

**Secretaria de Saúde do Governo do Estado de São Paulo
Centro de Formação de Recursos Humanos para o SUS/SP
“Dr. Antônio Guilherme de Souza”
Instituto Butantan**

Imunização de base com antígeno do gênero *bothrops* em equinos soroprodutores visando uma resposta imunológica.

Raul de Jesus Souza

**São Paulo/SP
2019**

Raul de Jesus Souza

Imunização de base com antígeno do gênero *bothrops* em equinos soroprodutores visando uma resposta imunológica.

Monografia de Conclusão do Curso de Especialização
Animais de Interesse em Saúde: Biologia Animal do
Instituto Butantan, sob orientação de Vânia Gomes de
Moura Mattarai

São Paulo/SP

2019

Dados internacionais de catalogação-na-publicação

Souza, Raul de Jesus

Imunização de base com antígeno do gênero *bothrops* em equinos soroprodutores visando uma resposta imunológica / Raul de Jesus Souza; orientadora Vânia Gomes de Moura Mattarai; coorientador Thiago Jhonatha Fernandes Silva. – São Paulo, 2019.

25 p. : il.

Trabalho de Conclusão de Curso (Especialização) – Secretaria de Estado Saúde, Centro de Formação de Recursos Humanos para o SUS/SP “Doutor Antônio Guilherme de Souza” desenvolvido no Instituto Butantan para o Curso de Especialização Animais de Interesse em Saúde: Biologia Animal.

1. Assunto. I. Mattarai, Vânia Gomes de Moura. II. Silva, Thiago Jhonatha Fernandes. III. Instituto Butantan. IV. Curso de Especialização Animais de Interesse em Saúde: Biologia Animal. V. Título.

Ficha catalográfica elaborada pelo aluno a partir de modelo desenvolvido pela
Biblioteca do Instituto Butantan

Secretaria de Saúde do Governo do Estado de São Paulo
Centro de Formação de Recursos Humanos para o SUS/SP
“Dr. Antônio Guilherme de Souza”
Instituto Butantan

AUTORIZAÇÃO PARA ACESSO E REPRODUÇÃO DE TRABALHO

Eu, Paul de Jesus Souza, aluno(a) do curso Animais de Interesse em Saúde: Biologia Animal, autorizo a divulgação do meu trabalho de conclusão de curso por mídia impressa eletrônica ou qualquer outra, assim como a reprodução total deste trabalho de conclusão de curso após publicação, para fins acadêmicos desde que citada a fonte.

Prazo de liberação da divulgação do trabalho de conclusão de curso após a data da avaliação:

- Imediato
 06 meses
 12 meses
 Não autorizo a divulgação

Justifique:

São Paulo, 28 de Fevereiro de 2019

Paul de Jesus Souza
aluno(a)

De acordo: [Assinatura]
Orientador(a):

RESUMO

Os equinos são animais de grande porte, com isso apresenta grande volume sanguíneo, sendo assim sempre foi o animal de escolha para realização dos procedimentos de hiperimunização, além de se tratar de um animal de fácil manejo e dócil. Os acidentes ofídicos podem ocorrer em qualquer espécie animal, inclusive nos seres humanos. O gênero de serpentes no Brasil que mais ocasionam esses acidentes são conhecidas como *Bothrops*. O cavalo é utilizado para ser imunizado com o veneno da serpente, com o objetivo de criar anticorpos específicos contra esse veneno. O presente trabalho teve como intuito realizar a mensuração de anticorpos em nove equinos, que foram submetidos à imunização de base com o antígeno do gênero *Bothrops*. Os adjuvantes utilizados para o estudo foram Emulsão múltipla incompleta (EMI) e o Tampão fosfato salina. Os animais foram sujeitos a três imunizações e em seguida foram efetuadas seis sangrias exploradoras após isso foi mensurado a titulação de cada animal, para saber qual indivíduo obteve uma titulação adequada e se está apto ou não para entrar no serviço definitivo de Botrópico.

Palavras-chave: Acidentes ofídicos. *Bothrops*. Equinos. Hiperimunização.

ABSTRACT

Equines are large animals, with large blood volume, thus being always the animal of choice for performing hyperimmunization procedures, besides being an animal that is easy to handle and docile. Snakebite accidents can occur in any animal species, including humans. The genus of snakes in Brazil that most cause these accidents are known as Bothrops. The horse is used to be immunized with the venom of the snake, in order to create specific antibodies against this venom. The aim of the present study was to measure antibodies in nine horses, which were submitted to basic immunization with the antigen of the genus Bothrops. The adjuvants used for the study were Incomplete Multiple Emulsion (EMI) and the Saline Phosphate Buffer. The animals were subjected to three immunizations and then six exploratory bleeds were performed after that, the titration of each animal was measured to determine which individual obtained an adequate titration and whether or not he was able to enter the definitive Botropicus service.

