FELIPE RAIMONDI GUIDOLIN

**REAVALIAÇÃO DO MÉTODO DE PRODUÇÃO DO SORO
ANTICROTÁLICO**

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Imunologia do Instituto de
Ciências Biomédicas da
Universidade de São Paulo, para
obtenção do Título de Mestre em
Ciências.

São Paulo
2013

FELIPE RAIMONDI GUIDOLIN

**REAVALIAÇÃO DO MÉTODO DE PRODUÇÃO DO SORO
ANTICROTÁLICO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Imunologia

Orientador: Prof. Dr. Wilmar Dias da Silva

Versão original

São Paulo
2013

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

© reprodução total

Guidolin, Felipe Raimondi.

Reavaliação do método de produção do soro anticrotálico / Felipe Raimondi Guidolin. -- São Paulo, 2013.

Orientador: Prof. Dr. Wilmar Dias da Silva.

Tese (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Imunologia. Área de concentração: Imunologia. Linha de pesquisa: Venenos de origem animal e anticorpos.

Versão do título para o inglês: Reevaluation of the crotalic antiserum production method.

1. Imunologia 2. Imunização passiva 3. Venenos de origem animal
4. Anticorpos 5. Serpentes 6. Soros I. Dias da Silva, Prof. Dr. Wilmar II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Imunologia III. Título.

ICB/SBIB054/2013

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Felipe Raimondi Guidolin.

Título da Dissertação: Reavaliação do método de produção do soro anticrotálico.

Orientador(a): Prof. Dr. Wilmar Dias da Silva.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**,
em sessão pública realizada a/...../....., considerou

☐ **Aprovado(a)**

☐ **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

Aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais do Instituto Butantan (CEIAIB)

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
INSTITUTO BUTANTAN

Av. Vital Brazil, 1500, CEP 05503-900, São Paulo, SP, Brazil
Telefone: (55) (011) 3726-7222 ramal 2106 - Fax: (55) (011) 3726-1505

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Reavaliação do Método de Produção de Soro-Anticrotálico" **protocolo nº 790/11**, sob a responsabilidade de Wilmar Dias da Silva e Felipe Raimondi Guidolin, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DO INSTITUTO BUTANTAN (CEUAIB) em reunião de 10/02/2011.

We certify that the research entitled "Reavalaution of the anti-Crotalic serum production method", **protocol nº 790/11**, under the responsibility of Wilmar Dias da Silva and Felipe Raimondi Guidolin, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Research, adopted by the Brazilian College of Animal Experimentation, and was approved by the ETHICAL COMMITTEE FOR ANIMAL RESEARCH of BUTANTAN INSTITUTE in the meeting of 02/10/2011.

Vigência do Projeto: 02/2011 – 01/2013	Nº de animais/espécie
Laboratório de Imunoquímica	160 camundongos Balb/c Fêmeas

São Paulo, 11 de fevereiro de 2011.

Dra. Denise V. Tambourgi
Presidente da CEUAIB

*Aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais do Instituto de Ciências Biomédicas
da Universidade de São Paulo (CEUA-ICB/USP)*

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP Brasil
Telefone : (55) (011) 3091.7733 – e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **001** nas fls. **98** do livro **02** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a)) **Wilmar Dias da Silva**, Coordenador(a) da Linha de pesquisa "*Reavaliação do método de produção do soro anti-crotálico*" do qual participam o(s) alunos **Felipe Raimondi Guidolin** e os pesquisadores **Denise Vilarinho Tambourgi**, **Fabio Magnoli**, **Rosalvo Guidolin**, **José Roberto Marcelino**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela **COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA)** em **12.08.2011**, com validade de **3 anos**.

São Paulo, 18 de agosto de 2011.

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador
CEUA - ICB/USP

Prof. Dr. ARIEL MARIANO SILBER
Secretário
CEUA – ICB/USP

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
INSTITUTO BUTANTAN

Av. Dr. Vital Brazil, 1500, CEP 05503-900, São Paulo, SP, Brazil
Telefone: (55) (011) 3726-7222 ramal 2163 - Fax: (55) (011) 3726-1505

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "Reavaliação do Método de Produção de Soro Anticrotálico", **protocolo nº 790/11**, sob a responsabilidade de Wilmar Dias da Silva e Felipe Raimondi Guidolin- que envolve a criação e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica - está de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto 6.899, de 15 de julho de 2009 e de normas complementares, bem como está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DO INSTITUTO BUTANTAN (CEUAIB) em reunião de 04/08/2011.

We certify that the research entitled "Reevaluation of the anti-Crotalic serum production method", **protocol number 790/11**, under the responsibility of Wilmar Dias da Silva and Felipe Raimondi Guidolin- which involves the breeding and/or use of animals belonging to phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research - is in agreement with Brazilian laws for use of experimental animals and the Ethical Principles in Animal Research adopted by the Brazilian College of Animal Experimentation, and was approved by the ETHICAL COMMITTEE FOR ANIMAL RESEARCH of BUTANTAN INSTITUTE in the meeting of August 04, 2011.

Vigência do Projeto:	Nº de animais/espécie	OBSERVAÇÃO
02/2011 - 01/2013 Laboratório de Imunoquímica	55 Camundongos/ Swiss (F)	Troca de linhagem - Saldo remanescente para camundongos Swiss

São Paulo, 16 de agosto de 2011.

Dr. Marcelo L. Santoro
Coordenador da CEUAIB

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
INSTITUTO BUTANTAN

Av. Dr. Vital Brazil, 1500, CEP 05503-900, São Paulo, SP, Brazil
Telefone: (55) (011) 2627-9585 - Fax: (55) (011) 2627-9505
ceuaib@butantan.gov.br

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "Reavaliação do Método de Produção de Soro-Anticrotálico", **protocolo nº 790/11**, sob a responsabilidade de Wilmar Dias da Silva e Felipe Raimondi Guidolin - que envolve a criação e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica - está de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto 6.899, de 15 de julho de 2009 e de normas complementares, bem como está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DO INSTITUTO BUTANTAN (CEUAIB) em reunião de 11/4/12.

We certify that the research entitled "Reavalaution of the anti-Crotalic serum production method", **protocol number 790/11**, under the responsibility of Wilmar Dias da Silva and Felipe Raimondi Guidolin - which involves the breeding and/or use of animals belonging to phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research - is in agreement with Brazilian laws for use of experimental animals and the Ethical Principles in Animal Research adopted by the Brazilian College of Animal Experimentation, and was approved by the ETHICAL COMMITTEE FOR ANIMAL RESEARCH of BUTANTAN INSTITUTE in the meeting of 4/11/12.

Vigência do Projeto: 02/2011 - 01/2013	Nº de animais/espécie	Observações
Laboratório de Imunoquímica	55 camundongos Swiss (F) 140 camundongos Swiss (M)	Adição de animais

São Paulo, 18 de abril de 2012

Dr. Marcelo L. Santoro
Coordenador da CEUAIB

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente à banca examinadora, pelo tempo, energia e dedicação na avaliação desse manuscrito e da minha defesa.

À banca de qualificação, pela correção e avaliação do manuscrito.

Ao meu orientador, prof. Dr. Wilmar Dias da Silva, por ter me aceitado como seu aluno e compartilhado a sua experiência e conhecimento.

Ao pesquisador Fábio Magnoli, do Laboratório de Imunoquímica, Instituto Butantan, pela cromatografia do veneno de *C. d. terrificus*.

À Dra. Giselle Pidde Queiroz pela realização dos testes de atividade fosfolipásica e *dot blotting* realizados com as frações do veneno crotálico obtidas após a cromatografia, apresentados nesse manuscrito.

Aos outros membros participantes desse projeto, Dra. Denise Vilarinho Tambourgi, diretora do Laboratório de Imunoquímica do Instituto Butantan, e Dr. José Roberto Marcelino, da Seção de Produção de Soros Hiperimunes do Instituto Butantan.

Ao meu amigo e colega, Dr. Daniel Manzoni, pelo auxílio na elaboração desse manuscrito.

Aos meus colegas de laboratório e funcionários do Instituto Butantan pela ajuda prestada durante a execução desse projeto.

À Mônica e a equipe de apoio da Biblioteca do Instituto de Ciências Biológicas.

À Maria Eni e Secretaria da Pós-Graduação do Departamento de Imunologia.

Gostaria de agradecer especialmente ao Dr. Rosalvo Guidolin (*in memoriam*), por ter me iniciado na carreira científica e por ter sido o melhor exemplo de pesquisador, homem e pai de família que eu poderia querer.

RESUMO

GUIDOLIN, F. R. **Reavaliação do método de produção do soro anticrotático**. 2013. 70 f. Dissertação (Mestrado em Imunologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

O gênero *Crotalus* é representado no Brasil por uma espécie, *Crotalus durissus*, e cinco subespécies: *C. d. terrificus*, *C. d. collilineatus*, *C. d. cascavella*, *C. d. marajoensis* e *C. d. ruruima*. O grupo contribui com cerca de 7,7% dos acidentes ofídicos anuais no Brasil, e apresenta a letalidade mais elevada (1,8%). O veneno crotático apresenta quatro componentes principais: crotoxina, crotamina, giroxina e convulsina. A crotoxina é formada por duas sub-unidades, fosfolipase A₂ (PLA₂), enzimaticamente ativa, e crotapotina, um carreador, e é responsável pelos efeitos neurotóxicos e miotóxicos observados nas vítimas de acidente. O único tratamento específico disponível atualmente é a soroterapia heteróloga. Os anticorpos produzidos pelos métodos atuais são gerados através da imunização de animais soroprodutores com veneno crotático *in natura*, e, dessa forma, irão reconhecer todas as proteínas presentes no veneno, independente do papel e/ou importância desses componentes no contexto do acidente humano. Dada a importância epidemiológica das serpentes *Crotalus* e a necessidade da atualização da metodologia de soroprodução, nós resolvemos investigar novas estratégias de imunização no sentido de direcionar a produção de anticorpos contra as frações de maior toxicidade do veneno, a crotoxina e seu componente PLA₂. Nós utilizamos 6 cavalos adultos como animais soroprodutores, divididos em três grupos experimentais: Grupo 1 (imunizado com 500 µg/animal de veneno *in natura* de *C. d. terrificus*), Grupo 2 (imunizado com 200 µg/animal de crotoxina) e Grupo 3 (imunizado com 100 µg/animal de PLA₂). Os plasmas hiperimunes obtidos foram analisados por testes padrões (*western blotting*, ELISA, determinação da afinidade e soroneutralização *in vivo*) contra diferentes antígenos crotáticos (venenos de *C. d. terrificus*, *C. d. collilineatus*, *C. d. cascavella*, e componentes crotoxina e PLA₂) e comparados com plasmas e soros anticrotáticos produzidos atualmente pelo Instituto Butantan pela metodologia tradicional (5,0 mg/animal de uma mistura 1:1 de veneno de *C. d. terrificus* e *C. d. collilineatus*). Os resultados obtidos mostram o reconhecimento cruzado entre o veneno das diferentes *Crotalus*, apresentado por todos os antivenenos utilizados, reflexo da similaridade entre o veneno das diferentes espécies e sugerindo uma utilização ampla dos antivenenos crotáticos desenvolvidos no âmbito do território nacional. Os antivenenos produzidos pelo Instituto Butantan apresentaram, de forma geral, os títulos e atividade neutralizante mais elevada, apesar de não serem específicos contra os componentes de maior toxicidade e reconhecerem outros compostos presentes no veneno. Foi possível observar também que os anticorpos gerados a partir da imunização com os crotoxina e PLA₂ apresentaram maior especificidade pelos seus respectivos compostos nos venenos testados. Entre os grupos experimentais, o Grupo 2 apresentou os títulos mais elevados, e a maior atividade neutralizante *in vivo*. O Grupo 1 apresentou os piores resultados, sugerindo que o veneno de *C. d. terrificus* seria um imunógeno ineficiente.

Palavras-chave: *Crotalus*. Anticorpos. Soroterapia. Crotoxina. Fosfolipase A₂.

ABSTRACT

GUIDOLIN, F. R. **Reevaluation of the crotalic antiserum production method.** 2013. 70 p. Masters thesis (Immunology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

The *Crotalus* genus is represented in Brazil by a single species, *Crotalus durissus*, and five sub-species: *C. d. terrificus*, *C. d. collilineatus*, *C. d. cascavella*, *C. d. marajoensis* and *C. d. ruruima*. The group contributes with 7.7% of the annual ophidic accidents in Brazil, and has the highest lethality (1.8%). The crotalic venom has four major components: crotoxin, crotamine, gyroxin and convulxin. Crotoxin is formed by two sub-units, phospholipase A₂ (PLA₂), enzymatically active, and crotapotin, a carrier protein, and it is responsible for the neurotoxic and myotoxic effects shown by the snakebite victims. The only specific treatment available today is the serum therapy with heterologous antibodies. These antibodies are produced by the immunization of animals against crotalic venom *in natura*, and therefore capable of recognizing all proteins present in the venom, regardless of the relevance of those proteins in the context of the human accident. Given the epidemiologic importance of the *Crotalus* snakes and the need of updating the serum production methods, we decided to investigate new immunizations strategies focusing in orientating the immune response against the most toxic fractions of the venom, crotoxin and its PLA₂ component. We used six adult horses as serum producers, divided in three groups: Group 1 (immunized with 500 µg/animal of *C. d. terrificus* venom), Group 2 (immunized with 200 µg/animal of crotoxin) and Group 3 (immunized with 100 µg/animal of PLA₂). The hiperimmune plasmas obtained were analyzed by standart immunochemical tests (western blotting, ELISA, affinity determination, serum neutralization *in vivo*) against different crotalic antigens (venoms from *C. d. terrificus*, *C. d. collilineatus*, *C. d. cascavella*, and components crotoxin and PLA₂) and compared with antivenoms currently produced by Instituto Butantan (animals immunized with 5 mg/animal of a 1:1 antigen mixture of *C. d. terrificus* and *C. d. collilineatus* venom). The results show cross-recognition of all *Crotalus* venoms by the antivenoms, reflecting the similarity in their composition, and suggesting that the crotalic antivenoms can be widely used inside the national territory. The antivenoms produced by Instituto Butantan showed higher titers and neutralization capacity, although they were not specific against the components of higher toxicity present in the venom. Antibodies generated from immunization with crotoxin and PLA₂ showed a greater specificity against their respective antigens in the venoms tested. Between the experimental groups, Group 2 showed the highest titers and neutralizing potency *in vivo*. Group 1 showed the lowest scores, suggesting that venom from *C. d. terrificus* alone is an inefficient immunogen.

Keywords: *Crotalus*. Antibodies. Serum therapy. Crotoxin. Phospholipase A₂.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	13
1.1 <i>Biologia das serpentes do gênero <u>Crotalus</u>.....</i>	13
1.2 <i>Acidentes por serpentes do gênero <u>Crotalus</u>.....</i>	14
1.3 <i>O veneno das serpentes do gênero <u>Crotalus</u>.....</i>	15
1.4 <i>Soroterapia e antivenenos.....</i>	16
1.5 <i>Novas estratégias.....</i>	17
2 OBJETIVOS.....	19
2.1 <i>Objetivo geral.....</i>	19
2.2 <i>Objetivos específicos.....</i>	19
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	20
3.1 <i>Reagentes utilizados.....</i>	20
3.2 <i>Quantificação de proteínas.....</i>	20
3.3 <i>Venenos.....</i>	21
3.4 <i>Isolamento de crotoxina e PLA₂ a partir do veneno de <u>C. d. terrificus</u>.....</i>	21
3.5 <i>Avaliação da atividade fosfolipásica e reconhecimento por dot blotting com anticorpos anti-crotoxina.....</i>	21
3.6 <i>Preparação os antígenos e esquema de imunização.....</i>	22
3.7 <i>Antivenenos.....</i>	23
3.8 <i>Processamento do antiveneno comercial.....</i>	24
3.9 <i>Eletroforese e western blotting.....</i>	24
3.10. <i>Quantificação dos anticorpos.....</i>	25
3.11. <i>Determinação da afinidade dos anticorpos.....</i>	26
3.12 <i>Determinação da LD₅₀ do veneno de <u>C. d. terrificus</u>, e ensaio de soroneutralização in vivo.....</i>	27
3.13 <i>Análise estatística.....</i>	28
4 RESULTADOS.....	29
4.1 <i>Perfil cromatográfico do veneno de <u>C. d. terrificus</u> e isolamento da crotoxina e fosfolipase A₂.....</i>	29
4.2 <i>Perfil eletroforético dos diferentes antígenos crotálicos.....</i>	31
4.3 <i>Reconhecimento de diferentes antígenos crotálicos pelo soro produzido pelo Instituto Butantan.....</i>	33

<i>4.4 Reconhecimento de diferentes antígenos crotálicos pelo plasma hiperimune produzido pelo Instituto Butantan.....</i>	34
<i>4.5 Reconhecimento de diferentes antígenos crotálicos pelo plasma do Grupo Experimental 1.....</i>	35
<i>4.6 Reconhecimento de diferentes antígenos crotálicos pelo plasma do Grupo Experimental 2.....</i>	36
<i>4.7 Reconhecimento de diferentes antígenos crotálicos pelo plasma do Grupo Experimental 3.....</i>	37
<i>4.8 Titulação dos antivenenos.....</i>	38
<i>4.9 Avaliação da afinidade dos antivenenos pelo veneno de <u>C. d. terrificus</u>, crotoxina e PLA₂.....</i>	41
<i>4.10 DL₅₀ e ensaio de soroneutralização in vivo.....</i>	42
<i>4.11 Atividade específica.....</i>	44
5 DISCUSSÃO.....	46
6 CONCLUSÕES.....	51
7 EXPECTATIVAS.....	52
REFERÊNCIAS.....	53
APÊNDICE – Artigo completo publicado em periódico.....	59

1 INTRODUÇÃO

1.1 Biologia das serpentes do gênero *Crotalus*

As serpentes do gênero *Crotalus*, popularmente conhecidas como cascavéis, possuem como característica mais marcante a presença de um “guizo” epidérmico na porção terminal da cauda, que é usado para alertar outros animais de sua presença. São serpentes tipicamente associadas aos ambientes áridos, e a sua coloração parda com padrão de diamantes dorsal permite que se camuflem facilmente no terreno. São predadores de emboscada, possuem hábitos noturnos e se alimentam principalmente de roedores e pequenos mamíferos (**Figura 1**) (MELGAREJO, 2003).

Figura 1 – Exemplar de *Crotalus durissus* ssp.

Fonte: Melgarejo (2003).

Nas Américas, existem cerca de 70 representantes diferentes de *Crotalus*, (CAMPBELL; LAMAR, 2004). O Brasil apresenta uma única espécie, *Crotalus durissus*, com cinco sub-espécies: *C. d. terrificus* (presente nas regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste), *C. d. collilineatus* (regiões Sudeste e Centro-Oeste), *C. d. cascavella* (região Nordeste), *C. d. marajoensis* (restrita à ilha de Marajó) e *C. d. ruruima* (restrita à Roraima) (**Figura 2**). A proximidade taxonômica é refletida no veneno desses animais, que possuem composição, atividade enzimática e doses letais similares

(BOLDRINI-FRANÇA et al., 2010; RANGEL-SANTOS et al., 2004; SANTORO et al., 1999).

