocolo de hiperimunização

No processo de hiperimunização, cada animal recebeu, em cinco momentos diferentes com intervalos de 14 dias, 1mL de uma solução de inóculo aplicada bilateralmente por via subcutânea, na porção da tábua do pescoço, sendo 0,5mL do lado esquerdo e 0,5mL do lado direito, com o uso de seringa plástica descartável de 1mL e agulha hipodérmica estéril (0,45x13mm). Esta solução de inóculo era composta de veneno diluído em solução salina, associado a um adjuvante, de acordo com os diferentes grupos e protocolos de hiperimunização, como demonstra a tabela 1 a seguir:

Tabela 1: Protocolo de hiperimunização utilizado para cada animal pertencente aos grupos um (G1), dois (G2), três (G3) e quatro (G4), nos dias um, 14, 28, 42 e 56 de inoculação.

Grupos		Momentos				
		M0 Dia 1	M1 Dia 14	M2 Dia 28	M3 Dia 42	M4 Dia 56
Quantidades de veneno e adjuvantes empregados						
1	Veneno Nativo	0,5mg + AIF	1,0mg + Al(OH) ₃	1,0mg + Al(OH) ₃	2,0mg + SS	2,0mg + SS
2		0,5mg + SBA-15	1,0mg C.d.t. + SBA-15	1,0mg C.d.t. + SBA-15	2,0mg + SS	2,0mg + SS
3	Veneno Irradiado	0,5mg + AIF	1,0mg + Al(OH) ₃	1,0mg + Al(OH) ₃	2,0mg + SS	2,0mg + SS
4		0,5mg + SBA-15	1,0mg C.d.t. + SBA-15	1,0mg C.d.t. + SBA-15	2,0mg + SS	2,0mg + SS

AIF = Adjuvante incompleto de Freund; Al(OH)₃ = Hidróxido de alumínio; SBA-15 = Sílica nanoestruturada SBA-15; SS = Solução salina

No dia um, para a inoculação dos animais pertencentes ao primeiro grupo (G1), foi utilizada uma solução de inóculo contendo 3,0 mg de veneno nativo diluídos em 3 mL de solução salina adicionada à 3mL de adjuvante incompleto de Freund, sendo inoculado 1 mL por animal, o que equivale a 0,5 mg de veneno. Para o segundo grupo (G2), foi utilizada uma solução de inóculo contendo 3,0 mg de veneno nativo diluídos em 3 mL de solução salina adicionada à 75 mg de sílica nanoestruturada SBA-15 diluídas em 3 mL de solução salina, sendo inoculado 1 mL por animal, o que equivale a 0,5 mg de veneno. Para o terceiro grupo (G3) foi utilizada uma solução de inóculo contendo 1,5 mL de solução de veneno irradiado com ⁶⁰Co previamente preparada na proporção de 2 mg/mL, diluída em 1,5 mL de solução salina adicionada à 3 mL de Adjuvante Incompleto de Freund, sendo inoculado 1mL por animal, o que equivale a 0,5 mg de veneno. Para o quarto grupo (G4) foi utilizada uma solução de inóculo contendo 1,5 mL de solução de veneno irradiado com ⁶⁰Co previamente preparada na proporção de 2 mg/mL, diluída em 1,5 mL de solução salina adicionada à 75 mg de sílica nanoestruturada

SBA-15 diluídas em 3 mL de solução salina, sendo inoculado 1 mL por animal, o que equivale a 0,5mg de veneno.

Nos dias 14 e 28, as doses foram de 1,0 mg de veneno nativo para os grupos um (G1) e dois (G2) e 1,0 mg de veneno irradiado para os grupos três (G3) e quatro (G4). Em relação aos adjuvantes, nesse mesmo momento, os grupos dois (G2) e quatro (G4) tiveram suas doses dobradas, uma vez que a sílica nanoestruturada SBA-15 segue uma razão de 1:25.

Nos dias 42 e 56, as doses de venenos nativo e irradiado foram aumentadas para 2,0 mg, sem a associação de adjuvantes.

3.2.5. Exames laboratoriais

3.2.5.1. Exame parasitológico

Os exames das fezes coletadas foram realizados por meio da técnica McMaster (40), que permite a identificação e contagem de ovos por grama de fezes (OPG) de ruminantes.

3.2.5.2. Titulação de anticorpos pelo método do ensaio imunoenzimático (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay - ELISA)

A – Reagentes

- a) Placas de microtitulação de 96 poços
- b) Tampão carbonato/bicarbonato de sódio 0,05 M pH 9,6
- c) Solução salina, contendo 0,05% de Tween 20[®]
- d) Leite em pó desnatado (Molico[®]) a 5%
- e) Soro IgG de burro anti-IgG de carneiro, conjugado com peroxidase (SIGMA[®])
- f) Orto fenilenodiamina
- g) Água oxigenada
- h) Tampão citrato/fosfato 0,05M pH 5,0

i) Ácido cítrico 0,2M

B – Técnica

Foram sensibilizadas, durante 12 horas a 4°C, em câmara úmida, placas plásticas de fundo chato para microtitulação de 96 poços, com 100 µL por poço de uma solução de antígeno a 10 µg/mL (1µg/poço), diluídos em tampão carbonato/bicarbonato de sódio 0,05M e pH 9,6. A placa foi lavada quatro vezes com solução salina 0,15M contendo 0,05% de Tween 20[®]. Foram aplicados 200µL por poço de solução de bloqueio (5g de Molico[®] q.s.p. 100mL de PBS) e deixado por uma hora a 37°C, em câmara úmida.

Foram aplicados nos poços 100 µL de soro de ovinos proveniente do processo de hiperimunização, diluídos a partir de 1/100 até 1/102.400 em solução de bloqueio e aplicadas na placa, em duplicata.

Após a incubação por uma hora a 37°C, em câmara úmida, as placas foram lavadas quatro vezes com PBST 0,15M e iniciou-se a revelação com adição de 100 µL por poço de soro de burro anti-IgG de carneiro conjugado com peroxidase (SIGMA[®]), diluído 1/2000 da fração aliquoteada em solução de bloqueio. Após a incubação durante uma hora a 37°C, em câmara úmida, as placas foram lavadas quatro vezes com PBST 0,15M.

Para revelar a reação, foram aplicados 100µL de uma solução de OPD (O-phenylenediamine) 0,5 mg/mL e H₂O₂ (30%) 0,5mg/mL em tampão citrato de sódio/ácido cítrico (0,05M e pH5,0). As placas foram mantidas durante 20 minutos, em câmara escura e temperatura ambiente. A reação foi interrompida com a adição de 50 µL (por poço) de ácido cítrico 0,2M.

A leitura das placas foi feita em leitor automático de microplaca utilizando-se filtro de comprimento de onda de 450nm.

Todas as amostras de soro foram testadas em duplicata.

3.2.6. Avaliação do crescimento e ganho de peso dos animais

Todos os animais foram pesados a cada 14 dias, em cinco momentos diferentes, no intuito de se determinar a interferência do processo de hiperimunização dos ovinos no desenvolvimento dos animais.

3.2.7. Abate dos animais e inspeção sanitária

Após a realização do processo de hiperimunização, os ovinos foram ainda mantidos nas baias em observação durante o período de um mês. Ao término deste, foram transportados ao frigorífico Frigor®, situado no município de Lençóis Paulista, com o apoio da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da UNESP – FMVZ, Campus de Botucatu, onde permaneceram em descanso e dieta hídrica durante 24 horas. Após esse período, os animais foram abatidos conforme as normas e técnicas do Serviço de Inspeção Federal (SIF). A seguir as carcaças foram avaliadas pelos agentes de inspeção do frigorífico.

3.2.8. Exame histológico de rim

Após o abate, foram coletados fragmentos de rins de dois animais de cada grupo selecionados aleatoriamente para análise histológica. As amostras coletadas foram armazenadas em tubo coletor em formol 10% e enviadas ao Serviço de Patologia Veterinária, do Departamento de Clínica Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da UNESP – FMVZ, Campus de Botucatu, para posterior análise.

A seguir, os fragmentos dos rins coletados dos ovinos foram fixados em solução de formalina tamponada a 10%, pH 7,0 por 24 a 48 horas e lavadas em água corrente por uma hora. As amostras foram submetidas ao processamento histológico de rotina e incluídas em parafina. Os cortes obtidos em micrótomo rotativo possuíam espessura de três micrômetros (μm). Estes cortes foram corados pelo método de Hematoxilina e Eosina – HE e a seguir examinados (41).

3.2.9. Determinação da atividade tóxica do veneno crotálico

A determinação da atividade tóxica do veneno utilizado foi realizada pelo cálculo da dose letal capaz de levar a óbito 50% dos animais do experimento (DL₅₀).

Para tal, foram utilizados 50 camundongos Swiss machos e fêmeas, com pesos entre 18 e 22 gramas, divididos em cinco grupos contendo 10 animais cada, mantidos em caixas de polipropileno forradas com maravalha de pinho, com alimentação e água ad libitum.

Foram inoculados 500µL por animal, via intra peritoneal, de uma solução composta de veneno de *Crotalus durissus terrificus* nativo e solução salina a 85%. A razão da variação das quantidades de veneno entre os cinco grupos foi de 1.2, como mostra a tabela 2 (42).

Tabela 2: Quantidades de veneno de *Crotalus durissus terrificus* nativo diluídos em solução salina a 0,85%, inoculados individualmente pela via intraperitoneal em camundongos.

Grupos	Número de animais por grupo	µg de veneno por animal	Volume (mL) de veneno a 0,1mg/mL/animal
1	10	1,388	0,01388
2	10	1,666	0,01666
3	10	2	0,02
4	10	2,4	0,024
5	10	2,88	0,0288

Após a inoculação, os animais foram mantidos em observação. Os óbitos ocorridos foram registrados após 48 horas.

3.2.10. Avaliação da capacidade de neutralização

Para determinar a dose neutralizante do soro, dose efetiva 50% (DE₅₀), capaz de neutralizar 50% dos animais utilizados no teste, foi realizado o método

de soroneutralização “in vitro”, onde cada mililitro de soro a ser testado deve ser capaz de neutralizar cinco doses letais 50% (DL₅₀) (43,44).

Para a realização do cálculo da DE₅₀ foi utilizada a seguinte fórmula:

$$P = \frac{TV - 1 \times DL_{50}}{DE_{50}}$$

Onde:

P = Potência da amostra em mg/mL

TV = número de DL₅₀ por camundongo utilizado na prova

DL₅₀ = dose letal 50% calculada

Para tal, foram utilizados 200 camundongos Swiss, machos e fêmeas, com pesos variando entre 18 e 22 gramas, divididos em cinco grupos contendo 10 animais cada para cada grupo de soros testados, mantidos em caixas de polipropileno forradas com maravalha de pinho, com alimentação e água ad libitum.

Cada animal recebeu 500µL, por via intraperitoneal, de uma solução contendo um “pool” dos soros dos animais referentes a cada grupo, no momento de maior titulação detectado pelo teste de ELISA, associado à cinco doses letais 50% de veneno crotálico.

Após a inoculação, os animais foram mantidos em observação. Os óbitos ocorridos foram registrados após 48 horas.

3.2.11. Análise estatística

Para analisar os resultados referentes às titulações de cada grupo obtidas em diferentes momentos e diluições foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis, aplicado para amostras dependentes. A comparação entre os momentos de observação da leitura de densidade óptica foi obtida por meio dos intervalos de 93,6% de confiança.

Foi feita a comparação entre grupos por diluição por meio da análise dos intervalos de confiança para a densidade óptica mediana no momento quatro (M4) de observação.

O teste de Friedman foi empregado para comparar diluições no quarto momento de observação em relação aos valores de densidade óptica, seguido da análise dos intervalos de confiança para a densidade óptica mediana.

Para comparar os grupos em relação ao ganho de peso foram utilizadas a média e o desvio padrão.

A determinação da atividade tóxica do veneno de *Crotalus durissus terrificus* e a avaliação da capacidade de neutralização dos soros foram realizadas pelo teste de Probit (42).

4. RESULTADOS

4.1. Exame parasitológico

O exame parasitológico foi realizado antes do início do experimento e demonstrou que, do total de 24 animais avaliados, apenas cinco – 25 e 26 (G2) com níveis regular e raro, respectivamente, 29 e 30 (G3) e 39 (G4) com níveis raros – apresentaram oocistos de *Eimeria* sp nas fezes. Nenhum outro parasita foi identificado nas amostras coletadas.

Apesar dos resultados obtidos no exame parasitológico, optou-se pela vermifugação de todos os animais em dose única de 0,5 mL/25Kg, com vermífugo Moxidectina à 1% (Cydectin®). Garantiu-se dessa maneira que nenhum deles pudesse sofrer interferência em seu perfil imunológico decorrente de parasitismo.

4.2. Avaliação do título de anticorpos

O título de anticorpos produzidos nos grupos testados foi avaliado a cada 14 dias pelo método de Ensaio Imunoenzimático Indireto – ELISA.

Os valores das medianas da produção de anticorpos demonstrada pela leitura de densidades ópticas (450nm) resultantes das inoculações com veneno de *Crotalus durissus terrificus* nativo e irradiado com ^{60}Co associados ao adjuvante incompleto de Freund, hidróxido de alumínio e sílica nanoestruturada SBA-15, conforme protocolo determinado para cada grupo, estão descritos na tabela 3 a 6, para diluições de 1:100, 1:200, 1:400, 1:800 nos momentos M1 (dia 14), M2 (dia 28), M3 (dia 42), M4 (dia 56) e M5 (dia 70) de observação.

Nas figuras 1 a 4 estão representados graficamente os valores das medianas das densidades ópticas resultantes das inoculações com veneno de *Crotalus durissus terrificus* nativo e irradiado com ^{60}Co associados ao adjuvante incompleto de Freund, hidróxido de alumínio e sílica nanoestruturada SBA-15, conforme protocolo determinado para cada grupo para diluições de 1:100, 1:200, 1:400, 1:800 momentos M1 (dia 14), M2 (dia 28), M3 (dia 42), M4 (dia 56) e M5 (dia 70) de observação.