Keywords: Snaky Accidents. Bothrops. Horses. Hyperimmunization.

LISTA DE ABREVIACOES

E.M.I - Emulsão múltipla incompleta

PBS - Tampão fosfato salina (Phosphate Buffered Solution)

IgG - Imunoglobulina G

IgE - Imunoglobulina E

IgD - Imunoglobulina D

IgM - Imunoglobulina M

IgA - Imunoglobulina A

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	9
2.1 Objetivo geral	10
2.2 Objetivo específico.....	10
3 REVISÃO DE LITERATURA	11
3.1 Equino	11
3.2 Acidentes Ofídicos	11
3.3 Defesas do organismo	12
4 MATERIAIS E MÉTODOS	15
4.1 Descrição da escolha do grupo experimental.....	15
5 RESULTADO.....	17
6 DISCUSSÃO.....	21
7 CONCLUSÃO	23
Referências	24

1 INTRODUÇÃO

A produção de plasma hiperimune leva em consideração vários fatores, para que ocorra de maneira eficaz. Pontos que vão desde a escolha do animal a ser imunizado passando por seu manejo, até o preparo do antígeno, estes podem interferir diretamente na produção de imunoglobulinas.

Entre os animais com potencial de produção de imunoglobulinas heterólogas os equinos se destacam, por sua docilidade e volemia plasmática, além de boas respostas ao processo de imunização.

Em 1901 Vital Brasil cientista brasileiro mineiro, iniciou em seu laboratório a produção pioneira do soro hiperimune antibubônico e no mesmo ano iniciou a produção do soro antiofídico. Hoje o instituto continua localizado na cidade de São Paulo, bairro Butantã, onde reúnem laboratórios de pesquisa e produção de soro hiperimunes (RAW, et al, 1991; BIRGEL, 2004; MARTINS, 1995).

Após este marco de início na ciência brasileira, diversos métodos e alternativas foram buscados, para melhorar os processos desde o preparo do antígeno até a escolha dos animais e um manejo mais específico para esta atividade. Tal evolução nos levou a entender novas formas de imunizar e com o advento de novas técnicas para a detecção de imunoglobulinas as respostas individuais conseguem ser demonstradas de maneira mais clara.

A fim de se obter plasmas hiperimunes antiofídicos os equinos da fazenda São Joaquim localizada no município de Araçariguama-SP, são inoculados, ou seja, são expostos ao veneno de serpentes do gênero Bothrops, assim como em outros tipos de venenos. Na imunização de base de botrópico, onde o animal está entrando pela primeira vez em contato com o antígeno, são realizadas três injeções no subcutâneo na região dorsal, dois pontos do lado direito e um ponto do lado esquerdo com um volume de 2ml em cada ponto de aplicação (GUIDOLIN et al., 1989).

2 OBJETIVO

2.1 Objetivo geral

Avaliar a imunização base de nove equinos (prima imunização) quanto a sua efetividade por meio de testes laboratoriais para obter sua titulação de anticorpos.

2.2 Objetivo específico

- Determinar a titulação de anticorpos dos animais imunizados em cada etapa.
- Demonstrar a produção de anticorpos dos animais por gráfico, para saber em qual obteve mais efeito.
- Demonstrar através dos resultados quais estarão aptos a entrar no serviço Botrópico.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Equino

O equino é um mamífero que pertence à família Equidae e sua subespécie é a *Equus caballus*, a qual faz parte o cavalo doméstico. É um dos animais mais utilizados pelo homem, por conta da sua docilidade, tamanho, fácil manejo e criação (FLORIOS, 2017).

3.2 Acidentes Ofídicos

Os acidentes ofídicos são constantemente relatados nas áreas rurais, causando muitas vezes a morte dos animais de produção e dos seres humanos (SILVA & LOFEGO, 2006; SOUSA et al, 2011).

O acidente ofídico é o quadro de envenenamento resultante da inoculação intramuscular ou subcutânea de toxinas por meio do aparelho inoculador das serpentes. O envenenamento só acontece quando a serpente consegue injetar o conteúdo presente em suas glândulas venenosas (FUNASA, 2001). Nos equinos, a região mais afetada é sua cabeça, por conta da posição do animal ao se alimentar, mas outros membros também são acometidos, como membros torácicos, pélvicos e úbere (BICUDO et al, 2002).

