AUTARQUIA ASSOCIADA À UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

**USO DE VENENO DE SERPENTES AUSTRALIANAS COMO POTENCIAL ALTERNATIVA PARA A
PRODUÇÃO DE SORO ANTI-ELAPÍDICO.**

ED CARLOS SANTOS E SILVA

**Dissertação apresentada como parte dos
requisitos para obtenção do Grau de Mestre em
Ciências na Área de Tecnologia Nuclear –
Aplicações**

Orientador:

Prof. Dr. Patrick Jack Spencer

São Paulo

2015

INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES
Autarquia associada à Universidade de São Paulo

**USO DE VENENO DE SERPENTES AUSTRALIANAS COMO POTENCIAL ALTERNATIVA PARA A
PRODUÇÃO DE SORO ANTI-ELAPÍDICO.**

ED CARLOS SANTOS E SILVA

**Dissertação apresentada como parte dos
requisitos para obtenção do Grau de Mestre em
Ciências na Área de Tecnologia Nuclear -
Aplicações**

**Orientador:
Prof. Dr. Patrick Jack Spencer**

Versão Corrigida

Versão Original Disponível no IPEN

**São Paulo
2015**

Dedico este trabalho a toda a minha família e amigos, com quem sempre pude contar nos momentos alegres e tristes !!!!

Agradecimentos

Agradeço a DEUS pela minha existência, vitalidade e fé.

A toda a minha família, em especial à minha Mãe Edna Gomes dos Santos.

A minha namorada, Luana Alves de Andrade, por todo o amor, apoio, compreensão, incentivo e companheirismo.

Ao meu orientador, Dr. Patrick Jack Spencer pelo grande apoio, auxílio e confiança.

A minha grande amiga Paula Juliana Nishimura, desde a universidade.

A minha amiga Patricia Marinho, pela amizade, companheirismo e pelas risadas.

À Dra. Nanci do Nascimento, pelo grande auxílio no trabalho e pelas sugestões.

Aos grandes amigos e colegas de laboratório, Dr. Vincent Louis Viala, Dra. Karina Corleto, MSc. Tamara Mieco Fucase, Dr. Rodrigo Queiroz, MSc. Danielle Gordillo, MSc. Alisson Buchi, Mariana El Corab, MSc. Bruno Baessa Chagas, Samuel Brito, Marina Gordillo, pelo apoio e pelos conselhos.

Aos pesquisadores do Instituto Butantan: Dra Ruth Camargo Vassão, Dr. Paulo Lee Ho e ao aluno de pós Doc. Dr. Henrique Roman Ramos, pela parceria nos testes com os soros.

Ao Dr. Peter Mirschin, e à Venom Supplies pelos venenos australianos.

Ao Johnny, pela ajuda nas cromatografias e fornecimento de reagentes.

A todos os funcionários do IPEN, pela organização e manutenção do centro.

Ao IPEN pelo fornecimento da infraestrutura necessária para o desenvolvimento desse trabalho.

A CAPES pelo financiamento do projeto.

USO DE VENENO DE SERPENTES AUSTRALIANAS COMO POTENCIAL ALTERNATIVA PARA A PRODUÇÃO DE SORO ANTI-ELAPÍDICO.

Ed Carlos Santos e Silva

Resumo

O soro anti-elapídico brasileiro é produzido com uma mistura de veneno de *Micrurus frontalis* e de *M. corallinus*. Estudos indicam que o soro resultante não neutraliza o veneno de algumas espécies de *Micrurus*. Além disso, o baixo rendimento de veneno e as dificuldades de manutenção destas serpentes em cativeiro dificultam a produção de soro. Assim, um método alternativo para a produção deste soro seria de grande valor. Estudos têm mostrado que os venenos de elapídeos brasileiros contêm toxinas com um elevado grau de homologia com as de suas congêneres australianas. O presente trabalho teve como objetivo comparar inicialmente o soro brasileiro e o australiano frente ao veneno de *Micrurus frontalis* e *M. lemniscatus*. A reatividade cruzada foi testada por Western-blot e ELISA com veneno de *Micrurus frontalis* e a capacidade neutralizante por soroneutralização com venenos de *M. frontalis*, *M. lemniscatus*, e em parceria com venenos de *M. corallinus*, *M. altirostris*, *M. spixii*, *M. ibiboboca*, *M. fulvius*, *M. pyrrhocryptus*, *M. nigrocinctus*, em camundongos. Os dados obtidos indicam nível elevado de reatividade e neutralização cruzada entre os soros. Também comparamos a imunogenicidade do veneno nativo ou irradiado, não observando diferenças nos níveis de anticorpos obtidos. As serpentes australianas utilizadas para a produção de soro são mais fáceis de manusear e produzem maiores quantidades de venenos do que as corais brasileiras. Concluímos que um soro produzido com o veneno de serpentes australianas neutraliza a atividade tóxica das *Micrurus* estudadas, incluindo espécies que o soro nacional não neutraliza. Assim, o uso de venenos da Austrália como imunógeno constitui alternativa viável para sanar a carência do soro nacional.

AUSTRALIAN SNAKE VENOMS AS A POTENCIAL ALTERNATIVE FOR ANTI-ELAPIDIC SERUM PRODUCTION

Ed Carlos Santos e Silva

Abstract

The Brazilian coral snake antivenom is produced using a mixture of *Micrurus corallinus* and *M. frontalis* venom. Several studies have shown that this serum does not neutralize the venom of some species. Furthermore, the low venom yields and the difficulties of keeping coral snakes in captivity impair antivenom production. Although belonging to different species, coral snakes and Australian elapids share many homologous toxins in their venom. The present work aimed to compare the Brazilian and Australian antivenoms against *Micrurus* venom. Cross-reactivity was assayed by Western blot and ELISA, while cross-neutralization was tested in mice. Both types of assays indicate high levels of cross-reactivity and neutralization. We also tested the immunogenicity of native or radiation-attenuated venom and no significant difference in antibody levels was observed. The Australian snakes used for antivenom production are much easier to breed and produce higher amounts of venom than their Brazilian relatives. From this study, we conclude that a serum produced using Australian venoms neutralizes the toxicity of coral snake venoms, including several venoms which are not neutralized by the Brazilian antivenom. Thus, the use of Australian venoms as an immunogen might solve the bottleneck of coral snake antivenom production.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Envenenamentos	1
1.2. Características do veneno de <i>Micrurus</i>	4
1.3. Tratamento.....	6
1.4. Estudos Imunoquímicos	8
1.5. Elapidae australianas	10
1.6. Irradiação de Toxinas.....	12
2. OBJETIVOS	16
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	17
3.1. Material.....	17
3.1.1. Venenos.....	17
3.1.2. Adjuvante.....	17
3.1.3. Soros	17
3.1.4. Animais	17
3.1.5. Soluções	18
3.2. Métodos.....	19
3.2.1. Eletroforese em gel de poliacrilamida (<i>M. frontalis</i> e <i>N. scutatus</i>).....	19
3.2.2. Western Blot (<i>M. frontalis</i> frente aos soros Nacional e Australiano)	20
3.2.3. Ensaio Imunoenzimático ELISA: venenos de <i>M. frontalis</i> e <i>N. scutatus</i> ..	21
3.2.4. Cromatografia de Exclusão Molecular (<i>M. frontalis</i> e <i>N. scutatus</i>).....	22
3.2.5. Eletroforese em gel de poliacrilamida de <i>Pseudechis australis</i> , <i>Notechis scutatus</i> , <i>Pseudonaja textilis</i> , <i>Acanthophis antarcticus</i> , <i>Oxyuranus scutellatus</i> , <i>Micrurus lemniscatus</i> e <i>Micrurus frontalis</i>	22
3.2.6. Cromatografia de Exclusão Molecular de <i>Micrurus lemniscatus</i> , <i>Notechis scutatus</i> , <i>Pseudechis australis</i> e <i>Oxyuranus scutellatus</i>	23
3.2.7. Soroneutralização	24
3.2.8. Imunização	25
3.2.8.1. Irradiação.....	25
3.2.8.2. Cronograma de imunização.....	25
3.2.8.3. Ensaio imunoenzimático ELISA	26
4. RESULTADOS.....	27
4.1. Eletroforese em gel de poliacrilamida (<i>M. frontalis</i> e <i>N. scutatus</i>).	27
4.2. Western Blot (<i>M. frontalis</i> frente aos soros Nacional e Australiano)	28
4.3. Ensaio Imunoenzimático ELISA: venenos de <i>M. frontalis</i> e <i>N. scutatus</i>	29
4.4. Cromatografia de Exclusão Molecular (<i>M. frontalis</i> e <i>N. scutatus</i>).....	31
4.5. Eletroforese em gel de poliacrilamida de <i>Pseudechis australis</i> , <i>Notechis scutatus</i> , <i>Pseudonaja textilis</i> , <i>Acanthophis antarcticus</i> , <i>Oxyuranus scutellatus</i> , <i>Micrurus lemniscatus</i> e <i>Micrurus frontalis</i>	35
4.6. Cromatografia de Exclusão Molecular de <i>Micrurus lemniscatus</i> , <i>Notechis scutatus</i> , <i>Pseudechis australis</i> e <i>Oxyuranus scutellatus</i>	36
4.7. Soroneutralização	42
4.8. Imunização (ELISA).....	45
5. DISCUSSÃO	47
6. CONCLUSÕES.....	50
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:.....	51