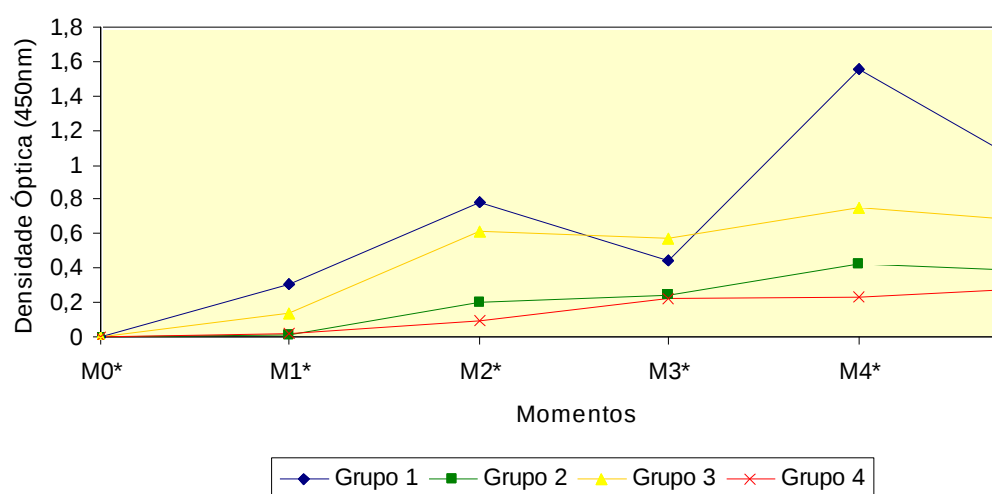
Tabela 3: Distribuição dos valores da mediana da produção de anticorpos demonstrados óptica (450nm) por grupo nos momentos M1, M2, M3, M4,e M5 de observação na diluição 1:10

Grupos	Valores da medianas (intervalo de confiança mínimo - máximo)				
	M1	M2	M3	M4	M5
1	0,304 (0,294 - 0,476)	0,780(0,643 - 0,887)	0,442(0,379 - 0,651)	1,555 (1,363 - 1,600)	0,937 (0,765 -
2	0,006 (0,003 - 0,011)	0,203(0,123 - 0,499)	0,245(0,166 - 0,365)	0,423 (0,332 - 1,106)	0,380 (0,190 -
3	0,137 (0,063 - 0,318)	0,616(0,422 - 0,834)	0,572(0,495 - 0,691)	0,751 (0,662 - 1,042)	0,672 (0,476 -
4	0,016 (0,004 - 0, 041)	0,095(0,073 - 0,256)	0,218(0,096 - 0,900)	0,237 (0,110 – 0,454)	0,287 (0,117 -

M1 = dia 14, M2 = dia 28, M3 = dia 42, M4 = dia 56 e M5 = dia 70.

1 - Kruskal-Walis aplicado para amostras dependentes.

2- Obtidas pela comparação entre intervalos de 93,6% de confiança para os valores medianos das densidades ópticas entre os



M0= dia 1, M1 = dia 14, M2 = dia 28, M3 = dia 42, M4 = dia 56 e M5 = dia 70.

Figura 1: Apresentação dos valores da mediana da produção de anticorpos demonstrados óptica (450nm) dos grupos avaliados nos momentos M0, M1, M2, M3, M4 e M5 de observação

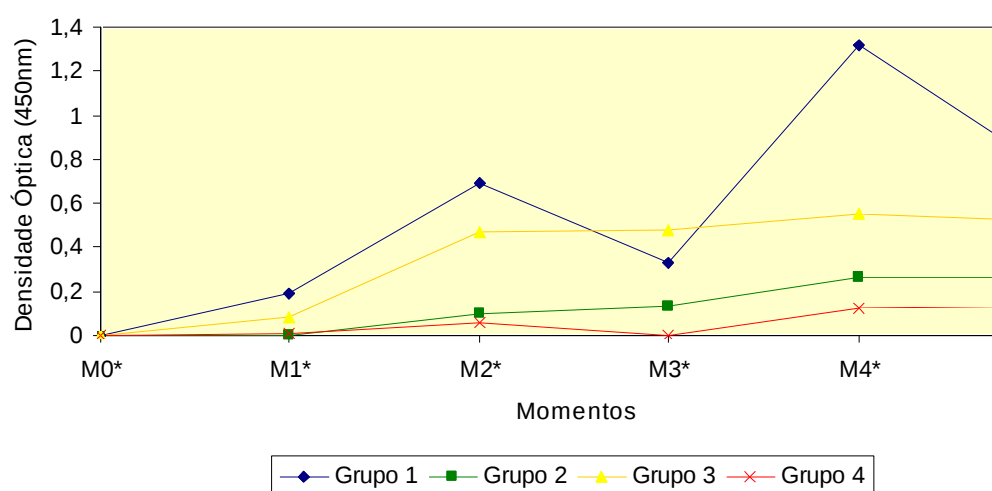
Tabela 4: Distribuição dos valores da mediana da produção de anticorpos demonstrados óptica (450nm) por grupo nos momentos M1, M2, M3, M4,e M5 de observação na diluição 1:20

Grupos	Valores da medianas (intervalo de confiança mínimo - máximo)				
	M1	M2	M3	M4	M5
1	0,190 (0,182 - 0,326)	0,692 (0,584 - 0,772)	0,334 (0,267 - 0,514)	1,317 (1,094 - 1,496)	0,754 (0,630 -
2	0,003 (0,000 - 0,005)	0,096 (0,060 - 0,282)	0,130 (0,102 - 0,273)	0,261 (0,182 - 0,794)	0,264 (0,117 -
3	0,083 (0,035 - 0,268)	0,471 (0,311 - 0,732)	0,482 (0,404 - 0,583)	0,551 (0,477 - 0,900)	0,515 (0,342 -
4	0,011 (0,003 - 0, 027)	0,061 (0,031 - 0,179)	0,003 (0,000 - 0,098)	0,121 (0,039 - 0,279)	0,130 (0,065 -

M1 = dia 14, M2 = dia 28, M3 = dia 42, M4 = dia 56 e M5 = dia 70.

1 - Kruskal-Walis aplicado para amostras dependentes.

2- Obtidas pela comparação entre intervalos de 93,6% de confiança para os valores medianos das densidades ópticas entre os



M0 = dia 1, M1 = dia 14, M2 = dia 28, M3 = dia 42, M4 = dia 56 e M5 = dia 70. * Inoculação.

Figura 2: Apresentação dos valores da mediana da produção de anticorpos demonstrados óptica (450nm) dos grupos avaliados nos momentos M0, M1, M2, M3, M4 e M5 de observação

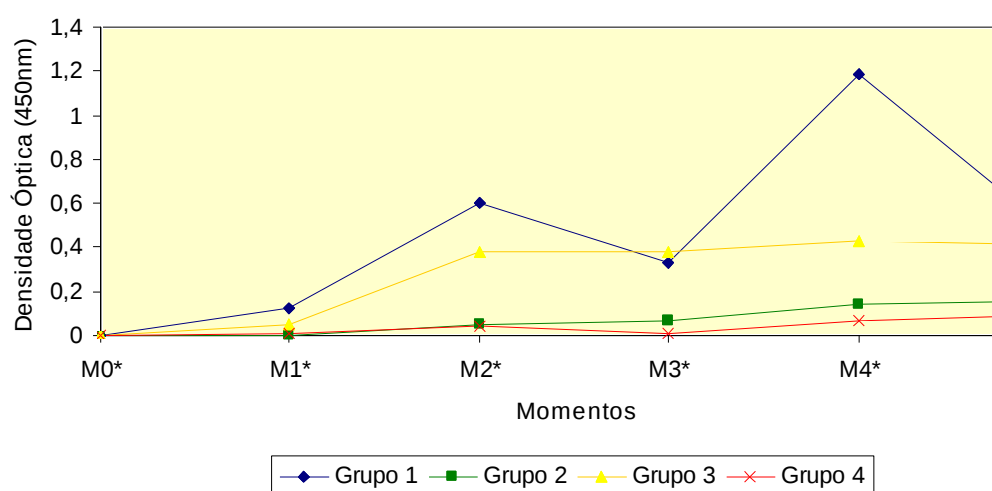
Tabela 5: Distribuição dos valores da mediana da produção de anticorpos demonstrados óptica (450nm) por grupo nos momentos M1, M2, M3, M4,e M5 de observação na diluição 1:40

Valores da medianas (intervalo de confiança mínimo - máximo)					
Grupos	M1	M2	M3	M4	M5
1	0,120 (0,101 - 0,263)	0,605 (0,496 - 0,733)	0,239 (0,211 - 0,502)	1,185 (0,994 - 1,266)	0,489 (0,387 -
2	0,002 (0,001 - 0,004)	0,051 (0,034 - 0,165)	0,065 (0,053 - 0,202)	0,141 (0,100 - 0,433)	0,153 (0,074 -
3	0,049 (0,019 - 0,234)	0,376 (0,234 - 0,665)	0,379 (0,289 - 0,491)	0,432 (0,319 - 0,799)	0,414 (0,208 -
4	0,006 (0,000 - 0,015)	0,039 (0,011 - 0,116)	0,005 (0,000 - 0,074)	0,068 (0,026 - 0,177)	0,091 (0,029 -

M1 = dia 14, M2 = dia 28, M3 = dia 42, M4 = dia 56 e M5 = dia 70.

1 - Kruskal-Walis aplicado para amostras dependentes.

2- Obtidas pela comparação entre intervalos de 93,6% de confiança para os valores medianos das densidades ópticas entre os



M0 = dia 1, M1 = dia 14, M2 = dia 28, M3 = dia 42, M4 = dia 56 e M5 = dia 70. *Inoculação.

Figura 3: Apresentação dos valores da mediana da produção de anticorpos demonstrados óptica (450nm) dos grupos avaliados nos momentos M0, M1, M2, M3, M4 e M5 de observação

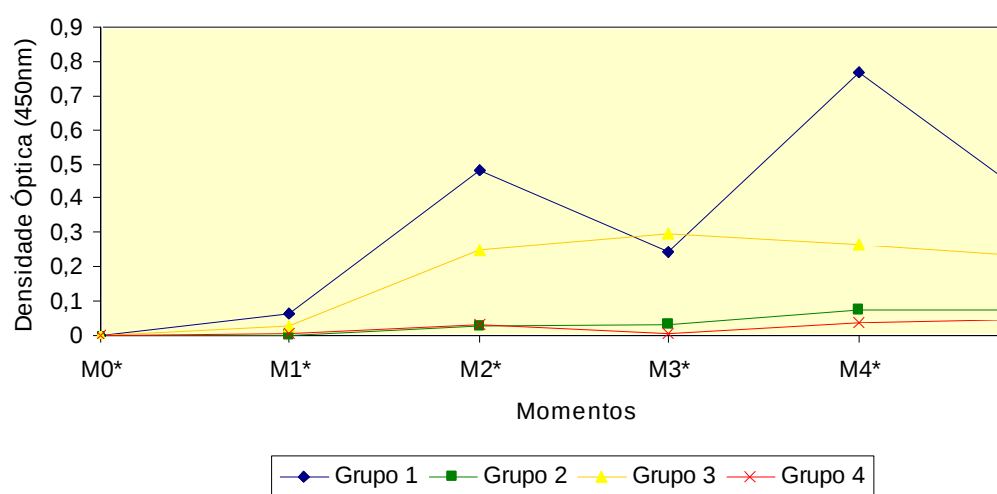
Tabela 6: Distribuição dos valores da mediana da produção de anticorpos demonstrados óptica (450nm) por grupo nos momentos M1, M2, M3, M4,e M5 de observação na diluição 1:80

Valores da medianas (intervalo de confiança mínimo - máximo)					
Grupos	M1	M2	M3	M4	M5
1	0,065 (0,055 - 0,158)	0,482 (0,400 - 0,615)	0,241 (0,163 - 0,419)	0,768 (0,629 - 1,025)	0,365 (0,259 -
2	0,001 (0,000 - 0,004)	0,027 (0,018 - 0,090)	0,034 (0,018 - 0,103)	0,073 (0,050 - 0,222)	0,074 (0,039 -
3	0,029 (0,015 - 0,118)	0,248 (0,195 - 0,469)	0,298 (0,180 - 0,382)	0,267 (0,198 - 0,659)	0,230 (0,118 -
4	0,008 (0,002 - 0,010)	0,032 (0,002 - 0,090)	0,004 (0,001 - 0,050)	0,038 (0,023 - 0,093)	0,046 (0,012 -

M1 = dia 14, M2 = dia 28, M3 = dia 42, M4 = dia 56 e M5 = dia 70.

1 - Kruskal-Walis aplicado para amostras dependentes.

2- Obtidas pela comparação entre intervalos de 93,6% de confiança para os valores medianos das densidades ópticas entre os



M0 = dia 1, M1 = dia 14, M2 = dia 28, M3 = dia 42, M4 = dia 56 e M5 = dia 70. *Inoculação.

Figura 4: Apresentação dos valores da mediana da produção de anticorpos demonstrados óptica (450nm) dos grupos avaliados nos momentos M0, M1, M2, M3, M4 e M5 de observação

Os valores das medianas e quartis da produção de anticorpos demonstrados pela leitura de densidade óptica (450nm), referentes às diluições de 1:1600, 1:3200, 1:6400, 1:12800, 1:25600, 1:51200 e 1:102400, estão descritos no apêndice.

Após a avaliação dos títulos de anticorpos ao longo do tempo de estudo, verificou-se que o momento quatro (M4) de observação apresentou os maiores títulos nos quatro grupos avaliados para as diluições 1:100, 1:200, 1:400, e 1:800 (M4>M1, M2, M3 e M5 com intervalo de 93,6% de confiança).

Na tabela 7 estão descritas as comparações entre os grupos nas diluições de 1:100, 1:200, 1:400 e 1:800 no momento quatro (M4) de observação.

Tabela 7: Intervalos de confiança para os valores das medianas da produção de anticorpos obtidos em cada diluição no momento quatro (M4) de observação.

Diluição	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4	Comparações (&)
1:100	(1,36 – 1,60)	(0,33 – 1,10)	(0,66 – 1,04)	(0,11 – 0,45)	G1>G2,G3,G4 G3>G4
1:200	(1,09 – 1,46)	(0,18 – 0,79)	(0,47 – 0,90)	(0,03 – 0,27)	G1>G2,G3,G4 G3>G4
1:400	(0,99 – 1,26)	(0,10 – 0,43)	(0,31 – 0,79)	(0,02 – 0,17)	G1>G2,G3,G4 G3>G4
1:800	(0,62 – 1,02)	(0,05 – 0,22)	(0,19 – 0,65)	(0,02 – 0,09)	G1>G2,G3,G4 G3>G4

(&) Feitas utilizando intervalos de confiança de 93,8% para G1 e G2 e 96,9% para G3 e G4.

Os resultados da tabela 7 demonstram que houve diferença estatística significativa entre os grupos no momento quatro (M4) de observação, sendo G1>G2, G3 e G4 e G3>G4 nas diluições de 1:100, 1:200, 1:400 e 1:800.