Figura 2 - Distribuição das serpentes *Crotalus* no Brasil.

Fonte: Modificado de Brasil (1998).

1.2 Acidentes causados por serpentes do gênero Crotalus.

Serpentes *Crotalus*, no Brasil, contribuem com 7,7% dos acidentes ofídicos anuais, cerca de 5.000 casos, e apresentam índice de letalidade de 1,8%. O gênero é o segundo maior causador de acidentes (*Bothrops*, 73%; *Lachesis*, 1%; *Micrurus*, 0,3%) e apresenta o índice de letalidade mais alto (*Bothrops*, 0,3%; *Lachesis*, 0,9%; *Micrurus*, 0,4%) (BRASIL, 1998). Regionalmente, são responsáveis por 20% das notificações no estado de São Paulo (BOCHNER; STRUCHINER, 2002).

Vítimas de acidente crotálico exibem efeitos neurotóxicos e miotóxicos. Entre os efeitos neurotóxicos podemos citar ptose palpebral, parestesia dos músculos faciais (“face miastênica”), oftalmoplegia e paralisia progressiva dos músculos respiratórios. Os efeitos miotóxicos incluem dor muscular difusa, mioglobínúria, e valores séricos aumentados de creatinoquinase (CK), lactato desidrogenase (LDH), aspartato

aminotransferase (AST) e aldolase. A insuficiência renal aguda (IRA) é o sintoma sistêmico mais importante e a principal causa de óbito. Não há presença de edema nem dor no local da picada (AZEVEDO-MARQUES; HERING; CUPO, 2003).

1.3 O veneno das serpentes do gênero *Crotalus*

O veneno crotálico é, assim como os demais venenos animais, uma mistura complexa de diferentes substâncias. Quatro componentes se destacam: a crotamina, a giroxina, convulxina e a crotoxina. A crotamina foi isolada como uma proteína a partir do veneno de *C. d. terrificus* (GONÇALVES, 1959), e possui características biológicas e bioquímicas similares às miotoxinas (BIEBER; NEDELKOV, 1970), tendo massa molecular de aproximadamente 5 kDa (KARLSSON, 1979). A giroxina foi inicialmente descrita por Barrio (1961) e isolada a partir do veneno de *C. d. terrificus* (BARRABIN et al., 1978), possuindo massa molecular de cerca de 35 kDa (SEKI; VIDAL; BARRIO, 1980). Essa toxina foi identificada pela sua propriedade de induzir a perda de equilíbrio em camundongos, seguido de revoluções do corpo no eixo longitudinal (“rolamento em barril”). A convulxina é uma glicoproteína com cerca de 70 kDa (MARLAS, 1985), capaz de agregar e promover a lise de plaquetas (SANO-MARTINS; DAIMON, 1992). A crotoxina foi isolada pela primeira vez a partir do veneno da *C. d. terrificus* (SLOTTA; FRAENKEL-CONRAT, 1938), e representa cerca de 50% a 70% do peso seco do veneno total. Ela é formada por duas sub-unidades ligadas de maneira não-covalente, a crotoxina A ou crotapotina (CA), não catalítica, e a crotoxina B (CB), uma fosfolipase A₂ (PLA₂), catalítica. A crotapotina é um polipeptídeo sem atividade enzimática detectada (HARRIS, 1991) e funciona como uma carreadora, potencializando a toxicidade da PLA₂ em 35 vezes. A PLA₂ é um polipeptídeo de cadeia simples formado por 123 resíduos de aminoácidos, que se liga à receptores de membrana pré-sinápticos, inibindo a liberação de acetilcolina e promovendo o bloqueio neuromuscular (MARLAS; BON, 1982). A imunização de camundongos com pequenas quantidades de PLA₂ purificada e veneno de *C. d. terrificus* resulta na produção de anticorpos anti-PLA₂ capazes de reagir e neutralizar tanto a enzima isolada como o veneno crotálico *in natura* (DOS SANTOS et al., 1988), e cavalos imunizados com PLA₂ tornam-se protegidos ao desafio com doses letais do veneno bruto (DOS SANTOS et al., 1989).

A crotoxina é a componente majoritário do veneno crotálico. Induz efeitos classicamente descritos, como neurotoxicidade (VITAL BRAZIL, 1966), nefrotoxicidade (HADLER; VITAL BRAZIL, 1966), miotoxicidade (BREITHAUP, 1976) e cardiotoxicidade (SANTOS et al., 1990). Recentemente também foram atribuídas a ela efeitos imunossupressores (CARDOSO; MOTA, 1997), anti-inflamatórios (SAMPAIO et al., 2003) e analgésicos (ZHANG et al., 2006). Uma revisão detalhada dos diferentes efeitos da crotoxina foi realizada por Sampaio et al. (2010). As evidências apresentadas na literatura apontam fortemente para a crotoxina como a responsável pelos efeitos clínicos observados nos acidentes graves e na progressão para o óbito. Essa constatação é corroborada por experimentos nos quais a neutralização específica da crotoxina resultou em sobrevida dos animais experimentais e proteção contra os efeitos tóxicos do veneno (BEGHINI et al., 2004; FREITAS; FORTES-DIAS; DINIZ, 1990; OSHIMA-FRANCO et al., 1999).

1.4 Soroterapia e antivenenos

O principal tratamento específico disponível atualmente para o acidente crotálico, e para acidentes com demais serpentes, é a soroterapia heteróloga, desenvolvida sobre fundações criadas há mais de 100 anos. Wücherer (1867) foi o primeiro a sugerir que o próprio envenenamento poderia levar à imunidade, de modo semelhante à “profilaxia” obtida com a varíola, e suas idéias foram comprovadas por Sewall (1887), que demonstrou que a inoculação repetida de veneno diluído em um animal conferia a ele uma resistência gradativa contra a ação da peçonha, e por Behring e Kitasato (1890), que observaram que animais tratados com culturas de bacilo de tétano e difteria produziam em seu sangue substâncias capazes de neutralizar as toxinas produzidas pelos microorganismos. Phisalix e Bertrand (1894) e Calmette (1894) constataram que o plasma de animais previamente imunizados com veneno ofídico poderia ser utilizado para proteger outro animal envenenado. Calmette, todavia, foi o primeiro a utilizar o soro no tratamento de pacientes picados por serpentes. Brazil (1901; 1903) demonstrou que a especificidade dos antivenenos, e consequentemente a sua eficácia no tratamento, estava relacionada ao gênero da serpente utilizada no processo de imunização. A comprovação da especificidade do soro derrubou a teoria de Calmette sobre a existência de um soro antiofídico universal. Os trabalhos de Vital

Brazil levaram à introdução e expansão da soroterapia no Brasil e a criação de diversos antivenenos contra serpentes, aranhas e escorpiões. Em 1906 já era relatada uma redução de mais de 50% no número de mortes provocadas por acidentes ofídicos, e uma letalidade de 2,6% a 4,6% quatro décadas depois (BARROSO, 1943).

A escolha dos venenos presentes na mistura antigênica utilizada é um fator chave para o desenvolvimento de um soro antiofídico eficaz, e segue os seguintes princípios: distribuição geográfica das serpentes e a determinação das espécies causadoras de acidentes; proximidade taxonômica e a similaridade entre o veneno das diferentes espécies; ocorrência de reconhecimento cruzado entre o veneno das diferentes espécies; e presença de elementos imunossupressores no veneno. Uma vez que os antígenos sejam determinados, a mistura é inoculada em animais soroprodutores (cavalos, ovelhas ou galinhas, principalmente), seguindo os protocolos de imunização específicos de cada instituição.

Uma problemática encontrada no processo atual está na utilização dos venenos ofídicos *in natura*. Venenos animais possuem componentes com diferentes graus de toxicidade, de altamente tóxicos a inócuos, e o antiveneno produzido possuirá, consequentemente, anticorpos capazes de neutralizar as frações de maior importância assim como anticorpos que neutralizarão as frações inócuas, sendo assim irrelevantes no tratamento. Além disso, são utilizadas grandes quantidades de antígeno, embora Steiner e Eisen (1966) já tenham demonstrado que doses baixas resultam em anticorpos com títulos altos e grande afinidade.

1.5 Novas estratégias

Recentemente, esforços têm sido realizados no sentido de direcionar a produção de anticorpos contra as proteínas de maior toxicidade e presentes no veneno de um maior número de serpentes dentro de um gênero, com o objetivo de utilizar a menor quantidade possível de componentes e ainda assim produzir um antiveneno de grande qualidade. O trabalho de Gutiérrez et al. (2009), com a utilização da proteômica como ferramenta para a escolha desses antígenos, é um exemplo dessa nova tendência.

O veneno crotálico se apresenta como um modelo de grande interesse, pois possui um pequeno número de componentes, e um número ainda menor de componentes tóxicos de interesse no contexto do envenenamento (a crotoxina e seu

componente enzimaticamente ativo, PLA₂). Além disso, a similaridade entre os venenos das diferentes *Crotalus* abre a possibilidade da ocorrência de reconhecimento cruzado, de modo que o soro produzido a partir do veneno de uma única subespécie poderia ser capaz de neutralizar o veneno de outras *Crotalus*.

2 OBJETIVOS

2.1 *Objetivo geral*

Obter informações pontuais sobre o método em uso para produzir soros antivenenos animais visando sugerir modificações, também pontuais que melhorem a qualidade do produto final.

A estratégia utilizada foi imunização de equinos com frações tóxicas purificadas, crotoxina e PLA₂, em esquemas de imunização que favoreçam a produção de anticorpos com altos títulos neutralizantes das atividades tóxicas de veneno crotálico. Atividade específica, afinidade, e baixo teor de anticorpos contra componentes atóxicos foram os parâmetros selecionados para acompanhar a produção dos anticorpos durante a imunização.

2.2 *Objetivos específicos*

Comparar as atividades dos anticorpos antiveneno crotálico produzido no Instituto Butantan pela metodologia tradicional com os antivenenos produzidos usando crotoxina e seu componente fosfolipase A₂. Serão utilizados como parâmetros:

- identificação das frações presentes no veneno *in natura* por *western blotting*;
- titulação dos antivenenos por ELISA contra diferentes antígenos crotálicos;
- verificação de reação cruzada dos antivenenos com o veneno de outras *Crotalus* presentes na herpetofauna brasileira;
- determinação da afinidade dos anticorpos para o veneno de *C. d. terrificus*, crotoxina e fosfolipase A₂.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Reagentes utilizados

Foram utilizados os seguintes reagentes: tampão Tris para cromatografia (Tris HCl 25 mM; pH 7,4), MMT80 completo (Marcol Montanide ISA 50, 2 mL; cloreto de sódio 0,15 M, 5 mL; Tween 80, 1 mL; BCG liofilizado, 1 mg), MMT80 incompleto (Marcol Montanide Isa 50, 2 mL; cloreto de sódio 0,15 M, 5 mL; Tween 80, 1 mL), solução A para tampão de SDS para eletroforese (Tris, 6,25 mM; SDS, 6,94 mM; pH 6,8), tampão de SDS em condição redutora para eletroforese (solução A, 8,5 mL; glicerol, 1 mL; β -mercaptoetanol, 0,5 mL; azul de bromofenol 1%, 2 mL), tampão PBS (cloreto de potássio, 2,6 mM; fosfato de potássio monobásico, 1,5 mM; cloreto de sódio, 76 mM; fosfato dissódico, 8,2 mM; pH 7,2-7,4), tampão AP (Tris HCl, 100 mM; cloreto de sódio, 100 mM; cloreto de magnésio, 5 mM; pH 9,5), solução de NBT (NBT, 50 mg; dimetilformamida, 700 μ L; H₂O destilada, 300 μ L), solução de BCIP (BCIP, 50 mg; dimetilformamida, 1 mL), solução reveladora para *dot/western blotting* (tampão AP, 5 mL; solução de NBT, 33 μ L; solução de BCIP, 16,5 μ L), tampão citrato (ácido cítrico, 0,1 M; fosfato de sódio monobásico, 0,2 M; pH 5,0), solução de OPD (OPD, 20 mg; tampão citrato, 1 mL), tampão substrato para ELISA (tampão citrato, 5 mL; solução de OPD, 100 μ L; H₂O₂ 30 volumes, 5 μ L).

3.2. Quantificação de proteínas

A concentração proteica das amostras de venenos, soros e plasmas foi determinada pelo método do ácido bicinconínico (SMITH et al., 1985), com a utilização do kit comercial Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific, Rockford, IL). Iniciamos com a preparação de uma curva padrão de albumina soro bovina (BSA) em PBS (0 μ g/mL, 25 μ g/mL, 125 μ g/mL, 250 μ g/mL, 500 μ g/mL, 750 μ g/mL, 1000 μ g/mL, 1500 μ g/mL e 2000 μ g/mL). Aplicamos em uma placa de 96 poços de fundo chato 10 μ L/poço de cada uma das soluções da curva padrão ou das amostras a serem dosadas. Em seguida, aplicamos de 200 μ L/poço da “solução de trabalho (WR)” (uma parte de íons cobre em 49 partes de ácido bicinconínico, ambos fornecidos no kit comercial). A placa foi deixada a 37 °C por 30 minutos, e à temperatura ambiente por 5

minutos. A leitura foi realizada em espectrofotômetro de placas (Labsystems Multiskan Ex, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA) e a absorbância à 540 nm registrada. Os dados de absorbância das soluções da curva padrão foram plotados, e uma curva correspondente à absorbância x concentração proteica foi construída. Os dados de absorbância das amostras a serem dosadas foram substituídos na equação dessa curva e a concentração proteica de cada amostra foi obtida.

3.3 Venenos

Amostras de veneno liofilizado de *C. d. terrificus*, *C. d. collilineatus*, *C. d. cascavella* e *C. d. marajoensis* foram fornecidas pelo “Laboratório de Venenos – Instituto Butantan”. As amostras foram armazenadas à -20 °C. Para a utilização, amostras de cada veneno foram diluídas em PBS, tiveram sua concentração proteica determinada pelo método descrito em 3.2, e alíquotas armazenadas à -20 °C.

3.4 Isolamento de Crotoxina e PLA₂ a partir do veneno de *C. d. terrificus*

O isolamento das frações crotoxina e PLA₂ foi realizado por cromatografia de troca aniônica, seguindo o procedimento descrito por Faure (1994), com modificações. Foram aplicados 40,0 mg do veneno bruto de *C. d. terrificus* em uma coluna Mono Q HR 5/5 (Amersham Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Sweden) previamente equilibrada com tampão Tris. O material adsorvido à coluna foi eluído em um gradiente linear de NaCl (0 M a 5 M) em tampão Tris. O conteúdo proteico das frações foi estimado pela absorbância à 280 nm pelo monitor UPC-900 ÄKTA FPLC (GE Healthcare, Piscataway, NJ). Os picos obtidos foram dosados pelo método BCA e alíquotas armazenadas à -20 °C.

3.5 Avaliação da atividade fosfolipásica e reconhecimento por dot blotting com anticorpos anti-crotoxina

A avaliação da atividade fosfolipásica foi realizada seguindo o método descrito por Price III (2007), levemente modificado. Amostras (128 µL) de cada um dos picos obtidos por cromatografia foram adicionadas à placas de 96 poços. Como controle

positivo, foram utilizados 128 μ L de veneno in natura de *C. d. terrificus*. À cada amostra foram adicionados 180 μ L de uma mistura contendo 10 mM Triton X-100, 5 mM L- α -fosfatidilcolina (Sigma, EUA), 1,5 mM HEPES, 10 mM cloreto de cálcio, 0,9% cloreto de sódio e 0,03% azul de bromotimol, pH 7,5. As placas foram incubadas por 5 min a 37 °C, e em seguida foi realizada a leitura em espectrofotômetro de placas (Labsystems Multiskan Ex, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA), registrando-se a absorbância a 620 nm. Os resultados foram expressos em nanomoles de ácido por minuto por miligrama de enzima, tendo como referência uma curva padrão de mudança de pH obtida pela incubação da mistura com HCl.

A análise *dot blotting* foi realizada com a aplicação de 1 μ g de cada pico obtido em membrana de nitrocelulose. A membrana foi deixada em recipiente fechado por 30 min para a fixação das amostras. Em seguida foi realizado o bloqueio com PBS contendo 5% de soro albumina bovina (BSA 98%, Sigma Aldrich, St. Louis, MO), por 2 h à 37 °C, em quantidade suficiente para cobrir totalmente a membrana. As membranas foram lavadas rapidamente com tampão PBS, e a membrana foi tratada com o anticorpo anti-crotoxina, produzido em camundongos H_{III}, diluído 1:10.000 em tampão PBS contendo 0,1% de BSA, em quantidade suficiente para cobrir a membrana, por 1 h em temperatura ambiente sob leve agitação. Em seguida a membrana foi lavada três vezes consecutivas com PBS contendo 0,05% de Tween-20. A membrana foi incubada com o anticorpo secundário IgG (molécula total) de coelho “anti-mouse” (Sigma Aldrich, St. Louis, MO) diluído 1:7.500 em PBS contendo 0,1% de BSA, em quantidade suficiente para cobrir totalmente a membrana, por 1 h à temperatura ambiente. A membrana foi lavada três vezes consecutivas com PBS contendo 0,05% de Tween-20, e colocada em solução reveladora de *dot/western blotting*. A revelação foi acompanhada visualmente, e a reação foi terminada com a colocação da membrana em água destilada.

3.6 Preparação dos antígenos e esquema de imunização

Os cavalos pertencentes ao plantel de animais soroprodutores do Instituto Butantan receberam quatro inoculações de antígeno crotálico (mistura 1:1 do veneno bruto de *C. d. terrificus* e *C. d. collilineatus*). Na primeira inoculação foram injetados 5mg/animal da mistura antigênica em 8,0 mL de MMT80 Completo, um adjuvante

utilizado no esquema de imunização padrão do Instituto Butantan. Na segunda inoculação, injetados 3,5 mg/animal da mistura antigênica em 8,0 mL de MMT80 Incompleto, outro adjuvante utilizado no esquema de imunização padrão do Instituto Butantan. Nas duas inoculações finais foram injetados 2,5 mg/animal da mistura antigênica em 8,0 mL de solução salina (NaCl 0,15 M). As injeções foram realizadas por via subcutânea em quatro pontos do dorso do animal, e com intervalo de 15 dias entre cada inoculação.

Para os grupos experimentais, foram utilizados seis cavalos machos adultos (400-450 kg). Os animais foram separados em três grupos, e cada grupo foi imunizado com um antígeno diferente. O grupo 1 (n=2) recebeu inoculações de 500 µg/animal de veneno bruto de *C. d. terrificus*, o grupo 2 (n=2) recebeu inoculações de 200 µg/animal de crotoxina parcialmente purificada (pico 5 obtido na cromatografia), e o grupo 3 (n=2) recebeu inoculações de 100 µg/animal de PLA₂ parcialmente purificada (pico 2 obtido na cromatografia). Cada animal recebeu quatro inoculações, por via subcutânea em quatro pontos do dorso do animal, e com intervalo de 15 dias entre inoculações. A primeira inoculação de cada grupo foi preparada em MMT80 Completo, a segunda inoculação em MMT80 Incompleto, e as últimas duas inoculações em solução salina (NaCl 0,15 M).