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - SDS-PAGE - Gel 12 %: M: padrão de massa molecular (valores em kDa), venenos : Nsf: *Notechis scutatus* fervido, Ns: *Notechis scutatus* não fervido, Mff: *Micrurus frontalis* fervido, Mf: *Micrurus frontalis* não fervido. Foram colocados, 5µL de padrão de massa molecular, e 10µL de amostra a 2mg/mL 27
- Figura 2 - Western-blot: utilizando o soro anti-elapídico nacional (a) e anti-elapídico australiano CSL (b), com veneno total de *Micrurus frontalis*, não denaturado (ND) e denaturado (D) respectivamente. Sendo M (Padrão) = 17,34,45,55,78,105 KDa 28
- Figura 3 - Ensaio imunoenzimático (ELISA): com veneno de *M. frontalis* 10µg/mL com soros anti-elapídicos nacional bivalente IB (em preto) e australiano pentavalente - CSL (em vermelho)..... 29
- Figura 4 - Ensaio imunoenzimático (ELISA): com veneno de *N. scutatus* 10µg/mL, com soros anti-elapídicos nacional bivalente IB (em preto) e australiano pentavalente - CSL (em vermelho)..... 30
- Figura 5 - Perfil cromatográfico de Exclusão Molecular do veneno total de *M. frontalis* em coluna TosoHaas TSK 2000 (600x 7,5 mm) numa concentração de 2mg/ml em Bicarbonato de Amônio a 0,025M, pH:7,0. 31
- Figura 6 - Perfil cromatográfico de Exclusão Molecular do veneno total de *N. scutatus* em coluna TosoHaas TSK 2000 (600x 7,5 mm) numa concentração de 2mg/ml em Bicarbonato de Amônio a 0,025M, pH:7,0. 32
- Figura 7 - Sobreposição dos perfis cromatográficos de Exclusão Molecular dos venenos totais de *N. scutatus*, em vermelho e *M. frontalis*, em preto em coluna TosoHaas TSK 2000 (600x 7,5 mm) numa concentração de 2mg/ml em Bicarbonato de Amônio a 0,025M, pH:7,0. 33
- Figura 8 - SDS-PAGE - Gel 12 % M: padrão de massa molecular , venenos: Pa: *Pseudechis australis*, Ns: *Notechis scutatus*, Pt: *Pseudonaja textilis*, Aa: *Acanthophis antarcticus*, Os: *Oxyuranus scutellatus*, Ml: *Micrurus lemniscatus* e Mf: *Micrurus frontalis*. Foram colocados, 3µl de padrão de massa molecular, e 8µl de amostra a 2mg/ml. 35
- Figura 9 - Perfil cromatográficos de Exclusão Molecular do veneno total de *M. lemniscatus*, em coluna TosoHaas TSK 2000 (600x 7,5 mm) numa concentração de 2mg/ml em Bicarbonato de Amônio a 0,025M, pH:7,0. 36
- Figura 10 - Perfil cromatográfico de Exclusão Molecular do veneno total de *N. scutatus*, em coluna TosoHaas TSK 2000 (600x 7,5 mm) numa concentração de 2mg/ml em Bicarbonato de Amônio a 0,025M, pH:7,0. 37
- Figura 11 - Perfil cromatográfico de Exclusão Molecular do veneno total de *P. australis*, em coluna TosoHaas TSK 2000 (600x 7,5 mm) numa concentração de 2mg/ml em Bicarbonato de Amônio a 0,025M, pH:7,0. 38
- Figura 12 - Perfil cromatográfico de Exclusão Molecular do veneno total de *O. scutellatus*, em coluna TosoHaas TSK 2000 (600x 7,5 mm) numa concentração de 2mg/ml em Bicarbonato de Amônio a 0,025M, pH:7,0. 39
- Figura 13 - Sobreposição dos perfis cromatográficos de Exclusão Molecular dos venenos totais de *M. lemniscatus* em preto, *P. australis* em vermelho, *N. scutatus* em verde e *O. scutellatus* em azul, em coluna TosoHaas TSK 2000 (600x 7,5 mm) numa concentração de 2mg/ml em Bicarbonato de Amônio a 0,025M, pH:7,0. 40
- Figura 14 - ELISA - Perfil dos soros obtidos na ultima coleta, dos animais imunizados com o antígeno nativo (aNativo) e irradiado (alradiado). Frente aos venenos constituintes do antígeno nativo a 10ug/poço. 45
- Figura 15 - ELISA - Perfil dos soros obtidos na ultima coleta, dos animais imunizados com o antígeno nativo (aNativo) e irradiado (alradiado). Frente ao veneno de *M. lemniscatus* a 10ug/poço..... 46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Soluções utilizadas no Protocolo de preparo dos Geis, 4% e 12%, para SDS-PAGE	19
Tabela 2 - Calendário de imunização dos animais, com antígeno nativo ou irradiado com ou sem adjuvante.	26
Tabela 3 - Comparação entre os tempos de retenção dos picos nos perfis cromatográficos de Exclusão Molecular dos venenos totais de <i>N. scutatus</i> e <i>M. frontalis</i> em coluna TosoHaas TSK 2000 (600x 7,5 mm) numa concentração de 2mg/ml em Bicarbonato de Amônio a 0,025M, pH:7,0. Indicando os tempos de retenção e a área percentual no perfil.	34
Tabela 4 – Comparação dos perfis cromatográficos de Exclusão Molecular dos venenos totais de <i>M. lemniscatus</i> , <i>P. australis</i> , <i>N. scutatus</i> e <i>O. scutellatus</i> , em coluna TosoHaas TSK 2000 (600x 7,5 mm) numa concentração de 2mg/ml em Bicarbonato de Amônio a 0,025M, pH:7,0. Indicando os tempos de retenção e a área percentual no perfil.	41
Tabela 5 - Soroneutralização <i>in vitro</i> com veneno de <i>M. frontalis</i> e <i>M. lemniscatus</i> frente ao soro Nacional (grupos de 1 a 4) e frente ao soro Australiano (grupos 5 a 8) e grupo controle (9A e 9B)	42
Tabela 6 - Soroneutralização com venenos de <i>P. textilis</i> (Pt), <i>O. scutellatus</i> (Os), <i>A. antarcticus</i> (Aa), <i>P. australis</i> (Pa), 3DL ₅₀ por animal. Frente aos soros comerciais anti-elapídico bivalente nacional (IB), soro homólogo anti elapídico australiano e PBS.	43
Tabela 7 - Soroneutralização com venenos de <i>M. frontalis</i> (Mf), 3DL ₅₀ por animal, frente aos soros comerciais anti-elapídicos Nacional bivalente (IB), Australiano pentavalente (CSL5) e Soros monovalentes: Anti <i>Oxyuranus scutellatus</i> (Anti-Os), Anti <i>Pseudonaja textilis</i> (Anti-Pt), Anti <i>Notechis scutatus</i> (Anti-Ns) e Anti <i>Pseudechis australis</i> (Anti-Pa) e controle com PBS. E com veneno de <i>M. corallinus</i> (Mc), na mesma DL ₅₀ frente aos quarto primeiros soros.	43
Tabela 8 - Soroneutralização com venenos de <i>M. corallinus</i> (Mc), <i>M. lemniscatus</i> (MI), <i>M. altirostris</i> (Ma), <i>M. spixii</i> (Ms), <i>M. ibiboboca</i> (Mi), <i>M. fulvius</i> (Mf), <i>M. pyrrhocryptus</i> (Mp), <i>M. nigrocinctus</i> (Mn), 3DL ₅₀ por animal. Frente aos soros comerciais anti-elapídicos Nacional bivalente (IB), Australiano pentavalente (CSL5), Soros monovalentes anti <i>Oxyuranus</i> com anti <i>Pseudechis</i> (OsPa), Soros monovalentes anti <i>Oxyuranus</i> com anti <i>Pseudechis</i> acrescido o soro anti <i>Notechis</i> (OsPaNs), e controle com PBS.....	44

1. INTRODUÇÃO

1.1. Envenenamentos

Envenenamento por picada de serpente é um problema de saúde pública negligenciado, de importância elevada em todo o mundo, particularmente na África subsaariana, Ásia, América Latina e Papua Nova Guiné (Gutiérrez *et. al.*, 2010). Enfrentar esse problema efetivamente exige uma abordagem multifocal integrada, que envolve muitos aspectos como: aquisição de informações confiáveis sobre a incidência e mortalidade atribuível à envenenamentos, e o número de pessoas que ficaram com sequelas permanentes; melhorar a produção de soros eficazes e seguros, por meio de estratégias que visam reforçar a capacidade tecnológica de laboratórios de fabricação destes; aumentar a capacidade dos países de baixa renda para produzir imunógenos específicos (venenos de serpentes) localmente, e executar o seu próprio controle de qualidade; o compromisso dos produtores para a fabricação de soro para países onde a produção não é possível; implementação de iniciativas financeiras que garantam a aquisição de volumes adequados de soro, a preços acessíveis nos países de baixa renda; a realização de estudos colaborativos sobre a segurança e eficácia de soro, avaliados por estudos clínicos e pré-clínicos bem elaborados; desenvolvimento de programas de distribuição de soro adaptados às necessidades reais e situações epidemiológicas das áreas rurais em cada país; programas de formação permanente para o pessoal de saúde, especialmente nas zonas rurais, onde picadas de cobra são frequentes; implementação de programas para apoiar aquelas pessoas cujos acidentes resultaram em deficiência crônica e programas preventivos e educativos na comunidade, com a participação ativa de organizações locais empregando métodos modernos de promoção da saúde (Gutiérrez *et. al.*, 2010).