A tabela 8 descreve a comparação entre as diluições em relação aos valores dos títulos obtidos no momento quatro (M4).

Tabela 8: Comparação entre diluições em relação aos valores da mediana da produção de anticorpos obtidos no momento quatro de observação.

	Diluição				p ^(*)
	1:100	1:200	1:400	1:800	
Título	(1,36 – 1,60) _a	(1,09 – 1,46) _{ab}	(0,99 – 1,26) _b	(0,62 – 1,02)	< 0,0001

(*) Teste de Friedman. Intervalos de confiança para o valor mediano dos títulos a 93,8% de confiança. As letras iguais indicam diferenças não significativas pela comparação dos intervalos de confiança dos títulos medianos entre as diluições.

A tabela 8 demonstra estatisticamente que:

- a diluição de 1:100 apresenta igualdade quando comparada com a diluição de 1:200 e diferença quando comparada com as diluições de 1:400 e 1:800;
- a diluição de 1:200 apresenta igualdade quando comparada com a diluição de 1:400 e diferença quando comparada com a diluição de 1:800;
- a diluição de 1:400 apresenta diferença quando comparada com a diluição de 1:800.

4.3. Avaliação do crescimento e ganho de peso dos animais

Os pesos obtidos ao nascimento, ao desmame e nos cinco momentos de observação durante o processo de hiperimunização dos ovinos estão descritos na tabela 9.

Tabela 9: Descrição dos pesos em quilogramas (Kg) dos animais obtidos no nascimento, ao desmame e nos cinco momentos de observação durante o processo de hiperimunização.

	Animal	PN	PD	M1	M2	M3	M4	M5
Grupo 1	17	5	19,9	24,7	27,1	33,2	38,6	42,7
	18	3	17,4	18,05	-	-	-	-
	19	5	17,8	20	22	24	28,3	30
	20	4	15,8	19,5	21,75	23	28,9	30
	21	4,3	18,2	21,9	22,5	24,8	28,6	31
	22	3,9	16	18,95	21	26,1	30,5	31,6
Grupo 2	23	4,6	18,5	20	22,2	27,5	21,5	34
	24	3,8	14,9	18,65	21,7	-	-	-
	25	3	14	18	20,7	25,3	30	32,5
	26	5	15,8	21,6	21,5	23,9	27	30
	27	3,2	14,7	18,9	19,8	22,1	24,2	29,8
	28	4,5	18,5	20,2	22,2	27,6	31,3	32
Grupo 3	29	3,6	14,8	18,4	19	20,05	24,2	22,2
	30	4,5	16,5	22,55	23,35	27,2	32	33
	31	4,6	19	20,9	21,5	29,65	29	30,05
	32	5	18,9	18,6	21,6	25,5	30,3	30,1
	33	5	16,6	21	21,6	27,5	30,2	31,5
	34	3,5	13,8	18,65	19,8	22,6	26,5	30
Grupo 4	35	5	16,7	18,85	20	25,2	30,2	30,1
	36	5	16,5	23,5	25	29,8	33,5	34,6
	37	2,7	15,4	18,65	20	22,6	24,5	25
	38	5,5	19,8	22,6	23,1	29,5	28,4	30
	39	5	18	20,65	21,5	25,7	30,1	31
	40	5	13,2	18,4	20	23	27,7	30

PN: Peso ao nascimento; PD: Peso ao desmame; M1: dia 14; M2: dia 28; M3: dia 42; M4: dia 56; M5: dia 70. Os animais 18 e 24 vieram a óbito nos momentos dois e três, respectivamente.

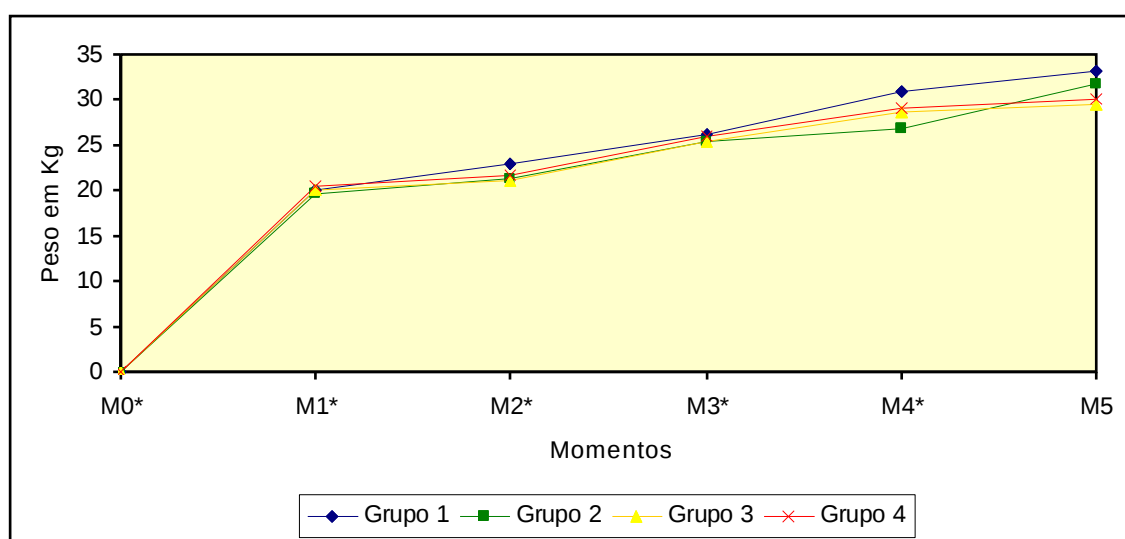
Na tabela 10 estão descritos os valores das médias referentes ao ganho de peso dos grupos nos cinco momentos de observação durante a realização do experimento.

Tabela 10: Valores das médias dos pesos em quilogramas (Kg) dos animais de cada grupo nos momentos M1, M2, M3, M4 e M5 de observação e média do ganho de peso dos animais.

Grupos	M1	M2	M3	M4	M5	Média de ganho de peso	Desvio Padrão
1	20,01	22,87	26,22	30,98	33,06	12,05	± 3,57
2	19,74	21,28	25,28	26,8	31,68	11,92	± 2,47
3	20,01	21,14	25,41	28,7	29,47	9,45	± 2,89
4	20,44	21,6	25,96	29,06	30,11	9,67	± 2,23

M1 = dia 14, M2 = dia 28, M3 = dia 42, M4 = dia 56 e M5 = dia 70.

Na figura 05 estão representados graficamente os valores medianos referentes ao ganho de peso dos grupos nos cinco momentos de observação durante a realização do experimento.



M0 = dia 1, M1 = dia 14, M2 = dia 28, M3 = dia 42, M4 = 56 e M5 = dia 70.

Figura 05: Média dos pesos dos animais de cada grupo referente aos cinco momentos de observação.

A tabela 10 demonstra que não houve diferença estatística entre os grupos, quando comparados em relação ao ganho de peso médio dos animais de cada grupo.

4.4. Inspeção sanitária e análise de carcaças

Os animais foram abatidos conforme a legislação do Serviço de Inspeção Federal (SIF) e avaliados pelos agentes de inspeção do frigorífico. Nenhum animal apresentou lesão característica de envenenamento crotálico. Após análise macroscópica das carcaças, as mesmas foram pesadas e armazenadas em câmara fria a -10°C. Todas as carcaças obtiveram um carimbo de aprovação para consumo.



Figura 13: Armazenamento das carcaças em câmara fria para obtenção do carimbo “inspecionado”.



Figura 14: Demonstração da carcaça com o carimbo de aprovação para consumo.

4.5. Exame histológico dos rins

Os fragmentos de rins coletados dos oito animais durante o abate foram analisados em relação às alterações macroscópicas e depois avaliados pelo exame histológico.

Os resultados referentes aos achados macroscópicos estão descritos na tabela 21:

Tabela 21: Descrição dos achados macroscópicos das amostras de rins coletadas dos ovinos.

Grupos	Animal	Achados Macroscópicos
1	19	Área focal de coloração amarelada em superfície cortical subcapsular
	20	Sem alterações dignas de nota
2	23	Sem alterações dignas de nota
	28	Sem alterações dignas de nota
3	31	Sem alterações dignas de nota
	33	Sem alterações dignas de nota
4	37	Sem alterações dignas de nota
	38	Sem alterações dignas de nota

Os achados microscópicos referentes ao animal 19 (G1) demonstraram microabscessos, hemorragia focal e edema intersticiais no corte histológico de rim. O epitélio da região da pelve apresentou descamação intensa associado a infiltrado leucocitário intersticial difuso subepitelial composto por neutrófilos e raros linfócitos. Estes achados sugerem o quadro de pielonefrite aguda supurativa. Nos cortes histológicos dos animais 20 (G1), 23 (G2) 28 (G2), 31 (G3), 33 (G3), 37 (G4) e 38 (G4) foram notados restos celulares, neutrófilos e cilindros granulosos no interior dos túbulos. Observou-se ainda hemorragia focal e edemas intersticiais acentuados. O epitélio da região da pelve apresentou descamação difusa, achados estes característicos de pielonefrite aguda.

Os resultados encontrados por meio do exame histológico não são compatíveis com as alterações renais decorrentes da ação do veneno crotálico.

4.6. Determinação da atividade tóxica do veneno crotálico

A taxa de mortalidade dos cinco grupos inoculados com a solução de veneno nativo de *Crotalus durissus terrificus* foi registrada após o período de 48 horas. O número de camundongos vivos e mortos está descrito na tabela 22.

Tabela 22: Determinação da atividade tóxica do veneno nativo de *Crotalus durissus terrificus* inoculado em camundongos por via intraperitoneal nas concentrações variáveis de veneno por grupo.

Grupo	Número de camundongos por grupo	µg de veneno por animal	Vivos/Óbitos 48 horas
1	10	1,388	6/4
2	10	1,666	3/7
3	10	2	3/7
4	10	2,4	2/8
5	10	2,88	1/9

A determinação da atividade tóxica da peçonha de *Crotalus durissus terrificus* foi realizada pelo teste de Probit, onde a dose letal capaz de levar a óbito 50% dos animais utilizados no experimento foi de 0,073 µg/g de camundongo (42).

4.7. Avaliação da capacidade de neutralização

Após a determinação da atividade tóxica do veneno de *Crotalus durissus terrificus*, foi aplicada a fórmula para a realização do cálculo da DE₅₀, sendo:

$$DE_{50} = \frac{5 - 1 \times 1,46}{0,6}$$

$$DE_{50} = 9,73 \mu L$$

Após a determinação da DE₅₀, foram calculadas, na razão de 1.2, as quantidades de soros referentes aos quatro grupos de ovinos hiperimunizados, como demonstra a tabela 23.

Tabela 23: Quantidades de soros utilizados na razão de 1.2 a partir da DE₅₀ calculada.

Grupo	Número de animais por grupo	Veneno em mL a 0,1mg/mL	µL de soro por animal	mL de soro 1/10
1	10	0,073	6,75	0,0675
2	10	0,073	8,10	0,0810
3	10	0,073	9,73	0,0973
4	10	0,073	11,67	0,01167
5	10	0,073	14,01	0,01401

Após a inoculação, os óbitos ocorridos foram registrados em 48 horas. O número de óbitos referentes a grupo de camundongos e os respectivos soros analisados estão descritos nas tabelas 24 a 27. Os resultados apresentados foram analisados pelo teste de Probit (42).

Tabela 24: Determinação da capacidade de neutralização do soro obtido de ovinos hiperimunizados com veneno crotálico nativo associado ao adjuvante incompleto de Freund e hidróxido de alumínio, inoculado em camundongos por via intraperitoneal em diferentes concentrações e fixada a concentração de cinco DL₅₀ de veneno nativo.

Grupo	Número de animais por grupo	Vivos/Mortos 48horas
1	10	2/8
2	10	3/7
3	10	2/8
4	10	1/9
5	10	4/6

Tabela 25: Determinação da capacidade de neutralização do soro obtido de ovinos hiperimunizados com veneno crotálico nativo associado à sílica nanoestruturada SBA-15, inoculado em camundongos por via intraperitoneal em diferentes concentrações e fixada a concentração de cinco DL₅₀ de veneno nativo.

Grupo	Número de animais por grupo	Vivos/Mortos 48horas
1	10	1/9
2	10	0/10
3	10	0/10
4	10	0/10
5	10	0/10

Tabela 26: Determinação da capacidade de neutralização do soro obtido de ovinos hiperimunizados com veneno crotálico irradiado associado ao adjuvante incompleto de Freund e hidróxido de alumínio, inoculado em camundongos por via intraperitoneal em diferentes concentrações e fixada a concentração de cinco DL₅₀ de veneno nativo.

Grupo	Número de animais por grupo	Vivos/Mortos 48horas
1	10	1/9
2	10	4/6
3	10	5/5
4	10	2/8
5	10	2/8

Tabela 27: Determinação da capacidade de neutralização do soro obtido de ovinos hiperimunizados com veneno crotálico irradiado associado à sílica nanoestruturada SBA-15, inoculado em camundongos por via intraperitoneal em diferentes concentrações e fixada a concentração de cinco DL₅₀ de veneno nativo.

Grupo	Número de animais por grupo	Venenos DL ₅₀	Vivos/Mortos 48horas
1	10	5	1/10
2	10	5	0/10
3	10	5	0/10
4	10	5	0/10
5	10	5	0/10

Pela análise dos resultados observados nos testes de soroneutralização não foi possível realizar o cálculo da DE₅₀. Porém, pôde-se verificar que a capacidade de neutralização do grupo um (G1) foi maior do que os demais grupos, seguido do grupo três (G3), superior aos grupos dois (G2) e quatro (G4).

4.8. Avaliação clínica dos animais

Durante o desenvolvimento de todo processo de hiperimunização, os animais foram avaliados diariamente, sendo realizadas análises clínicas e laboratoriais mediante sua necessidade.

Apenas um animal (número 21) pertencente ao grupo um apresentou alteração no local da aplicação da solução de inóculo, caracterizada pela formação de um abscesso supurativo. A lesão apareceu cinco dias após a primeira inoculação.



Figura 15: Abscesso supurativo formado cinco dias após o dia um de inoculação, no animal 21 pertencente ao G1, que recebeu 0,5mg de veneno nativo de *Crotalus durissus terrificus* associado ao adjuvante incompleto de Freund.

Para o tratamento da ferida, foi realizada a drenagem e a anti-sepsia do local foi feita diariamente com solução de iodo até sua total cicatrização.