No Brasil, as serpentes peçonhentas que causam mais acidentes ofídicos e de maior importância pertencem aos gêneros *Bothrops* (jararaca), *Micrurus* (Corais), *Crotalus* (Cascavéis) e *Lachesis* (Surucucus). Dentre elas a que mais se destaca pela maioria dos acidentes é a do gênero *Bothrops*, responsável por cerca de 80% a 90% dos casos em humanos (FUNASA, 2001). O veneno do gênero *Bothrops* possui uma complicada combinação de proteínas, carboidratos, lipídios, metais e aminoácidos, e sua ação é proteolítica, coagulante e hemorrágica, levando a um quadro de inflamação local, necrose e dano ao epitélio vascular (PEREIRA, 2006).

3.3 Defesas do organismo

A imunidade inata ou natural é assim nomeada porque está presente desde o nascimento dos seres humanos e animais, e não precisa ser criada através da exposição de um agente invasor. Ela reconhece um número limitado de substâncias de identificação nos agentes estranhos. Diferente da imunidade adquirida, não possui memória dos encontros, não se lembra de antígenos estranhos específicos e não oferece qualquer proteção contínua contra infecções futuras (DELVES, 2018).

Imunidade Adquirida não está presente desde o nascimento. É obtida à proporção que o sistema imunológico de um indivíduo se depara com substâncias estranhas como os antígenos, os componentes da imunidade adquirida desenvolvem a melhor maneira de atacá-los e começam a criar uma memória para cada um deles. A imunidade adquirida é também nomeada específica porque programa um ataque ao antígeno específico previamente encontrado (DELVES, 2018).

Uma molécula capaz de se ligar a um anticorpo é denominada de antígeno, possuem estruturas químicas que possibilitam mutualidade com anticorpos, por ligações não-covalentes (MURO et al., 2009)

Se um antígeno for inoculado em um animal, anticorpos capazes de se ligar a esses antígenos irão ser produzidos, efetuando assim sua destruição. Os anticorpos são específicos e se ligam aos antígenos que estimulam a sua produção (TIZARD, 2009). O sistema imune adquirido leva alguns dias para se tornar efetivo após o primeiro contato a um novo antígeno. Apesar do seu desenvolvimento mais lento, é um sistema extremamente eficaz (TIZARD, 2009).

No entanto, mais tarde, o antígeno é lembrado e a resposta seguinte àquele antígeno é mais rápida e eficiente relacionada à resposta que ocorreu após o primeiro contato (DELVES, 2018). O incentivo da resposta imune é conhecido como imunização que por sua vez se dá por repetidas imunizações experimentais utilizando antígenos que são inoculados no animal ou no homem gerando uma resposta (NUNES et al., 2008).

O curso cronológico da resposta humoral pode ser acompanhado através de amostras sanguíneas, coletada de um cavalo logo em seguida da inoculação de um antígeno específico. Após a realização da coleta, o sangue permanece em descanso

até ocorrer à coagulação e separação das hemácias e soro, em seguida o soro é removido. Cada vez que os anticorpos aparecem no soro, os níveis aumentam até alcançarem o pico, cerca de 10 a 20 dias após a inoculação.

No decorrer da primeira resposta, a quantidade de anticorpos formados e a proteção adquirida, são mínimas. Se uma segunda dose de antígeno for inoculada no mesmo cavalo e houver uma resposta humoral, a fase de latência demorará de 2 ou 3 dias e os níveis e anticorpos no soro aumentam rapidamente antes de diminuírem lentamente. Os anticorpos podem ser detectados por muitos meses ou anos após essa segunda inoculação, em uma terceira imunização com o mesmo antígeno dada ao mesmo animal terá uma resposta imune com um período de latência mais curto e uma resposta humoral ainda maior e mais duradoura (TIZARD,2009).

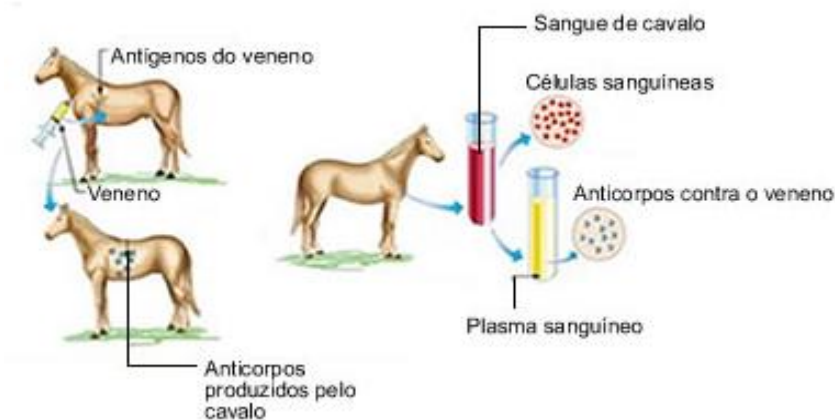


Figura 1- Processo de imunização (MORAES, 2019)

Na imunização ocorre o desenvolvimento da imunogenicidade que é a competência do antígeno de produzir resposta imunológica, e também ocorre a antigenicidade que é a habilidade da substância reagir com os anticorpos (ALOISI, 1979).