3.7 Antivenenos

Quatro plasmas hiperimunes equinos (lotes #143, #158, #223 e #356), e seis preparações F(ab')₂ do soro comercial anticrotálico (lotes #1006140, #1001719, #1007187, #1009230, #1010282, #1010283) foram fornecidos pela “*Divisão Bioindustrial – Seção de Antisoros, Instituto Butantan*”. Plasmas hiperimunes dos animais experimentais foram obtidos pela retirada do sangue por punção da veia jugular, realizada 15 após o término das inoculações. O sangue (8,0 mL de cada animal) foi coletado em frascos próprios com anticoagulante (heparina), e as frações plasma e celular foram separadas. O plasma de cada animal foi identificado e alíquotas armazenadas à -20 °C.

3.8 Processamento do antiveneno comercial

As preparações $F(ab')_2$ fornecidas pela “*Divisão Bioindustrial – Seção de Antisoros, Instituto Butantan*” foram obtidas a partir do processamento dos plasmas hiperimunes equinos do plantel regular de animais soroprodutores do Instituto Butantan. O procedimento é descrito em detalhes por Raw, Higashi e Kelen (1996). De maneira resumida, o procedimento é iniciado pela coleta de sangue (5,0 L) dos animais por punção da veia jugular, em sacos plásticos próprios, com anticoagulante. A fração celular é devolvida ao respectivo animal. O plasma recebe sulfato de amônio até a concentração de 29%, que aglutina com os anticorpos e provoca a sua decantação. A massa de anticorpos é removida por ultracentrifugação, e tratada com pepsina, que separa a porção Fc da porção $F(ab')_2$. Em seguida, o preparado passa por termocoagulação para provocar a desnaturação da porção Fc, ultrafiltração molecular e diálise para a retirada do excesso de sulfato de amônio. O produto resultante, o soro comercial, é submetido a diferentes testes de qualidade, e se aprovado é envasado e enviado para uso.

3.9 Eletroforese e western blotting

Os venenos de *C. d. terrificus*, *C. d. collilineatus*, *C. d. cascavella* e *C. d. marajoensis*, e frações crotoxina e PLA_2 foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS, seguindo o método descrito por Laemmli (1970). O gel foi montado em placas de vidro com o sistema Might Small II (GE Healthcare, Piscataway, NJ), de modo a possuir o upper gel com concentração de acrilamida de 5% e o lower gel com concentração de 12,5%. Foram utilizados 10 µg de cada veneno crotálico, e 2 µg das frações. As amostras foram diluídas em tampão SDS na condição redutora na proporção volumétrica de 1:1, aquecidas a 96 °C por 6 minutos, aplicadas no gel em poços individuais e submetidas a uma corrente de 90 V. Os géis foram corados com sulfato de prata ou transferidos para membranas de nitrocelulose e submetidos à *western blotting*.

As transferências foram realizadas “overnight” a 4 °C, em cuba de transferência TE 22 (Hoefer Pharmacia Biotech, San Francisco, CA), sob uma corrente de 150 mA. Após a transferência, as membranas foram bloqueadas em PBS contendo 5% de BSA,

em quantidade suficiente para cobrir totalmente as membranas, por 2 h a 37 °C. Em seguida, as membranas foram lavadas rapidamente com PBS, e tratadas com uma das amostras de plasma ou soro. Cada membrana foi tratada apenas com uma das amostras de antiveneno, preparados na diluição fixa de 1:50.000 em PBS contendo 0,1% de BSA, em quantidade suficiente para cobrir totalmente as membranas. As membranas foram deixadas por 1 h a temperatura ambiente, e em seguida lavadas três vezes consecutivamente com PBS contendo 0,05% de Tween-20. As membranas foram incubadas com o anticorpo secundário, IgG (molécula total) de coelho “anti-horse” (Sigma Aldrich, St. Louis, MO) diluído 1:7.500 em PBS contendo 0,1% de BSA, em quantidade suficiente para cobrir totalmente as membranas, por 1 h a temperatura ambiente. As membranas foram lavadas três vezes consecutivas com PBS contendo 0,05% de Tween-20, e colocadas em solução reveladora para *dot/western blotting*. A revelação das bandas foi acompanhada visualmente, e a reação foi terminada com a colocação das membranas em água destilada.

3.10 Quantificação dos anticorpos

A quantificação dos anticorpos foi realizada por ELISA, em placas de poliestireno de 96 poços, “high-binding”. Foram preparadas soluções (10 ug/mL, em PBS) dos seguintes antígenos: venenos brutos de *C. d. terrificus*, *C. d. collilineatus*, *C. d. cascavella*, *C. d. marajoensis*, e frações crotoxina e PLA₂. As placas foram sensibilizadas com 100 µL/poço das soluções antigênicas, de modo a haver apenas um antígeno em cada duas fileiras de poços da placa, e três antígenos diferentes por placa no total. As placas foram colocadas em câmara úmida, e deixadas “overnight” a 4 °C. Em seguida, as placas foram bloqueadas com PBS contendo 5% de BSA, 200 µL/poço, por 2 h a 37 °C. Foram preparadas diluições seriadas dos diferentes antivenenos em PBS contendo 0,1% de BSA, no intervalo de 1:4.000 à 1:2.048.000. As diluições foram preparadas e aplicadas separadamente, de modo a não haver duas diluições diferentes, ou antivenenos diferentes, em um mesmo poço. As placas foram lavadas rapidamente com PBS, 200 µL/poço, e em seguida foram aplicados 100 µL/poço das diluições dos antivenenos. As placas foram deixadas em câmara úmida por 1h a 37 °C. Após isso, as placas foram lavadas três vezes consecutivas com PBS contendo 0,05% de Tween-20, 200 µL/poço, e foi aplicado o anticorpo secundário, IgG (molécula total) “anti-horse”

produzida em coelho (Sigma Aldrich, St. Louis, MO). O anticorpo secundário foi preparado em PBS contendo 0,1% de BSA e 0,05% de Tween-20, na diluição de 1:20.000, e foram aplicados 100 μ L/poço. As placas foram deixadas em câmara úmida por 1h a 37 °C. Em seguida foram realizadas novamente três lavagens consecutivas com PBS contendo 0,05% de Tween-20, 200 μ L/poço, e foram aplicados 50 μ L/poço do tampão substrato para ELISA. As placas foram deixadas reagindo à temperatura ambiente por 15min. A reação foi terminada com a aplicação de ácido sulfúrico 2 M, 50 μ L/poço. A leitura das placas foi realizada em espectrofotômetro de placas (Labsystems Multiskan Ex, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA) e a absorbância à 492 nm registrada. Os dados de absorbância x diluição do antiveneno foram plotados, e a curva correspondente foi construída. Com a equação da curva, foi possível realizar a titulação dos antivenenos contra os diferentes antígenos em Unidades-ELISA/mL (uma U-ELISA é definida como a menor concentração de anticorpo na qual é verificada uma D.O. de 0,2, como descrito ALMEIDA et al., 2008).

3.11 Determinação da afinidade dos anticorpos

A determinação da afinidade dos anticorpos foi realizada por ELISA, seguindo o método descrito acima. Houve apenas três modificações: apenas o veneno de *C. d. terrificus* e as frações crotoxina e PLA₂ foram utilizados como antígenos; os antivenenos tiveram a sua diluição fixada em 1:50.000; houve a adição de uma etapa de eluição com tiocianato de potássio (KSCN, Sigma Aldrich, St. Louis, MO) como agente caotrópico (PULLEN; FITZGERALD; HOSKING, 1986; ROMERO-STEINER et al., 2005). O KSCN foi preparado em diluições crescentes de 0 M a 5 M, com intervalos de 0,5 M, e aplicado após a etapa de incubação com os antivenenos. Foram aplicados 150 μ L/poço de cada diluição de KSCN, de modo que não houvessem duas diluições diferentes em um mesmo poço. As placas foram deixadas à temperatura ambiente por 30 min, e em seguida lavadas três vezes consecutivas com PBS contendo 0,05% de Tween-20, 200 μ L/poço. A partir disso, a reação prosseguiu como descrita em 3.10. A leitura das placas foi realizada em espectrofotômetro de placas (Labsystems Multiskan Ex, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA) e a absorbância à 492 nm registrada. Os dados foram plotados, e o score de afinidade de cada antiveneno foi medido como

sendo a concentração de KSCN necessária para reduzir em 50% a densidade óptica obtida com os controles (poços onde foi aplicado KSCN 0M).

3.12 Determinação da LD₅₀ do veneno de C. d. terrificus, e ensaio de soroneutralização in vivo

A letalidade do veneno de *C. d. terrificus* foi determinada por meio da injeção de doses crescentes (0 µg, 1,0 µg, 2,0 µg, 4,0 µg e 8 µg) do veneno em camundongos da linhagem Swiss (18-20 g). As doses foram preparadas em PBS, e utilizados quatro animais por dose. As injeções foram realizadas por via intraperitoneal. O número de mortes foi contabilizado 24 h e 48 h após a injeção do veneno, e a LD₅₀ determinada por probits (FINNEY, 1992).

Para os ensaios de soroneutralização, foi fixada uma quantidade de veneno correspondente a 5 LD₅₀, diluído em PBS. Ao veneno foram adicionadas concentrações crescentes dos diferentes antivenenos (1:5, 1:10, 1:20, 1:40), preparados em PBS. As preparações foram incubadas por 30 min a 37 °C, e em seguida inoculadas em camundongos da linhagem Swiss (18-20 g). Amostras de veneno incubadas apenas com PBS foram injetadas nos grupos controle. Utilizamos quatro animais por grupo, e foram injetados 500 µL de cada preparado por animal, por via intraperitoneal. O número de mortes foi contabilizado 24 h e 48 h após as inoculações, e a dose efetiva (ED₅₀) foi determinada por probits (FINNEY, 1992).

A partir dos dados de ED₅₀ e concentração protéica de cada antiveneno, pudemos calcular a atividade específica de cada antiveneno, de acordo com a fórmula: $AE = (1000/\text{volume em } \mu\text{L correspondentes à } ED_{50})/(\text{concentração proteica em mg/ml})$.

Os procedimentos descritos estão de acordo com as determinações da World Health Organization (WHO, 1981), e foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais do Instituto Butantan (CEUAIB) e pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (CEUA-ICB/USP).

3.13 Análise estatística

Os dados das titulações e afinidade foram expressos como Média $\pm$ Desvio Padrão, e analisados por “one way ANOVA” seguido de “Dunn’s multiple comparison test”. Os valores de DL₅₀ e ED₅₀ foram calculados por probits, e foram expressos como Média. As atividades específicas estão expressas como Média.

4 RESULTADOS

4.1 Perfil cromatográfico do veneno de *C. d. terrificus* e isolamento da crotoxina e fosfolipase A₂

A cromatografia de troca aniônica permitiu a obtenção de 11 picos diferentes a partir do veneno bruto de *C. d. terrificus* (**Figura 3a**). Os picos foram submetidos à eletroforese, e analisados quanto às bandas apresentadas. O pico 2 apresentou a presença majoritária de uma banda com peso próximo à 15 kDa, que é o peso encontrado para a PLA₂. O pico 5, além de ser mais proeminente na cromatografia, apresentou duas bandas majoritárias, uma próxima à 15 kDa (novamente, relacionada à PLA₂) e de próxima à 30 kDa (relacionada à crotoxina íntegra) (**Figura 3b**).

Figura 3 – Perfil cromatográfico e isolamento de proteínas do veneno de *C. d. terrificus*

a) Perfil cromatográfico do veneno de *C. d. terrificus*. 20 mg do veneno foram submetidos à cromatografia de troca aniônica em coluna Mono Q HR 5/5, previamente equilibrada com tampão Tris. O material adsorvido foi eluído com um gradiente linear de NaCl (0 a 1 M) em tampão Tris. **b)** Perfil eletroforético dos picos 2 e 5, mostrando a presença majoritária de PLA₂ e crotoxina, respectivamente. 10 µg de cada pico foram tratados tampão de SDS na condição redutora e resolvidos em gel de poliacrilamida (upper gel 5%, lower gel 12,5%). Coloração feita com sulfato de prata.

Todos os picos foram submetidos à avaliação da atividade fosfolipásica, e o pico 2 apresentou a maior atividade (**Figura 4**). Esse dado, associado aos dados da eletroforese que mostram uma banda majoritária de 15 kDa, nos sugere que o pico 2 é composto predominantemente de PLA₂.

Figura 4 - Atividade fosfolipásica dos picos obtidos pela cromatografia

128 μ L de cada amostra reagiram com 180 μ L de uma mistura padrão (10 mM Triton X-100; 5 mM L- α -fosfatidilcolina; 1,5 mM HEPES; 10 mM cloreto de cálcio; 0,9% cloreto de sódio; 0,03% azul de bromotimol; pH 7,5) por 5 min à 37 °C. Foi utilizado veneno de *C. d. terrificus* como controle positivo. Absorbância a 620 nm foi registrada. Resultados expressos em nanomoles de ácido por minuto por miligrama de enzima.

Os picos também foram avaliados por *dot blotting*, com a utilização de anticorpos específicos contra a crotoxina. O pico 5 foi o que reagiu mais fortemente (**Figura 5**). Esse dado, associado aos dados da eletroforese, nos sugere que o pico 5 é composto predominantemente de crotoxina. Foram obtidos aproximadamente 9,0 mg do

pico 5 a partir dos 40 mg de veneno bruto inicial, o que corresponde à 45% da crotoxina total teoricamente existente (considerando a proporção de 50% desse composto no veneno de *C. d. terrificus*).

Figura 5 - Dot blotting dos picos obtidos pela cromatografia.

Membrana sensibilizada com 1 µg de cada amostra. Incubada por 1h à temperatura ambiente com anticorpo “anti-crotoxina” diluído 1:10.000 em PBS contendo 0,1% de BSA. Incubada por 1h à temperatura ambiente com anticorpo “anti-mouse” conjugado com fosfatase, diluído 1:7.500 em PBS contendo 0,1% de BSA.

4.2 Perfil eletroforético dos diferentes antígenos crotálicos

A análise do perfil eletroforético do veneno de *C. d. terrificus*, *C. d. collilineatus*, *C. d. cascavella* e *C. d. marajoensis* mostrou haver uma grande semelhança entre o veneno dessas serpentes quanto à sua composição, havendo apenas

uma pequena diferença quanto à intensidade das bandas encontradas nos diferentes venenos (**Figura 6**). Podemos destacar a presença das bandas de 10 kDa (relacionada à crotapotina), 15 kDa (relacionada à PLA₂) e 30 kDa (relacionada à crotoxina íntegra), que apareceram com grande intensidade em todos os venenos. Também pode ser vista a giroxina (35 kDa), embora não tenha sido possível evidenciar a crotamina (5 kDa) ou a convulxina (70 kDa). Os perfis encontrados para a crotoxina e PLA₂ parcialmente purificadas refletem o perfil mostrado anteriormente (**Figura 3b**), com a predominância de duas bandas (15 kDa e 30 kDa) na crotoxina, e uma banda de 15 kDa na PLA₂. A presença outras bandas pode ser notada, de modo que a purificação do material não foi completa, apesar de ter sido eficiente para a obtenção das frações de interesse.

Figura 6 - Perfil eletroforético dos diferentes antígenos crotálicos.

Amostras de veneno bruto de *C. d. terrificus*, *C. d. collilineatus*, *C. d. cascavella*, *C. d. marajoensis* e frações crotoxina e PLA₂ foram tratadas com tampão de SDS em condição redutora (proporção volumétrica 1:1) e resolvidas em gel de poliacrilamida (upper gel 5%, lower gel 12,5%). Foram utilizados 10 µg dos venenos brutos e 2 µg das frações.

4.3 Reconhecimento de diferentes antígenos crotálicos pelo soro produzido pelo Instituto Butantan

A análise do reconhecimento dos antígenos crotálicos pelo soro do Instituto Butantan (**Figura 7**) mostrou haver uma grande semelhança no reconhecimento dos diferentes venenos crotálicos, e um forte reconhecimento de poucas bandas, com destaque para as bandas de 15 kDa e 30 kDa em todos os venenos brutos. Podemos também observar o reconhecimento de uma banda de 60 kDa apenas nos venenos de *C. d. terrificus*, *C. d. collilineatus* e *C. d. cascavella*, o reconhecimento de uma banda de 6 kDa apenas no veneno de *C. d. collilineatus* e o reconhecimento de uma banda de 50 kDa apenas no veneno de *C. d. terrificus*. Quanto as frações, foi reconhecida apenas a banda de 15 kDa, não havendo o reconhecimento da banda de 30 kDa presente na crotoxina.

Figura 7 - Reconhecimento de antígenos crotálicos pelo soro produzido pelo Instituto Butantan.

10 µg de cada veneno das serpentes *Crotalus* e 2 µg de cada fração foram tratados com tampão de SDS em condição redutora, resolvidos em gel de poliacrilamida (upper gel 5%, lower gel

12,5%) e transferidos para membrana de nitrocelulose. Membrana incubada por 1h à temperatura ambiente com soro diluído 1:5.000 em PBS contendo 0,1% de BSA. Membrana incubada por 1h à temperatura ambiente com anticorpo “anti-horse” conjugado com fosfatase, diluído 1:7.500 em PBS contendo 0,1% de BSA.

4.4 Reconhecimento de diferentes antígenos crotálicos pelo plasma hiperimune produzido pelo Instituto Butantan

A análise do reconhecimento dos antígenos crotálicos pelo plasma hiperimune (**Figura 8**) mostrou um perfil similar ao mostrado anteriormente (**Figura 7**), com um reconhecimento mais intenso das bandas de 15 kDa e 30 kDa, e o reconhecimento de uma banda de 60 kDa apenas nos venenos de *C. d. terrificus*, *C. d. collilineatus* e *C. d. cascavella*. Também é possível observar a presença de bandas de outros pesos nos venenos brutos, reconhecidas com baixa intensidade. Novamente, diferenças pontuais remetem à presença dessas bandas nos diferentes venenos, mostrado no perfil eletroforético (**Fig. 6**). Quanto às frações, podemos observar o reconhecimento das bandas de 15 kDa e 30 kDa presentes na crotoxina, e o fraco reconhecimento da banda de 15 kDa presente na PLA₂.

Figura 8 - Reconhecimento de antígenos crotálicos pelo plasma hiperimune produzido pelo Instituto Butantan.

10 µg de cada veneno das serpentes *Crotalus* e 2 µg de cada fração foram tratados com tampão de SDS em condição redutora, resolvidos em gel de poliacrilamida (upper gel 5%, lower gel 12,5%) e transferidos para membrana de nitrocelulose. Membrana incubada por 1h à temperatura ambiente com plasma diluído 1:5.000 em PBS contendo 0,1% de BSA. Membrana incubada por 1h à temperatura ambiente com anticorpo “anti-horse” conjugado com fosfatase, diluído 1:7.500 em PBS contendo 0,1% de BSA.

4.5 Reconhecimento de diferentes antígenos crotálicos pelo plasma do Grupo Experimental 1

A análise do reconhecimento dos antígenos crotálicos pelo plasma do Grupo Experimental 1 (**Figura 9**) mostrou haver o reconhecimento de poucas bandas dos venenos brutos, com destaque para as bandas de 15 kDa e 30 kDa. A banda de 60 kDa foi encontrada apenas no veneno de *C. d. terrificus*, e a banda de 6 kDa pôde ser encontrada no veneno de *C. d. terrificus* e *C. d. collilineatus*. Quanto às frações, houve o reconhecimento apenas da banda de 15 kDa, não sendo encontrada a banda de 30 kDa presente na crotoxina.