Durante a realização do experimento, 19 dias após o início do processo de hiperimunização dos ovinos e quatro dias após a segunda inoculação (dia 14),

todos os animais apresentaram sintomas de afecção em trato respiratório superior, apresentando tosse e secreção nasal. Os mesmos já haviam recebido duas doses de veneno de *Crotalus durissus terrificus*, sendo elas de 0,5 e 1,0 mg de veneno nativo e irradiado associado a um adjuvante, conforme protocolo de hiperimunização referente a cada grupo. Em função dos sintomas apresentados, todos os animais foram submetidos a um tratamento com o uso do antibiótico Enrofloxacina, na dose de 5 mg/kg, totalizando 1 mL por animal, uma vez ao dia, durante cinco dias, por via subcutânea. Algumas alterações no manejo dos animais também foram realizadas. Após os cinco dias de tratamento, os animais passaram a não apresentar mais os sintomas iniciais.

5. DISCUSSÃO

Peres et al. (45) descreveram um grande aumento no interesse em desenvolver outras fontes produtoras de antivenenos e também de novas técnicas para a identificação do veneno e sua concentração nos fluidos corporais.

Rodriguez et al. (46) utilizando coelhos, produziram anticorpos do tipo IgG contra a ação da fosfolipase A2 de *Crotalus durissus terrificus*, neutralizando a atividade letal do veneno.

Alguns autores citam a não detecção de IgG_T em soros produzidos em ovinos, que por sua vez é produzida em altos níveis nos eqüinos e, apesar de sua alta capacidade protetora, é altamente imunogênica, sendo responsável pelo desenvolvimento de reações de hipersensibilidade (11,47,48).

Netto et al. (49) demonstraram excelentes perspectivas em hiperimunizações utilizando ovinos adultos, de um a dois anos de idade, com veneno de *Crotalus durissus terrificus* nativo e irradiado com ⁶⁰Co para a produção comercial de antivenenos para tratamentos de envenenamentos humanos e animais.

Herrera et al (50) empregaram com sucesso a metodologia de purificação de IgGs em soros produzidos em ovinos e camelos .

Mais recentemente, Ferreira Jr (51) produziu anticorpos em ovinos hiperimunizados com veneno crotálico em sua forma nativa e irradiado com ⁶⁰Co. Estes mostraram-se eficazes na neutralização “in vitro” do veneno nativo de *Crotalus durissus terrificus*. Entretanto, os autores relatam a ocorrência de efeitos adversos nos animais soroprodutores decorrentes do processo de hiperimunização.

Os objetivos do presente trabalho foram definidos no intuito de se avaliar as diferentes respostas imunológicas obtidas mediante aos diferentes adjuvantes e diferentes venenos empregados nos protocolos e a possível interferência destes no crescimento e desenvolvimento dos animais. Para tal, a técnica de ELISA, previamente padronizada, foi utilizada no acompanhamento dos títulos de anticorpos durante todo processo de hiperimunização.

Para assegurar que não houvesse nenhum tipo de interferência no perfil imunológico decorrente de parasitismo, o exame parasitológico e a vermifugação de todos os animais foram realizados antes do início do experimento.

O controle parasitológico é considerado de extrema importância, uma vez que estas verminoses podem se apresentar de forma aguda, levando os animais a óbito, ou de forma crônica, levando a um menor desenvolvimento corporal, perda de peso e redução na produção e qualidade de lã. Os ovinos jovens, após o desmame, são altamente sensíveis às verminoses, onde se observa o maior índice de mortalidade por parasitas gastrointestinais (52).

No acompanhamento do exame de fezes e da sintomatologia característica de parasitismo, em função dos resultados obtidos, a dose única de 0,5mL/25Kg do vermífugo Moxidectina à 1% (Cydectin®) fez-se suficiente dado o tempo de duração do experimento, uma vez que o fármaco utilizado possui uma ação prolongada. Nenhum dos animais apresentou sintomas característicos de parasitismo até o final do experimento. A forma de confinamento, em baias suspensas, também facilitou a higienização e manutenção do recinto, evitando o contato direto com os dejetos, minimizando assim as chances de possíveis reinfestações.

Quanto aos venenos, foram utilizadas peçonhas de *Crotalus durissus terrificus* nativos e irradiados com ^{60}Co .

O veneno de *Crotalus durissus terrificus*, tem um potencial imunogênico relativamente baixo e apresenta uma atividade imunossupressora. Estes tornam o soro anticrotálico inferior quanto à quantidade de anticorpos quando comparados a outros antivenenos (53-55).

Segundo Abib e Laraba-Djebari (56,57), a toxicidade dos venenos deve ser reduzida para que se tenha uma melhor produção de soro e sobrevivência do animal utilizado. No caso, a radiação gama demonstrou-se uma excelente alternativa na destoxificação de venenos.

Rogero e Nascimento (58) também sugerem a radiação gama como ferramenta importante a ser utilizada no processo de imunização para a produção de antivenenos visando o bem estar dos animais soroprodutores.

Clissa et al. (29) consideraram o uso da radiação gama um método adequado para diminuir a toxicidade do veneno crotálico sem alterar o seu potencial imunogênico. Altas doses de 5 e 10KGy destruíram praticamente toda a toxicidade do veneno embora sua imunogenicidade seja mantida nessas condições. Entretanto, demonstraram que as doses de 2kGy foram consideradas as mais adequadas na destoxificação do veneno sem diminuir seu potencial imunogênico.

Esta dose de irradiação também foi sugerida por Heffar-Bennacef e Laraba-Djebari (59), que aplicaram diferentes doses de radiação gama em veneno de *Vipera lebetina*, e apontam que 2kGy pode promover uma destoxificação significativa do veneno mantendo suas propriedades imunológicas intactas.

Nascimento et al. (39) avaliaram o efeito da irradiação ionizante sobre a fração crotoxina do veneno de *Crotalus durissus terrificus* e observaram a formação de agregados protéicos menos tóxicos do que a crotoxina em sua forma nativa.

Souza et al. (60) também analisaram o efeito da radiação gama na atenuação das toxinas de *Bothrops jararacussu*. Tiveram como resultados a diminuição dos efeitos tóxicos do veneno como paralisia e miotoxicidade quando estudados em junções neuromusculares de camundongos, sem que houvesse perda de sua imunogenicidade.

Oussedik-Oumehdi e Laraba-Djebari (61) descrevem a radiação gama como excelente ferramenta na destoxificação de venenos sem alterar o potencial neutralizante dos soros obtidos, uma vez que o processo de hiperimunização é altamente prejudicial para os animais soroprodutores (61).

As doses de 2kGy empregadas no processo de irradiação do veneno de *Crotalus durissus terrificus* utilizado no presente estudo corroboram com as referidas pelos autores. Esta foi capaz de reduzir a toxicidade do veneno sem que houvesse alteração em sua imunogenicidade.

Juntamente a estes fatos, o emprego de adjuvantes associados aos antígenos utilizados na produção de anticorpos em animais permite diminuir ainda mais a quantidade de antígenos a serem inoculados nos animais. Porém, algumas

reações podem ocorrer de acordo com a qualidade, quantidade e local de aplicação do adjuvante utilizado. O adjuvante completo de Freund (ACF), apesar de sua efetividade, pode levar ao aparecimento de granulomas, abscessos e necrose ulcerativa, dependendo do local de aplicação, da qualidade e quantidade da substância utilizada (62).

Alterações locais como edemas, abscessos e fibroses foram verificadas durante o processo de hiperimunização de ovinos, quando o adjuvante completo de Freund foi utilizado. Esse adjuvante é amplamente empregado em processos de hiperimunização nos laboratórios do mundo todo, mesmo sendo extremamente agressivo para o animal soroprodutor (11,36).

Por outro lado, o adjuvante incompleto de Freund possui a mesma composição do adjuvante completo de Freund, sendo um óleo mineral, uma substância surfactante, mas com exceção do *Mycobacterium tuberculosis*. É freqüentemente utilizado em animais que já receberam um antígeno primário associado ao adjuvante completo de Freund, mas pode ser empregado também na primeira inoculação. Possui excelente atividade estimulatória da resposta humoral, porém é considerado menos potente (62).

Os adjuvantes à base de sais de alumínio, como o $\text{Al}(\text{OH})_3$ utilizado no presente trabalho, são considerados menos efetivos do que as emulsões. Entretanto, em função das leves reações inflamatórias, segurança e eficácia na formação de memória celular, são amplamente empregados tanto em humanos como em animais de laboratório (62).

Mercuri et al. avaliaram o emprego da sílica mesoporosa nanoestruturada SBA-15 como veículo carreador de imunógenos e sua capacidade de modular positivamente a resposta imune. Demonstraram que a sílica SBA-15, além de potencializar a produção de anticorpos, foi capaz de modular positivamente a resposta em camundongos Maus respondedores, enquanto que os outros adjuvantes, adjuvante incompleto de Freund e hidróxido de alumínio, não modularam a resposta dos camundongos geneticamente selecionados para a mínima produção de anticorpos (Low) que mantiveram títulos inferiores em relação aos de linhagem máxima (High). Evidenciaram, portanto, o efeito

adjuvante da SBA-15, com a potencialização da imunogenicidade dos antígenos, eficácia na instalação da memória, melhora da resposta de indivíduos maus respondedores e a não apresentação de toxicidade (37).

Com base nessas informações, para a realização deste trabalho, foram delineados quatro protocolos diferentes a fim de se comparar o efeito de cada adjuvante empregado, associados ao veneno de *Crotalus durissus terrificus* nativo e irradiado com ^{60}Co . Foram comparados quanto ao aparecimento de alterações locais resultantes das inoculações e avaliados em relação ao perfil imunológico gerado a partir dos diferentes protocolos de hiperimunização pela técnica de ELISA.

O emprego do adjuvante incompleto de Freund, do hidróxido de alumínio e da sílica nanoestruturada SBA-15 não tiveram como consequência o surgimento de lesões locais características de reações secundárias frente ao uso de adjuvantes, como citado anteriormente.

Clinicamente, a avaliação dos animais demonstrou que apenas um animal apresentou alteração no local da aplicação do inóculo, contendo 0,5mg de veneno nativo de *Crotalus durissus terrificus* associado ao adjuvante incompleto de Freund. Estes dados sugerem que os protocolos empregados não foram nocivos aos animais.

Os animais também não apresentaram nenhuma alteração clínica que pudesse estar relacionada com envenenamento crotálico, demonstrando que as diferentes doses de veneno utilizadas nos cinco momentos de inoculação foram suficientes para gerar a resposta imunológica desejada sem que houvesse prejuízos à saúde dos mesmos.

Lago et al. (63), avaliaram o quadro clínico de bovinos envenenados experimentalmente com veneno de *Crotalus durissus terrificus* na dose de 0,03 mg/kg de peso vivo. Após algumas horas, os animais apresentaram apatia, prostração, letargia e aumento de temperatura, seguido de sialorréia, dispnéia e óbito. Nenhum dos sinais clínicos citados pelos autores foi observado no processo de hiperimunização dos ovinos.

Os ensaios imunoenzimáticos para a detecção de venenos e antivenenos vêm sendo estudados e desenvolvidos para auxiliar no estudo de envenenamentos por animais peçonhentos. A técnica utilizada com maior frequência é a do ensaio imunoenzimático de fase sólida (ELISA) em razão de sua sensibilidade, reprodutibilidade, facilidade de execução e custo não muito elevado (9,64).

Beghini et al. (65) determinaram títulos de anticorpos pela técnica de ELISA durante o processo de hiperimunização em coelhos utilizando veneno de *Crotalus durissus cascavella*. A técnica empregada confirmou a excelente reação do soro produzido contra as frações crotoxina e fosfolipase A₂ (PLA₂), com os maiores títulos sendo obtidos através da utilização de antígenos correspondentes durante o processo de hiperimunização.

Dos-Santos (66) avaliou a eficácia do antiveneno botrópico-crotálico na neutralização das principais atividades do veneno de *Bothrops jararacussu* utilizando a técnica de ELISA.

Barraviera et al. (67) descreveram, com sucesso, o emprego da técnica de ELISA para a detecção sensível e específica tanto para os antígenos como para os anticorpos utilizados na pesquisa.

Ferreira Jr et al., (35) utilizando o ensaio imunoenzimático (ELISA), avaliaram qualitativa e quantitativamente o nível de anticorpos antiveneno de *Crotalus durissus terrificus* irradiado em fonte de ⁶⁰Co produzidos em camundongos. Verificaram que os soros produzidos foram capazes de reconhecer as toxinas nativas.

Peres et al. (46), por meio da técnica de ELISA, determinaram o potencial neutralizante de soro obtido por meio da hiperimunização de ovinos contra o veneno de *Bothrops jararaca*.

Rial et al. (68) consideraram em pesquisa realizada que o teste de ELISA é adequado para o acompanhamento de títulos de anticorpos durante processos de imunização.

No presente estudo, os resultados obtidos por meio da técnica de ELISA corroboram com os dos autores citados, demonstrando a eficiência do ensaio

imunoenzimático na detecção de anticorpos gerados pelo processo de hiperimunização. Ainda, a técnica foi capaz de identificar a diferença nas respostas imunológicas frente aos diferentes períodos de inoculação, os adjuvantes empregados em cada protocolo e o tipo de veneno utilizado, nativo ou irradiado com ^{60}Co . Ressalta-se a necessidade da utilização do veneno de *Crotalus durissus terrificus* em sua forma nativa como antígeno na padronização da técnica de ELISA, uma vez que o soro produzido seja a partir de veneno nativo ou irradiado com ^{60}Co deve ser capaz de neutralizar o veneno nativo.

O valor da mediana da produção de anticorpos demonstrado pela leitura de densidade óptica (450nm) associado aos intervalos de confiança determinados para cada grupo nas diluições de 1:100, 1:200, 1:400 e 1:800 nos cinco momentos de observação demonstraram que o momento quatro (dia 56) apresentou o maior nível de produção de anticorpos quando comparado com os outros momentos ($M_4 > M_1, M_2, M_3, M_5$ com intervalo de 93,6% de confiança). Estas análises não foram aplicadas nas diluições de 1:1600, 1:3200, 1:6400, 1:12800, 1:25600, 1:51200 e 1:102400, pois os valores encontrados foram considerados baixos devido à maior diluição empregada na técnica de ELISA.

Com base nestes resultados, os quatro grupos foram avaliados no momento quatro de observação nas diluições de 1:100, 1:200, 1:400 e 1:800, sendo que a associação entre o veneno nativo de *Crotalus durissus terrificus* com o adjuvante incompleto de Freund e hidróxido de alumínio, protocolo empregado nos animais referentes ao grupo um, apresentou o maior nível de titulação quando comparado com os outros três grupos nas diluições avaliadas.