Os anticorpos são moléculas de glicoproteínas que também são conhecidas como imunoglobulinas e gamaglobulinas que tem a função de identificar, neutralizar e opsonizar antígenos, para que sejam fagocitados ou eliminados pelos macrófagos (MORAES, 2018).

As proteínas que constituem os anticorpos são formadas e secretadas por um glóbulo branco específico, chamado de linfócito B (plasmócitos). Quando o antígeno

que ameaça o corpo é reconhecido, rapidamente são produzidos os anticorpos para atacá-lo, dessa maneira, eles impedem a sua multiplicação, contribuindo com o sistema imunológico do corpo. Existem 5 tipos de isótipos de anticorpos mais comuns, que são eles IgG, IgE, IgD, IgM, IgA (JORGE, 2015).

A imunoglobulina M (IgM) é responsável pelo início da resposta contra antígenos, quando o indivíduo tem o primeiro contato com o mesmo, e possui uma função essencial na regulação da resposta imunológica (JORGE, 2015). É encontrada principalmente no sangue e em uma quantidade menor nas linfas e também é formada por células B-1 que estão na cavidade peritoneal e nos espaços pleurais. A IgM é a principal imunoglobulina em uma resposta primária, muito mais eficaz na ativação do sistema complemento, na opsonização, neutralização e na aglutinação (LOPES, 2015).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Descrição da escolha do grupo experimental

O trabalho foi realizado na Fazenda São Joaquim – Instituto Butantan, situada no município de Araçariçuama, localizada no Estado de São Paulo.

Foram selecionados nove equinos hípidos, machos, castrados, sem raça definida, pesando aproximadamente de 360 kg a 570 kg, criado em modelo semi extensivo, recebendo volumoso (3% PV) capim cost cross e ração comercial (0,5% PV) dividida em duas vezes ao dia, pasto e água a vontade. Os animais foram vermifugados com Febendazol. Assim entram em serviço para ter o primeiro contato com antígeno Botrópico.

O antígeno empregado na imunização foi o veneno de botrópico e os adjuvantes utilizados foram E.M.I (Emulsão múltipla incompleta) na primeira imunização e as seguintes imunizações foi utilizado o PBS (Tampão fosfato salina).

As matérias primas utilizadas para o levantamento de dados são o Pool botrópico que é composto pelo veneno de cinco espécies do gênero *Bothrops*: *B. jararaca*, *B. alternatus*, *B. jararacuçu*, *B. moojeni* e *B. neuwiedi*. Os materiais utilizados para preparação dos antígenos, luvas de procedimento descartável, avental descartável, toca descartável, máscara descartável, óculos de segurança, ponteiros esterilizadas, seringas de 10 ml descartável, agulhas 25x080, câmara de exaustão para preparação do antígeno, filtro com Membrana 0,45µm para filtragem do antígeno, béquer esterilizado, proveta esterilizada, gelo reciclável para manter a temperatura do antígeno, bastão de vidro esterilizado, agitador magnético.

Para realizar a sangria exploradora (colheita de sangue para verificação da titulação específica de anticorpos no soro do animal produtor) e posteriormente à imunização, os nove animais foram colocados no tronco que possui um corredor extenso da seção de obtenção de plasma hiperimune, a partir desse ponto foi realizada a tricotomia e antisepsia com iodo polvidona degermante e álcool 70% na pele para acessar a veia jugular de cada animal.

O primeiro passo foi coletar o sangue dos animais em todas as etapas a fim de mensurar a titulação de anticorpos, usando agulha exploradora e um tubo de ensaio sem anticoagulante (sangria exploradora). Ou seja, antes da primeira imunização que é o primeiro contato com o animal, e antes de iniciar a segunda e terceira inoculação, também é realizada a coleta de sangue, com isso obtemos uma base de dados para comparação dos resultados.

Após realizadas todas as etapas de imunizações, a sangria exploradora continua sendo realizada a fim de analisar se os animais mantiveram o desenvolvimento de anticorpos específicos. No total foram feitas seis sangrias, com intervalos variados, totalizando 38 dias de obtenção de dados.

As amostras coletadas ficaram no tubo de ensaio em repouso com o sangue de cada indivíduo, para ocorrer à sedimentação das hemácias e do soro, foi retirado o soro de cada amostra e foram processadas em tubos graduados com tampa de 2,5 ml (Eppendorf), em seguida foram encaminhadas ao laboratório para realização e obtenção dos resultados da titulação de anticorpos de cada indivíduo imunizado.