Cerca de 20 % das serpentes são peçonhentas e, portanto, clinicamente importantes. As serpentes peçonhentas têm glândulas produtoras de veneno especializadas e presas para inoculação eficaz do mesmo. As serpentes venenosas vem das famílias Elapidae , Viperidae , Colubridae , Hydrophiidae e Atractaspididae. A maior parte dos casos de envenenamento é devida a picadas

por Viperideos e Elapideos (Berling, 2015). Como regra geral, víboras causam principalmente coagulopatias em comparação com elapídeos cujo veneno causa principalmente neurotoxicidade (Berling, 2015).

Nas Américas, as serpentes das famílias Viperidae produzem a maior parte dos envenenamentos humanos. No entanto, acidentes envolvendo cobras da família Elapidae também podem ser graves ou letais (Chacón *et. al.*, 2012).

As serpentes peçonhentas no Brasil se distribuem em duas famílias: Viperidae dos gêneros *Bothrops* (jararacas), *Lachesis* (surucucu) e *Crotalus* (cascavéis) e Elapidae, representada no continente Americano, pelos gêneros, *Micruroides*, *Leptomicrurus* e *Micrurus* (Tanaka *et. al.*, 2010) dos quais, o último é o grupo mais abundante e diversificado. Apesar da baixa incidência dos acidentes com cobras coral registrados no Brasil, estes tornam-se significativos epidemiologicamente devido à alta letalidade do veneno (FUNASA, 2001).

Cobras corais são as únicas Elapidae na América. Pouco se sabe sobre a bioquímica de venenos de *Micrurus* devido à baixa disponibilidade do veneno (Prieto da Silva *et. al.*, 2001).

A gravidade da picada de cobra coral está relacionada com o volume de veneno injetado e o tamanho da vítima. O comprimento da cobra correlaciona-se positivamente com o rendimento do veneno (Peterson, 2006). O veneno é principalmente neurotóxico com pouca reação tecidual local ou dor no local da picada (de Roodt, 2012). O efeito líquido das neurotoxinas é uma síndrome semelhante ao curare (Peterson, 2006). Em certas vítimas tem havido relatos de hemólise acentuada com anemia grave e hemoglobinúria. O aparecimento de sinais clínicos pode levar de 10 a 18 horas. A vítima começa a ter alterações no estado mental e desenvolve fraqueza generalizada e muscular com progressão para paralisia dos membros e músculos respiratórios, em seguida (Peterson, 2006). O melhor a ser feito, nesses acidentes, é o atendimento rápido com o transporte da vítima para uma instalação médica para cuidados intensivos. A vítima deve ser hospitalizada por um período mínimo de 48 horas para monitoramento contínuo (Peterson, 2006). O único tratamento definitivo para o envenenamento é a administração do soro (FUNASA, 2001; WHO, 1981). Uma vez que os sinais clínicos do envenenamento se tornem manifestos e que progridam com rapidez, são difíceis de reverter. Se o soro não está disponível ou

sua administração é retardada, os cuidados incluem suporte respiratório, que pode durar entre 48 e 72 horas (Peterson, 2006).

As cobras corais mais importantes, do ponto de vista médico, pertencem ao gênero *Micrurus*, incluindo *Micrurus fulvius* (Estados Unidos), *Micrurus diastema*, *Micrurus distans* e *Micrurus laticoralis* (México e Guatemala); *Micrurus nigrocinctus* e *Micrurus alleni* (América Central) e *Micrurus mipartitus*, *Micrurus corallinus*, *Micrurus frontalis*, *Micrurus spixii*, *Micrurus dumerilli carnicauda*, *Micrurus surinamensis* e *Micrurus isozenus* (América do Sul) (Chacón *et. al.*, 2012).

1.2. Características do veneno de *Micrurus*

A toxicidade do veneno de serpente é a consequência de uma combinação de peptídeos e proteínas, cuja identificação e caracterização são de grande importância para a compreensão do envenenamento e desenvolver novos tratamentos clínicos. A subfamília Elapinae inclui as cobras corais cuja picada provoca efeitos neurotóxicos, bloqueando a contração muscular, e paralisando coração, além de provocar distúrbios respiratórios graves. No entanto, a relação estrutura-função de toxinas do veneno de *Micrurus* foi investigada apenas para algumas espécies.

Venenos de *Micrurus* são essencialmente neurotóxicos, mas outras atividades tais como miotoxicidade, podem ser observadas em condições experimentais. Embora esta miotoxicidade seja ocasionalmente relatada, não há estudos que abordam este efeito de forma sistemática em todo o gênero, particularmente na sua relação com outras manifestações sistêmicas tais como insuficiência renal (de Roodt, 2012).

Uma variedade de manifestações locais e sistêmicas, de envenenamento, tem sido descritas em pacientes picados por diferentes espécies de cobra coral. O veneno de Elapidae é constituído principalmente de neurotoxinas, e os envenenamentos por serpentes desta família ocasionam parada respiratória e morte (Manock *et. al.*, 2008).

Toxinas isoladas do veneno de cobra coral brasileira (*Micrurus frontalis frontalis*) incluem fosfolipase A₂ (atividade anticoagulante) e neurotoxinas pós-sinápticas. Esta fosfolipase A₂ (PLA₂) tem a capacidade de promover coagulopatia em ratos de uma maneira muito semelhante à produzida por PLA₂s isoladas a partir do veneno de *Notechis scutatus scutatus*, uma serpente de mesma família, do continente australiano (Francis *et. al.*, 1997).

Venenos de *Micrurus* contém toxinas do tipo three finger (3FTxs) e alto teor de fosfolipase A₂ (Vergara *et. al.*, 2014).

O veneno de *Micrurus. nigrocinctus* exerce efeitos neurotóxicos e miotóxicos e desempenha um papel fundamental na imobilização das presas. Um estudo com proteoma de venenos de *M. altirostris* e *M. corallinus* indicou que, em ambas as espécies de cobra coral, 3FTx e PLA₂ foram as famílias de toxina mais abundantes e diversificadas, sendo encontradas 33 diferentes 3FTx e 13 PLA₂,

que representam, respectivamente, 79,5% e 13,7% das proteínas totais, que foram identificadas no veneno de *M. altirostris* (Corrêa-Netto *et. al.*, 2011)

Foi demonstrado por Oliveira e colaboradores (2008), que o veneno de uma cobra coral da América do Sul, *M. lemniscatus*, contém PLA₂s que podem induzir perturbações comportamentais, convulsões e degeneração neuronal, com lesão de células do hipocampo por perda neuronal maciça e gliose em testes no hipocampo (Oliveira *et. al.*, 2008).

A partir do veneno de *M. lemniscatus* foi possível isolar uma nova toxina muscarínica (MT- M1α). Este peptídeo, tem uma massa molecular de 7048 Da, e partilha elevada homologia de sequência com toxinas do tipo three-finger (3FTx) que atuam sobre os receptores colinérgicos (da Silva *et. al.*, 2011).

Recentemente o principal componente do veneno de *Micrurus mipartitus*, uma cobra coral distribuída a partir da Nicarágua para o norte da América do Sul, foi caracterizado bioquimicamente e funcionalmente. Esta proteína, denominada mipartoxin-I, é um novo membro da superfamília de toxinas do tipo three finger, exibindo atividade neurotóxica (Rey-Suárez *et. al.*, 2012).

Venenos de espécies de *Micrurus* do Estado do Amazonas foram testados para os seguintes efeitos: edematogênico , miotóxico , coagulante, hemorrágico e atividade PLA₂. Nenhum dos venenos testados apresentou atividade coagulante. A presença de PLA₂ foi detectada por ELISA nos venenos de *M. spixii* , *M. averyi* e *M. lemniscatus*. A miotoxicidade foi estimada pelo aumento do nível de creatina quinase no soro e por análise histológica. Todos os venenos, exceto *M. surinamensis*, induziram efeito edematogênico intenso e efeitos miotóxicos. O veneno da *M. averyi* mostrou atividade hemorrágica, que foi confirmado por teste histopatológico. (Barros *et. al.*, 1994)

Um trabalho onde os venenos de *Micrurus lemniscatus carvalhoi*, *Micrurus frontalis frontalis*, *Micrurus surinamensis surinamensis* e *Micrurus nigrocinctus nigrocinctus* tiveram suas atividades biológicas avaliadas (CECCHINI *et. al.*, 2005) reforça os dados acima, quanto a composição dos venenos de *Micrurus* e sugere o desenvolvimento de agentes terapêuticos e ferramentas para estudo de alvos moleculares em membranas celulares (CECCHINI *et. al.*, 2005).

A produção de soro é de suma importância para a sobrevivência do acidentado que depende da rapidez em seu atendimento e imunoterapia (FUNASA, 2001).

1.3. Tratamento

Em muitos casos de envenenamento de picada de cobra, o animal responsável pelo acidente permanece não identificado. Isto frequentemente resulta na dificuldade de decidir qual o soro ideal para administrar à vítima, especialmente quando apenas estão disponíveis soros monovalentes específicos. Normalmente, o diagnóstico específico de picada de cobra pode ser convenientemente feito usando métodos clínicos e laboratoriais. Este diagnóstico clínico depende do reconhecimento de sinais específicos de envenenamento no paciente, enquanto o diagnóstico laboratorial é baseado nas alterações que ocorrem em vítimas de envenenamento, incluindo a detecção de anormalidades nos parâmetros sanguíneos, a presença ou ausência de mioglobinúria, alterações em certos níveis de enzima, presença ou ausência de sinais neurotóxicos e da detecção no sangue de antígenos específicos de veneno (Theakston, 2014).