Figura 9 - Reconhecimento de antígenos crotálicos pelo plasma do Grupo Exp. 1.

10 µg de cada veneno das serpentes *Crotalus* e 2 µg de cada fração foram tratados com tampão de SDS em condição redutora, resolvidos em gel de poliacrilamida (upper gel 5%, lower gel 12,5%) e transferidos para membrana de nitrocelulose. Membrana incubada por 1h à temperatura ambiente com plasma diluído 1:5.000 em PBS contendo 0,1% de BSA. Membrana incubada por 1h à temperatura ambiente com anticorpo “anti-horse” conjugado com fosfatase, diluído 1:7.500 em PBS contendo 0,1% de BSA.

4.6 Reconhecimento de diferentes antígenos crotálicos pelo plasma do Grupo Experimental 2

A análise do reconhecimento dos antígenos crotálicos pelo plasma do Grupo Experimental 2 (**Figura 10**) apresentou o reconhecimento de poucas bandas dos venenos brutos, com destaque para o reconhecimento das bandas de 15 kDa e 30 kDa em todos os venenos, bandas de 50 kDa e 60 kDa no veneno de *C. d. terrificus*, uma banda de 10 kDa com pouca intensidade no veneno de *C. d. collilineatus* e uma banda entre 15 kDa e 20 kDa no veneno de *C. d. cascavella*. Quanto às frações, houve o

reconhecimento apenas da banda de 15 kDa, não havendo o reconhecimento da banda de 30 kDa presente na crotoxina.

Figura 10 - Reconhecimento de antígenos crotálicos pelo plasma do Grupo Exp. 2.

10 µg de cada veneno das serpentes *Crotalus* e 2 µg de cada fração foram tratados com tampão de SDS em condição redutora, resolvidos em gel de poliacrilamida (upper gel 5%, lower gel 12,5%) e transferidos para membrana de nitrocelulose. Membrana incubada por 1h à temperatura ambiente com plasma diluído 1:5.000 em PBS contendo 0,1% de BSA. Membrana incubada por 1h à temperatura ambiente com anticorpo “anti-horse” conjugado com fosfatase, diluído 1:7.500 em PBS contendo 0,1% de BSA.

4.7 Reconhecimento de diferentes antígenos crotálicos pelo plasma do Grupo Experimental 3

A análise do reconhecimento dos antígenos crotálicos pelo plasma do Grupo Experimental 3 (**Figura 11**) revelou uma grande especificidade do plasma pela banda de 15 kDa, sendo que essa banda foi a única reconhecida com forte intensidade em todas as amostras de venenos brutos e frações utilizados. Podemos notar também uma banda de 10 kDa no veneno de *C. d. collilineatus*, reconhecida com fraca intensidade.

Figura 11 - Reconhecimento de antígenos crotálicos pelo plasma do Grupo Exp. 3.

10 µg de cada veneno das serpentes *Crotalus* e 2 µg de cada fração foram tratados com tampão de SDS em condição redutora, resolvidos em gel de poliacrilamida (upper gel 5%, lower gel 12,5%) e transferidos para membrana de nitrocelulose. Membrana incubada por 1h à temperatura ambiente com plasma diluído 1:5.000 em PBS contendo 0,1% de BSA. Membrana incubada por 1h à temperatura ambiente com anticorpo “anti-horse” conjugado com fosfatase, diluído 1:7.500 em PBS contendo 0,1% de BSA.

4.8 Titulação dos antivenenos

O gráfico unificado dos títulos obtidos pelos antivenenos contra os diferentes antígenos crotálicos pode ser observado na **Figura 12**.

O soro fornecido pelo Instituto Butantan apresentou os títulos mais altos contra os diferentes antígenos utilizados. Os títulos obtidos contra os venenos de *C. d. cascavella* e *C. d. marajoensis* foram superiores aos títulos obtidos contra os venenos de *C. d. terrificus* e *C. d. collilineatus*, sendo que apenas os dois últimos foram utilizados para a imunização dos animais. Os títulos observados contra as frações crotoxina e PLA₂ foram mais baixos do que os títulos observados contra qualquer um dos venenos

brutos, o que nos sugere que os altos títulos observados contra os venenos brutos são devido ao reconhecimento de outras proteínas do veneno que possuem uma importância menor que a crotoxina e a PLA₂ no contexto de um acidente ofídico.

O plasma hiperimune fornecido pelo Instituto Butantan apresentou títulos altos contra os venenos brutos utilizados, sendo os títulos mais altos contra os venenos de *C. d. terrificus* e *C. d. marajoensis*. Houve uma diferença grande entre os títulos obtidos contra as frações crotoxina e PLA₂ e os títulos obtidos contra os venenos brutos. Isso sugere que os altos títulos observados contra os venenos brutos são reflexo do reconhecimento de outras frações do veneno crotálico que possuem uma importância menor que a crotoxina e a PLA₂ no contexto do acidente ofídico.

O plasma do Grupo Experimental 1, apesar de ter sido capaz de reconhecer venenos estranhos ao utilizado na imunização, apresentou os títulos mais baixos dentre os antivenenos utilizados. Isso nos sugere que o veneno de *C. d. terrificus*, por si só, não é um agente imunizante de grande eficiência. Novamente, é vista uma pequena diferença entre os títulos obtidos contra as frações e os venenos brutos.

O plasma do Grupo Experimental 2 apresentou títulos altos contra os diferentes antígenos crotálicos. Em especial, sobre os títulos obtidos contra as frações crotoxina e PLA₂, podemos ver que os títulos obtidos são mais altos que os obtidos pelo plasma do Instituto Butantan contra os respectivos antígenos. Os títulos obtidos contra a crotoxina se encontram no mesmo patamar que os títulos obtidos contra os venenos brutos, mostrando que esses resultados refletem o reconhecimento específico da fração crotoxina presente nesses venenos.

O plasma do Grupo Experimental 3 apresentou os títulos mais altos entre os plasmas experimentais para todos os antígenos crotálicos utilizados. Quanto ao reconhecimento das frações, novamente temos títulos mais altas que os obtidos pelo plasma do Instituto Butantan, e num patamar próximo aos encontrados pelo soro comercial. Não é vista uma diferença entre os títulos obtidos contra as frações e os venenos brutos, o que nos sugere que está havendo o reconhecimento apenas da PLA₂ presente nesses venenos.

Todos os antivenenos testados apresentaram títulos altos contra os diferentes antígenos crotálicos. O material fornecido pelo Instituto Butantan apresentou títulos muito altos contra os venenos crotálicos brutos, e títulos mais baixos contra as frações crotoxina e PLA₂, indicando que os títulos altos são devido ao reconhecimento de outras

frações de menor importância no acidente ofídico. Os plasmas do Grupo Experimental 2 e 3 apresentaram títulos mais baixos contra os venenos brutos, mas títulos no mesmo patamar contra as frações crotoxina e PLA₂, indicando que houve o reconhecimento apenas dessas frações dentro dos venenos crotálicos.

Não foi encontrada diferença significativa entre os diferentes grupos testados, exceto entre o soro do Instituto Butantan e o plasma do Instituto Butantan contra as frações crotoxina e PLA₂.

Figura 12 - Titulação dos antivenenos contra diferentes antígenos crotálicos.

Titulação realizada por ELISA, em placas sensibilizadas com 1 µg de antígeno por poço. Diluição dos anticorpos foi feita seriadamente no intervalo entre 1:4.000 e 1:2.048.000, em PBS contendo 0,1% de BSA. Detecção com anticorpos “anti-horse” conjugados com peroxidase, diluídos 1:20.000 em PBS contendo 0,1% de BSA e 0,05% de Tween20. Absorbância à 420 nm registrada. Títulos foram calculados em Unidades-ELISA/mL x 10⁶. Resultados representativos de dois experimentos independentes, e médias comparadas por *one-way* ANOVA, * P>0,05. Soro IB, n=6; Plasma IB, n=4; Grupo Exp 1, n=2; Grupo Exp 2, n=2; Grupo Exp 3, n=2.

4.9 Avaliação da afinidade dos antivenenos pelo veneno de *C. d. terrificus*, crotoxina e PLA₂

O gráfico unificado do score de afinidade dos antivenenos pelos antígenos crotálicos pode ser observado na **Figura 13**.

O material fornecido pelo Instituto Butantan (soro e plasma) apresentou o score de afinidade mais alto pelos antígenos testados, sendo que o score obtido pelas frações crotoxina e PLA₂ foi mais alto que o score obtido pelo veneno bruto de *C. d. terrificus*. Isso nos sugere que essa alta afinidade contra as frações poderia contrabalancear os títulos baixos obtidos contra as frações, e resultar em uma grande atividade protetora.

Os scores de afinidade obtidos pelos plasmas dos três grupos experimentais pelos antígenos crotálicos foram mais baixos e ficaram no mesmo patamar, independente do grupo testado ou do antígeno. Isso nos sugere que, embora o protocolo de imunização utilizado tenha resultado em títulos altos, ele não foi eficiente para gerar o aumento de afinidade dos anticorpos pelo antígeno.

Figura 13 - Avaliação do score de afinidade.

Realizada por ELISA, em placa de 96 poços “high binding”, sensibilizada com 1 µg de antígeno por poço. Diluição dos anticorpos foi fixada em 1:50.000 em PBS contendo 0,1% de BSA. KSCN preparado em H₂O destilada com concentrações entre 0 M e 5M, com intervalos de 0,5 M. Detecção com anticorpos “anti-horse” conjugados com peroxidase, diluídos 1:20.000 em PBS contendo 0,1% de BSA. Absorbância à 420 nm registrada. Score de afinidade definido como a concentração de KSCN na qual eram encontrados 50% da D.O. obtida pelo grupo controle. Resultados representativos de dois experimentos independentes, e médias comparadas por *one-way* ANOVA, * P>0,05. Soro IB, n=6; Plasma IB, n=4; Grupo Exp 1, n=2; Grupo Exp 2, n=2; Grupo Exp 3, n=2.

4.10 DL₅₀ e ensaio de soroneutralização *in vivo*

A dose letal 50% (DL₅₀) do veneno de *C. d. terrificus* foi determinada como sendo 1,20 µg/animal. Os resultados do ensaio de soroneutralização são apresentados na **Figura 14**.

O soro e o plasma fornecidos pelo Instituto Butantan apresentaram uma capacidade neutralizante mais elevada que os demais antivenenos utilizados. Os

resultados obtidos para ambos foram muito próximos, sendo necessários 2,18 mL do soro e 2,42 mL do plasma para neutralizar 1 mg do veneno de *C. d. terrificus*.

O plasma do Grupo Experimental 1 apresentou uma baixa capacidade neutralizante, sendo necessários 6,15 mL de plasma para neutralizar 1 mg do veneno de *C. d. terrificus*.

O plasma do Grupo Experimental 2 apresentou uma elevada capacidade neutralizante, apresentando resultados melhores que os grupos experimentais 1 e 2, e estando mais próximos dos resultados obtidos com os antivenenos fornecidos pelo Instituto Butantan. Foi determinada a necessidade de 3,80 mL de plasma para neutralizar 1 mg do veneno de *C. d. terrificus*.

O plasma do Grupo Experimental 3 apresentou a pior capacidade neutralizante, com resultados ligeiramente mais elevados que os obtidos com o Grupo Experimental 1, sendo necessários 6,68 mL de plasma para neutralizar 1 mg do veneno de *C. d. terrificus*.

Figura 14 - Ensaio de soroneutralização *in vivo* do veneno de *C. d. terrificus*.

Amostras do veneno de *C. d. terrificus* (5 DL₅₀) foram incubadas com diluições crescentes de amostras dos antivenenos (1:5, 1:10, 1:20, 1:40) por 30 min à 37 °C. Como controle foram utilizados amostras de veneno incubação com anticorpos, mas sujeitas as mesmas condições de temperatura. Após incubação, foram inoculados 500 µL de cada diluição em camundongos Swiss por via intra-peritonial (4 animais por diluição utilizada). O número de óbitos foi registrado 24h e 48h após a inoculação. A soroneutralização foi expressa em mL de antiveneno necessários para neutralizar 1 mg de veneno. Amostra representativa de um único experimento. Soro IB, n=1; Plasma IB, n=1; Grupo Exp 1, n=2; Grupo Exp 2, n=2; Grupo Exp 3, n=2.

4.11 Atividade específica

A atividade específica foi calculada a partir dos dados obtidos pela determinação da ED₅₀ e da concentração protéica dos diferentes antivenenos (**tabela 1**).

O soro e o plasma fornecidos pelo Instituto Butantan apresentaram os valores de atividade específica acima dos demais antivenenos, com o soro apresentando o valor mais elevado.

Os plasmas do Grupo Experimental 1 apresentaram valores baixos e próximos aos encontrados para o Grupo Experimental 3.

Dentre os plasmas dos grupos experimentais, o Grupo 2 apresentou os valores mais elevados, embora abaixo dos valores encontrados para os antivenenos do Instituto Butantan.

Tabela 1 - Atividade específica dos antivenenos contra o veneno de *C. d. terrificus*.

Antiveneno	Concentração protéica ^a	Capacidade neutralizante ^b	Atividade específica ^c
Soro IBU	93,10 ± 22,96	131,60	0,082
Plasma IBU	130,24 ± 15,98	145,30	0,067
Grupo Exp. 1	105,80 ± 3,10	416,70	0,023
Grupo Exp. 2	110,22 ± 3,51	320,00	0,029
Grupo Exp. 3	116,19 ± 6,05	403,00	0,022

^a Concentração proteica expressa em mg/mL. ^b Neutralização expressa como a Dose Efetiva (ED₅₀), definida como o volume de antiveneno (μL) necessário para reduzir em 50% a mortalidade de camundongos injetados com 5 LD₅₀. ^c A atividade específica de cada antiveneno foi calculada utilizando a seguinte fórmula: AE = (1000/volume em μL correspondentes à ED₅₀)/(concentração proteica em mg/ml), e resultados expressos em ED₅₀/mg de antiveneno.

5 DISCUSSÃO

O ofidismo é um problema de saúde pública global e reconhecido pela Organização Mundial da Saúde como uma “doença tropical negligenciada” (WHO, 2007). No Brasil, as serpentes do gênero *Crotalus* são a segunda maior causadora de acidentes, e apresentam letalidade mais elevada quando comparadas com outros grupos de serpentes (BRASIL, 1998). A produção do antiveneno crotálico atual está defasada em relação aos conhecimentos acumulados sobre imunologia e farmacologia de venenos, e estudos que possibilitem a modificação dos métodos de soroprodução são necessários. Os resultados aqui apresentados mostram que a utilização de frações tóxicas em substituição ao veneno *in natura* resultou em um antiveneno com títulos elevados contra diferentes antígenos crotálicos, especificidade pelos componentes mais tóxicos presentes no veneno, capacidade neutralizante da toxicidade do veneno de *C. d. terrificus* e reconhecimento do veneno de diferentes subespécies de *Crotalus*.

O soro anticrotálico e o plasma hiperimune fornecidos pelo Instituto Butantan se mostraram capazes de reconhecer componentes presentes no veneno das serpentes *C. d. terrificus*, *C. d. collilineatus*, *C. d. cascavella* e *C. d. marajoensis*, e apresentaram os títulos mais elevados contra esses antígenos. A ocorrência de reconhecimento cruzado era esperada pela proximidade taxômica entre os animais e similaridade na composição dos venenos (BOLDRINI-FRANÇA et al., 2010; RANGEL-SANTOS et al., 2004; SANTORO et al., 1999). Os resultados de *western blotting* mostram o reconhecimento dos componentes crototoxina e PLA₂, de maior relevância na evolução do acidente, e também outros componentes presentes no veneno (**figuras 7 e 8**). O mesmo pode ser observado nos resultados da titulação, pela diferença dos títulos contra os venenos *in natura* e contra os componentes isolados (**figura 12**). Esses dados corroboram a ideia de que os antivenenos produzidos pelo método tradicional possuem anticorpos cujo papel é o reconhecimento e neutralização de compostos de menor importância no contexto do acidente. O soro e o plasma apresentaram uma capacidade de neutralização *in vivo* do veneno de *C. d. terrificus* muito similar, e mais elevada que os demais antivenenos utilizados (**figura 14**), e também uma atividade específica mais elevada (**tabela 1**). A atividade específica mais elevada do soro, quando comparado ao plasma, já era esperada, uma vez que o soro é constituído essencialmente de anticorpos, enquanto o plasma apresenta uma grande quantidade grande de proteínas além de

imunoglobulinas. A similaridade do veneno de *C. d. terrificus* com o de outras *Crotalus* brasileiras, e o reconhecimento dessas peçonhas com altos títulos, sugere que o material disponibilizado pelo Instituto Butantan seria capaz de neutralizar com eficiência a toxicidade dos venenos de *C. d. collilineatus*, *C. d. cascavella* e *C. d. marajoensis*, podendo dessa forma ser usado com segurança no tratamento de acidentes por cascavéis de forma ampla no território brasileiro.

O plasma do Grupo Experimental 1, obtido pela imunização com doses pequenas (500 µg/animal) do veneno de *C. d. terrificus*, reconheceu compostos presentes no veneno das diferentes *Crotalus*, e o perfil obtido por western blotting (**figura 9**) foi similar ao obtido do Grupo Experimental 2 (**figura 10**). É possível que a pequena quantidade de antígeno utilizado tenha direcionado a resposta imune do animal contra o componente presente em maior quantidade no veneno, a crotoxina, o que explicaria essa similaridade. Os títulos obtidos contra os diferentes antígenos crotálicos foram os mais baixos encontrados (**figura 12**) e o plasma apresentou uma capacidade protetora *in vivo* muito baixa. É descrito que o veneno de *C. d. terrificus* possui propriedades imunossupressoras (CARDOSO; MOTA, 1997), e, como nossos resultados sugerem, não é um imunógeno eficiente. Rangel-Santos (2004) demonstrou que os venenos de *C. d. collilineatus* e *C. d. cascavella* não apresentam efeito imunossupressor, e é possível que utilização de uma mistura antigênica constituída de outros venenos crotálicos em adição, ou substituição, ao veneno de *C. d. terrificus* pode resultar em antivenenos de maior qualidade. Isso poderia explicar em parte os títulos elevados obtidos com os soros e plasmas fornecidos pelo Instituto Butantan, já que estes foram gerados a partir da imunização com uma mistura 1:1 dos venenos de *C. d. terrificus* e *C. d. collilineatus*.