As coletas foram realizadas da seguinte forma, após cinco dias da primeira sangria foi realizado a 2º coleta (D35), depois de quatro dias a 3º coleta (D39), sete dias a 4º coleta (D46), mais sete dias a 5º coleta (D53) e outros oito dias a 6º coleta (D61) finalizando as coletas. E por fim o processamento dos exames para mensuração dos anticorpos dos animais no Teste de Elisa, chegando a um resultado quantitativo final.

Teste de Elisa é um ensaio imunoenzimático, colorimétrico, ligações antígeno-anticorpo e detecção, titulação e quantificação de anticorpos ou antígenos. Possui alta sensibilidade, detectam quantidades mínimas de anticorpos presentes na amostra, alta especificidade na detecção, teste de várias amostras e ensaio relativamente rápido.

Os materiais utilizados foram EPIs (Luvas, avental), placa 96 poços high-binding(Corning), micropipetas para medir os volumes indicados, material descartável, ponteiras, tubo para centrifuga, estufa a 37º C, papel absorvente, relógio alarme ou cronômetro, espectrofotômetro para leitura de placas.

5 RESULTADO

Uma vez que os animais permaneceram contidos em tronco, (figura 2), pode ser feito o processo de imunização, (Figura 3), e assim também foi possível realizar as coletas de sangue total e fracionamento em micro tubos plásticos 2,5ml (Figura 4).



Figura 2 - Tronco onde são realizados os processos de imunização e sangria(Arquivo pessoal)



Figura 3 – Inoculação do antígeno do gênero *Bothrops* no dorso do animal(Arquivo pessoal)

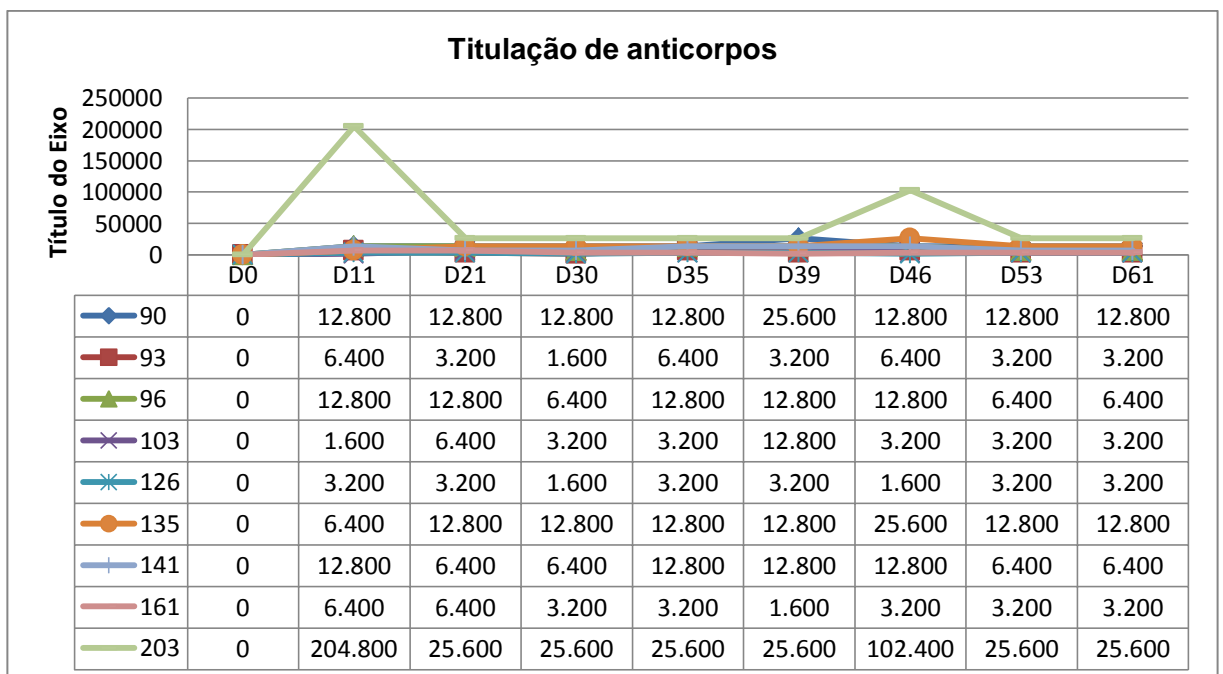


Figura 4 – Soros em Eppendorf (Arquivo pessoal)

Para ter uma avaliação quantitativa de anticorpos foi realizado o Teste de Elisa-Enzyme linked immuno sorbent assay que mensura a titulação de anticorpos.

O animal para ser considerado hiperimunizado deve seguir o padrão da Seção de Processamento de Plasma Hiperimune do Instituto Butantan. Podemos ver a dinâmica no gráfico 1.