O tratamento recomendado pela Organização Mundial de Saúde (OMS) é a soroterapia, em que soros hiperimunes de cavalos são utilizados como fonte de anticorpos para neutralizar as toxinas circulantes (FUNASA, 2001; WHO, 1981).

Na produção do soro anti-elapídico no Brasil, utiliza-se uma mistura dos venenos de *Micrurus corallinus* (50%) e *Micrurus frontalis* (50%). Porém, o soro obtido não neutraliza de forma eficiente os venenos de todos os gêneros de *Micrurus*, sendo pouco efetivo para o tratamento de envenenamentos por *Micrurus altirostris* e *Micrurus lemniscatus* (Tanaka *et. al.*, 2010).

Sabe-se também que as serpentes do gênero *Micrurus* são de pequeno e médio porte com tamanho em torno de um metro (FUNASA, 2001), produzindo reduzidas quantidades de veneno, e que sua manutenção em cativeiro é bastante complexa (Chacón *et. al.*, 2012), fato que dificulta a obtenção do veneno em quantidades suficientes para a produção de soro, gerando sua escassez. Porém, outro aspecto importante que dificulta a obtenção deste imunobiológico é a alta letalidade do veneno de *Micrurus* (Tanaka *et. al.*, 2010; Chacón *et. al.*, 2012) que dificulta a administração do antígeno em doses apropriadas, comprometendo a qualidade de vida dos animais soroprodutores durante o processo de imunização. Desta forma, uma metodologia alternativa para a produção deste imunoterapêutico é de grande importância.

Outro aspecto importante é a variabilidade de venenos que pode ter um impacto sobre a pesquisa primária sobre envenenamentos, incluindo a seleção de imunógenos para a produção do soro. Esse fenômeno é considerado em vários níveis: intrafamiliar, intragêneros, intraespécies, intrasubspecies, variação geográfica, entre espécimes individuais, e em amostras individuais, devido à variação sazonal, dieta, habitat, ontogenia, e dimorfismo sexual. Produtores de soro devem utilizar um entendimento de tal variabilidade na seleção de fontes de veneno, para assegurar a representação de todos os tipos de veneno necessários dentro de cada imunoterapêutico. Além disso, os médicos que tratam picada de serpentes devem compreender a influência da variabilidade do veneno tanto na sintomatologia de envenenamento quanto nas implicações do tratamento (Chippaux, 1991).

1.4. Estudos Imunoquímicos

Foi realizado um estudo com o objetivo de uma compreensão mais profunda sobre a composição dos venenos de *M. frontalis*, *M. ibiboboca* e *M. lemniscatus*. Nos três venenos investigados, foram observadas proteínas que variam de 6 a 8 kDa (3FTx) e 12 a 14 kDa (PLA2) consideradas mais abundantes. Ambas as espécies *M. corallinus* e *M. frontalis*, que ocorrem nas regiões Central, Sul e Sudeste do Brasil, são responsáveis pela maioria dos casos de envenenamento por cobra coral, o que explica a escolha desses venenos para o uso no protocolo de imunização, até agora. No entanto, ensaios de neutralização *in vivo* têm mostrado que o soro anti-elapídico nacional é capaz de neutralizar os venenos de *M. spixii*, *M. frontalis* e *M. corallinus*, mas não neutraliza eficientemente os venenos de *M. altirostris* e *M. lemniscatus* (Ciscotto *et. al.*, 2011).

Em um estudo onde o veneno *Micrurus altirostris* do Rio Grande do Sul, Brasil, foi caracterizado por suas atividades biológicas e propriedades imunoquímicas foi demonstrado que o soro anti-elapídico produzido no Brasil, reconhecia os venenos de *M. frontalis* (homólogo) e *M. altirostris* (heterólogo) por Western blot, e ambos os venenos apresentaram imunorreatividades semelhantes quando analisados por ELISA. Contudo, os resultados observados em testes de neutralização mostraram que o soro anti-elapídico produzido pelo Instituto Butantan neutraliza as atividades miotóxicas e hemolíticas mas que, este soro não neutraliza a atividade letal do veneno de *M. altirostris*. Provavelmente, sua atividade letal foi causada por neurotoxinas semelhantes a α -neurotoxinas normalmente encontrados em outros venenos de *Micrurus*. Os dados deste trabalho sugerem que o veneno de *M. altirostris* apresenta características biológicas, enzimáticas e imunológicas diferentes das de outros venenos elapídicos, indicando a presença de alguns componentes comuns ou diferentes entre os venenos de *M. frontalis* e *M. altirostris*. (Moraes *et. al.*, 2003)

Tanaka *et. al.* (2010) indicaram a existência de uma grande variabilidade qualitativa e quantitativa em venenos de *Micrurus*, provavelmente decorrente da adaptação das cobras deste gênero a habitats muito diferentes. Os dados também mostram que o soro usado para terapia humana no Brasil não é capaz de neutralizar totalmente as principais atividades tóxicas presentes nos venenos de todas as espécies de *Micrurus* que ocorrem no país, como *M. altirostris* e *M.*

lemniscatus. O estudo sugere que modificações no esquema de imunização, como a inclusão de outros venenos na mistura antigênica, precisam ocorrer para gerar um soro anti-elapídico de maior cobertura.

O soro anti *Micrurus* produzido pelo Instituto Butantan reconhece algumas toxinas de *M. altirostris* e *M. corallinus*, mas mostrou baixa reatividade cruzada em relação aos seus principais constituintes, como 3FTx (toxina three finger) e PLA2 (Corrêa-Netto *et. al.*, 2011). A diversidade estrutural da 3FTxs entre *Micrurus sp.* poderia estar por trás desta baixa imunorreatividade cruzada do soro nacional contra *M. altirostris* e *M. corallinus*.

Nos Estados Unidos, existem apenas duas espécies de cobra coral de importância médica que pertencem ao gênero *Micrurus*: *M. fulvius fulvius* (Eastern coral snake) e *M. tener tener* (Texas coral snake). Uma empresa farmacêutica, notificou aos clientes que a produção do soro antiofídico contra cobra coral dos EUA terminaria, e uma pesquisa se deu em busca de alternativas para tratar esse tipo de envenenamento. Uma alternativa, foi o soro contra o veneno de cobra coral, Coralmyon, produzido pela empresa mexicana, Bioclon contra o veneno de *Micrurus nigrocinctus nigrocinctus*. Este foi capaz de neutralizar efetivamente três doses letais 50% (DL50) do veneno de ambos *M. t. tener* e *M. f. fulvius*. (Sánchez *et. al.*, 2008)

Estes problemas no fornecimento de soro anti-*Micrurus fulvius* (uma Elapidae norte-americana) nos Estados Unidos, fizeram com que Wisniewski *et al.* (2003) buscassem alternativas. Eles demonstraram que o soro anti-*Notechis* (uma Elapidae australiana) comercial neutraliza a letalidade do veneno de *M. fulvius*, de forma similar ao soro autólogo (Wisniewski *et. al.*, 2003).

Em consulta preliminar a bancos de dados de proteínas (SwissProt) foi observada similaridade entre as toxinas de *Micrurus* Brasileiras e as de elapídeos do continente Australiano, reforçando os dados obtidos nos trabalhos acima. Tal fato seria interessante, uma vez que estas serpentes australianas são de grande porte (Fearn *et. al.*, 2012) e fácil manejo em cativeiro, assegurando e garantindo a abundância na produção de veneno, eliminando um sério gargalo para a obtenção do soro no Brasil.

1.5. Elapidae australianas

A investigação sobre venenos de elapidae australianas tem-se concentrado principalmente nos sete gêneros de maior significância clínica: *Acanthophis* (death adders), *Hoplocephalus* (Stephen's banded snake), *Notechis* (tiger snakes), *Oxyuranus* (taipans), *Pseudechis* (Black snakes), *Pseudonaja* (Brown snakes) e *Tropidechis* (Rough scale snake). No entanto, mesmo espécies mais raras representam um potencial para causar envenenamento clínico grave. Além disso, devido ao carácter distintivo taxonômico, estas espécies são uma fonte potencial de novas toxinas para uso, inclusive em desenvolvimento de medicamentos. Os venenos das serpentes destes gêneros contêm neurotoxinas bem caracterizadas, miotoxinas e toxinas coagulantes que causam efeitos clínicos significativos em humanos. Serpentes da maioria dos outros gêneros de elapidae australianas são consideradas de importância clínica limitada, devido à raridade das picadas e ou a falta de efeitos clínicos após envenenamento (Pycroft *et. al.*, 2012).

Todavia, os venenos elapídicos do continente australiano são conhecidos pela sua alta letalidade, sendo os mais tóxicos de que se tem notícia. (Fearn *et. al.*, 2012),

Munawar *et al.* (2014) fizeram uma análise comparativa de duas serpentes da família Elapidae: *Naja mossambica mossambica* (representante do gênero *Naja*, sub-família Elapinae encontrada na África) e *Notechis scutatus* (gênero *Notechis*, sub-família Acanthophiinae distribuídos na Austrália), que estão entre os mais venenosos do mundo. O estudo evidenciou certas semelhanças entre estas. No peptidoma de *N. scutatus* foram observadas α -neurotoxinas do tipo three finger. Eles inibem os receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChR). O veneno de *N. scutatus* contém também inibidores de serinoprotease do tipo Kunitz, que não foram detectados no veneno de *Naja mossambica mossambica*. Curiosamente, peptídeos hipotensores estão presentes em ambos os venenos, indicando que durante a evolução, estes peptídeos foram conservados, devido às suas funções essenciais em venenos de cobra.