A comparação das diluições de 1:100, 1:200, 1:400 e 1:800 foi realizada a fim de se determinar uma diferença estatística entre elas. A igualdade estatística apresentada entre as diluições de 1:100 e 1:200 sugere uma possível otimização da produção de antivenenos se a avaliação da capacidade de neutralização desmonstrarem também os mesmos resultados.

As diferenças demonstradas entre os grupos inoculados com veneno nativo e irradiado com ^{60}Co confirmam a eficiência da irradiação gama na atenuação da toxicidade dos venenos. Os grupos três e quatro apresentaram titulações

inferiores aos grupos um e dois quando comparados em relação ao mesmo adjuvante empregado no protocolo de hiperimunização.

Entretanto, a avaliação da capacidade de neutralização do soro torna-se extremamente importante, uma vez que altos títulos de anticorpos verificados no teste de ELISA, não significam que estes possuam alta capacidade de neutralização. Por esta razão, foi selecionado um “pool” dos soros dos animais de cada grupo no momento quatro de leitura de densidade óptica, obtidos no dia 42 (M4), o qual apresentou títulos mais elevados detectados pelo teste de ELISA e pela análise estatística.

Para a realização dos testes, foram utilizadas cinco DL_{50} de veneno nativo de *Crotalus durissus terrificus* e sugerido uma capacidade neutralizante inicial do soro na concentração de 0,6 mg/mL.

O cálculo da DE_{50} dos soros obtidos não foi possível de ser determinado devido à taxa de mortalidade observada. Isto ocorreu devido à utilização estimada da concentração do soro em 0,6 mg/mL estar muito acima da concentração dos soros testados.

As provas de soroneutralização de cada grupo devem ser realizadas com concentrações diferentes para o cálculo da DE_{50} .

Este procedimento não foi realizado pois o objetivo era comparar os quatro grupos. Sendo assim, foi possível observar que o grupo um (G1), inoculado com veneno crotálico nativo associado ao adjuvante incompleto de Freund e hidróxido de alumínio mostrou-se mais eficiente na neutralização quando comparado com os demais grupos.

Observou-se também que os soros do grupo três (G3), inoculados com veneno crotálico irradiado associado ao adjuvante incompleto de Freund e hidróxido de alumínio, garantiu a sobrevivência de um maior número de animais quando comparados com os grupos dois (G2) e quatro (G4).

Estes resultados demonstram que o uso da sílica nanoestruturada SBA-15 como adjuvante não se mostrou eficiente na produção de anticorpos neutralizantes dentro do protocolo empregado.

Em se tratando de uma substância recém empregada como agente adjuvante em hiperimunizações com venenos ofídicos, novos protocolos deverão ser desenvolvidos com o intuito de se encontrar um melhor uso, visto que trabalhos anteriores demonstraram sua melhor eficiência (37,38).

Por meio da técnica de ELISA e dos resultados obtidos pela avaliação da capacidade de neutralização dos soros obtidos em sua forma bruta, os ovinos utilizados no experimento mostraram-se potenciais soroconversores. Foram capazes de gerar uma resposta humoral frente aos estímulos sem sofrer qualquer consequência referente ao processo de imunização.

No que se refere à avaliação do crescimento e ganho de peso dos animais, os resultados demonstraram que não houve diferença estatística significativa entre os quatro grupos quando comparados em relação ao ganho médio de peso. Estes sugerem que não houve interferência do processo de hiperimunização dos ovinos com veneno de *Crotalus durissus terrificus* nativo ou irradiado com ^{60}Co associado ao adjuvante incompleto de Freund, hidróxido de alumínio e sílica nanoestruturada SBA-15 no desenvolvimento dos animais.

De acordo com os resultados obtidos na inspeção sanitária dos animais, pode-se afirmar que o processo de hiperimunização dos ovinos com veneno de *Crotalus durissus terrificus* nativo e irradiado com ^{60}Co não teve como consequência nenhum tipo de lesão que pudesse levar à condenação da carcaça, seja ela parcial ou total, e de órgãos analisados macroscopicamente. Assim, todas as carcaças foram aprovadas e liberadas para consumo humano pelo Serviço de Inspeção Federal (SIF).

Os achados microscópicos obtidos pelo exame histológico demonstrou o não surgimento de lesões conseqüentes de um possível envenenamento crotálico, uma vez que o veneno é considerado altamente nefrotóxico. As alterações conseqüentes do quadro de pielonefrite caracterizam uma infecção ascendente, via sistema urinário.

A associação dos resultados encontrados na avaliação do ganho de peso, exame histológico de fragmentos de rins e inspeção sanitária das carcaças, com aprovação para consumo humano demonstraram que não houve interferência do

processo de hiperimunização no crescimento e desenvolvimento sadio dos animais.

No que se refere às afecções respiratórias apresentadas por todos os animais, acreditou-se que as mudanças extremas de temperatura, a forma do alimento oferecido, em farelo, e as conseqüências do processo de hiperimunização, quando associadas a estes fatores, favoreceram a multiplicação da *Pasteurella* sp, levando os animais a um quadro patológico. Ressalta-se que a pasteurelose foi considerada uma hipótese diagnóstica, e confirmada logo após com o diagnóstico terapêutico. O emprego da Enrofloxacina® no tratamento do processo infeccioso demonstrou-se eficaz, visto que todos os animais, após este procedimento, não apresentaram mais sintomas.

As quinolonas são antibióticos de amplo espectro e possuem uma grande importância no tratamento de infecções bacterianas. Entretanto, podem induzir efeitos adversos em pacientes humanos, caracterizados por reações cutâneas, urticária, angio-edema e anafilaxia, sugerindo uma reação de hipersensibilidade do tipo I mediada por células IgE. Já as reações tardias, caracterizadas por diferentes formas de exantemas também podem ocorrer em tratamentos que utilizam as quinolonas, sendo mediadas por células T (69-75).

Estas reações alérgicas mediadas por células T são exemplos de reações imunes frente a compostos de baixo peso molecular (<1000Da), indicando que drogas podem ser estimulatórias para células T por reagirem com o receptor de células T (TCR). As reações podem ser desenvolvidas se as drogas utilizadas agirem como um apteno, por exemplo, por formarem uma ligação covalente estável, com um carreador macromolecular, como um peptídeo ou uma proteína endógena (76,77).

Apesar das reações adversas citadas em literatura por diversos autores, os resultados obtidos neste trabalho demonstraram que não houve interferência do emprego do medicamento no tratamento dos animais com a formação dos anticorpos, uma vez que os títulos resultantes do processo de hiperimunização demonstrados pela técnica de ELISA apresentaram aumentos significativos após o período da antibioticoterapia.

Durante o processo de hiperimunização dois animais vieram a óbito. O primeiro deles foi inoculado com veneno nativo de *Crotalus durissus terrificus* associado ao adjuvante incompleto de Freund (G1). O outro animal foi inoculado com veneno nativo de *Crotalus durissus terrificus* associado à sílica nanoestruturada SBA-15 (G2). Ambos foram enviados ao Departamento de Clínica Veterinária – Serviço de Patologia Veterinária – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, FMVZ, UNESP – Botucatu, para realização da necropsia. Os laudos estão descritos no apêndice.

O relato dos casos dos animais que vieram a óbito (animal 18 e 24) bem como a realização da necropsia neste trabalho foi de extrema importância, uma vez que as mortes poderiam ter sido causadas por ação do veneno crotálico decorrente do processo de hiperimunização dos ovinos ou então de alguma outra alteração a ser elucidada que pudesse interferir diretamente na pesquisa. Em amostras coletadas de pulmão do animal número 18, pertencente ao grupo um, foi isolada a *Pasteurella* sp. Apesar de estar presente em sua microbiota, a multiplicação da mesma pode levar a um quadro septicêmico agudo e morte em poucas horas. Frequentemente ocorre após o transporte ou tosquia, ou outros fatores de estresse, como após o desmame (51).

No caso, o desenvolvimento pode ser atribuído ao estresse do deslocamento do animal, mudança extrema de temperaturas e também pelo manejo em todo processo de hiperimunização e coletas de sangue para posterior análise. Juntamente a estes fatos, o veneno crotálico possui fração imunossupressora que, isoladamente e em pequenas quantidades, não interfere no perfil imunológico do animal, mas quando associado aos outros fatores, pode determinar uma imunossupressão, permitindo então a multiplicação da bactéria em questão, levando o animal a óbito por insuficiência respiratória em um curto período de tempo.

Com base nessas informações, justifica-se plenamente o uso dos ovinos jovens como animais alternativos para a produção de soros heterólogos. O emprego da sílica nanoestruturada SBA-15 como adjuvante deverá ser realizada com diferentes venenos, doses e novos protocolos de hiperimunização.

A aprovação para o consumo humano da carne dos animais utilizados no processo de hiperimunização oferece boas perspectivas ao ovinocultor.

Por fim, acredita-se que a produção de soros heterólogos altamente responsivos possa estar associada à otimização da tecnologia empregada, na redução dos custos gerados pelo processo, bem como na garantia de hígidez dos animais.

6. CONCLUSÕES

Considerando a análise do resultados obtidos na presente pesquisa, pode-se verificar que:

- O ensaio imunoenzimático (ELISA) mostrou-se eficiente na detecção de anticorpos produzidos, demonstrando que o momento quatro (M4) apresentou o maior nível de titulação nos quatro grupos, sugerindo que apenas quatro inoculações são suficientes, sem induzir efeitos colaterais decorrentes do processo de hiperimunização;
- Os títulos obtidos em ovinos inoculados com veneno nativo de *Crotalus durissus terrificus* mostraram-se superiores quando comparados com a forma irradiada, detectados pelo teste de ELISA;
- Os adjuvantes empregados nos diferentes protocolos foram eficientes na formação da resposta imune humoral sem induzir reações adversas no local de aplicação;
- O processo de hiperimunização não interferiu no desenvolvimento dos animais, pela análise de ganho de peso;
- O protocolo convencional de imunização utilizado no grupo um (G1) mostrou-se mais eficiente na neutralização do efeito letal quando comparados com os demais protocolos;
- A inspeção sanitária e aprovação para consumo demonstraram não haver prejuízos que levem à condenação parcial ou total da carcaça;
- Novos protocolos utilizando a sílica nanoestruturada SBA-15 como adjuvante devem ser estudados.

7. RESUMO

A administração de soros heterólogos de origem eqüina constitui o único tratamento para os acidentes ofídicos, porém estes são capazes de induzir reações de hipersensibilidade. Novos processos de hiperimunização em animais alternativos vêm sendo desenvolvidos, juntamente à ferramentas de destoxificação dos venenos e novas alternativas de adjuvantes. No presente trabalho, foi utilizado veneno de *Crotalus durissus terrificus* nativo (VN) e irradiado com Co_{60} (Vlr), em quatro diferentes protocolos de hiperimunização, para uma avaliação quinzenal do perfil imunológico dos grupos de ovinos pela técnica de ELISA. Os animais foram avaliados clinicamente todos os dias e pesados a cada 14 dias. Ao final, foram inspecionados em frigorífico para aprovação de consumo e os rins, analisados histologicamente. Os soros obtidos foram avaliados quanto à capacidade de neutralização por meio de testes “in vitro”. O momento quatro (M4) apresentou o maior nível de titulação nos quatro grupos, porém o G1, inoculado com VN associado ao adjuvante incompleto de Freund (AIF), apresentou o maior nível quando comparados com os demais grupos, inoculados com VN associado à sílica nanoestruturada SBA-15 (G2), Vlr associado ao AIF (G3) e Vlr associado a SBA-15. Não houve diferença estatística entre os grupos em relação ao ganho de peso. Apenas um animal apresentou lesão no local de aplicação. Todas as carcaças obtiveram um carimbo de aprovação para consumo do Serviço de Inspecção Federal (SIF). Não houve alterações histológicas renais características de envenenamento crotálico. Os soros produzidos pelos quatro grupos foram capazes de neutralizar o efeito letal do veneno de *Crotalus durissus terrificus*, observados pelos testes de neutralização. O protocolo convencional de imunização utilizado no grupo um (G1) mostrou-se mais eficiente na neutralização do efeito letal quando comparados com os demais protocolos.

Palavras-chave: *Crotalus durissus terrificus*, hiperimunização, ovinos.

8. SUMMARY

The administration of heterologous antivenoms raised in horses is considered the only treatment for envenoming by venomous animals. However, it causes hypersensitivity reactions. New hyperimmunization processes in alternative animals have been developed, associated to detoxication of venoms and new alternatives of adjuvants. In the present study it was used the natural (NV) and Co-60-irradiated (IrrV) *Crotalus durissus terrificus* venom, in four different protocols for a evaluation every fifteen days of the immunological response of the four ovine groups by the ELISA test. The clinical evaluation of the animals was performed and the weight obtained every fourteen days, submitted to a frigorific inspection and histological kidneys analysis. The neutralization capacity of the serum produced was evaluated in "in vitro" test. The fourth moment presented the major titles for all groups. However, the first group (G1), inoculated with NV associated with Freund's incomplete adjuvant (FIA) and aluminium hydroxide presented the major titles when compared with the other ones, inoculated with NV associated to SBA-15 (G2), IrrV associated with FIA (G3) and IrrV associated with SBA-15 (G4). There was no statistical difference between the groups concerning the weight analysis. Only one animal presented lesion at the inoculation site. All the carcass obtained the consume approval stamp of the Federal Inspection Service (FIS). There was no kidney lesions on histological analysis. The four serum produced were able to neutralize the lethal effect of *Crotalus durissus terrificus* venom, showed by the neutralization test. The conventional immunization protocol used for the first group (G1) showed more efficient neutralization capacity when compared with the others groups.

Key-words: *Crotalus durissus terrificus*, hyperimmunization, ovines.