Gráfico 1 - Comparativo individual das respostas entre animais



Conforme mostrado no gráfico 1, os animais 90, 96,135,141 e 203 mantiveram uma resposta imunológica constante, tornando-os mais favoráveis e foram os que desenvolveram uma imunização desejada e efetiva.

Os animais antes de serem imunizados tinham uma média de anticorpos de ≤ 1.600 , antes das imunizações seguintes.

A partir do gráfico 1 podemos analisar que os animais obtiveram uma boa resposta imunológica com valores ≥ 1.600 g/dL este fato precisa ser bem entendido, uma vez que o N é baixo, podendo haver uma forte correlação com a resposta individual dos animais.

O fator idade, com animais jovens pode também ter grande influencia, uma vez que nunca foram imunizados e por isso o sistema imune não conhecia uma resposta específica a um agente nunca sensibilizado.

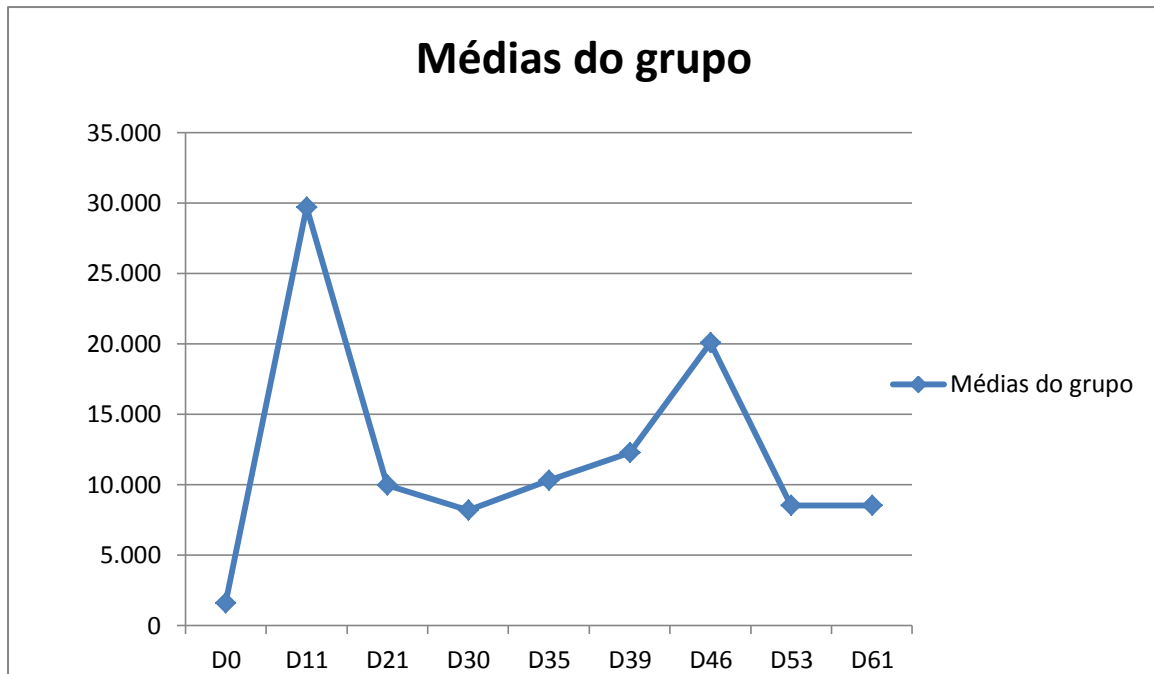
Conforme o gráfico 1 observamos que antes do animal receber a imunização a sua titulação era inferior a de um animal imunizado ≤ 1.600 g/dL. Vale ressaltar que não significa que o animal não tenha as imunoglobulinas totais, mas antes de ser realizada a primeira imunização os animais não tinham a imunoglobulina específica contra o veneno anti-botrópico.

Fator que pode estar relacionado ao esquema de imunização, os estímulos para animais nunca imunizados poderiam ser maiores na primeira imunização.

Todos os animais que foram submetidos à imunização, conseguiram atingir um nível de imunoglobulinas específicas ≥ 1.600 g/dL, sendo considerados por tanto hiperimunizados. Porém, quatro equinos não obtiveram valores constantes de imunoglobulinas específicas.

Se analisarmos os animais em bloco, podemos avaliar o seguinte perfil, na tabela 2:

Tabela 2 - Média aritmética do pool de plasmas



O gráfico demonstra que a uma oscilação tendendo a picos em 10 dias após a primeira imunização, em D30 a primeira coleta ocorre com a curva ainda em ascensão, e continua aumentando em D35 e D39 voltando a fazer pico em D46, e em D53 nos temos uma queda seguido de platô em D61, que demonstra uma viabilidade de coleta a partir de D35, se pensarmos em plasmas hiperimunes.