O plasma do Grupo Experimental 2, resultado da imunização com pequenas doses (200 µg/animal) de crotoxina isolada do veneno de *C. d. terrificus*, se mostrou capaz de reconhecer com maior especificidade os componentes crotoxina e PLA₂ presentes no veneno das diferentes serpentes *Crotalus* utilizados (**figura 10**). Os títulos contra os diferentes antígenos crotálicos foram elevados e houve uma diferença pequena entre os títulos contra os venenos *in natura* e os componentes isolados (**figura 12**), indicando uma maior especificidade dos anticorpos pela crotoxina. O plasma do Grupo Experimental 2 também apresentou uma capacidade protetora *in vivo* maior que os grupos experimentais 1 e 2, e próxima à encontrada para os antivenenos

disponibilizados pelo Instituto Butantan. A crotoxina é apontada como sendo o componente responsável pelo efeito imunossupressor do veneno crotálico (CARDOSO; MOTA, 1997), mas nossos resultados mostram que a utilização de uma pequena quantidade desse antígeno purificado pode resultar em anticorpos com grande capacidade neutralizante, indo de acordo com a demonstração de Steiner e Eisen (1966) com outros antígenos. A crotoxina é também o componente de maior toxicidade do veneno crotálico, um fator que deve ser levado em conta na determinação das dosagens inoculadas. A aplicação de doses reduzidas e utilização de adjuvantes, como lipossomos (FREITAS; FRÉZARD, 1997), pode prevenir a ocorrência de reações adversas e promover uma resposta mais eficiente dos animais soroprodutores. A utilização da crotoxina também representa uma economia da quantidade de antígeno necessário para a imunização das tropas de cavalos. De acordo com nossas estimativas de rendimento, com a mesma quantidade de veneno *in natura* necessário para a imunização de um único animal (5 mg), poderiam ser imunizados 5 cavalos com crotoxina (200 µg/animal).

O plasma do Grupo Experimental 3, obtido pela imunização dos animais com fosfolipase A₂ (100 µg/animal), apresentou uma grande especificidade pelo componente PLA₂ presente no veneno das *Crotalus* utilizadas (**figura 11**). Os títulos obtidos contra os diferentes antígenos crotálicos foram mais elevados do que os obtidos pelos grupos experimentais 1 e 2, e houve uma diferença mínima entre os títulos contra a PLA₂ e os demais antígenos, mostrando novamente a especificidade do plasma do Grupo Experimental 3 por esse componente (**figura 12**). Apesar de ter apresentado os títulos mais altos entre os três grupos experimentais, o plasma obteve os piores resultados no ensaio de soroneutralização, indicando uma baixa capacidade de fornecer proteção contra o veneno de *C. d. terrificus*. Embora a fosfolipase seja o componente enzimaticamente ativo da crotoxina, a dissociação do complexo crotapotina-PLA₂ é um fator de importância maior na neutralização da toxicidade desse composto do que a neutralização da PLA₂ apenas (CHOUMET et al., 1996, 1998). É possível que anticorpos presentes no plasma do Grupo Experimental 3 tenham se ligado à fosfolipase A₂ sem promover a dissociação do complexo, sendo assim menos eficientes na prevenção da letalidade do veneno. Outra hipótese seria de que os epítomos apresentados pela fosfolipase conjugada com a crotapotina seriam diferentes daqueles apresentados

pela fosfolipase livre. Dessa forma, os anticorpos gerados não seriam capazes de reconhecer e neutralizar a crotoxina. Isso também poderia explicar o não reconhecimento da banda de 30 kDa em nenhum dos antígenos testados por *western blotting* (**figura 11**).

Curiosamente, nos *western blottings* realizados a banda de 30 kDa não foi visualizada quando a crotoxina foi utilizada como antígeno, embora os antivenenos a tenham reconhecido nos venenos crotálicos brutos utilizados, e os resultados do SDS-Page comprovem a presença dessa banda na crotoxina purificada. Nós acreditamos que isso seja reflexo da quantidade de agente redutor (β -mercaptoetanol) x quantidade de antígeno. Nas amostras de veneno bruto, pela grande quantidade de proteínas presentes, o agente redutor teria sido insuficiente para desnaturar toda a crotoxina existente em crotapotina e PLA₂. Já nas amostras de componentes purificados, pela menor quantidade protéica, a quantidade de β -mercaptoetanol utilizada teria sido suficiente para promover uma desnaturação completa. A banda de 10 kDa, relacionada a crotapotina, foi identificada apenas no veneno de *C. d. collilineatus*, embora o SDS-Page mostre a presença dessa banda nos três venenos crotálicos utilizadas. Sabe-se que a crotapotina é fracamente imunogênica, e, embora presente em grande quantidade, uma resposta específica discreta era esperada.

Os métodos descritos para a imunização dos três grupos experimentais se mostrou eficiente no sentido de produzir antivenenos com títulos elevados e grande especificidade, mas não foi capaz de induzir um aumento da afinidade, de modo que os grupos experimentais apresentaram um score abaixo do material fornecido pelo Instituto Butantan (**figura 13**). Sabe-se que não existe uma correlação direta entre títulos e afinidade, e é aparente que um protocolo de imunização diferente seja necessário para a obtenção de anticorpos com afinidade elevada. O processo de imunização possui muitas variáveis, e a utilização de diferentes adjuvantes, alterações nas dosagens antigênicas, ou mudanças no intervalo entre as inoculações podem alterar a afinidade dos anticorpos obtidos, de modo que essa questão permanece em aberto para ser estudada com maior profundidade futuramente.

A metodologia utilizada na produção em larga escala de soro anticrotálico, fundamentada em conceitos desenvolvidos por Vital Brazil há mais 100 anos, é eficiente e resulta em antivenenos capazes de reconhecer e neutralizar o veneno das principais serpentes do gênero *Crotalus* brasileiras, como apresentado aqui, e, de forma

mais importante, na utilização diária desse material no tratamento dos pacientes. Entretanto, esse método está defasado em relação aos avanços realizados nos campos da imunologia fundamental, proteômica e farmacologia de venenos. Os componentes isolados a partir do veneno crotálico, e suas propriedades, têm sido alvo dos estudos atuais, e nesse contexto a crotoxina têm sido tratada com grande interesse, e autores têm relatado o uso de anticorpos anti-crotoxina com sucesso na neutralização da toxicidade do veneno crotálico (BEGHINI et al., 2004; FREITAS; FORTES-DIAS; DINIZ, 1990; OSHIMA-FRANCO et al., 1999). Beghini et al. (2005) foi além, e demonstrou a eficácia dos anticorpos anti-crotoxina em neutralizar a ação neurotóxica do veneno de *Bothrops jararacussu*, que apresenta uma grande quantidade de PLA₂ em seu veneno, conseguindo reproduzir os efeitos do uso do soro anticrotálico no tratamento do acidente por *B. jararacussu*, observados há muito por Vital Brazil e demonstrados experimentalmente por Dos Santos et al. (1992). Nossos resultados apontam muitas vantagens na utilização da crotoxina como agente imunizante: fácil isolamento do antígeno a partir do veneno *in natura*; redução da quantidade de antígeno necessário para a imunização dos animais soroprodutores; produção de um antiveneno com grande especificidade pelos componentes de maior toxicidade do veneno crotálico, capacidade do reconhecimento cruzado do veneno das *Crotalus* brasileiras e neutralização *in vivo* da atividade letal do veneno de *C. d. terrificus* com grande eficácia. Considerando os dados apresentados aqui e disponíveis na bibliografia, sugerimos a utilização da crotoxina purificada em adição ou substituição das misturas antigênicas de venenos *in natura* utilizados atualmente.

6 CONCLUSÕES

O método de soro anticrotático atual resulta em antivenenos eficientes na neutralização do veneno crotático, mas apresentam anticorpos que não reconhecem os componentes de maior toxicidade do veneno.

A utilização do veneno *in natura* de *C. d. terrificus* é desaconselhável, e deve ser substituída, ou complementada, por outros antígenos crotáticos.

A imunização com crotoxina exigiu pequena quantidade de antígeno e resultou em anticorpos específicos contra as frações tóxicas, capazes do reconhecimento cruzado do veneno de diferentes *Crotalus* e com grande capacidade neutralizante da ação tóxica do veneno de *C. d. terrificus*.

A imunização com PLA₂ purificada resultou em anticorpos com grande especificidade pela fosfolipase, mas a proteção *in vivo* contra o veneno de *C. d. terrificus* foi baixa.

Recomendamos a utilização da crotoxina em pequenas doses em adição ou substituição das misturas antigênicas atualmente utilizadas para a produção de soro anticrotático.

7 EXPECTATIVAS

O trabalho atual culminou na obtenção de anticorpos com grande capacidade neutralizante e especificidade. O próximo passo que gostaríamos de dar está na direção da biologia molecular. Os anticorpos obtidos por nós seriam isolados, e suas regiões CDR estudadas para a determinação de sua sequência aminoácida. As sequências seriam sintetizadas e, com o uso de *phage display*, poderíamos obter peptídeos com capacidade de reconhecer e neutralizar o veneno crotálico. As sequências codificadoras desses peptídeos poderiam ser manipuladas no sentido de aumentar a afinidade dos peptídeos pelo veneno, aumentando assim seu potencial neutralizante, e modificadas para que não provoquem reações adversas nos pacientes, como as reações alérgicas ou ativação do sistema complemento que ocorrem com a utilização de soros animais. A utilização dessas técnicas poderia levar à otimização do processo de soroprodução e ao fim da utilização de animais na produção de antivenenos.

REFERÊNCIAS*

- ALMEIDA, C. M. C.; SILVA, C. L.; PENA-COUTO, H.; ESCOCARD, R. C. M.; ROCHA, D. G.; SENTINELLI, L. P.; KIPNIS, T. L.; DIAS DA SILVA, W. D. Development of process to produce polyvalent IgY antibodies anti-African snake venom. **Toxicon**, v. 52, p. 293–301, 2008.
- AZEVEDO-MARQUES, M. M.; HERING, S.; CUPO, P. Acidente crotálico. In: COSTA CARDOSO, J. L.; SIQUEIRA FRANÇA, F. O.; WEN, F. H.; MÁLAQUE, C. M. S.; HADDAD JR, V. (Ed.). **Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes**. São Paulo: Sarvier/Fapesp, 2003. 91-98 p.
- BARRABIN, H.; MARTIARENA, J. L.; VIDAL, J. C.; BARRIO, A. Isolation and characterization of gyroxin from *Crotalus durissus terrificus* venom. In: ROSEMBERG, P. (Ed.). **Toxins: animals, plant and microbial**. New York: Pergamon Press, 1978. 113-133 p.
- BARRIO, A. Gyroxin, a new neurotoxin of *Crotalus durissus terrificus* venom. **Acta Physiol. Latinoamer.**, v. 11, p. 224, 1961.
- BARROSO, R. D. Ofidismo no Brasil. Considerações em torno de 2238 acidentes ofídicos tratados com soro. **Bol. Inst. Vital Brazil**, v. 25, p. 35-47, 1943.
- BEGHINI, D. G.; HERNANDEZ-OLIVEIRA, S.; RODRIGUES-SIMIONI, L.; NOVELLO, J. C.; HYSLOP, S.; MARANGONI, S. Anti-sera raised in rabbits against crotoxin and phospholipase A2 from *Crotalus durissus cascavella* venom neutralize the neurotoxicity of the venom and crotoxin. **Toxicon**, v. 44, p. 141–148, 2004.
- BEGHINI, D. G.; CRUZ-HÖFLING, M. A.; RANDAZZO-MOURA, P.; RODRIGUES-SIMIONI, L.; NOVELLO, J. C.; HYSLOP, S.; MARANGONI, S. Cross-neutralization of the neurotoxicity of *Crotalus durissus terrificus* and *Bothrops jararacussu* venoms by antisera against crotoxin and phospholipase A₂ from *Crotalus durissus cascavella* venom. **Toxicon**, v. 46, p. 604-611, 2005.
- BEHRING, E.; KITASATO, S. Über das zustandekommen der diphtherie-immunität und der tetanus-immunität bei tieren. **Dtsch. Med. Wschr.**, v. 16, p. 1113-1114, 1890.
- BIEBER, A. L.; NEDELKOV, D. Structural, biological and biochemical studies of myotoxin A and homologous myotoxins. **J. Toxicol. Toxin Rev.**, v. 16, p. 33-52, 1997.
- BOCHNER, R.; STRUCHINER, C. J. Acidentes por animais peçonhentos e sistemas nacionais de informação. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 18, p. 735-746, 2002.

* De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

BOLDRINI-FRANÇA, J.; CORRÊA-NETTO, C.; SILVA, M. M. S.; RODRIGUES, R. S.; DE LA TORRE, P.; PÉREZ, A.; SOARES, A. M.; ZINGALI, R. B.; NOGUEIRA, R. A.; RODRIGUES, V. M.; SANZ, L.; CALVETE, J. J. Snake venomomics and antivenomics of *Crotalus durissus* subspecies from Brazil: Assessment of geographic variation and its implication on snakebite management. **J. Proteomics**, v. 73, p. 1758-1776, 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos**. Brasília: Fundação Nacional da Saúde, 1998.

BRAZIL, V. Contribuição ao estudo do veneno ophidico. III. Tratamento das mordeduras das cobras. **Rev. Med. São Paulo**, v. 4, p. 375-380, 1901.

BRAZIL, V. Contribuição ao estudo do veneno ophidico. III. Tratamento das mordeduras das cobras. **Rev. Med. São Paulo**, v. 6, p. 265-278, 1903.

BREITHAUPT, H. Neurotoxic and myotoxic effects of *Crotalus* phospholipase A and its complex with crotopotin. **Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.**, v. 292, p. 271-278, 1976.

CALMETTE, A. L'immunisation artificielle des animaux contre le venin des serpents et la therapeutique experimentale de morsures venimeuses. **CR. Soc. Biol.**, v. 46, p. 120-124, 1894.

CAMPBELL, J. A.; LAMAR, W. W. **The venomous reptiles of the western hemisphere**. New Work: Cornell University Press, 2004.

CARDOSO, D. F.; MOTA, I. Effect of *Crotalus* venom on the humoral and cellular immune response. **Toxicon**, v. 35, p. 607-612, 1997.

CHOUMET, V.; BOUCHIER, C.; DELOT, E.; FAURE, G.; SALIOU, B.; BON, C. Structure and function relationship of crotoxin, a heterodimeric neurotoxic phospholipase A₂ from the venom of a South American rattlesnake. **Adv. Exp. Med. Biology**, v. 391, p. 197-202, 1996.

CHOUMET, V.; LAFAYE, P.; MAZIÉ, J. C.; BON, C. A monoclonal antibody directed against the non-toxic subunit of a dimeric phospholipase A₂ neurotoxin, crotoxin, neutralizes its toxicity. **Biol. Chem.**, v. 379, p. 899-906, 1998.

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

DOS SANTOS, M. C.; YAMAGUCHI, I. K.; CARICATTI, C. P.; HIGASHI, H. G.; DIAS-DA-SILVA, W. Immunization of equines with phospholipase A₂ protects against the lethal effects of *Crotalus durissus terrificus* venom. **Brazilian J. Med. Biol. Res.**, v. 22, p. 509-512, 1989.

DOS SANTOS, M. C.; GONÇALVES, L. R.; FORTES-DIAS, C. L.; CURY, Y.; GUTIÉRREZ, J. M.; FURTADO, M. F. Eficácia do antiveneno botrópico-crotálico na neutralização dos principais efeitos do veneno de *Bothrops jararacussu*. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v. 34, n. 2, p. 77-83, 1992.

FAURE, G.; CHOUMET, V.; BOUCHIER, C.; CAMOIN, L.; GUILLAUME, J. L.; MONEGIER, B.; VUILHORGNE, M.; BON, C. The origin of the diversity of crotoxin isoforms in the venom of *Crotalus durissus terrificus*. **Eur. J. Biochem.**, v. 223, p. 161-164, 1994.

FINNEY, D. J. **Probit analysis**. 3rd ed. Cambridge: Cambridge University Press, 1992. 333 p.

FREITAS, T. V.; FORTES-DIAS, C. L.; DINIZ, C. R. Protection against the lethal effects of *Crotalus durissus terrificus* (South American rattlesnake) venom in animals immunized with crotoxin. **Toxicon**, v. 28, p. 1491-1496, 1990.

FREITAS, T. V.; FRÉZARD, F. Encapsulation of native crotoxin in liposomes: a safe approach for the production of antivenom and vaccination against *Crotalus durissus terrificus* venom. **Toxicon**, v. 35, p. 91-100, 1997.

GONÇALVES, J. M. Purification and properties of crotamine. In: BUCKLEY, E. E.; PORGES, N. (Ed.). **Venoms**. Washington: A.A.A.A.S., 1959. 261 p.

GUTIÉRREZ, J. M.; LOMONTE, B.; LÉON, G.; ALAPE-GIRÓN, A.; FLORES-DÍAZ, M.; SANZ, L.; ÂNGULO, Y.; CALVETE, J. Snake venomomics and antivenomics: Proteomic tools in the design and control of antivenoms for the treatment of snakebite envenoming. **Journal of Proteomics**, v. 72, p. 165-182, 2009.

HADLER, W. A.; VITAL BRAZIL, O. Pharmacology of crotoxin. IV. Nephrotoxicity. **Mem. Inst. Butantan**, v. 33, p. 1001-1008, 1966.

HARRIS, J. B. Phospholipases in snake venoms and their effects on nerve and muscle. In: HARVEY, A. (Ed.). **Snake Toxins**. New York: Pergamon Press, 1991. p. 91-129.

KARLSSON, E. Chemistry of protein toxins in snake venoms. In: LEE, C. Y. (Ed.) **Snake venoms**. Berlin: Springer-Verlag, 1979. p. 159.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-685, 1970.

MARLAS, G. Isolation and characterization of the alpha and beta subunits of the platelet-activation glycoprotein from the venom of *Crotalus durissus cascavella*. **Biochimie**, v. 67, p. 1231-1239, 1985.

MARLAS, G.; BON, C. Relationship between the pharmacological action of crotoxin and its phospholipase activity. **Eur. J. Biochem.**, v. 125, p. 157-165, 1982.

MELGAREJO, A. R. Serpentes peçonhentas do Brasil. In: COSTA CARDOSO, J. L.; SIQUEIRA FRANÇA, F. O.; WEN, F. H.; MÁLAQUE, C. M. S.; HADDAD JR, V. (Ed.). **Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes**. São Paulo: Sarvier/Fapesp, 2003. p. 33-61.

OSHIMA-FRANCO, Y.; HYSLOP, S.; PRADO-FRANCESCHI, J.; CRUZ-HÖFLING, M. A.; RODRIGUES-SIMIONI, L. Neutralizing capacity of antisera raised in horses and rabbits against *Crotalus durissus terrificus* (South American rattlesnake) venom and its main toxin, crotoxin. **Toxicon**, v. 37, p. 1341-1357, 1999.

PHISALIX, M.; BERTRAND, G. Sur la propriété antitoxique du sang des animaux vaccinés contre le venin de vipère. **CR. Soc. Biol.**, v. 1, p. 111-115, 1894.

PRICE III, J. A. A colorimetric assay for measuring phospholipase A₂ degradation of phosphatidylcholine at physiological pH. **J. Biochem. Biophys. Methods**, v. 70, p. 441-444, 2007.

PULLEN, G. R.; FITZGERALD, M. G.; HOSKING, C. S. Antibody avidity determination by ELISA using thiocyanate elution. **J. Immunol. Methods**, v. 86, p. 83-87, 1986.

RANGEL-SANTOS, A. **Atividade tóxica e imunossupressora do principal componente do veneno de serpentes do gênero *Crotalus***. 2004. 105 f. Tese (Doutorado em Imunologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

RANGEL-SANTOS, A.; LIMA, A.; LOPES-FERREIRA, M.; CARDOSO, D. F. Immunosuppressive role of principal toxin (crotoxin) of *Crotalus durissus terrificus* venom. **Toxicon**, v. 44, p. 609–616, 2004.