9. REFERÊNCIAS¹

- 1 - Mader DR. Reptile Medicine Surgery. 2nd ed. Saunders: Missouri, 2006.
- 2 - Freitas MA. Serpentes Brasileiras. 1ª ed. Malha-de-Sapo: Bahia, 2003.
- 3 - Chippaux JP, Goyffon M. Venoms, Antivenoms and Immunotherapy. *Toxicon*. 1998;36(6):823-46.
- 4 - Francis SM. Snake Venoms and the Hemostatic System. *Toxicon*. 1998;36(12):1749-1800.
- 5- Araújo HSS, Souza DHF. Métodos em toxinologia - Toxinas de Serpentes. 1ª ed. EDUFSCAR: São Carlos, 2007.
- 6 - Cascardi J, Young BA, Husic HD, Sherma J. Protein variation in the venom spat by the red spitting cobra, *Naja palida* (Reptilia: Serpentes). *Toxicon*. 1999;37:1271-79.
- 7 - Sociedade Brasileira de Herpetologia. Lista de espécies - Répteis do Brasil; 2008. [Capturado em 21 ago 2008] Disponível em <http://www.sbherpetologia.org.br>
- 8 - Franco FL. Origem e diversidade das serpentes. In: Cardoso JLC, França FOS, Wen FF, Málaque CMS, Haddad Jr V (editores). *Animais Peçonhentos no Brasil*. São Paulo: Sarvier; 2003. p.13-32.
- 9 - Ministério da Saude/FUNASA (Fundação Nacional de Saúde). Manual de Diagnóstico e tratamento de Acidentes por Animais Peçonhentos. 2001. Brasília: MS/FUNASA
- 10 - Araújo HP, Bourguignon SC, Boller MAA, Dias AASO, Lucas EPR, Santos IC, et al. Potency evaluation of antivenoms in Brazil: The national control laboratory experience between 2000 to 2006. *Toxicon*. 2008;51:502-14.
- 11 - Theakston RDG, Warrel DA, Griffiths E. Report of a WHO workshop on the standardization and control of antivenoms. *Toxicon*. 2003;41:541-57.
- 12 - White J. Bites and stings from venomous animals: a global overview. *Therapeutic Drug Monitoring*. 2000;22(1):65-68.

¹ Segundo normas de Vancouver: "Uniform Requirements for Manuscripts submitted to Biomedical Journals" (International Committee of Medical Journals Editors, 1993) (138) e por deliberação do Curso de Pós-Graduação em Doenças Tropicais da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP.

- 13 - Gutiérrez JM, Theakston RDG, Warrel DA. Confronting the neglected problem of snake bite envenoming: the need for a global partnership. *PlosMedicine*. 2006;3(6):727-31.
- 14 - Barraviera B, Coelho KYR, Curi PR, Meira DA. Liver dysfunction in patients bitten by *Crotalus durissus terrificus* (Laurenti, 1768) snakes in Botucatu (State of São Paulo, Brazil). *Rev Inst Med Trop São Paulo*. 1995;37(1):63-9.
- 15 - Barraviera B. *Venenos Animais – Uma visão integrada*. 1ª ed. EPUC: Rio de Janeiro, 1994.
- 16 - Fan WH, França FOS. Soroterapia. In: Schvartsman S. *Plantas Venenosas e Animais Peçonhentos*. 2ª ed. Sarvier, São Paulo 1992, 288p.
- 17 - Sjostrom L, Al-Abdulla IH, Rawat S, Smith DC, Landon J, A comparison of ovine and equine antivenoms. *Toxicon*. 1994;32:427-33.
- 18 - Russel FE, Timmerman WF, Meadows PE. Clinical use of antivenin prepared from goat serum. *Toxicon*. 1970;8:63-5.
- 19 - Egen N, Russel F, Consroe P, Gerrish K, Dart R et al. A new ovine Fab antivenom for north american venomous snakes. *Vet Human Toxicol*. 1994;36:362.
- 20 - Dart RC, Seifert S, Carroll L, Clark R, Hall E. Affinity-purified, Mixed Monospecific Crotalid Antivenom Ovine Fab for the Treatment of Crotalid Venom Poisoning. *Annals of Emergency Medicine*. 1997;30:33-39.
- 21 - Rawat S, Laing G, Smith DC, Theakston D, Landon J. A new antivenom to treat eastern coral (*Micrurus fulvius fulvius*) envenoming. *Toxicon*. 1994;32:185-90.
- 22 - Clark RF, Williams SR, Nordt SP, Boyer-Hassen LV. Successful treatment of crotalid-induced neurotoxicity with a new polyspecific crotalid Fab antivenom. *Annals E Med*. 1997;30:54-57.
- 23 - Chulasugandha P. Snake Antivenoms: Heterologous and Polyclonal Antisera. *Toxin Reviews*. 2003;22(1):1-14.
- 24 - Harrison RA, Hasson SS, Harmsen M, Laing GD, Conrath K, Theakston RDG. Neutralisation of venom-induced haemorrhage by IgG from camels and llamas immunised with viper venom and also by endogenous, non-IgG components in camelid sera. *Toxicon*. 2006;47:364-68.

- 25 - Landon J, Smith DS. Merits of sheep antisera for antivenom manufacture. *J Toxicol Toxin Rev.* 2003;22:15-22.
- 26 - Krifi MN, Ayeb M EL, Dellagi K. The improvement and standardization of antivenom production in developing countries: Comparing antivenom quality, therapeutical efficiency and cost. *J. Venom. Anim. Toxins.* 1999;5(2):128-41.
- 27 - Morais V. Development and improvement in the snake antivenom production. *J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis.* 2006;12(2):315.
- 28 - Morais V, Massaldi H. Economic evaluation of snake antivenom production in the public system. *J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis.* 2006;12(3):497-511.
- 29 - Clissa PB, Nascimento N, Rogero JR. Toxicity and immunogenicity of *Crotalus durissus terrificus* venom treated with different doses of gama rays. *Toxicon.* 1997;37:1131-41.
- 30 - Freire-Maia N. *Radiogenética humana.* 1^a ed Edgard Blücher: São Paulo, 1972.
- 31 - Grosch DS, Hopywood LE. The eletrophoretic analysis of snake venoms. *Arch Biochem.* 1947;13:253-9.
- 32 - Cardi BA, Nascimento N, Andrade JR HF. Irradiation of *Crotalus durissus terrificus* crotoxin with ⁶⁰Co ã-rays induces its uptake by macrophages through scavenger receptors. *Int J Radiat Biol.* 1998;73(5): 557-64.
- 33 - Boni-Mitake M, Costa H, Spencer PJ, Vassilieff VS, Rogero JR. Effects of ⁶⁰Co gamma radiation on crotamine. *Braz J Med Biol Res.* 2001;34:1531-38.
- 34 - Ferreira Junior RS, Nascimento N, Martinez JC, Alves JB, Meira DA, Barraviera B. Immunization with native and cobalt 60-irradiated *Crotalus durissus terrificus* venom in Swiss mice: assessment of the neutralizing potency of antisera. *J Venom Anim Toxins incl Trop Dis.* 2005;11(3):299-314.
- 35 - Ferreira Junior RS, Nascimento N, Martinez JC, Alves JB, Meira DA, Barraviera B. Immunological assessment of mice hyperimmunized with native and Cobalt-60-irradiated *Bothrops* venoms. *J Venom Anim Toxins incl Trop Dis.* 2005;11:447-64.
- 36 - Ferreira Junior RS, Nascimento N, Martinez JC, Alves JB, Meira DA, Barraviera B. Laboratory evaluation of young ovines inoculated with natural or

- 60Co-irradiated *Crotalus durissus terrificus* venom during hyperimmunization process. *J Venom Anim Toxins incl Trop Dis*. 2006;12(4):620-31.
- 37 - Mercuri LP, Carvalho LV, Lima FA, Quayle C, Fantini MCA, Tanaka GS, et al. Ordered Mesoporous Silica SBA-15: A New Effective Adjuvant to Induce Antibody Response. *Small*. 2006;2(2): 254-56.
- 38 - Zhao D, Feng J, Huo Q, Melosh N, Fredrickson GH, Chmelka BF, Stucky GD. Triblock copolymer syntheses of mesoporous silica with periodic 50 to 300 angstrom pores. *Science*. 1998;279:548-52.
- 39 - Nascimento N, Seebart CS, Francis B, Rogero JR, Kaiser II. Influence of ionizing radiation on crotoxin: biochemical and immunological aspects. *Toxicon*. 1996;34(1):123-31.
- 40 - Gordon HM, Whitlock HUA. A new technique for counting nematodes eggs in sheep faeces. *Braz J Vet Res Anim Sci*. 1939;12(13):50-2
- 41 - Luna, LG. *Manual of Histological Staining Methods of Armed Forces Institute of Pathology*. 3rd ed York McGraw Hill: Washington, 1968.
- 42 - Finney DJ. *Probit Analysis*. 3rd ed. University Press: Cambridge, 1971.
- 43 - Farmacopéia Brasileira. 4^a ed (II). Atheneu: São Paulo, 2000.
- 44 - Ministério da Saúde. Normas e Técnicas de Fabricação e Controle de Qualidade de Soros Antiofídicos, Antirábico. Secretaria de Vigilância Sanitária, portaria nº 174, de 11/11/1996. Imprensa Nacional – Brasília.
- 45 - Peres CM, Bastos MF, Ferreira J, Sartori A. Detection and neutralization of venom by ovine antiserum in experimental envenoming by *Bothrops jararaca* - J. *Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis*. 2006;12(1):124-36.
- 46 - Rodriguez JP, Marzi M, Marunak S, Malchiodi EL, Leiva LC, Acosta O. Rabbit IgG antibodies against phospholipase A₂ from *Crotalus durissus terrificus* neutralize the letal activity of the venom. *Medicina*. 2006;66:512-16.
- 47 - Fernandes I, Takehara HA, Santos ACR, Cormont F, Latinne D, Bazin H, Mota I. Neutralization of bothropic and crotalic venom toxic activities by IgG(T) and IgGa subclasses isolated from immune horse seum. *Toxicon*. 1997;35(6):931-36.

- 48 - Fernandes I, Lima EX, Takehara HA, Moura-da-Silva AM, Tanjoni I, Gutiérrez JM. Horse IgG isotypes and cross-neutralization of two snake antivenoms produced in Brazil and Costa Rica. *Toxicon*. 2000;38:633-44.
- 49 - Netto DP, Chiacchio SB, Bicudo PL, Alfieri AA, Nascimento N. Humoral response and neutralization capacity of sheep serum inoculated with natural and Cobalt-60-irradiated *Crotalus durissus terrificus* venom (Laurenti, 1768). *J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis.* 2002;8(2):297-314.
- 50 - Herrera M, Leon G, Segura A, Meneses F, Lomonte B, Chippaux JP, Gutiérrez JM. Factors associated with adverse reactions induced by caprylic acid-fractionated whole IgG preparations: comparison between horse, sheep and camels IgGs. *Toxicon*. 2005;46:775-781.
- 51 - Ferreira JR RS. Comparação da resposta imune humoral, da capacidade de neutralização dos soros anticrotálicos produzidos em ovinos jovens, avaliação clínica e ponderal entre animais inoculados com veneno de serpente *Crotalus durissus terrificus* nativo ou irradiado com Cobalto-60. (Tese). Botucatu: Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista; 2005.
- 52 - Domingues PF, Langoni H. *Manejo Sanitário Animal*. 1ª ed. EPUB: Rio de Janeiro, 2001.
- 53 - Cardoso DF, Mota I. Effect of *Crotalus durissus terrificus* venom on the humoral and celular immune response. *Toxicon*. 1997;35(4):607-12.
- 54 - Rangel-Santos AC, Mota I. Effect of heating on the toxic, immunogenic and immunosuppressive activities of *Crotalus durissus terrificus* venom. *Toxicon*. 2000;38:1451-57
- 55 - Rangel-Santos AC, Lima C, Ferreira-Lopes M, Cardoso DF. Immunosuppressive role of toxin (crotoxin) of *Crotalus durissus terrificus* venom. *Toxicon*. 2004;44:609-16.
- 56 - Abib H, Laraba-Djebari F. Effect of gamma irradiation on toxicity and immunogenicity of *Androctonus australis hector* venom. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 2003;81(12):1118-24.

- 57 - Abib H, Laraba-Djebari F. Effects of ^{60}Co gamma radiation and hemorrhagic, myonecrotic, and edema-forming activities of *Cerastes cerastes* venom. *Can J Physiol Pharmacol*. 2003;81(12): 1125-30.
- 58 - Rogero JR, Nascimento N. Detoxification of snake venom using ionizing radiation. *J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis*. 1995;1(1):07-10.
- 59 - Heffar-Bennacef N, Laraba-Djebari F. Evaluation of the effect of gamma rays on the venom of *Vipera lebetina* by biochemical study. *Can J Physiol Pharmacol*. 2003;81(12):1110-17.
- 60 - Souza FAD, Spencer PJ, Rogero JR, Nascimento N, Pai-Silva MD, Gallaci M. ^{60}Co gamma radiation prevents *Bothrops jararacussu* venom neurotoxicity and myotoxicity in isolated mouse neuromuscular junction. *Toxicon*. 2002;40:1001-06.
- 61 - Oussedik-Oumehdi H, Laraba-Djebari F. Irradiated *Cerastes cerastes* venom as a novel tool for immunotherapy. *Immunopharmacol Immunotoxicol*. 2008;30(1):37-52.
- 62 - Hanly WC, Bennett BT. Overview of adjuvants. [Capturado em 21 ago 2008] Disponível em <http://www.nal.usda.gov/awic/pubs/antibody/overview.htm>
- 63 - Lago LA, Ferreira PM, Facury Filho EJ, Melo MM, Alzamora Filho F. Clinical picture of experimental crotalic poisoning in cattle (*Crotalus durissus terrificus* – positive crotamine). *Braz J Vet Res Anim Sci*. 2000;37(4):312-15.
- 64 - Teakston RDG, Lloyd-Jones MJ, Reid HA. Micro-ELISA for detecting and assaying snake venom and venom-antibody. *The Lancet*. 1977;24:639-41.
- 65 - Beghini DG, Hernandez-Oliveira S, Rodrigues-Simioni L, Novello JC, Hyslop S, Marangonia S. Anti-sera raised in rabbits against crotoxin and phospholipase A_2 from *Crotalus durissus cascavella* venom neutralize the neurotoxicity of the venom and crotoxin. *Toxicon*. 2004;44:141-48.
- 66 - Dos-Santos MC, Gonçalves LRC, Fortes-Dias CL, Cury Y, Gutiérrez JM, Furtado MF. A eficácia do antiveneno botrópico-crotálico na neutralização das principais atividades do veneno de *Bothrops jararacussu*. *Ver Inst Méd trop São Paulo*. 1992;34(2):77-83.
- 67 - Barraviera B, Sartori A, Silva PMF, Kaneno R, Peraçoli MTS. Use of an ELISA assay to evaluate venom, antivenom, IgG and IgM human antibody levels in serum

and cerebrospinal fluid from patients bitten by *Crotalus durissus terrificus* in Brazil. *J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis.* 1996;2(1):14-27.

68 - Rial A, Morais V, Rossi S, Massaldi H. A new ELISA for determination of potency in snake antivenoms. *Toxicon.* 2006;48:462-66.