6 DISCUSSÃO

Segundo Cardoso; Yamaguchi; Silva (2003), os soros antiofídicos são produzidos com base nos métodos originalmente descritos. Equinos são imunizados com venenos de uma ou mais espécies de animais peçonhentos que possuem importância médica. Esses animais apresentam em seu soro anticorpos que tem capacidade de neutralizar a toxina dos venenos. Para que se tenha uma neutralização desejada dos efeitos tóxicos de um veneno animal, o soro precisa conter anticorpos dirigidos contra as principais toxinas de ação sistêmica e local. Portanto é de grande importância selecionar os antígenos para serem usados na imunização dos animais a fim de se obter produtos ativos.

Conforme refere às normas de Produção e Controle de Qualidade dos Soros Antiofídicos, BRASIL (1996), “o soro antiofídico é uma solução de imunoglobulinas específicas purificadas, obtidas a partir de plasma de equídeos hiperimunizados, contra o veneno da espécie a que se refere”.

Os cavalos soroprodutores utilizados para o levantamento de dados tem três anos de idade e possuem em média de 360 a 570 quilos , segundo GUIDOLIN et al., (1989) cita que os equinos utilizados para imunização tinham de um a um ano e meio, e pesavam por volta de 110 a 150 quilos.

Todos os nove animais estavam com titulação $\leq 1.600\text{g/dL}$ antes de ocorrer à primeira imunização. Após alguns ciclos os animais já adquiriram uma hiperimunização, mas só cinco equinos mantiveram uma constância na titulação de anticorpos, os outros quatro atingiram a hiperimunização, mas não mantiveram uma constância de titulação.

Os animais que não titularam bem, encontramos como possível justificativa da oscilação de produção de anticorpos, fatores nutricionais, que afetam o metabolismo, que possivelmente interferiram no resultado da imunização para esses quatro equinos, segundo SCALAMANDRÉ (2006) os cavalos soroprodutores da fazenda São Joaquim recebem uma alimentação de concentrados com 22% de proteína bruta, pois acredita-se que administrando um concentrado hiperprotéico estes animais apresentariam um bom desempenho na produção de anticorpos e melhor recuperação após os ciclos de imunização . Portanto, essa categoria de animais necessita de uma dieta rica e balanceada com uma adequada concentração

de proteínas para que não aconteça uma sobrecarga funcional hepática ou renal, levando a desenvolver problemas nutricionais.

Um exemplo disso é o equino de número 203, no início das imunizações pesava 360 quilos e no final o peso foi para 353 quilos.

Outro fator que pode ter influenciado na oscilação de produção de anticorpos nesses quatro equinos é o estresse quando eram manejados , segundo Calviello (2013) o relacionamento entre o homem e animais , em sistemas de produção, em que existe o contato entre ambos, pode gerar implicações no bem-estar e na produtividade desses animais.

7 CONCLUSÃO

Foi possível concluir que, dos nove animais selecionados todos conseguiram desenvolver anticorpos específicos suficientes, de acordo com o teste de ELISA, atingindo assim a hiperimunização para entrar no programa.

Alguns desses animais não mantiveram uma resposta imunológica constante, são eles identificados com os números 93, 103,126 e 161, o que não é favorável, pois um pico de imunoglobulina e depois um possível declínio pode interferir na qualidade final do soro, por isso o ideal é uma resposta imunológica constante, conforme ocorreu nos animais identificados com os números 90, 96, 135,141 e 203.

Referências

ALOISI, R.M. *Principles of Immunodiagnosics*. The C.V. Mosby Company. St. Louis, 1979. P. 47- 52.

BICUDO, P. L. In: Radostits, O. M.; Gay, C. C., Blood, D. C., Hinchcliff, K. W. Clínica Veterinária – **Um Tratado de doenças dos bovinos, ovinos, suínos, caprinos e equinos**. 9 ed. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara Koogan. 2002. p. 1543- 1546.

BIRGEL, E.H. (2004) O ensino da Medicina Veterinária em São Paulo. **INFOVET**-Informativo da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia- USP, v. 12, nº88, p.7 – 8.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria no 174, de 11 de novembro de 1996. Aprova as Normas de Produção e Controle de Qualidade dos Soros Antiofídicos, Antitóxicos e Anti-Rábico. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Poder Executivo, Brasília, DF, 12 nov. 1996. Disponível em: Acesso em: 22 dez. 2012.

CALVIELLO, Raquel Ferrari. **Avaliação da reatividade de equinos durante o manejo e na presença de estímulo desconhecido**. 2013. 77 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Pirassununga, 2013.