RAW, I.; HIGASHI, H. G.; KELEN, E. M. Antivenom production and organization of the public health system for the treatment of envenoming in Brazil. In: BON, C.; GOYFFON, M. (Ed.). **Envenomings and their Treatments**. Lyon: Foundation Marcel Mérieux, 1996. p. 155-160.

ROMERO-STEINER, S.; HOLDER, P. F.; DE LEON, P. G.; SPEAR, W.; HENNESSY, T. W.; CARLONE, G. M. Avidity determinations for *Haemophilus influenzae* Type b anti-polyribosylribitol phosphate antibodies. **Clin. Diagn. Lab. Immunol.**, v. 12, p. 1029-1035, 2005.

SAMPAIO, S. C.; BRIGATTE, P.; SOUSA-E-SILVA, M. C.; DOS SANTOS, E. C.; RANGEL-SANTOS, A. C.; CURI, R.; CURY, Y. Contribution of crotoxin for the inhibitory effect of *Crotalus durissus terrificus* snake venom on macrophage function. **Toxicon**, v. 41, p. 899–907, 2003.

SAMPAIO, S. C.; HYSLOP, S.; FONTES, M. R. M.; PRADO-FRANCESCHI, J.; ZAMBELLI, V. O.; MAGRO, A. J.; BRIGATTE, P.; GUTIERREZ, V.; CURY, Y. Crotoxin: novel activities for a class β-neurotoxin. **Toxicon**, v. 55, p. 1045-1060, 2010.

SANO-MARTINS, I. S.; DAIMON, T. Electron microscopic cytochemistry on the distribution of wheat germ agglutinin receptor on the platelet plasma membrane after treatment with convulxin isolated from *Crotalus durissus terrificus* venom. **Toxicon**, v. 30, p. 141-150, 1992.

SANTORO, M. L.; SOUSA-E-SILVA, M. C. C.; GONÇALVES, L. R. C.; ALMEIDA SANTOS, S. M.; CARDOSO, D. F.; LAPORTA-FERREIRA, I.; SAIKI, M.; PERES, C. A.; SANO-MARTINS, I. S. Comparision of the biological activities in venons from three subspecies of the South American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*, *C. d. cascavella* and *C. d. collilineatus*). **Comparative Biochem. Phisiol.**, v. 22, p. 61-73, 2009.

SANTOS, P. E.; SOUZA, S. D.; FREIRE-MAIA, L.; ALMEIDA, A. P. Effects of crotoxin on the isolated guinea pig heart. **Toxicon**, v. 28, p. 215-224, 1990.

SEKI, C.; VIDAL, J. C.; BARRIO, A. Purification of gyroxin from South American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*). **Toxicon**, v. 18, p. 235-247, 1980.

SEWALL, H. Experiments in the preventive inoculation of rattlesnake venom. **J. Physiol. Lond.**, v. 8, p. 203-210, 1887.

SLOTTA, K. H.; FRAENKEL-CONRAT, H. L. Schlangengifte. III Mitteilung: Reinnigung und Krystallisationdes Klapperschlangen-Giftes. **Ber. Disch. Chem. Ges.**, v. 71, p. 1076-1081, 1938.

SMITH, P. K.; KROHN, R. I.; HERMANSON, G. T.; MALLIA, A. K.; GARTNER, F. H.; PROVENZANO, M. D.; FUJIMOTO, E. K.; GOEKE, N. M.; OLSON, B. J.; KLENK, D. C. Measurement of protein using bicinchoninic acid. **Anal. Biochem.**, v. 150, n. 1, p. 76-85, 1985.

STEINER, L. A.; EISEN, H. N. Variations in the immune response to a simple determinant. **Bacteriological Reviews**, v. 30, n. 2, p. 383-396, 1966.

VITAL BRAZIL, O. Pharmacology of crystalline crotoxin-II. Neuromuscular blocking action. **Mem. Inst. Butantan**, v. 33, p. 981-992, 1966.

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

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Rabies and envenomings. A neglected public health issue: report of a consultative meeting**. Geneva: WHO Offset Publications, 2007.

WÜCHERER, O. Sobre a mordedura das cobras venenosas e seu tratamento. **Gazeta Med. Bahia**, v. 21, p. 241-243, 1867.

ZHANG, H. L.; HAN, R.; CHEN, Z. X.; CHEN, B. W.; GU, Z. L.; REID, P. F. Opiate and acetylcholine-independent analgesic actions of crotoxin isolated from *Crotalus durissus terrificus* venom. **Toxicon**, v. 48, p. 175–182, 2006.

APÊNDICE – Artigo completo publicado em periódico

Characterization of anti-*crotalic* antibodies

F.R. Guidolin^a, D.V. Tambourgi^a, R. Guidolin^{b,1}, J.R. Marcelino^b, C.K. Okamoto^a,
F.C. Magnoli^a, G.P. Queiroz^a, W. Dias da Silva^{a,*}

^a Laboratório de Imunoquímica, Instituto Butantan, 05503-900 São Paulo, SP, Brazil

^b Divisão de Desenvolvimento Tecnológico e Produção, Instituto Butantan, São Paulo, SP, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 29 October 2012

Received in revised form 8 January 2013

Accepted 16 January 2013

Available online 8 February 2013

Keywords:

Snake venom

Antivenom

Crotalus

Crotoxin

Crotapotin

Phospholipase A₂

ABSTRACT

Crotalus durissus terrificus, *C. d. collilineatus*, *C. d. cascavella* and *C. d. marajoensis* are responsible minor but severe snake bites in Brazil. The venoms of these snakes share the presence of crotoxin, a neurotoxin comprising of two associated components, crotapotin and phospholipase A₂ (PLA₂). Treatment of the victims with specific antiserum is the unique effective therapeutic measure. The ability of anti-*Crotalus antisera* produced by the routine using crude venom to immunize horses or purified crotoxin and PLA₂ as individual immunogens was compared. Antisera obtained from horses immunized with *C. durissus terrificus* crude venom were able to recognize and neutralize not only the toxins presents in *C. durissus terrificus*, but also the ones present in the venoms from *C. d. collilineatus*, *C. d. cascavella* and *C. d. marajoensis*. Antisera from horses immunized with individual crotoxin or PLA₂, although in lesser titers, were also able of recognizing the toxins in all four *Crotalus* species and neutralize the lethality of the *C. d. terrificus* venom.

© 2013 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Envenomation caused by *Crotalus* snake bites represents 6.2% of reported cases of envenomation in Brazil, with an estimated mortality rate of 1.8% per year (Ministério da Saúde, Brasil, 2001). As is shown in Fig. 1, five geographic subspecies of *Crotalus* are found in Brazil. *Crotalus durissus terrificus*, although common in the southern states of São Paulo, Minas Gerais, Paraná and Rio Grande do Sul, is also present in the areas of Mato Grosso, Rondônia, Amazonas and Pará to the west, including Paraguai, Uruguai and Argentina. *Crotalus durissus cascavella* is found in the dry “caatinga” region, ranging from southern Maranhão, Piauí, Ceará and Rio Grande do Norte. *Crotalus durissus collilineatus* is present in central and northern Brazil, including parts of Rondônia, Mato Grosso, Goiás, southWestern Bahia,

Western Minas Gerais, and São Paulo (where it intermingles with *C. durissus terrificus*), and its presence may extend southward into Western Paraná (Fig. 1). *Crotalus durissus marajoensis* is restricted to the “cerrado” of Ilha de Marajó in the state of Pará. *Crotalus durissus ruuima* is also present in Roraima (Melgarejo, 2003). The general pharmacological and composition of the venom from the various *Crotalus* species in Brazil is very similar (Santoro et al., 1999; Boldrini-Franca, 2010). The toxins in *Crotalus* venoms are crotoxin, crotamin (Gonçalves, 1956) and gyroxin (Barrio, 1961; Barrabin et al., 1978). Crotoxin is responsible for both the neurotoxic and systemic myotoxic effects characteristic of this venom. Crotoxin was first isolated from the venom of *C. d. terrificus* (Slotta and Fraenkel-Conrat, 1938). Crotoxin comprises two sub-units that are non-covalently linked: the non-catalytic crotoxin A (CA), or crotapotin, and the catalytic unit, crotoxin B (CB), which is also known as PLA₂. Crotapotin is an acidic polypeptide with no detectable enzymatic activity (Harris, 1991). Crotapotin, working as a chaperon, potentiates the toxicity of PLA₂ by about 35-fold. PLA₂ is a basic single-chain polypeptide formed by 123 amino acid residues. PLA₂ binds pre-

* Corresponding author.

E-mail addresses: wds@butantan.gov.br, wds@uenf.br (W. Dias da Silva).

¹ Dr. Rosalvo Guidolin contributed to improving the quality of antisera and vaccines throughout his fruitful, professional life (in memoriam).

Fig. 1. Distribution of *Crotalus* subspecies in Brazil (modified from Melgarejo, 2003).

synaptic receptors, inhibiting acetylcholine release (Marlas and Bon, 1982). Mice and horses immunized with purified PLA₂ are protected from the lethal effects of the *C. d. terrificus* crude venom (Dos Santos et al., 1988, 1989). While antibodies specific to crotoxin are unable to neutralize crotoxin activity, antibodies specific to PLA₂ neutralize crotoxin but do not cross-react with crotoxin (Choumet et al., 1998).

Crotamin was isolated as a basic protein, i.p. 10.3, from *C. d. terrificus* (Gonçalves, 1956). The biological and biochemical molecular features of crotamin suggest that crotamin is related to myotoxins (Bieber and Nedelkov, 1997). Crotamin was purified (Seki et al., 1980), and its nucleotide sequence was determined (Rádis-Baptista et al., 1999). *In vitro* and *in vivo* studies indicate that crotamin is a cell membrane-penetrating protein with nuclear localization. Although the nature of the interaction between crotamin and cells has not been investigated at the molecular level, the suggested mechanisms differ from those of DAPI or 5-BrdU. Cumulatively, the data indicate that crotamin could be a marker for actively proliferating cells (Kerkis et al., 2004).

Gyroxin was described by Barrio (1961), and it was subsequently isolated from the venom of *C. d. terrificus* (Barrabin et al., 1978). This toxin was first identified by its ability to induce a loss of equilibrium and the subsequent complete revolutions of the body around the longitudinal axis upon experimental injection into mice (barrel roll). These manifestations are preceded by systemic skeletal muscle contractions (Kosako et al., 2000). In addition to these typical neurological toxic effects, gyroxin exhibits a thrombin-like activity fibrinogen A cleavage at its N-terminal peptide region (Raw et al., 1986).

Victims of *C. d. terrificus* exposure exhibit almost no local symptoms but do present grave neurotoxic and myotoxic symptoms (Azevedo-Marques et al., 2003). The neurotoxic effects include eyelid heaviness; facial muscle paralysis, specifically around the mouth; blurred vision; ptosis; external ophthalmoplegia; and progressive respiratory muscle paralysis. The myotoxic effects include diffuse

muscular pain, red or brown urine, decreased blood coagulation, and increased serum levels of creatine kinase (CK), lactic dehydrogenase (LDH), aminotransferase aspartate (AST) and aldolase. Acute renal failure (ARF) is the most important systemic symptom. Histopathological analyses of muscle fragments collected distal from the bite location show myonecrosis with lysis of the myofilaments. The induction of myonecrosis by *C. d. terrificus* venom has been experimentally confirmed, and this effect was demonstrated to be caused by the sub-units of crotoxin (Kouyoumdjian et al., 1986). Neurotoxicity (Vital Brazil, 1966), nephrotoxicity (Hadler and Vital Brazil, 1966), myotoxicity (Breithaupt, 1976) and cardiotoxicity (Santos et al., 1990) have been also ascribed to crotoxin. The variety of local and systemic effects resulting from *Crotalus* venom injection is likely the result of the combined action of the toxic components of the venom.

Current antiserum production still relies on the use of whole snake venom as an immunogen. This strategy results in the production of antibodies against both the toxic and non-toxic components of the venom, resulting in an antiserum that contains both relevant and non-relevant therapeutic antibodies. The injection of irrelevant antibodies into victims of snake bites can increase the risk adverse reactions (Cardoso et al., 1993). Thus, using purified toxic venom components instead of whole venom during antiserum production is the first step to obtaining more specific antivenoms. To promote the selection and expansion of high-affinity naïve and memory lymphocyte subsets, the immunization period and the amount of injected immunogen should be reduced. Steiner and Eisen (1966) demonstrated that smaller quantities of antigen result in antibodies with high titers and higher affinity. Highly specific antivenom antibodies exhibiting high avidity and high-affinity will likely result in more efficient and reliable therapeutic tools.

This work aims to compare the quality between sera produced by injecting crude *Crotalus* venom into horses and antivenoms produced using purified crotoxin and phospholipase A₂ as immunogens. Evaluated parameters include the antibody titers against whole venom and the toxic components of venom, the levels of neutralizing antibodies, the antibody affinity and the ability of these antibodies to cross-react with venoms from related *Crotalus* subspecies found in Brazil.

2. Materials and methods

2.1. Reagents

Tris buffer (Tris HCl, 25 mM; pH 7.4), complete MMT80 (Marcol Montanide ISA 50, 2 mL; sodium chloride 0.15 M, 5 mL; Tween 80, 1 mL; lyophilized BCG, 1 mg), incomplete MMT80 (Marcol Montanide ISA 50, 2 mL; sodium chloride 0.15 M, 5 mL; Tween 80, 1 mL), solution A for SDS buffer (Tris, 6.25 mM; SDS, 6.94 mM; pH 6.8); SDS buffer for reduction conditions (solution A, 8.5 mL; glycerol, 1 mL; β-mercaptoethanol, 0.5 mL; bromophenol blue 1%, 2 mL), PBS buffer (potassium chloride, 2.6 mM; monobasic potassium phosphate, 1.5 mM; sodium chloride, 76 mM; disodium phosphate, 8.2 mM; pH 7.2–7.4), AP buffer (Tris HCl,

100 mM; sodium chloride, 100 mM; magnesium chloride, 5 mM; pH 9.5), NBT solution (NBT, 50 mg; dimethylphormamide, 700 μ L; H₂O, 300 μ L), BCIP solution (BCIP, 50 mg; dimethylphormamide, 1 mL), developing solution for Western/dot blotting (AP buffer, 5 mL; NBT solution, 33 μ L; BCIP solution, 16.5 μ L), citrate buffer (citric acid, 0.1 M; monobasic sodium phosphate, 0.2 M; pH 5.0), OPD solution (OPD, 20 mg; citric acid, 1 mL), and substrate buffer for ELISA (citrate buffer, 5 mL; OPD solution, 100 μ L; H₂O₂ 30 volumes, 5 μ L). All the reagents used were obtained from Sigma–Aldrich (USA), except from NBT/BCIP, obtained from Molecular Probes (USA).

2.2. Quantification of proteins

The protein concentration of the venoms and sera was assessed by the bicinchoninic acid method (Smith et al., 1985) with the Pierce BCA Protein Assay Kit (Rockford, IL).

2.3. Venoms

C. d. terrificus, *C. d. collilineatus*, *C. d. cascavella* and *C. d. marajoensis* venoms were supplied by “Laboratório de Venenos, Instituto Butantan”. Each venom batch was a mixture of samples collected from several snake specimens and lyophilized. The lethality (LD₅₀) of crude *Crotalus* spp. Venoms was determined by intraperitoneally injecting male Swiss mice, 18–20 g, with 500 μ L of PBS containing 1.0, 2.0, 4.0 or 8.0 μ g of the venoms. Four mice were used for each venom dose. The deaths were recorded after 48 h, and the death/survival ratio was determined by probit analysis (Finney, 1992; World Health Organization, 1981).

2.4. Isolation of crotoxin and phospholipase A₂ from *C. d. terrificus* venom

Samples of *C. d. terrificus* venom (20.0 mg) were applied to a column packed with Mono Q HR 5/5 resin (Amersham Pharmacia Biotech AB/USA), which was previously equilibrated at room temperature with 25 mM Tris, pH 7.4 buffer. After washing the column with the same buffer, a linear gradient of NaCl starting from 0 to 0.1 M was applied under a 30 ml/h flow, and fractions corresponding to each protein peak were collected. Protein concentration and PLA₂ activity in each protein peak were determined using the method described by Price (2007). The absorbance at 280 nm was determined on UPC-900 (ÄKTA FPLC) and by specific hydrolysis of the PLA₂ substrate 1-Phosphatidylcholine, Type X-E, minimum 60% TLC (Sigma–Aldrich, Inc., 3050 Spruce Street, St. Louis, MO 63103 USA). Fractions exhibiting PLA₂ activity were pooled together, lyophilized and stored until immunization of the horses.

2.5. Animals

Groups of 20 adult horses (400–450 kg) are regularly used to produce anti-*Crotalus* antivenom. Six horses (two per group) were selected to be immunized with *C. d. terrificus* venom, purified crotoxin or PLA₂ venom components. The animals, not previously immunized, were maintained in a special animal house at the São Joaquim

Farm, Instituto Butantan, São Paulo, Brazil. Before immunization, the animals were vaccinated against the most common equine infectious diseases. Male Swiss out bred mice, 18–20 g, (four per group) were used in protocols to determine the lethality (LD₅₀) of the venoms and the neutralizing potency (ED₅₀) of the antivenoms. Mice were kept in standard conditions, with light between 7:00 a.m. and 6:00 p.m., a temperature of 22 $\pm$ 2 °C and laboratory food and water *ad libitum*. All animals used in this study were maintained and treated under strict ethical conditions in accordance with the “International Animal Welfare recommendations” (Remfry, 1987) and the “Committee Members, International Society on Toxinology” (1992). This project was approved by the Ethics Committee of Animal Usage in Research (Protocol No: 790/11) of the Instituto Butantan.

2.6. Antigen preparation and immunization schedule

Horses selected to produce regular antivenom received four inoculations of a mixture containing equal amounts of *C. d. terrificus* and *C. d. collilineatus* venoms. Horses were immunized as described in Guidolin et al. (2010). Horses were s.c. injected in the back with 2.0 mL of incomplete MMT80 or complete MMT80 adjuvant mixtures, or with 0.15 M NaCl containing 2.5–5.0 mg of venom. Two vaccinations were performed, with two weeks between the vaccinations. Two weeks after the last immunization, the antisera antibody titers were evaluated: the horses were bled, and a volume of blood corresponding to one-twelfth of each animal's body weight was collected in a sterile plastic bag containing anticoagulant. Plasma and cells were separated by gravity sedimentation, and the cells were re-infused into the corresponding horse through the jugular vein. Plasma from the same horse was pooled and stored at 4 °C. Before immunization, blood samples were drawn by jugular vein puncture, and sera was stored at –20 °C for use as negative controls in the antisera antibody determinations. Three months after bleeding, boosters with similar doses of venom in PBS were given, and blood was collected and processed as described previously (Guidolin et al., 2010). This final procedure was generally repeated for the following two years.