69 - Hooper DC, Wolfson JS. Mode of action of the new quinolones: new data. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 1991;10:223-31.

70 - Davis H, McGoodwin E, Reed TG. Anaphylactoid reactions reported after treatment with ciprofloxacin. *Ann Intern Med.* 1989;111:1041-43.

71 - Roujeau JC, Stern RS. Severe adverse cutaneous reactions to drugs. *N Engl J Med.* 1994;331:1272-85.

72 - Fernandez-Rivas M. Fixed drug eruption caused by norfloxacin. *Allergy.* 1997;52:477-8.

73 - Alonso MD, Martin JA, Quirce S, Davila I, Lezaun A, SanchezCano M. Fixed eruption caused by ciprofloxacin with cross-sensitivity to norfloxacin. *Allergy.* 1993;48:296-7.

74 - Tsuda S, Kato K, Karashima T, Inou Y, Sasai Y. Toxic pustuloderma induced by ofloxacin. *Acta Derm Venereol.* 1993;73:382-4.

75 - Kawada A, Hiruma M, Morimoto K, Ishibashi A, Banda H. Fixed drug eruption induced by ciprofloxacin followed by ofloxacin. *Contact Dermatitis.* 1994;31:182-3.

76 - Pichler WJ. Delayed drug hypersensitivity reactions. *Ann Intern Med.* 2003;139:683-93.

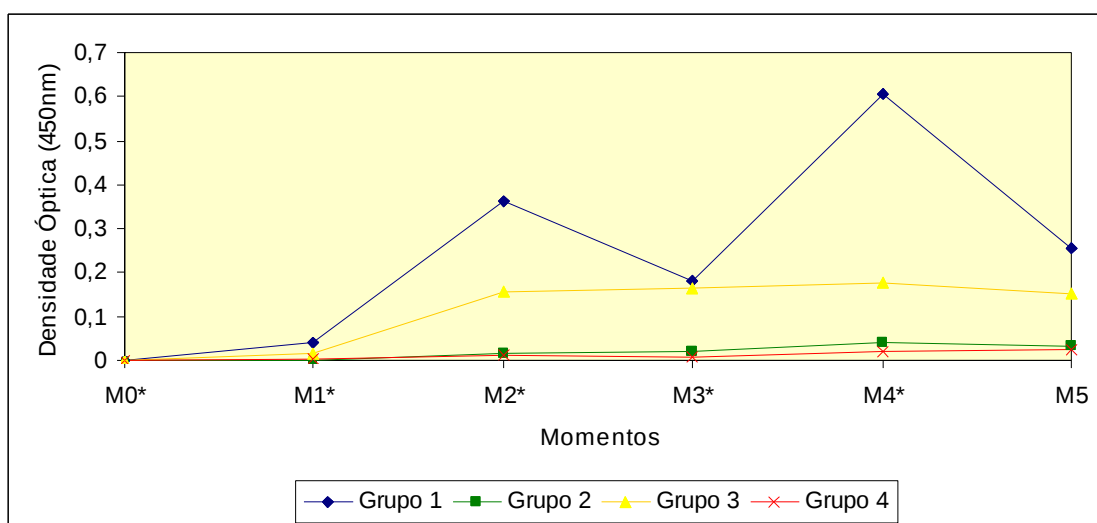
77 - Shnyder B, Mauri-Hellweg D, Zanni M, Bettens F, Pichler WJ. Direct, MHC-dependent presentation of the drug sulfamethoxazole to human alpha-beta T cells clones. *J Clin Invest.* 1997;100:136-141.
2000;37(4):312-15.

10. APÊNDICE

Tabela 27: Distribuição dos valores da mediana e quartis da produção de anticorpos demonstrados pela leitura de densidade óptica (450nm) por grupo nos momentos M1, M2, M3, M4,e M5 de observação na diluição de 1:1600.

Grupos	Resumo	M1	M2	M3	M4	M5
Grupo 1	1º Quartil	0,024	0,301	0,127	0,502	0,191
	Mediana	0,040	0,363	0,183	0,605	0,255
	3º Quartil	0,065	0,443	0,283	0,744	0,406
Grupo 2	1º Quartil	-0,001	0,011	0,008	0,029	0,019
	Mediana	0,000	0,018	0,023	0,043	0,035
	3º Quartil	0,004	0,037	0,040	0,098	0,045
Grupo 3	1º Quartil	0,008	0,130	0,108	0,124	0,098
	Mediana	0,018	0,155	0,167	0,179	0,152
	3º Quartil	0,039	0,256	0,265	0,293	0,293
Grupo 4	1º Quartil	-0,002	0,010	0,002	0,014	0,013
	Mediana	0,004	0,014	0,007	0,022	0,026
	3º Quartil	0,006	0,025	0,020	0,049	0,064

M1 = dia 14, M2 = dia 28, M3 = dia 42, M4 = 56 e M5 = dia 70.



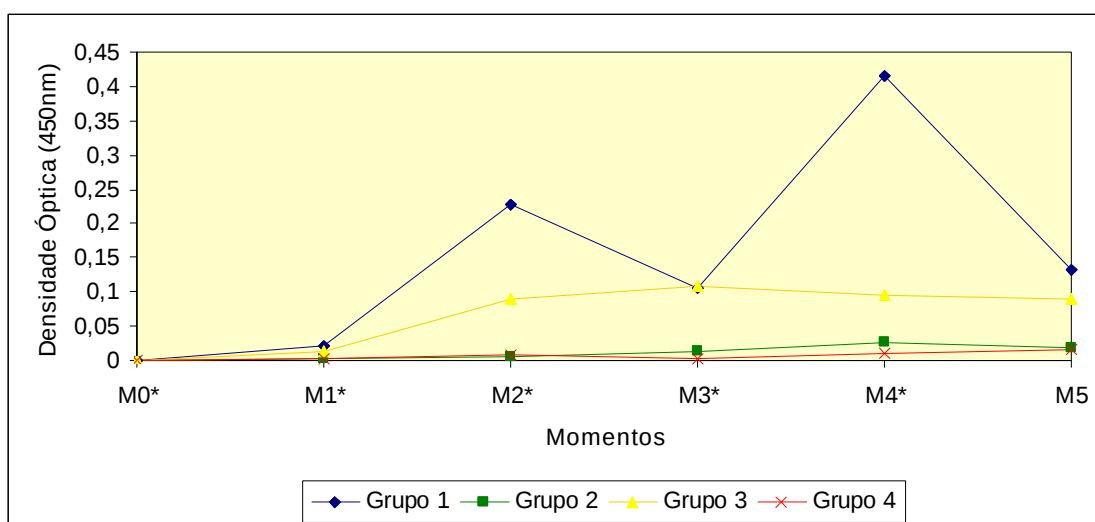
M0 = dia 1, M1 = dia 14, M2 = dia 28, M3 = dia 42, M4 = 56 e M5 = dia 70. *Inoculação.

Figura 15: Apresentação dos valores da mediana da produção de anticorpos demonstrados pela leitura de densidade óptica (450nm) dos grupos avaliados nos momentos M0, M1, M2, M3, M4 e M5 de observação na diluição de 1:1600.

Tabela 28: Distribuição dos valores da mediana e quartis da produção de anticorpos demonstrados pela leitura de densidade óptica (450nm) por grupo nos momentos M1, M2, M3, M4,e M5 de observação na diluição de 1:3200.

Grupos	Resumo	M1	M2	M3	M4	M5
Grupo 1	1º Quartil	0,010	0,190	0,067	0,333	0,108
	Mediana	0,020	0,228	0,106	0,415	0,134
	3º Quartil	0,032	0,330	0,172	0,544	0,250
Grupo 2	1º Quartil	0,002	0,005	0,001	0,018	0,012
	Mediana	0,003	0,007	0,014	0,026	0,018
	3º Quartil	0,005	0,020	0,048	0,057	0,024
Grupo 3	1º Quartil	0,004	0,069	0,066	0,072	0,053
	Mediana	0,013	0,091	0,109	0,096	0,089
	3º Quartil	0,024	0,179	0,156	0,203	0,198
Grupo 4	1º Quartil	-0,002	0,003	0,002	0,004	0,007
	Mediana	0,004	0,009	0,004	0,011	0,016
	3º Quartil	0,006	0,014	0,012	0,031	0,039

M1 = dia 14, M2 = dia 28, M3 = dia 42, M4 = 56 e M5 = dia 70.



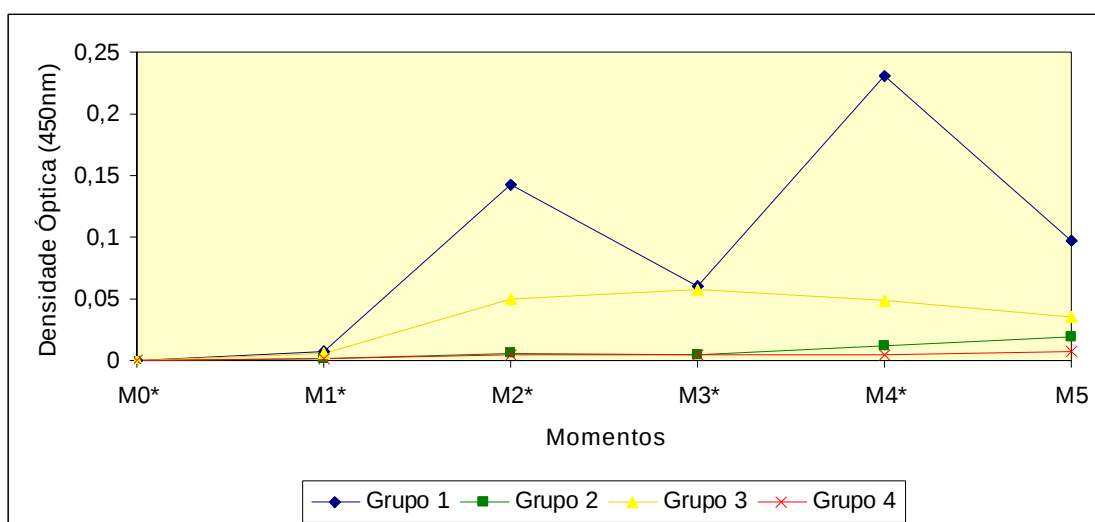
M0 = dia 1, M1 = dia 14, M2 = dia 28, M3 = dia 42, M4 = 56 e M5 = dia 70. *Inoculação.

Figura 16: Apresentação dos valores da mediana da produção de anticorpos demonstrados pela leitura de densidade óptica (450nm) dos grupos avaliados nos momentos M0, M1, M2, M3, M4 e M5 de observação na diluição de 1:3200.

Tabela 29: Distribuição dos valores da mediana e quartis da produção de anticorpos demonstrados pela leitura de densidade óptica (450nm) por grupo nos momentos M1, M2, M3, M4,e M5 de observação na diluição de 1:6400.

Grupos	Resumo	M1	M2	M3	M4	M5
Grupo 1	1º Quartil	0,002	0,118	0,035	0,188	0,073
	Mediana	0,008	0,143	0,061	0,232	0,098
	3º Quartil	0,018	0,232	0,100	0,310	0,179
Grupo 2	1º Quartil	0,001	0,004	-0,003	0,009	0,011
	Mediana	0,001	0,006	0,004	0,012	0,020
	3º Quartil	0,002	0,014	0,012	0,027	0,033
Grupo 3	1º Quartil	0,005	0,035	0,038	0,035	0,026
	Mediana	0,006	0,050	0,058	0,049	0,036
	3º Quartil	0,010	0,103	0,081	0,099	0,118
Grupo 4	1º Quartil	0,001	0,000	0,004	0,003	0,001
	Mediana	0,002	0,005	0,005	0,005	0,007
	3º Quartil	0,006	0,007	0,009	0,012	0,020

M1 = dia 14, M2 = dia 28, M3 = dia 42, M4 = 56 e M5 = dia 70.



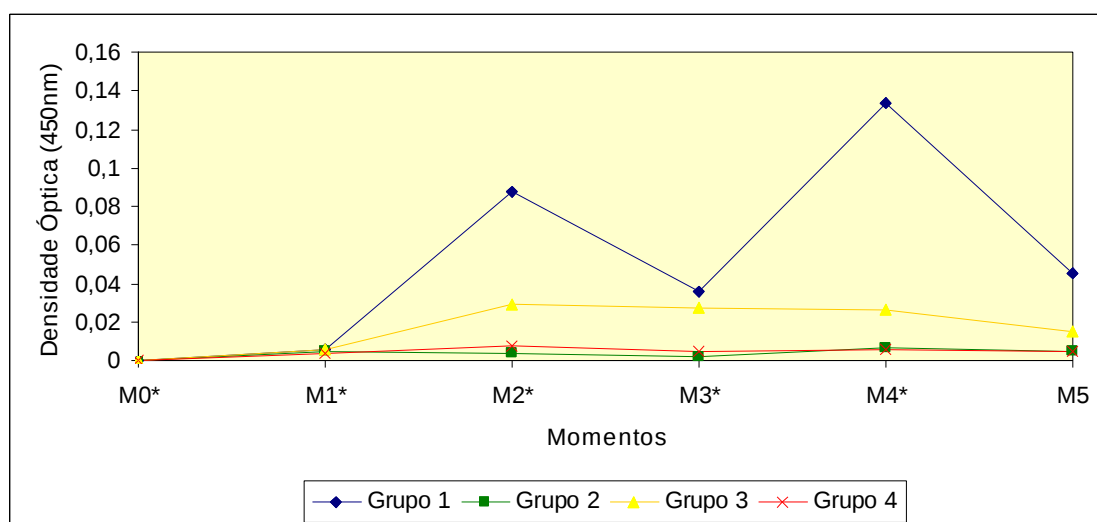
M0 = dia 1, M1 = dia 14, M2 = dia 28, M3 = dia 42, M4 = 56 e M5 = dia 70. *Inoculação.

Figura 17: Apresentação dos valores da mediana da produção de anticorpos demonstrados pela leitura de densidade óptica (450nm) dos grupos avaliados nos momentos M0, M1, M2, M3, M4 e M5 de observação na diluição de 1:6400.

Tabela 30: Distribuição dos valores da mediana e quartis da produção de anticorpos demonstrados pela leitura de densidade óptica (450nm) por grupo nos momentos M1, M2, M3, M4,e M5 de observação na diluição de 1:12800.