Existe também, a presença confirmada de toxinas do tipo three finger em gêneros diversos, como *Acanthophis*, *Aipysurus*, *Laticauda*, *Oxyuranus*, *Notechis*, *Pseudechis*, e *Pseudonaja* (Fry *et. al.*, 2003), contudo são necessários mais estudos para elucidar todas as características destes venenos.

Toxinas do tipo three finger são os principais componentes do veneno de serpentes da família Elapidae, formando uma das maiores famílias de proteínas presentes em venenos destas serpentes. Possuem diversas atividades biológicas, como por exemplo, se ligarem especificamente com elevada afinidade em receptores nicotínicos de acetilcolina, ou induzirem a lise não específica em grande variedade de células (Utkin, 2013).

Estas neurotoxinas têm sido isoladas a partir do veneno de hydrophiidae, elapidae, e mais recentemente colubridae. Apresentam ação pós-sináptica, que desempenham um papel importante na captura e morte da presa, por ligação ao receptor nicotínico de acetilcolina no músculo esquelético, influenciando a neurotransmissão, causando paralisia respiratória em pessoas envenenadas. (Barber, 2013)

1.6. Irradiação de Toxinas

A radiação gama vem sendo empregada como agente atenuante de venenos ofídicos mostrando resultados promissores (Murata, 1988; Guarnieri, 1992; Nascimento *et. al.*, 1996; Spencer, 2000) A irradiação de proteínas em solução aquosa tem sido utilizada, com muita frequência, por proporcionar os mesmos efeitos da irradiação a seco, com o uso de doses menores de radiação. Nessas condições, o efeito indireto é predominante tornando as espécies reativas da água particularmente importantes (Guarnieri, 1992). Estudos têm mostrado que essa técnica promove alterações nas estruturas primária, secundária, terciária e quaternária das proteínas, detectáveis pelas mudanças nas propriedades químicas e físico-químicas das toxinas (Spencer, 2000). As modificações se devem à excitação e ionização das proteínas que, ao interagirem com a radiação ionizante, ou quando em meio aquoso, reagem com as espécies resultantes da radiólise da água (OH^* , $\text{e}^{\text{aq-}}$, H_2O_2 e H^*) altamente reativas. Os produtos da radiólise da água podem, por exemplo, reagir com proteínas abstraindo o hidrogênio do carbono alfa, o hidrogênio de grupos sulfidrilas e com anéis aromáticos de triptofano, tirosina e fenilalanina, formando radicais livres altamente reativos. As modificações podem afetar ou modular as atividades enzimáticas tóxicas e imunológicas das proteínas (Murata, 1988).

A radiação ionizante promove modificações em biomoléculas, incluindo proteínas, entre estas modificações estão alterações estruturais e perda de atividade biológica. Toxinas irradiadas apresentam a diminuição de sua atividade, tendo preservadas suas propriedades imunogênicas. Este fato tem sido explorado por muitos pesquisadores para produzir imunógenos atóxicos para a produção de anti-soros (Nascimento *et. al.*, 1998).

Em estudos realizados com a crotamina, purificada do veneno de *Crotalus durissus terrificus* em que a toxina na sua forma nativa e irradiada, foi avaliada em termos de estrutura e atividade tóxica (DL50) foi demonstrado que a irradiação promoveu modificações estruturais nesta toxina. No mesmo estudo, foi relatada a redução da toxicidade da crotamina a 48,3%, mas não sua eliminação. (Bonimitalke *et. al.*, 2001)

Resultados indicam que a toxicidade de venenos irradiados com 1 e 2 kGy diminuiu em comparação com a de veneno nativo. As atividades hemorrágicas e

o aparecimento de edema, são reduzidos, nas amostras destoxicadas, em particular com a dose de 2 kGy. Em um estudo realizado com o veneno de *Cerastes cerastes*, Numa avaliação histopatológica mostrou que o veneno nativo que provoca alterações degenerativas graves no miocárdio, quando irradiado com 2 kGy, deixou de induzir alterações teciduais. Estes resultados indicam que a irradiação de veneno com uma dose de 2 kGy pode oferecer um método eficaz para reduzir os efeitos tóxicos crônicos do veneno em animais imunizados (Abib, 2003a)

Em um estudo com veneno de *Vipera lebetina*, Bennacef-Heffar (2003), demonstrou que as atividades caseinolítica, amidolítica, esterásica e atividades de coagulação foram reduzidas, para os venenos irradiados, enquanto a atividade de fosfolipase A2 desapareceu apenas no veneno irradiado com a dose de 2 kGy. O veneno destoxicado por raios gama foi utilizado para a imunização, e as propriedades imunogênicas foram preservadas e os anti-soros obtidos com os venenos irradiados reagiram de forma cruzada, ou seja, os anti-soros foram capazes de neutralizar o efeito tóxico do veneno nativo. Foi mostrado que a irradiação de veneno com uma dose de 2 kGy promoveu uma significativa destoxicação, mantendo as propriedades imunogênicas intactas (Bennacef-heffar, 2003).

Um trabalho demonstrou a capacidade da radiação gama de ^{60}Co (2 kGy) para atenuar os efeitos tóxicos do veneno de *Bothrops jararacussu*. Foram investigados os efeitos miotóxicos, por meio de estudos da junção neuromuscular em rato. Os resultados deste trabalho mostraram drástica redução da atividade miotóxica indicando que a radiação gama pode ser uma ferramenta importante para melhorar a produção de anti-soros, reduzindo a toxicidade e preservando imunogenicidade de venenos ofídicos (Souza *et. al.*, 2002).

A radiosensibilidade das propriedades tóxicas e imunológicas do veneno de escorpião *Androctonus australis hector* foi investigada por Abib (2003b). Este veneno foi irradiado com doses de 1 e 2 kGy. Os resultados mostraram que a toxicidade do veneno foi reduzida em até 25 vezes. Os anticorpos induzidos com o veneno irradiado foram capazes de reconhecer o veneno nativo. Ensaio *in vivo*, de proteção mostraram que ratos imunizados com veneno irradiado a 2kGy resistiram de 10 a 25 doses letais do veneno, por via intraperitoneal (Abib, 2003b).

Em outro estudo (Clissa, 1999), veneno de *Crotalus durissus terrificus* foi irradiado com quatro doses diferentes de raios gama (2 , 3 , 5 e 10 kGy) a partir de uma fonte de ^{60}Co e as suas propriedades estruturais, tóxicas e imunogênicas foram analisadas. Venenos irradiados com 2 e 3 kGy foram , respectivamente , 2,7 e 13,5 vezes menos tóxicos do que o nativo, enquanto amostras irradiadas com 5 ou 10 kGy foram pelo menos 100 vezes menos tóxicas do que o veneno nativo. Todas as doses de veneno irradiado eram imunogênicas e os anticorpos induzidos por eles foram capazes de reconhecer o veneno nativo por ELISA. No entanto, o imunógeno produzido com 2 kGy de irradiação teve a sua imunogenicidade melhorada. Os anti-soros produzidos contra este tiveram uma capacidade de neutralização mais elevada do que os produzidos contra o veneno nativo. A irradiação de veneno com 2 kGy foi o mais eficaz para inativar a toxicidade do veneno e melhorar a sua imunogenicidade (Clissa, 1999).

A irradiação da crotoxina do veneno de *Crotalus durissus terrificus* e de suas subunidades com 2 kGy leva à formação de agregados (Nascimento *et. al.*, 1996). Estes podem servir como antígenos para melhorar a produção de anti-soros que reagem de forma cruzada e neutralizando a atividade da crotoxina nativa. Comparado com esta, esses agregados são menos tóxicos e são em grande parte desprovidos de atividade de fosfolipase. Estes resultados indicam que a irradiação de proteínas tóxicas pode promover destoxicação significativa, preservando muitas das propriedades originais antigênicas e imunogênicas da crotoxina nativa (Nascimento *et. al.*, 1996).

Dados experimentais com o comportamento imunológico de Bothropstoxina-1, uma fosfolipase K49 de *Bothrops jararacussu*, antes e após a irradiação, reforçam que proteínas irradiadas têm atividade imunogênica, e os anticorpos produzidos por estas reconhecem sua forma nativa, e, apesar da radiação promover modificações significativas em suas estruturas, ainda mantêm muitas das propriedades antigênicas e imunogênicas originais da forma nativa. Estes dados também indicam que a proteína irradiada induziu títulos elevados de IgG2a e de IgG2b, o que sugere que células Th1 estejam predominantemente envolvidas na resposta imune. Esta população celular esta envolvida na regulação da resposta imune celular, especificamente por macrófagos (Baptista *et. al.*, 2006).

Em outro estudo, veneno de *Vipera russelli* foi destoxicado por irradiação, e foi usado como imunógeno administrado em coelhos por um curto ou longo

calendário de imunização, sem qualquer adjuvante. Foi observada uma neutralização eficaz do veneno pelos soros imunes obtidos dos coelhos, em ambos os protocolos de imunização (Hati, 1990).