Horses included in the Experimental Groups received four inoculations of the following mixtures. Experimental Group 1 ($n = 2$): 500 μ g/animal of crude *C. d. terrificus* venom; Experimental Group 2 ($n = 2$): 200 μ g/animal of partially purified crotoxin; and Experimental Group 3 ($n = 2$): 100 μ g/animal of partially purified PLA₂. The first inoculation of every group was prepared in Complete MMT80 and the respective antigens. The second inoculation was prepared in Incomplete MMT80 and the respective antigens. The final two inoculations were prepared in 8.0 mL of 0.15 M NaCl containing the respective antigens. The inoculations were performed 15 days apart by subcutaneous injection at four different points of the dorsal region of each animal. Fifteen days after the last inoculation, blood was collected in sterile plastic bags containing anticoagulant solution (citric acid, 1.47 g; sodium citrate, 4.80 g; dextrose, 1.47 g; dissolved in a sufficient amount of distilled water to a final volume of 100 mL) by venipuncture

of the jugular vein. The bags were allowed to stand overnight in a refrigerating chamber (4–8 °C). Plasma samples from each horse were pooled and stored at –20 °C. Blood cells resulting from the bleeding were re-infused in the original horse.

2.7. Antivenoms

Four equine plasma samples (Batches No: #143, #158, #223 and #356) and six F(ab')₂ anti-*Crotalus* commercial antivenom preparations (Batch #1006140; Batch #100107119; Batch #1007187; Batch #1009230; Batch #1010282; Batch #1010283) were provided by “Divisão de Desenvolvimento Tecnológico e Produção – Seção de Processamento de Plasmas Hiperimunes, Instituto Butantan”. Experimental plasma was obtained by separating plasma from the blood collected from the experimental animals, as described in Section 2.7.

2.8. Processing the horse plasma

The procedure presently used to manufacture horse commercial serum from plasma is completely enclosed and automated (Raw et al., 1996). The procedure used in this study, improved with the introduction of additional filtration and chromatography, included ten steps (Guidolin et al., 2010). Before the antivenom was released to treat envenomed victims, the purified F(ab')₂ were submitted to a quality control evaluation in order to verify the absence of bacterial contamination, bacterial lipopolysaccharide and toxic substances. The final products were adjusted to contain the desired neutralizing antibody titer in less than 10 mg of protein/ml and were labeled as “*Crotalic Anti-serum*”. One milliliter of the preparation neutralized 1.5 mg of *Crotalus* venom. Each ampoule contained 10 ml of antivenom. This antivenom, as well as the other antivenoms produced by the “Divisão de Desenvolvimento Tecnológico e Produção – Instituto Butantan”, was prepared according to the recommendations of the World Health Organization (1981). Serum rich in F(ab')₂ fragments was produced as described by Towbin et al. (1979).

2.9. SDS-PAGE and Western blot analyses

Western blot analysis was carried out according to the method previously described by Towbin et al. (1979). Crude *C. d. terrificus*, *C. d. collilineatus*, *C. d. cascavella* and *C. d. marajoensis* venoms (10 µg) and partially purified crotoxin and PLA₂ (2 µg) were treated with SDS-PAGE sample buffer under reducing conditions and resolved in a 12.5% polyacrylamide gel. Some preparations were stained with silver sulfate, while others were electroblotted onto nitrocellulose membranes, according the method described by Laemmli (1970). These membranes were blocked with PBS buffer containing 5% BSA at 37 °C for 2 h, washed with PBS, and treated with equine anti-*Crotalus* antivenoms diluted to 1:5000 in PBS plus 0.1% BSA for 1 h at room temperature on a horizontal shaker. After being washed three times with PBS plus 0.05% Tween-20, the membranes were incubated with rabbit anti-horse IgG conjugated to alkaline phosphatase (whole molecule) diluted 1:7500 in PBS plus

0.1% BSA and 0.05% Tween-20. Then, the membranes were incubated for 1 h at room temperature on a horizontal shaker. The membranes were washed three times with PBS plus 0.05% Tween-20 and placed in developing solution for Western blotting. The reaction was terminated by washing with distilled water.

2.10. Quantification of the antivenom antibodies

Polystyrene, high-affinity ELISA plates (96 wells) were coated with 1.0 µg of crude *C. d. terrificus*, *C. d. collilineatus*, *C. d. cascavella* or *C. d. marajoensis* venom in 100 µL of PBS buffer and kept overnight at 4 °C. In some assays, crotoxin or PLA₂ purified from *C. d. terrificus* was used as the antigen. The wells were blocked for 2 h at 37 °C with 200 µL of PBS plus 5% BSA. The wells were washed with 200 µL of PBS. Serial dilutions of horse IgG or F(ab')₂ preparations (1:4000 to 2,048,000) in PBS plus 0.1% BSA were prepared, and 100 µL of each dilution was added to individual wells. The plates were then incubated at 37 °C for 1 h, and then, the wells were washed three times with the wash buffer. Rabbit peroxidase-conjugated anti-horse IgG (whole molecule) (Sigma Aldrich, St. Louis, MO) diluted (1:20,000) in PBS plus 0.1% BSA and 0.05% Tween-20 (100 µL/well) was added to the plates. The plates were incubated for 1 h at 37 °C. After three washes with the wash buffer, 50 µL of substrate buffer were added to each well, and plates were incubated at room temperature for 15 min. The reaction was terminated with 50 µL of 4 N sulfuric acid per well. Absorbance was recorded at 492 nm using an ELISA plate reader (Labsystems Multiskan Ex, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA). IgG from horses collected before immunization was always used as a negative control. The IgG dilution giving an optical density of 0.2 was used to calculate the U-ELISA per milliliter of the undiluted IgG solution. One U-ELISA was defined as the smallest dilution of antibody that presented an O.D. of 0.2 under conditions of the ELISA assay, as described previously (Almeida et al., 2008). The value was then multiplied by 10 to correspond to milliliters.

2.11. Antivenom affinity measurement

The affinity of anti-*Crotalus* antibody was measured by ELISA, as described above, with the inclusion of a potassium thiocyanate (KSCN) elution step (Pullen et al., 1986; Romero-Steiner et al., 2005). After the serum incubation step, dilutions of KSCN (0.0–5.0 M, in intervals of 0.50 M) in PBS were added to the wells and incubated for 30 min at room temperature. The remaining bound antibodies were detected with rabbit peroxidase-conjugated anti-horse IgG (whole molecule) (Sigma Aldrich, St. Louis, MO) diluted (1:20,000) in PBS plus 0.1% BSA (100 µL/well). After three washes with the wash buffer, 50 µL/well of substrate buffer was added, and the plates were incubated at room temperature for 15 min. The reaction was terminated with 50 µL/well of 4 N sulfuric acid. Absorbance was recorded at 492 nm using an ELISA plate reader (Labsystems Multiskan Ex, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA). The results are expressed as follows: affinity index (AI) = M KSCN needed to displace 50% of the bound antibodies.

2.12. Neutralization of the *Crotalus* spp. lethality by antivenoms

A fixed amount of 5 LD₅₀ of *C. d. terrificus* venom and various dilutions of antivenoms were incubated for 30 min at 37 °C. Venom samples incubated only with PBS buffer were used as controls. After incubation, 500 µL aliquots of the mixtures were intraperitoneally injected in the mice. Five mice were used per mixture. The death/survival ratio was recorded 48 h after the injection. ED₅₀ was estimated by probit analysis (Finney, 1992).

2.13. Statistical analysis

The obtained data were subject to a one-way ANOVA, followed by the Dunn's multiple comparison test. Differences were considered to be significant for $P < 0.05$.

3. Results

3.1. General characteristics of *Crotalus* venom

The protein concentrations (µg/mL) and lethality (LD₅₀) of the *C. d. terrificus*, *C. d. collilineatus*, *C. d. cascavella* and *C. d. marajoensis* venoms used in this work were determined by using the bicinchoninic acid method and the LD₅₀ in mice (Table 1). The electrophoretic profiles of the venoms were determined by the polyacrylamide electrophoresis (Fig. 3a).

Previous studies have shown that the major venom in the *Crotalus* species is crotoxin (Santoro et al., 1999). Although some differences were noted, mainly in terms of the electrophoretic mobility of the protein bands and their intensity, the venoms were similar overall in the four *Crotalus* subspecies. The differences noted, usually in the concentrations of particular components, correlated with the ages of the snake donors at the time of venom collection as well to the particular ecological regions from which the specimens were collected.

3.2. Chromatographic isolation of PLA₂ from the *C. durissus* terrificus venom

C. d. terrificus crude venom (20.0 mg) was applied to a Mono Q HR 5/5 column (Amersham Pharmacia Biotech AB,

Uppsala, Sweden), which had been previously equilibrated with pH 7.4 Tris buffer and eluted with a linear gradient of NaCl (0.0–1.0 M) in pH 7.4 Tris buffer. The chromatography resulted in 11 peaks (Fig. 2a). Peak 2 was represented by only one 15 kDa protein band, whereas peaks 5 contained a majority band of 15 kDa and the other of 30 kDa (Fig. 2b). The activity of PLA₂, as assayed on synthetic substrate 1- α -phosphatidylcholine, was detected only in peak 2 (data not shown). Upon “dot blotting” using specific mouse anti-crotoxin as the primary antibody, peak 5 reacted positively, indicating the presence of crotoxin (data not shown).

3.3. Electrophoretic profiles of the different *C. d. terrificus* venoms

Equal samples of the *C. d. terrificus*, *C. d. collilineatus*, *C. d. cascavella* and *C. d. marajoensis* venoms were treated with SDS under reducing conditions and separated by polyacrylamide gel electrophoresis (upper gel, 5%; lower gel, 12.5%). Samples of purified crotoxin and PLA₂ were run in parallel. Fig. 3a shows strong similarities among the protein profiles of all venoms. The presence of crotoxin, PLA₂ and conjugated crotoxin was indicated by the similar mobility of the 10 kDa, 15 kDa and 30 kDa protein bands in the samples with the isolated crotoxin and PLA₂ controls that were run in parallel. A band of 35 kDa, equivalent to gyroxin, could be found in all the venom samples, although not in the purified fractions.

3.4. Antivenom recognition of the antigenic components present in the venom of four *Crotalus* species

Samples from the antivenom produced by the Instituto Butantan and samples of the *Crotalus* venoms were electrophoretically separated under reducing conditions on polyacrylamide gel electrophoresis (upper gel, 5%; lower gel, 12.5%). The protein bands were transferred to nitrocellulose membranes, treated with samples from the antisera (diluted 1:5000) and exposed to rabbit IgG anti-horse immunoglobulins as the second antibody. The recognition patterns of the plasma and antivenom from the Instituto Butantan were very similar, with the presence of bands near 15 kDa and 30 kDa, corresponding to PLA₂ and crotoxin, respectively (Fig. 3b and c). These proteins were detected in all the venoms with great intensity. Bands at 50 kDa and 60 kDa were also found in the *C. d. terrificus*, *C. d. collilineatus* and *C. d. cascavella* venoms, and a 10 kDa band, corresponding to crotoxin, was detected in the *C. d. collilineatus* venom. In the plasma from Experimental Group 1, bands at 15 kDa and 30 kDa were observed for all the venoms, a 10 kDa band was observed for the *C. d. terrificus* and *C. d. collilineatus* venoms, and a 60 kDa band was observed for the *C. d. terrificus* venom (Fig. 3d). In the plasma from Experimental Group 2, bands at 15 kDa and 30 kDa were observed in all the venoms, a band at 10 kDa was observed for *C. d. collilineatus* venom, and bands at 50 kDa and 60 kDa were observed for the *C. d. terrificus* venom (Fig. 3e). In the plasma from Experimental Group 3, only the 15 kDa band was observed for all the venoms (Fig. 3f).

Table 1
Specific activity of antivenoms against *C. d. terrificus* venom.

Antivenom	Protein concentration ^a	Neutralizing potency ^b	Specific activity ^c
IBU serum	93.10 ± 22.96	131.60	0.082
IBU plasma	103.24 ± 15.98	145.30	0.067
Exp. Group 1	105.80 ± 3.10	416.70	0.023
Exp. Group 2	110.22 ± 3.51	320.00	0.029
Exp. Group 3	116.19 ± 6.05	403.00	0.022

^a Protein concentration is expressed as mg/mL.

^b Neutralization is expressed as Median Effective Dose (ED₅₀), defined as the volume of antivenom (µL) required to reduce by 50% the mortality of mice injected with 5 LD₅₀.

^c Specific activity value for each antivenom was calculated by using the formula: SA = (1000/µL corresponding to 1 ED₅₀)/(mg/mL of protein concentration).

Fig. 2. Partial isolation of phospholipase 2 (PLA₂) and crotoxin from *C. d. terrificus*. a) Electrophoretic profile of the crude *C. d. terrificus* venom. Samples of the venom (20.0 mg) were applied to a chromatography column packed with Mono Q HR 5/5 (Amersham Pharmacia Biotech AB, USA) after equilibration with Tris 25 mM, pH 7.4 buffer. Adsorbed proteins were eluted with a linear gradient of NaCl from 0 to 1.0 M. The samples were collected, the protein contents were determined, and the presence of PLA₂ quantified using a synthetic specific substrate. b) SDS-Page, upper gel 5%, lower gel 12.5%, stained with silver, confirming the majority presence of PLA₂ in peak 2 and crotoxin in peak 5. In all, 10 µg of each sample was applied under reducing conditions.

3.5. Antivenom antibody quantification

Equal samples from the antivenoms were diluted ($1:4.0 \times 10^3$ to $1:2.048 \times 10^6$) and assayed by ELISA. The obtained O.D. values at 492 nm were plotted against the corresponding serum dilutions, and dilutions giving O.D. values of 0.2 were used to calculate the number of U-ELISA/mL (Fig. 4). Antivenoms produced by the Instituto Butantan obtained the highest titers against the *C. d. terrificus*, *C. d. collilineatus*, *C. d. cascavella* and *C. d. marajoensis* venoms. Although no significant difference could be observed, there was a gap between the titers obtained against the crude venoms and those obtained against the purified components, suggesting that the high titers observed were related to the recognition of components other than crotoxin and PLA₂. The titers obtained with plasma from Experimental Group 1 were the lowest against all the antigens tested. Plasma from Experimental Groups 2 and 3 showed high titers against the antigens tested. Of interest, no difference could be found between the titers against crude venoms and purified components, indicating that crotoxin and PLA₂ were the components being recognized. Antibody activity against the *C. d. collilineatus*, *C. d. cascavella* and *C. d. marajoensis* venoms were found with all the antivenoms, although those venoms were not used in the immunization schedules (with the exception of *C. d. collilineatus*, which was used in the Instituto Butantan's immunization schedule).

3.6. Antibody affinity evaluation

The antibody affinity for *C. d. terrificus* crude venom, crotoxin and PLA₂ was evaluated by ELISA with the addition of KSCN in increasing concentrations as a chaotropic agent

(Fig. 5). The antivenoms provided by the Instituto Butantan showed the highest affinity for the antigens used. The affinity scores from the three Experimental Groups were lower, and there was no difference between them.

3.7. Neutralization of venom lethality

The lethal dose 50% (LD₅₀) of *C. d. terrificus* venoms was calculated to be 1.2 µg per animal. Neutralizing activity was assessed by injecting Swiss mice (18–20 g) with serial dilutions of antivenoms and 5 LD₅₀ of venom, and neutralization was calculated by probit analysis. Results are expressed as the volume of antivenom (mL) required to neutralize 1 mg of venom (Fig. 6). Antivenom and plasma provided by the Instituto Butantan showed a great neutralizing capacity, with 2.18 mL and 2.42 mL required to neutralize 1 mg of venom, respectively. Plasma from Experimental Group 1 displayed a low neutralizing action, with 6.15 mL required to neutralize the venom. Plasma from Experimental Group 2 showed the highest neutralization capacity among the three Experimental Groups, although it was still lower than the commercial antivenoms, requiring 3.80 mL to neutralize 1 mg of venom. Plasma from Experimental Group 3 showed the lowest neutralizing capacity, with 6.68 mL needed to neutralize the venom.

Using the *in vivo* neutralization data and the protein concentration of the antivenoms, we were able to calculate the specific activity against *C. d. terrificus* venom (Table 1).

4. Discussion

The production of anti-snake venom antibodies to treat victims bitten by venomous snakes was originally

Fig. 3. Electrophoretic profile of different crotalic venoms and recognition by antivenoms as assessed by Western blotting (WB). a) SDS-Page, upper gel 5%, lower gel: 12.5%, stained with silver. b) WB using detection by the Instituto Butantan serum. c) WB using detection by the Instituto Butantan plasma. d) WB using detection by Experimental Group 1. e) WB using detection by Experimental Group 2. f) WB using detection by Experimental Group 3. In all, 10 μ g of crude venom or 2 μ g of partially purified fractions was applied, under reducing conditions. Serum and plasma samples were diluted to 1:5000.

developed in France at the Institute Pasteur (Calmette, 1894) and later developed and greatly expanded by Vital Brazil (Brazil, 1901, 1903). Crude venoms and horses were the immunogens and animals producing the antibodies, respectively. Once the antivenom effectiveness was demonstrated, the original procedure, although preserved in essence, evolved as dictated by progress in fields such as carbohydrate, lipid, and protein chemistry and basic immunology. For example, the serum protein cleavage by pepsin (Pope, 1936), with the clear objective of reducing the amount of heterologous protein injection into the victims. In addition to cleaving several non-antibody proteins, pepsin cleaves the Fc region of the IgG molecule generating a single, active, bivalent antigen-binding fragment, $F(ab')_2$ (Nisonoff et al., 1960). This fragment retains its original antigen-binding capacity and loses its ability to activate the complement system by the classical pathway, two properties that are absolutely required to neutralize venom components in a victim's circulation (WHO, 1981). Periodically, therefore, methods must be re-evaluated to take into account the advances of relevant basic science disciplines.

In this work, *Crotalus* antivenom was selected for improvement for several reasons. First, *Crotalus* venoms

contain a limited number of relevant toxic components; second, these components can be isolated as reasonably homogeneous forms, and they can be titrated using trusted techniques; third, animals can be immunized with separated components; fourth, the envenoming symptoms are quiet clear, allowing precise evaluation of both venom lethality and antivenom neutralizing potency.

To improve the usual methodology, we first characterized six anti-*Crotalus* antivenom batches with respect to specificity, potency, affinity and specific activity. Although the analyzed antivenoms exhibited the required overall neutralization capabilities recommended by WHO (1981), the affinity and specific activity needed to be improved. Antivenoms lacking these qualities are prone to induce unavoidable adverse reactions by the presence of unnecessary contaminating protein and non-specific antibody.

Groups of horses were immunized according current protocols using as antigen crude venoms or isolated crotoxin or PLA₂. Blood samples were collected at strategic times throughout the immunization, as dictated by the antibody evolution during the immune response.

The antibody titer, neutralizing potency and affinity were evaluated by immunochemical and *in vitro* and *in vivo*

Fig. 4. Titration of plasma and sera from the Instituto Butantan and experimental plasma against venom from *C. d. terrificus*, *C. d. collilineatus*, *C. d. cascavella*, *C. d. marajoensis*, purified crotoxin and purified phospholipase A₂. Plasma and sera were pooled within their respective groups and dilutions ranged from 1:4000 to 1:2,048,000. Titters are expressed as Units-ELISA/mL $\times 10^6$. Medians were compared by a one-way ANOVA followed by Dunn's test, * $P > 0.05$. Data are representative of two independent experiments.