CARDOSO, D. F.; YAMAGUCHI, I. K.; SILVA, A. M. M. Produção de soros antitoxinas e perspectivas de modernização por técnicas de biologia molecular. In: CARDOSO, J. L. C. et al. Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes. São Paulo: Sarvier, 2003. p. 367 – 379.

DELVES, Peter J.. **Imunidade inata**. 2018. Disponível em: <<https://www.msmanuals.com/pt-br/casa/doen%C3%A7as-imunol%C3%B3gicas/biologia-do-sistema-imunol%C3%B3gico/imunidade-inata>>. Acesso em: 08 ago. 2018.

FLORIOS, Daia. **TUDO SOBRE CAVALOS – CURIOSIDADES, RAÇAS E MUITO MAIS**. 2017. Disponível em: <<https://www.greenme.com.br/informar-se/animais/5960-cavalos-curiosidades-racas>>. Acesso em: 19 out. 2017.

GUIDOLIN, Rosalvo et al. **HIPERIMUNIZAÇÃO DE CAVALOS SOROPRODUTORES COM VENENOS BOTRÓPICOS E CROTÁLICO TRATADOS POR GLUTARALDEIDO. Memorial do Instituto Butantan**. São Paulo, p. 85-90. 16 maio 1989.

JORGE, Juliano José. Selective IgM deficiency: case report. **Brazilian Journal Of Allergy And Immunology (bjai)**, [s.l.], v. 3, n. 6, p.1-1, 2015. GN1 Genesis Network. <http://dx.doi.org/10.5935/2318-5015.20150030>.

LOPES, Priscila Diniz. **Anticorpos e Imunoglobulinas: propriedades e estrutura básica da molécula do anticorpo. Principais propriedade físico-químicas e biológicas das moléculas de anticorpo**. 2015. Disponível em:

<<http://www.fcav.unesp.br/Home/departamentos/patologia/HELIOJOSEMONTASSIER/aula-4--anticorpos-e-imunoglobulinas.pdf>>. Acesso em: 28 mar. 2015.

MARTINS, E. O.; **Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo**. Edição do Autor, São Paulo – SP (1995).

MORAES, Paula Louredo. **Anticorpos**. 2018. Disponível em: <<https://mundoeducacao.bol.uol.com.br/biologia/anticorpos.htm>>. Acesso em: 26 nov. 2018.

MORAES, Paula Louredo. **Soro antipeçonhento**. Disponível em: <<https://mundoeducacao.bol.uol.com.br/biologia/soro-antipeconhento.htm>>. Acesso em: 26 jan. 2019.

MURO, Luis Fernando Ferreira et al. Relação Antígeno-Anticorpo. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, Garça - Sp, v. 12, n. 7, p.1-4, jan. 2009. Semestral.

NUNES, Marcus Vinicius O. et al. COMPARAÇÃO DO PERFIL DE ANTICORPOS ANTI-IMUNOGLOBULINA G EM MURINOS IMUNIZADOS COM IGG HUMANA ASSOCIADA A DIFERENTES ADJUVANTES. **Revista Eletrônica de Farmácia**, Goiânia, v. 6, p.44-50, 15 dez. 2008. Mensal.

PEREIRA, M. T. **Acidente botrópico em cães**. 2006. 46f. Tese de Conclusão de Curso (Especialização em Clínica Médica e Cirúrgica em Pequenos Animais) – Universidade Castelo Branco – Campo Grande, MS.

RAW, I.; GUIDOLIN, R.; HIGASHI, H.G.; KELEN, E. M.A. Antivenins in Brazil: Preparation. 1991. P.557-81. In TU,A.T. **Reptile Venoms and Toxins**. V.5

SILVA, E.R.O. & LOFEGO, A.C. **Acidentes ofídicos na região de São Jose do Rio Preto**, SP. *Revista Unorp*. 2006. v.13, p.127-133.

SOUSA, G. M., TOKARNIA, C. H., BRITO, M. F., REIS, A. B., OLIVEIRA, C. M., FREITAS, N. F., OLIVEIRA, C. H., BARBOSA, J. D.. **Aspectos clínicos-patológicos do envenenamento botrópico experimental em equinos**. *Pesq. Vet. Bras*. 2011. v. 31(9). p. 773-780.

SCALAMANDRÉ, Patrícia Stocco Betiol. **Avaliação bioquímica clínica de equinos soroprodutores da Fazenda São Joaquim do Instituto Butantan, submetidos à alimentação com concentrado comercial ou hiperprotéico**. 2006. 120 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Medicina Veterinária e Zootecnia, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

TIZARD, Ian R.. A defesa do organismo. In: TIZARD, Ian R.. **IMUNOLOGIA VETERINÁRIA UMA INTRODUÇÃO**. 8. ed. College Station, Texas: Elsevier, 2009. Cap. 1. p. 1-10.