Grupos	Resumo	M1	M2	M3	M4	M5
Grupo 1	1º Quartil	0,002	0,068	0,024	0,106	0,035
	Mediana	0,005	0,088	0,036	0,134	0,046
	3º Quartil	0,010	0,161	0,066	0,188	0,090
Grupo 2	1º Quartil	0,000	0,000	-0,006	0,005	0,003
	Mediana	0,005	0,004	0,002	0,007	0,005
	3º Quartil	0,009	0,008	0,007	0,015	0,007
Grupo 3	1º Quartil	0,003	0,013	0,019	0,021	0,011
	Mediana	0,006	0,029	0,028	0,026	0,015
	3º Quartil	0,007	0,062	0,088	0,062	0,067
Grupo 4	1º Quartil	0,000	-0,002	0,003	0,001	0,001
	Mediana	0,004	0,008	0,004	0,005	0,005
	3º Quartil	0,007	0,013	0,007	0,008	0,012

M1 = dia 14, M2 = dia 28, M3 = dia 42, M4 = 56 e M5 = dia 70.



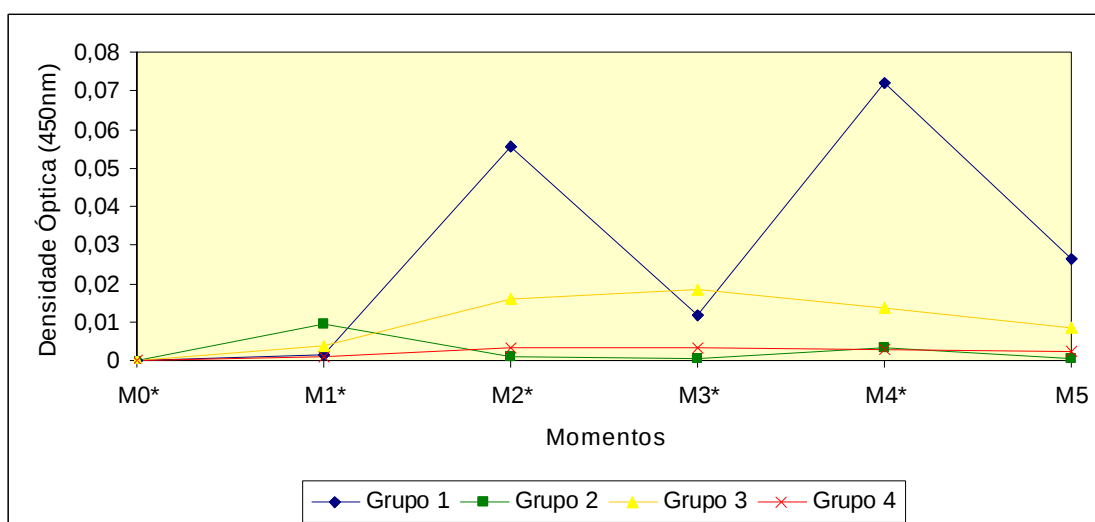
M0 = dia 1, M1 = dia 14, M2 = dia 28, M3 = dia 42, M4 = 60 e M5 = dia 56. *Inoculação.

Figura 18: Apresentação dos valores da mediana da produção de anticorpos demonstrados pela leitura de densidade óptica (450nm) dos grupos avaliados nos momentos M0, M1, M2, M3, M4 e M5 de observação na diluição de 1:12800.

Tabela 31: Distribuição dos valores da mediana e quartis da produção de anticorpos demonstrados pela leitura de densidade óptica (450nm) por grupo nos momentos M1, M2, M3, M4,e M5 de observação na diluição de 1:25600.

Grupos	Resumo	M1	M2	M3	M4	M5
Grupo 1	1º Quartil	-0,001	0,042	0,010	0,054	0,019
	Mediana	0,001	0,056	0,012	0,072	0,027
	3º Quartil	0,003	0,096	0,031	0,108	0,053
Grupo 2	1º Quartil	0,004	-0,002	-0,006	0,002	-0,003
	Mediana	0,010	0,001	0,001	0,004	0,001
	3º Quartil	0,021	0,006	0,002	0,006	0,003
Grupo 3	1º Quartil	-0,002	0,002	0,012	0,010	0,004
	Mediana	0,004	0,016	0,018	0,014	0,009
	3º Quartil	0,006	0,034	0,055	0,034	0,030
Grupo 4	1º Quartil	-0,006	-0,001	0,002	0,000	-0,001
	Mediana	0,001	0,004	0,003	0,003	0,003
	3º Quartil	0,003	0,006	0,004	0,005	0,257

M1 = dia 14, M2 = dia 28, M3 = dia 42, M4 = 56 e M5 = dia 70.



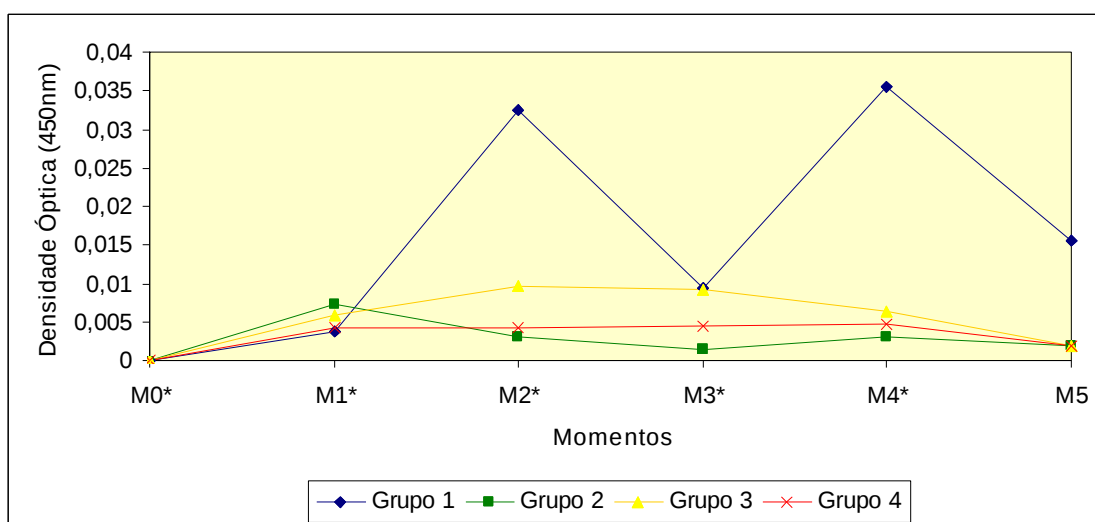
M0 = dia 1, M1 = dia 14, M2 = dia 28, M3 = dia 42, M4 = 56 e M5 = dia 70. *Inoculação.

Figura 19: Apresentação dos valores da mediana da produção de anticorpos demonstrados pela leitura de densidade óptica (450nm) dos grupos avaliados nos momentos M0, M1, M2, M3, M4 e M5 de observação na diluição de 1:25600.

Tabela 32: Distribuição dos valores da mediana e quartis da produção de anticorpos demonstrados pela leitura de densidade óptica (450nm) por grupo nos momentos M1, M2, M3, M4,e M5 de observação na diluição de 1:51200.

Grupos	Resumo	M1	M2	M3	M4	M5
Grupo 1	1º Quartil	0,003	0,022	0,006	0,028	0,010
	Mediana	0,004	0,033	0,010	0,036	0,016
	3º Quartil	0,008	0,055	0,021	0,250	0,029
Grupo 2	1º Quartil	-0,001	0,000	-0,004	0,002	-0,003
	Mediana	0,007	0,003	0,002	0,003	0,002
	3º Quartil	0,016	0,004	0,004	0,006	0,003
Grupo 3	1º Quartil	0,001	0,002	0,007	0,005	-0,001
	Mediana	0,006	0,010	0,009	0,006	0,002
	3º Quartil	0,009	0,034	0,016	0,018	0,013
Grupo 4	1º Quartil	0,003	-0,002	0,004	0,001	-0,001
	Mediana	0,004	0,004	0,005	0,005	0,002
	3º Quartil	0,006	0,006	0,008	0,007	0,004

M1 = dia 14, M2 = dia 28, M3 = dia 42, M4 = 56 e M5 = dia 70.



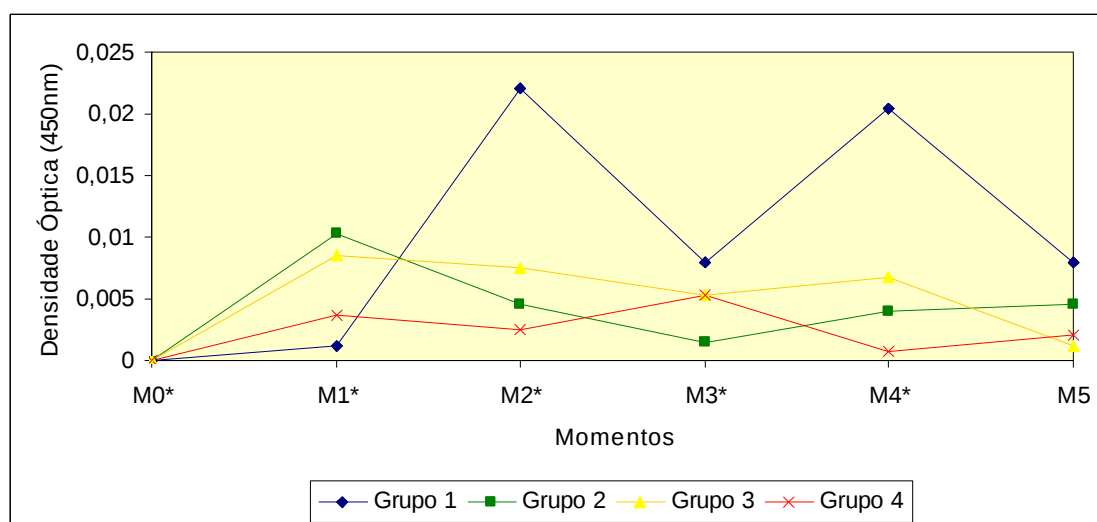
M0 = dia 1, M1 = dia 14, M2 = dia 28, M3 = dia 42, M4 = 56 e M5 = dia 70. *Inoculação.

Figura 20: Apresentação dos valores da mediana da produção de anticorpos demonstrados pela leitura de densidade óptica (450nm) dos grupos avaliados nos momentos M0, M1, M2, M3, M4 e M5 de observação na diluição de 1:51200.

Tabela 33: Distribuição dos valores da mediana e quartis da produção de anticorpos demonstrados pela leitura de densidade óptica (450nm) por grupo nos momentos M1, M2, M3, M4,e M5 de observação na diluição de 1:102400.

Grupos	Resumo	M1	M2	M3	M4	M5
Grupo 1	1º Quartil	0,001	0,012	0,005	0,015	0,006
	Mediana	0,001	0,022	0,008	0,021	0,008
	3º Quartil	0,006	0,041	0,012	0,035	0,015
Grupo 2	1º Quartil	0,006	0,001	-0,008	0,003	0,004
	Mediana	0,010	0,005	0,002	0,004	0,005
	3º Quartil	0,014	0,007	0,003	0,005	0,012
Grupo 3	1º Quartil	0,003	-0,005	0,004	0,004	-0,002
	Mediana	0,009	0,008	0,005	0,007	0,001
	3º Quartil	0,014	0,014	0,008	0,012	0,008
Grupo 4	1º Quartil	0,003	-0,002	0,003	-0,001	-0,002
	Mediana	0,004	0,003	0,005	0,001	0,002
	3º Quartil	0,009	0,008	0,012	0,005	0,004

M1 = dia 14, M2 = dia 28, M3 = dia 42, M4 = 56 e M5 = dia 70.



M0 = dia 1, M1 = dia 14, M2 = dia 28, M3 = dia 42, M4 = 56 e M5 = dia 70. *Inoculação.

Figura 22: Apresentação dos valores da mediana da produção de anticorpos demonstrados pela leitura de densidade óptica (450nm) dos grupos avaliados nos momentos M0, M1, M2, M3, M4 e M5 de observação na diluição de 1:102400.

Relato de Casos

A – Relato de Caso 1

O animal 18, pertencente ao grupo um (G1), veio a óbito um dia após a primeira inoculação com 0,5mg de veneno nativo de *Crotalus durissus terrificus* associado ao adjuvante incompleto de Freund. Ao exame clínico, o mesmo apresentou apatia, inapetência, prostração, dispnéia, tosse, secreção nasal e veio a óbito em 24 horas.

Laudo de necropsia:

RG: 147580

Espécie: Ovina

Raça: Suffolk

Sexo: macho

Idade: 4 meses

Exame externo: Mucosa oral cianótica. Mucosas oral, genital e anal congestas.

Causa mortis: Insuficiência respiratória aguda (edema pulmonar) e choque séptico (congestão de todos os órgãos examinados e presença de focos hemorrágicos).

Processo principal: Pneumonia com áreas de hepatização vermelha nos lobos craniais e mediais, com a presença de abscessos multifocais nas áreas comprometidas (Prova de docimasia hidrostática negativa)

Processos secundários: Congestão e edema cerebral. Petéquias em epicárdio e áreas esbranquiçadas em miocárdio. Fígado congesto, esbranquiçado, com focos amarelados e padrão lobular evidente. Baço com hiperplasia de polpa branca. Rumenite. Abomaso edemaciado. Equimose no pâncreas. Enterite hemorrágica. Rins congestos.

Outros achados: Sinusite

Observações: Não foram encontrados indícios de aplicações na região do pescoço.

B – Relato de Caso 2

O animal 24, pertencente ao grupo dois (G2) veio a óbito quatro dias após a primeira inoculação com 0,5mg de veneno nativo de *Crotalus durissus terrificus* associado à sílica nanoestruturada SBA-15. Ao exame clínico, o mesmo apresentou apatia, inapetência, prostração, dispnéia, tosse, secreção nasal e veio a óbito em 24 horas.

Laudo de necropsia:

RG: 147632

Espécie: Ovina

Raça: Suffolk

Sexo: Macho

Idade: 4 meses

Exame externo: bom estado nutricional e mucosas aparentes pálidas.

Causa mortis: Insuficiência respiratória aguda (edema pulmonar).

Processos secundários: Rinite acentuada, pneumonia abscedativa e áreas de degeneração hepática.

A figura 16 mostra a aderência dada pelo o abscesso localizado no pulmão, em lobo cranial direito, durante a realização da necropsia.

A figura 17 mostra o abscesso localizado no pulmão em lobo cranial direito, durante a realização da necropsia.

Outros achados: hematomas em subcutâneo de região cervical e sablose em abomaso.



Figura 23: Necropsia em ovino: aderência em gradil costal dada pelo abscesso formado no pulmão, em lobo cranial direito.



Figura 24: Necropsia em ovino: abscesso localizado no pulmão, em lobo cranial direito.