Fig. 5. Affinity determination of antivenoms for *C. d. terrificus* venom, crotoxin and PLA₂. Plasma and sera were pooled within their respective groups, and the dilution was fixed at 1:50,000. KSCN dilutions ranged from 0 M to 5 M in intervals of 0.5 M. The affinity score is expressed as the concentration of KSCN necessary to reduce to 50% the O.D. obtained with the controls (KSCN 0 M). Medians were compared by a one-way ANOVA followed by Dunn's test, * $P > 0.05$. Data are representative of two independent experiments.

Fig. 6. Serum neutralization of *C. d. terrificus* lethality *in vivo*. Swiss mice, 18–20 g, were injected intraperitoneally with mixtures of 5 DL₅₀ of *C. d. terrificus* venom with antivenom dilutions (1:5, 1:10, 1:20 or 1:40). Plasma and sera were pooled within their respective groups. Deaths were recorded after 48 h, and ED₅₀ was calculated by probit analysis. Neutralization is expressed as volume of antivenom (mL) required to neutralize 1 mg of venom.

assays. The ability of the antibodies to recognize purified crotoxin and PLA₂ was an additional and important data readout, and it was clearly successful.

The antivenoms provided by the Instituto Butantan were able to recognize proteins present in the venoms of the main Brazilian *Crotalus* snakes, and they showed high titers against those venoms. Cross-reaction was expected, as the venoms from those animals have a very similar composition and biological activity (Santoro et al., 1999; Rangel-Santos et al., 2004). This antivenom also provided the highest neutralization of lethality *in vivo*, even though titers against the most toxic components were relatively low. The high-affinity found for those components, however, might have acted to counterbalance the low titers and therefore increase the neutralizing capacity. The antivenoms also recognized components in the other venoms, as evidenced by both Western blotting and ELISA, which corroborated our presupposition that the antivenoms currently produced have antibodies that bind to non-toxic proteins and that are therefore irrelevant in the treatment.

In plasma from Experimental Group 1, obtained from animals immunized with crude *C. d. terrificus* venom, 500 µg/animal, we observed components in the different crotalic venoms tested in a profile similar to that of Experimental Group 2. The use of a small quantity of antigen might have directed the response toward the most prevalent component in the venom, crotoxin. The plasma yielded very low titers and neutralizing capacity. The venom from *C. d. terrificus* is known to possess immunosuppressive components (Cardoso and Mota, 1997) and, as our results and the literature suggest, is not an effective immunogen. The use of other venoms or proteins in addition to or as a substitute for *C. d. terrificus* venom could result in an antivenom of higher quality.

In plasma from Experimental Group 2, obtained from animals immunized with crotoxin at 200 µg/animal, we observed components present in the different crotalic venoms with a specificity for conjugated crotoxin (30 kDa) and PLA₂ (15 kDa). There was no difference between titers

against those components and titers against the crude venoms, strongly indicating a great specificity in the binding of the most toxic proteins. The plasma also showed a high protective capacity *in vivo*, which was more effective than that of the other Experimental Groups, and neutralization of crotalic venom by anti-crotoxin antibodies has also been shown by other groups (Freitas et al., 1990; Oshima-Franco et al., 1999; Beghini et al., 2004). The use of crotoxin as an immunogen has to be carefully planned, as crotoxin is the most toxic component present in the venom. The use of low dosages, as shown here, and/or adjuvants such as liposomes (Freitas and Frézard, 1997) could prevent injuries and adverse reactions in the serum-producing animals.

Plasma from Experimental Group 3, obtained from animals immunized with phospholipase A₂ (100 µg/animal), showed a great specificity for that component, and we observed almost exclusively that enzyme in the venom of the different *Crotalus* snakes tested. The plasma also yielded the highest titers when compared to the other Experimental Groups. However, the neutralizing capacity of this plasma *in vivo* was the lowest. The dissociation of the crotoxin/PLA₂ complex plays a major role in the neutralization of the crotalic venom (Choumet et al., 1996). Free phospholipase, like that used for the immunization, might present epitopes that differ from those presented by the complexed phospholipase, resulting in antibodies that were incapable of binding to the complexed enzyme and therefore unable to promote the dissociation of the complex. Antibodies against epitopes generated on the PLA₂-crotoxin complex interface, which were absent when the animals were immunized with PLA₂ alone, could be the most effective neutralizing antibodies.

The immunization protocols tested were able to produce antibodies with high titers and cross-reactive capacity, yet there was no increase in affinity. Changes in the schedules, with an increase in time between injections and use of alternate adjuvants, are still open for testing and could result in even better antivenoms.

This work resulted in the production of antibodies with high titers and specificities against the most toxic components of *C. d. terrificus* venom. The obtained antibodies were capable of cross-reacting with components present in the venom of other Brazilian *Crotalus*. Our next goal is the identification of CDRs present in the hypervariable regions of these antibodies with specificity to crotoxin, crotapotin and PLA₂. Variability of CDR1 and CDR2 is encoded by the germline and further diversified by somatic mutation while each one of CDR L3 and CDR H3 is somatically diversified by rearrangement of the V segment with the (J) L or diversity (D) H and JH segments, respectively (Wu and Kabat, 1970; Alazari et al., 1988; Padlan, 1994). Recognition of individual antigen (Ag) is mainly mediated by CDR H3 (Kabat and Wu, 1972). The amino acid sequences of these regions will be used to construct homologous peptides potentially capable of recognizing toxin domains.

Acknowledgments

The authors thank colleagues and the support staff of the laboratories of the “*Divisão de Desenvolvimento Tecnológico e Produção, Instituto Butantan*”. This project was supported by funds from CNPq – Bolsa Produtividade, Pesquisador 1A (WDS), Proc. No: 308542-2010/0, and from the Instituto Butantan-Fundação Butantan. F.R. Guidolin is recipient of a fellowship from CAPES/Proex.

Conflict of interest statement

The authors declare that there is no conflict of interest.

References

- Alazari, P.M., Lascombe, M.B., Poljak, R.J., 1988. Three-dimensional structure of antibodies. *Annu. Rev. Immunol.* 6, 555–580.
- Almeida, C.M.C., Silva, C.L., Pena-Couto, H., Escocard, R.C.M., Rocha, D.G., Sentinelli, L.P., Kipnis, T.L., Dias da Silva, W.D., 2008. Development of process to produce polyvalent IgY antibodies anti-African snake venom. *Toxicon* 52, 293–301.
- Azevedo-Marques, M.M., Hering, S., Cupo, P., 2003. Acidente Crotálico. In: Costa Cardoso, J.L., Siqueira França, F.O., Wen, F.H., Málague, C.M.S., Haddad Jr., V. (Eds.), *Animais Peçonhentos no Brasil: Biologia, Clínica e Terapêutica dos Acidentes*. Sarvier-Fapesp, São Paulo, pp. 91–98.
- Barrabin, H., Martiarena, J.L., Vidal, J.C., Barrio, A., 1978. Isolation and characterization of gyroxin from *Crotalus durissus terrificus* venom. In: Rosemberg, P. (Ed.), *Toxins: Animals, Plant and Microbial*. Pergamon Press, New York, pp. 113–133.
- Barrio, A., 1961. Gyroxin, a new neurotoxin of *Crotalus durissus terrificus* venom. *Acta Physiol. Latinoam.* 11, 224.
- Beghini, D.G., Hernandez-Oliveira, S., Rodrigues-Simioni, L., Novello, J.C., Hyslop, S., Marangoni, S., 2004. Anti-sera raised in rabbits against crotoxin and phospholipase A₂ from *Crotalus durissus cascavella* venom neutralize the neurotoxicity of the venom and crotoxin. *Toxicon* 44, 141–148.
- Bieber, A.L., Nedelkov, D., 1997. Structural, biological and biochemical studies of myotoxin A and homologous myotoxins. *J. Toxicol. Toxin. Rev.* 16, 33–52.
- Boldrini-França, J., Corrêa-Netto, C., Silva, M.M.S., Rodrigues, R.S., De la Torre, P., Pérez, A., Soares, A.M., Zingali, R.B., Nogueira, R.A., Rodrigues, V.M., Sanz, L., Calvete, J.J., 2010. Snake venomomics and antivenomics of *Crotalus durissus* subspecies from Brazil: assessment of geographic variation and its implication on snakebite management. *J. Proteomics* 73, 1758–1776.
- Brazil, V., 1901. Contribuição ao estudo do veneno ophidico. III. Tratamento das mordeduras das cobras. *Rev. Med. São Paulo* 4, 375–380.
- Brazil, V., 1903. Contribuição ao estudo do veneno ophidico. III. Tratamento das mordeduras das cobras. *Rev. Med. São Paulo* 6, 265–278.
- Breithaupt, H., 1976. Neurotoxic and myotoxic effects of *Crotalus* phospholipase A₂ and its complex with crotapotin. *Naunyn Schmiedberg's Arch. Pharmacol.* 292, 271–278.
- Calmette, A., 1894. L'immunisation artificielle des animaux contre le venin des serpents et la thérapeutique expérimentale de morsures venimeuses. *CR Soc. Biol.* 46, 120–124.
- Cardoso, D.F., Mota, I., 1997. Effects of *Crotalus* venom on humoral and cellular immune response. *Toxicon* 39, 197–202.
- Cardoso, J.L.C., Fan, H.W., França, F.O.S., Jorge, M.T., Leite, R.P., Nishioka, S.A., Avila, A., Sano-Martins, I.S., Tomy, S.C., Santoro, M.L., Chudzinski, A.M., Castro, S.C.B., Kamuguti, A.S., Kelen, E.M.A., Hirata, M.H., Mirandola, R.M.S., Theakston, R.D.G., Warrell, D.A., 1993. Randomized comparative trial of three antivenoms in the treatment of envenoming by lance-headed vipers (*Bothrops jararaca*) in São Paulo, Brazil. *Q. J. Med.* 86, 315–325.
- Choumet, V., Bouchier, C., Delot, E., Faure, G., Saliou, B., Bon, C., 1996. Structure and function relationship of crotoxin, a heterodimeric neurotoxic phospholipase A₂ from the venom of a South American rattlesnake. *Adv. Exp. Med. Biol.* 391, 197–202.
- Choumet, V., Lafaye, P., Mazié, J.C., Bon, C., 1998. A monoclonal antibody directed against the non-toxic subunit of a dimeric phospholipase A₂ neurotoxin, crotoxin, neutralizes its toxicity. *Biol. Chem.* 379, 899–906.
- Dos Santos, M.C., Diniz, C.R., Whitaker-Pacheco, M.A., Dias da Silva, W., 1988. Phospholipase A₂ injection in mice induces immunity against the lethal effects of *Crotalus durissus terrificus* venom. *Toxicon* 26, 201–213.
- Dos Santos, M.C., Yamaguchi, I.K., Caricatti, C.P., Higashi, H.G., Dias da Silva, W., 1989. Immunization of equines with phospholipase A₂ protects against the lethal effects of *Crotalus durissus terrificus* venom. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 22, 509–512.
- Finney, D.J., 1992. Probit Analysis, third ed. Cambridge University Press, Cambridge.
- Freitas, T.V., Frézar, F., 1997. Encapsulation of native crotoxin in liposomes: a safe approach for the production of antivenom and vaccination against *Crotalus durissus terrificus* venom. *Toxicon* 35, 91–100.
- Freitas, T.V., Fortes-Dias, C.L., Diniz, C.R., 1990. Protection against the lethal effects of *Crotalus durissus terrificus* (South American rattlesnake) venom in animals immunized with crotoxin. *Toxicon* 28, 1491–1496.
- Gonçalves, J.M., 1956. Purification and properties of crotaminc. In: Buckley, E.E., Porges, N. (Eds.), *Venoms*. A. A. A. S., Washington DC, p. 261.
- Guidolin, R.G., Marcelino, R.M., Gondo, H.H., Morais, J.F., Ferreira, R.A., Silva, C.L., Kipnis, T.L., Silva, J.A., Fafetine, J., Dias da Silva, W., 2010. Polyvalent horse F(Ab')₂ snake antivenom: development of process to produce polyvalent horse F(Ab')₂ antibodies anti-african snake venom. *Afr. J. Biotechnol.* 9, 2446–2455.
- Hadler, V.A., Vital Brazil, O., 1966. Pharmacology of crotoxin. IV. Nephrotoxicity. *Mem. Inst. Butantan* 33, 1001–1008.
- Harris, J.B., 1991. Phospholipases in snake venoms and their effects on nerve and muscle. In: Harvey, A. (Ed.), *Snake Toxins*. Pergamon Press, New York, pp. 91–129.
- Kabat, E.A., Wu, T.T., 1972. Construction of a three-dimensional model of the polypeptide backbone of the variable region of kappa immunoglobulin light chains. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 69, 960–964.
- Kerkis, A., Kerkis, I., Rádis-Baptista, G., Oliveira, G.E.B., Vianna-Morgante, A.M., Pereira, L.V., Yamane, T., 2004. Crotaminc is a novel cell-penetrating protein from the venom of rattlesnake *Crotalus durissus terrificus*. *FASEB J.* 18, 1407–1409.
- Kosako, T., Kawachi, A., Cheng, S.B., Kuchiiwa, S., Motoya, T., Nakagawa, S., Yamada, K., 2000. Role of the vestibular nuclei in endothelin-1-induced barrel rotation in rats. *Eur. J. Pharm.* 454, 199–220.
- Kouyoumdjian, J., Harris, J., Johnson, M., 1986. Muscle necrosis caused by the sub-units of crotoxin. *Toxicon* 24, 575–583.
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680–685.
- Marlas, G., Bon, C., 1982. Relationship between the pharmacological action of crotoxin and its phospholipase activity. *Eur. J. Biochem.* 125, 157–165.
- Melgarejo, A.R., 2003. Serpentes Peçonhentas do Brasil. In: Costa Cardoso, J.L., Siqueira França, F.O., Wen, F.H., Málague, C.M.S., Haddad Jr., V. (Eds.), *Animais Peçonhentos no Brasil: Biologia, Clínica e Terapêutica dos Acidentes*. Sarvier-Fapesp, São Paulo, pp. 33–61.
- Ministério da Saúde, 2001. Manual de Diagnóstico e Tratamento de Acidentes por Animais Peçonhentos, 1ª ed. Fundação Nacional da Saúde, Brasília.
- Nisonoff, A., Wissler, F.C., Lipman, L.N., Woernley, D.L., 1960. Separation of univalent fragments from the bivalent rabbit antibody molecule

- by reduction of disulfide bonds. Arch. Biochem. Biophys. 89 (2), 230–244.
- Oshima-Franco, Y., Hyslop, S., Prado-Francheschi, J., Cruz-Höfling, M.A., Rodrigues-Simioni, L., 1999. Neutralizing capacity of antisera raised in horses and rabbits against *Crotalus durissus terrificus* (South American rattlesnake) venom and its main toxin, crotoxin. Toxicon 37, 1341–1357.
- Padlan, E.A., 1994. Anatomy of the antibody molecule. Mol. Immunol. 31, 169–172.
- Pope, C.G., 1936. The action of proteolytic enzymes on antitoxins and proteins in immune sera. I. True digestion of the proteins. Br. J. Exp. Pathol. 20, 132–149.
- Price III, J.A., 2007. A colorimetric assay for measuring phospholipase A₂ degradation of phosphatidylcholine at physiological pH. J. Biochem. Biophys. Methods 70, 441–444.
- Pullen, G.R., Fitzgerald, M.G., Hosking, C.S., 1986. Antibody avidity determination by ELISA using thiocyanate elution. J. Immunol. Methods 86, 83–87.
- Rádis-Baptista, G., Oquiura, N., Hayashi, M.A., Camargo, M.E., Grego, K.F., Oliveira, E.B., Yamane, T., 1999. Nucleotide sequence of crotoxin isoform precursors from a single South American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*). Toxicon 37, 973–984.
- Rangel-Santos, A., Lima, A., Lopes-Ferreira, M., Cardoso, D.F., 2004. Immunosuppressive role of principal toxin (crotoxin) of *Crotalus durissus terrificus* venom. Toxicon 44, 609–616.
- Raw, I., Rocha, M.C., Esteves, M.I., Kamiguti, A.S., 1986. Isolation and characterization of a thrombin-enzyme from the venom of *Crotalus durissus terrificus*. Braz. J. Med. Biol. Res. 19 (3), 333–338.
- Raw, I., Higashi, H.G., Kelen, E.M., 1996. Antivenom production and organization of the public health system for the treatment of envenoming in Brazil. In: Bon, C., Goyffon, M. (Eds.), Envenomings and Their Treatments. Foundation Marcel Merieux, Lyon, pp. 155–160.
- Remfry, J., 1987. Ethical aspects of animal experimentation. In: Tuffery, A.A. (Ed.), Laboratory Animals: An Introduction for New Experimenters. Interscience, New York, pp. 5–9.
- Romero-Steiner, S., Holder, P.F., de Leon, P.G., Spear, W., Hennessy, T.W., Carlone, G.M., 2005. Avidity determinations for Haemophilus influenzae Type b anti polyribosylribitol phosphate antibodies. Clin. Diagn. Lab. Immunol. 12, 1029–1035.
- Santoro, M.L., Sousa-e-Silva, M.C., Gonçalves, L.R., Almeida-Santos, S.M., Cardoso, D.F., Laporta-Ferreira, I.L., Saiki, M., Peres, C.A., Sano-Martins, I.S., 1999. Comparison of the biological activities in venoms from three subspecies of the South American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*, *C. durissus cascavella* and *C. durissus collilineatus*). Comp. Biochem. Physiol. 22, 61–73.
- Santos, P.E., Souza, S.D., Freire-Maia, L., Almeida, A.P., 1990. Effects of crotoxin on the isolated guinea pig heart. Toxicon 28, 215–224.
- Seki, C., Vidal, J.C., Barrio, A., 1980. Purification of gyroxin from a South American rattlesnake *Crotalus durissus terrificus* venom. Toxicon 18 (3), 235–247.
- Slotta, K.H., Fraenkel-Conrat, H.L., 1938. Schlangengifte. III Mitteilung: Reinigung und Krystallisation des Klapperschlangen-Giftes. Ber. Disch. Chem. Ges. 71, 1076–1081.
- Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Gartner, F.H., Provenzano, M.D., Fujimoto, E.K., Goeke, N.M., Olson, B.J., Klenk, D.C., 1985. Measurement of protein using bicinchoninic acid. Anal. Biochem. 150 (1), 76–85.
- Steiner, L.A., Eisen, H.N., 1966. Variations in the immune response to a simple determinant. Bacteriol. Rev. 30 (2), 383–396.
- Towbin, H., Staechelin, T., Gordon, J., 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrilamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 76, 4350–4354.
- Vital Brazil, O., 1966. Pharmacology of crystalline crotoxin-II. Neuromuscular blocking action. Mem. Ins. Butantan 33, 981–992.
- World Health Organization, 1981. Progress in the Characterization of Venoms and Standardization of Antivenoms. WHO Offset Publication, Geneva. No 58.
- Wu, T.T., Kabat, E.A., 1970. An analysis of the sequences of the variable regions of Bence Jones proteins and myeloma light chains and their implications for antibody complementarity. J. Exp. Med. 132 (2), 211–250.