Um trabalho, sobre a avaliação da potência de neutralização de anti-soros obtidos, com a imunização de camundongos com veneno de *Crotalus durissus terrificus* nativo e irradiados demonstrou que soros produzidos com veneno nativo, foram similares aos produzidos com veneno irradiado quando titulados por ELISA (Ferreira Jr. *et. al.*.2005). A capacidade imunogênica foi mantida após irradiação, e o soro produzido a partir de veneno de *Crotalus durissus terrificus* irradiado apresentou maior capacidade de neutralização de que o soro obtido a partir de veneno nativo. Os autores ainda relatam que as alterações clínicas e os efeitos locais foram mínimos durante hiperimunização com veneno irradiado (Ferreira Junior *et. al.*, 2005).

O uso da irradiação de venenos e toxinas, com a preservação da imunogenicidade e a diminuição significativa da sua toxicidade apresenta a vantagem em relação a outros métodos de destoxicação de não requerer a adição de nenhuma substância ao veneno e têm se mostrado uma ótima ferramenta na detoxicação de venenos e toxinas.

Considerando a dificuldade de obtenção de quantidades suficientes de veneno de *Micrurus* aqui no Brasil, vislumbrou-se a possibilidade de utilizar de venenos de outras espécies para a produção de soro que neutralizasse os venenos das corais brasileiras, incluindo aquelas cujo soro atualmente utilizado, não é eficiente. Tentar melhorar a produção de soro utilizando a radiação ionizante já demonstrada ser uma boa ferramenta para tal finalidade.

No presente trabalho, investigamos o potencial do soro anti-elapídico Australiano para neutralizar, por reatividade cruzada, as toxinas do veneno das serpentes do gênero *Micrurus* no Brasil. Comprovada a reatividade cruzada destes soros, foi investigada a possibilidade de atenuar, por irradiação, os venenos usados na formulação do antígeno utilizado para a produção deste soro.

2. OBJETIVOS

- Analisar os venenos de *Micrurus frontalis* e *Notechis scutatus* por eletroforese, Western blot e ELISA para investigar semelhanças entre os venenos.
- Avaliar a reatividade cruzada dos venenos de *Micrurus frontalis* e *M. lemniscatus* frente ao soro comercial polivalente anti-Elapídico australiano e ao soro comercial produzido no Brasil.
- Investigar o potencial do soro anti-elapídico Australiano para neutralizar as os venenos de *Micrurus. frontalis*, *M. lemniscatus*, *M. corallinus*, *M. altirostris*, *M. spixii*, *M. ibiboboca*, *M. fulvius*, *M. pyrrhocryptus*, e *M. nigrocinctus*,
- Comparar a imunogenicidade dos venenos de *Pseudechis australis*, *Nothechis scutatus* e *Oxyuranus scutellatus* nativos ou irradiados.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material

3.1.1. Venenos

Para os procedimentos experimentais, foram utilizados venenos liofilizados de *Micrurus frontalis* e *Micrurus lemniscatus*, fornecidos pelo Instituto Butantan (São Paulo/SP), e venenos de *Pseudechis australis* (*King brown snake*), *Notechis scutatus* (*Tiger snake*), *Acanthophis antarcticus* (*Death adder*), *Pseudonaja textilis* (*Brown snake*), e *Oxyuranus scutellatus* (*Taipan*), fornecidos pela *Venom Supplies Pty. Ltd.* (Tanunda, Austrália).

3.1.2. Adjuvante

Adjuvante -ISA 50 fornecido pelo Instituto Butantan

3.1.3. Soros

O soro polivalente anti-elapídico australiano foi produzido e pela CSL Limited (Austrália) e gentilmente cedido pelo Dr. Julian White. O soro anti-elapídico brasileiro foi cedido pelo Instituto Butantan.

3.1.4. Animais

Foram utilizados camundongos Balb/c machos, entre 18 e 22 g, fornecidos pelo biotério do Centro de Biotecnologia do IPEN, devidamente mantidos e submetidos aos procedimentos experimentais com base em protocolos fundamentados. O uso dos animais foi aprovado pelo Comissão de Ética do Uso Animal, parecer-projeto nº 78/11- CEUA-IPEN/SP.

3.1.5. Soluções

Solução de acrilamida/bisacrilamida: Acrilamida (29,2g) e Bis-acrilamida (0,8g),

Tampão de Resolução= TrisHCl 1,5 M pH: 8,8

Tampão de Empilhamento = TrisHCl 750 mM pH: 6,8

Tampão de Transferência = Tris pH: 8,9

PA = Persulfato de Amônio 10 % em Água destilada

SDS = Dodecil Sulfato de sódio

TEMED= NNN'-Tetrametiletenodiamida

Tampão de amostra = Glicerol, SDS10%. TRIS pH:6,8 , Azul de Bromofenol.

Salina = NaCl 150mM

PBS = NaCl 137mM, KCl 2,7 mM, Na₂HPO₄O(Dibásico, anidro) 10mM,

KH₂PO₄O (Monobásico, anidro) 2mM

3.2. Métodos

3.2.1. Eletroforese em gel de poliacrilamida (*M. frontalis* e *N. scutatus*).

A comparação dos venenos, separados por massa molecular, foi investigada por eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS (Dodecil Sulfato de Sódio), com um sistema não reduzido (Laemmli, 1970). O gel de resolução foi preparado a 12_% e o gel de empilhamento a 4_% conforme tabela.

Tabela 1 - Soluções utilizadas no Protocolo de preparo dos Geis, 4% e 12%, para SDS-PAGE

Soluções	Resolução (12%) (mL)	Empilhamento (4%) (mL)
Acrilamida/bis	6	2
Tampão de Resolução	3,75	
Tampão de Empilhamento		3,75
SDS	0,15	0,15
Água Destilada	5,025	9,025
PA	0,05	0,05
TEMED	0,025	0,025

Os venenos das serpentes a (2 mg/mL) foram preparados e diluídos na proporção 4:1 com Tampão de Amostra não redutor .

No experimento foram colocados, 5µL de padrão de massa molecular, e 10µl de amostra dos venenos: *Notechis scutatus* fervido, *Notechis scutatus* não fervido, *Micrurus frontalis* fervido, *Micrurus frontalis* não fervido.

Os géis foram submetidos à eletroforese durante 1h30min sob voltagem constante de 90_V. Após a corrida os géis foram corados com *Coomassie Blue* 250-R durante 1 hora, depois descorados e colocados entre superfícies plásticas para escaneamento.

3.2.2. Western Blot (*M. frontalis* frente aos soros Nacional e Australiano)

O veneno de *M. frontalis* foi separado por eletroforese em dois géis de poliacrilamida na presença de SDS (SDS-PAGE). Foram aplicados 5 µl de padrão de massa molecular no primeiro poço e nos poços 2 e 3 foi aplicado o veneno total de *M. frontalis* a 2mg/ml, não fervido e fervido respectivamente.

Ao término da corrida, os géis foram lavados em água destilada e Tampão de transferência, e colocados sobre uma membrana de Nitrocelulose do mesmo tamanho do gel. Acima de cada gel e abaixo da membrana, foram colocadas 6 camadas de papel filtro, previamente umedecido em tampão de transferência e de mesmo tamanho do gel.

As proteínas foram transferidas, durante 1 hora sob a corrente de 0,85mA/cm² para duas membranas de nitrocelulose, em sistema semi-seco (Towbin, 1979). Ao término, as membranas foram lavadas em PBS 1X.

Foi realizado bloqueio por uma hora com leite em pó desnatado a 3% (3g em 100 mL de PBS 1X), Após três lavagens com PBS 1X, as membranas foram incubadas por uma hora, uma com o soro anti-elapídico comercial, nacional e a outra com o soro australiano polivalente (CSL), a uma diluição 1:1000 (anticorpo primário) no mesmo tampão usado nas etapas de lavagem.

Ao término de uma hora, as membranas foram lavadas em PBS 1X, sendo posteriormente incubadas com anticorpo anti-IgG de cavalo conjugado com peroxidase, a uma diluição 1:2000 (anticorpo secundário) durante 2 horas.

Finalmente, as bandas imunorreativas foram reveladas com uma solução de 25 µL de peróxido de hidrogênio 30% e 10 mg de 3-3´diaminobenzidina em 50 mL de PBS 1X .

3.2.3. Ensaio Imunoenzimático ELISA: venenos de *M. frontalis* e *N. scutatus*

Para uma avaliação quantitativa de reconhecimento, dos soros comerciais, nacional e australiano, frente aos venenos de *M. frontalis* e *N. scutatus*, foi realizado ensaio imunoenzimático (ELISA).

Placas de microtitulação de 96 poços foram sensibilizadas com 100 µL por poço de veneno na concentração de 0,01 mg/mL (para se obter 1ug por poço) de *M. frontalis* e *N. scutatus*. Amostras estas diluídas em tampão Bicarbonato (Na_2CO_3 – 0,5 M e NaHCO_3 – 0,5M pH: 9,5).

Após 16 horas, à 4°C , foi realizado o bloqueio com leite em pó desnatado 3% em PBS. Ao término de uma hora, as placas foram lavadas 4 vezes com PBS e adicionados 100 µL por poço de anticorpo primário comercial, nacional ou australiano (diluição 1:1000), em diluições seriadas (fator 2), em quadruplicata.

Terminadas as 4 lavagem, os poços foram incubados por mais uma hora com 100 µL de anticorpo secundário, anti-IgG de cavalo conjugado com peroxidase (SIGMA), na diluição 1:5000.

Finalmente, após novas lavagens, a reação foi revelada com 100 µL por poço, de uma solução de 10µL de peróxido de hidrogênio 30% e 10 mg de orto-fenil-diamina em 10 mL de PBS. Os resultados estão expressos na forma de média $\pm$ desvio padrão.

3.2.4. Cromatografia de Exclusão Molecular (*M. frontalis* e *N. scutatus*)

Os venenos de *Micrurus frontalis* e *Notechis scutatus* liofilizados foram pesados e dissolvidos para uma concentração de 2 mg/ml em Bicarbonato de Amônio a 25 mM, pH:7,0 e centrifugados a 14.000 g durante 5 min. Foram analisados 50 µl de cada veneno, em coluna TosoHaas TSK 2000 (600 x 7,5 mm) previamente ambientada com o mesmo tampão das amostras a serem analisadas, conectada a um sistema HPLC (High Performance Liquid Chromatography) Shimadzu, (bombas LC-20AT, detector SDP-20A, controlador CBM-20A), com um fluxo de 1mL/min. Os perfis cromatográficos obtidos foram monitorados pela leitura de absorbância a 220 nm.

3.2.5. Eletroforese em gel de poliacrilamida de *Pseudechis australis*, *Notechis scutatus*, *Pseudonaja textilis*, *Acanthophis antarcticus*, *Oxyuranus scutellatus*, *Micrurus lemniscatus* e *Micrurus frontalis*.

O gel de resolução foi preparado a 12 % e o gel de empilhamento a 4 %. Os venenos das serpentes *Pseudechis australis*, *Notechis scutatus*, *Pseudonaja textilis*, *Acanthophis antarcticus*, *Oxyuranus scutellatus*, *Micrurus lemniscatus* e *Micrurus frontalis* a (2 mg/mL) foram preparados e diluídos na proporção 4:1 com Tampão de Amostra não redutor. No experimento, foram colocados 3 µL de padrão de massa molecular, e 8 µL de veneno/poço.

Os géis foram submetidos à eletroforese durante 1h30min sob voltagem constante de 90 V. Após a corrida os géis foram corados com *Coomassie Blue* durante 1 hora, depois descorados e colocados entre superfícies plásticas para escaneamento.

3.2.6. Cromatografia de Exclusão Molecular de *Micrurus lemniscatus*, *Notechis scutatus*, *Pseudechis australis* e *Oxyuranus scutellatus*.

Os venenos de *Micrurus lemniscatus*, *Notechis scutatus*, *Pseudechis australis* e *Oxyuranus scutellatus* liofilizados foram pesados e diluídos para uma concentração de 2mg/mL em Bicarbonato de Amônio a 25 mM, pH:7,0 e centrifugados a 14.000 G durante 5 min. Foram analisados 50 µl de cada veneno, em coluna TosoHaas TSK 2000 (600 x 7,5 mm) previamente ambientada com o mesmo tampão das amostras a serem analisadas, conectada a um sistema HPLC (High Performance Liquid Chromatography) Shimadzu, (bombas LC-20AT, detector SDP-20A, controlador CBM-20A), com um fluxo de 1ml/min. Os perfis cromatográficos obtidos foram monitorados pela leitura de absorbância a 220 nm.

3.2.7. Soroneutralização

Camundongos Balb/c machos foram desafiados com 5 DL₅₀ (dose letal 50%) de veneno de *M. frontalis* ou *M. lemniscatus*, previamente incubadas com concentrações decrescentes (fator de diluição 1,5) (F.Bras. V, 2010) dos soros comerciais, anti-elapídico brasileiro (Butantan) ou australiano polivalente (CSL). Os camundongos foram divididos em 9 grupos de 5 animais e nos grupos de 1 a 4 foram injetados o veneno incubado com soro nacional e de 5 a 8 com CSL. As diluições realizadas entre os grupos submetidos ao mesmo soro foram as seguintes: puro, 1:1,5, 1:2,25 e 1:3,375 .

O grupo 9 representa o grupo controle, onde 3 animais receberam apenas o veneno e 2 animais apenas salina (NaCl - 150mM). Sendo usada esta mesma metodologia com veneno de *Micrurus lemniscatus*.

Após, trabalho apresentado em congresso com estudos preliminares, foi firmada uma colaboração com o Instituto Butantan, onde foram realizadas outras soroneutralizações, com venenos de *Micrurus frontalis*, *M. lemniscatus*, *M. corallinus*, *M. altirostris*, *M. spixii*, *M. ibiboboca*, *M. fulvius*, *M. pyrrhocryptus*, e *M. nigrocinctus*, frente aos soros polivalente australiano e soros monovalentes utilizados na composição deste. E também foram realizados experimentos com os venenos utilizados na produção do soro australiano individualmente, frente ao soro antielapídico nacional.

3.2.8. Imunização

3.2.8.1. Irradiação.

Os venenos brutos liofilizados de *Notechis scutatus*, *Oxyuranus scutellatus* e *Pseudechis australis*, foram pesados e ressuspensos em solução salina autoclavada (NaCl 150 mM), para uma concentração de 2 mg/mL. Foram divididos em seis tubos com 200 µL a 2 mg/mL de veneno, sendo dois para cada serpente.

Três amostras, uma de cada veneno, foram irradiadas com raios gama provenientes de uma fonte de ^{60}Co (Gammacell 220, Atomic Energy Commission of Canada Ltd, Canada) no Centro de Tecnologia das Radiações CTR/IPEN, a temperatura ambiente e na presença de oxigênio atmosférico. A dose total de 2 KGy e a taxa de dose de 1,2 kGy/h. Para fins de controle, os três tubos restantes foram mantidos nas mesmas condições, fora da câmara de irradiação, estas amostras dos venenos utilizados, foram para a obtenção de soro contra o veneno na sua forma nativa.

Esta dose de radiação foi estabelecida com base em trabalhos prévios que demonstraram a diminuição da toxicidade sem a perda da capacidade imunogênica de venenos submetidos a essa técnica (Nascimento *et. al.*, 1996).

3.2.8.2. Cronograma de imunização

Neste experimento, foram utilizados 10 camundongos, divididos em dois grupos. O antígeno foi feito com uma mistura dos venenos de *O. scutellatus* (Os), *N. scutatus* (Ns) e *P. australis* (Pa) irradiados, ou nativos.

A partir de uma solução mãe na concentração de 2mg/ml, de cada tubo foram retirados 100 µL e misturados em outro tubo, totalizando 300µL, a 2mg/mL de veneno, nas mesmas proporções.

A sua concentração final foi calculada de modo que, na mistura dos três venenos, fosse possível obter 0,5 e 1 DL₅₀ (9 µg/Kg) do veneno mais tóxico (Os). Para isto, foram utilizados os venenos irradiados e não irradiados destas

serpentes, sendo obtidos, portanto, um antígeno de veneno nativo, e um oriundo de veneno irradiado.

Foram injetados 200 μ L por animal, sendo 100 μ L de antígeno e 100 μ L de adjuvante (ISA 50) após emulsificação, ou apenas 100 μ L de salina (NaCl 150 mM) . Após 7 imunizações quinzenais, foi realizada sangria total após eutanásia dos animais. As imunizações ocorriam no mesmo dia da coleta de sangue, sendo um total de 6 coletas e uma sangria duas semanas após a última imunização e coleta.

Tabela 2 - Calendário de imunização dos animais, com antígeno nativo ou irradiado com ou sem adjuvante.

Dia	DL 50 Antígeno	Adjuvante/ Animal	Via	Volume/ Animal
1	0,5	ISA50	i.p.	200 μ L
15	0,5	ISA50	i.p.	200 μ L
30	0,5	Salina	i.p.	200 μ L
45	0,5	Salina	i.p.	200 μ L
60	1	ISA50	i.p.	200 μ L
75	1	ISA50	i.p.	200 μ L
90	1	Salina	i.p.	200 μ L

3.2.8.3. Ensaio imunoenzimático ELISA

A avaliação do reconhecimento dos soros obtidos nas imunizações com o antígeno nativo ou irradiado, frente ao veneno de *M. lemniscatus* ou o próprio antígeno nativo, foi realizada por ELISA.

Placas de microtitulação de 96 poços foram sensibilizadas com 0,1mg/mL por poço (para se obter 10 μ g por poço) de *M. lemniscatus*, ou Antígeno nativo. Em tampão Bicarbonato (Na_2CO_3 – 0,5 M e NaHCO_3 – 0,5M pH: 9,5).

Seguindo o mesmo protocolo anteriormente descrito, sendo 100 μ L por poço de anticorpo primário obtido das imunizações (diluição 1:100) em diluições seriadas (fator 2), em quadruplicata. Sendo utilizado como anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase (SIGMA) na diluição 1:5000.

Após novas lavagens, a reação foi revelada seguindo o mesmo procedimento descrito. Os resultados estão expressos na forma de média $\pm$ desvio padrão.

4. RESULTADOS

4.1. Eletroforese em gel de poliacrilamida (*M. frontalis* e *N. scutatus*).

Após a corrida dos venenos de *Notechis scutatus* e *Micrurus frontalis* em SDS - PAGE (figura 1) observou-se bandas com mesma massa molecular entre os venenos. Como bandas no veneno de *Micrurus* que possuem mesma massa que bandas no veneno de *Notechis*, principalmente abaixo de 50 KDa. Quando comparadas, as amostras fervidas e não fervidas, nota-se uma alteração na intensidade das bandas e no padrão de migração, nas bandas abaixo de 20 KDa principalmente no veneno de *Notechis*, resultado do efeito da desnaturação térmica na estrutura das toxinas.

Figura 1 - SDS-PAGE - Gel 12 %: M: padrão de massa molecular (valores em kDa), venenos : Nsf: *Notechis scutatus* fervido, Ns: *Notechis scutatus* não fervido, Mff: *Micrurus frontalis* fervido, Mf: *Micrurus frontalis* não fervido. Foram colocados, 5 μ L de padrão de massa molecular, e 10 μ L de amostra a 2mg/mL

4.2. Western Blot (*M. frontalis* frente aos soros Nacional e Australiano)

A comparação entre as amostras fervidas e não fervidas indica mudança no padrão de migração, e na intensidade das bandas de menor massa molecular na amostra. Infere-se que essa alteração seja em decorrência da presença de epítomos conformacionais, que após a fervura perderam sua imunorreatividade. Contudo, esse processo ocorre em uma menor intensidade nas proteínas de maior massa molecular, provavelmente devido à predominância de epítomos não conformacionais.

Quando o veneno de *Micrurus frontalis* foi exposto ao soro australiano CSL, ocorreu o reconhecimento de proteínas presentes no veneno com mesma massa molecular das reconhecidas pelo soro nacional (Figura 2).

Figura 2 - Western-blot: utilizando o soro anti-elapídico nacional (a) e anti-elapídico australiano CSL (b), com veneno total de *Micrurus frontalis*, não denaturado (ND) e denaturado (D) respectivamente. Sendo M (Padrão) = 17,34,45,55,78,105 KDa

4.3. Ensaio Imunoenzimático ELISA: venenos de *M. frontalis* e *N. scutatus*

Quando comparados, os soros Anti-elapídico nacional e o anti-elapídico polivalente CSL, notou-se reatividade cruzada frente ao veneno de *Micrurus frontalis* com valores de absorbância muito próximos, gerando duas curvas semelhantes (Figura 3).

Um fenômeno muito semelhante ocorreu quando o veneno de *Notechis scutatus* foi exposto ao soro nacional e ao soro australiano, havendo reatividade cruzada entre as toxinas de ambos os venenos (Figura 4).

Figura 3 - Ensaio imunoenzimático (ELISA): com veneno de *M. frontalis* 10µg/mL com soros anti-elapídicos nacional bivalente IB (em preto) e australiano pentavalente - CSL (em vermelho).

Figura 4 - Ensaio imunoenzimático (ELISA): com veneno de *N. scutatus* 10µg/mL, com soros anti-elapídicos nacional bivalente IB (em preto) e australiano pentavalente - CSL (em vermelho).

4.4. Cromatografia de Exclusão Molecular (*M. frontalis* e *N. scutatus*)

Foi possível observar semelhanças entre os perfis cromatográficos dos venenos de *Micrurus frontalis* (Figura 5) e *Notechis scutatus* (Figura 6), com relação ao tempo de retenção de muitos picos, tanto na faixa de alta quanto na de baixa massa molecular.

No perfil cromatográfico de *M. frontalis* é possível observar um pico predominante com tempo de retenção de 18,801 min (Figura 5), que equivale a 24,7% da área total do perfil, (Tabela 3).

Figura 5 - Perfil cromatográfico de Exclusão Molecular do veneno total de *M. frontalis* em coluna TosoHaas TSK 2000 (600x 7,5 mm) numa concentração de 2mg/ml em Bicarbonato de Amônio a 0,025M, pH:7,0.

Quando o veneno de *N. scutatus* foi submetido ao mesmo procedimento, foi possível observar dois picos predominantes com 11,680 e 15,170 min de tempo de retenção, (Figura 6) equivalentes a 27,884 e 33,743 % respectivamente da concentração de veneno, ou área do perfil, (Tabela 3).

Figura 6 - Perfil cromatográfico de Exclusão Molecular do veneno total de *N. scutatus* em coluna TosoHaas TSK 2000 (600x 7,5 mm) numa concentração de 2mg/ml em Bicarbonato de Amônio a 0,025M, pH:7,0.

Comparando os dois perfis, é possível observar que os picos predominantes do veneno de *Notechis*, possuem tempos de retenção muito próximos aos picos de 12,006 e 15,338 min, 6,672% e 10,685% respectivamente do perfil do veneno de *Micrurus*. Contudo, não apresenta nenhum com o mesmo tempo de retenção do pico mais abundante do veneno de *M. frontalis* (Figura 7) 18,801 min, equivalente a 24,7% do perfil (Tabela 3).

Figura 7 - Sobreposição dos perfis cromatográficos de Exclusão Molecular dos venenos totais de *N. scutatus*, em vermelho e *M. frontalis*, em preto em coluna TosoHaas TSK 2000 (600x 7,5 mm) numa concentração de 2mg/ml em Bicarbonato de Amônio a 0,025M, pH:7,0.

Embora existam certas diferenças nos perfis cromatográficos, se observa, um pico com mesmo tempo de retenção em ambos os venenos, 16,903 min em *Micrurus*, equivalente a 12,936 % e um pico em *Notechis* de 16,908 min, equivalente a 3,971 % do perfil do veneno.(Tabela 3)

Tabela 3 - Comparação entre os tempos de retenção dos picos nos perfis cromatográficos de Exclusão Molecular dos venenos totais de *N. scutatus* e *M. frontalis* em coluna TosoHaas TSK 2000 (600x 7,5 mm) numa concentração de 2mg/ml em Bicarbonato de Amônio a 0,025M, pH:7,0. Indicando os tempos de retenção e a área percentual no perfil.

M. frontalis			N. scutatus		
Nome	T. Retenção	Área %	Pico	T. Retenção	Área %
RT10.835	10.835	3.320	RT10.736	10.736	2.126
RT12.006	12.006	6.672	RT11.680	11.680	27.884
RT13.330	13.330	8.411	RT13.250	13.250	0.110
RT13.860	13.860	9.029	RT13.991	13.991	5.719
RT14.429	14.429	14.587	RT15.170	15.170	33.743
RT15.338	15.338	10.685	RT16.908	16.908	3.971
RT16.903	16.903	12.936	RT21.397	21.397	3.921
RT18.801	18.801	24.700	RT22.702	22.702	2.210
RT22.675	22.675	6.410	RT24.972	24.972	12.143
RT32.975	32.975	3.251	RT33.001	33.001	8.172
Total		100.000	Total		100.000

4.5. Eletroforese em gel de poliacrilamida de *Pseudechis australis*, *Notechis scutatus*, *Pseudonaja textilis*, *Acanthophis antarcticus*, *Oxyuranus scutellatus*, *Micrurus lemniscatus* e *Micrurus frontalis*.

Posteriormente, foi realizada a eletroforese em gel com os venenos utilizados para a produção do soro antielapídico australiano (*Pseudechis australis*, *Notechis scutatus*, *Acanthophis antarcticus*, *Pseudonaja textilis*, e *Oxyuranus scutellatus*) e os venenos de *Micrurus frontalis* e *M. lemniscatus*. Sendo possível observar, bandas com padrões de migração muito próximos entre os venenos.

O veneno de *Micrurus frontalis* possui bandas acima dos 20 KDa, assim como em *Oxyuranus*, *Pseudechis* e *Pseudonaja*.. Incluindo uma banda mais intensa, na mesma posição que a de bandas nesses três venenos. O veneno de *M. lemniscatus*, possui uma banda, que encontra um correspondente intensamente corado de mesma massa no veneno de *Notechis scutatus*.

Figura 8 - SDS-PAGE - Gel 12 % M: padrão de massa molecular , venenos: Pa: *Pseudechis australis*, Ns: *Notechis scutatus*, Pt: *Pseudonaja textilis*, Aa: *Acanthophis antarcticus*, Os: *Oxyuranus scutellatus*, MI: *Micrurus lemniscatus* e Mf: *Micrurus frontalis*. Foram colocados, 3µl de padrão de massa molecular, e 8µl de amostra a 2mg/ml.

4.6. Cromatografia de Exclusão Molecular de *Micrurus lemniscatus*, *Notechis scutatus*, *Pseudechis australis* e *Oxyuranus scutellatus*.

Posteriormente, foi realizada uma corrida de exclusão molecular com os venenos de *P. australis*, *N. scutatus*, *O. scutellatus* e *M. lemniscatus*. Onde é possível observar alguns picos com o mesmo tempo de retenção.

No experimento é possível observar que o perfil cromatográfico de *M. lemniscatus* possui um pico predominante com tempo de retenção de 26,666 min (Figura 9), equivalente a 38,681% no perfil (Tabela 4)

Figura 9 - Perfil cromatográficos de Exclusão Molecular do veneno total de *M. lemniscatus*, em coluna TosoHaas TSK 2000 (600x 7,5 mm) numa concentração de 2mg/ml em Bicarbonato de Amônio a 0,025M, pH:7,0.

No perfil cromatográfico do veneno de *N. scutatus* foi possível observar um pico predominante com tempo de retenção de 18,134 min (Figura 10), equivalente a 25, 290% na concentração do veneno (Tabela 4).

Figura 10 - Perfil cromatográfico de Exclusão Molecular do veneno total de *N. scutatus*, em coluna TosoHaas TSK 2000 (600x 7,5 mm) numa concentração de 2mg/ml em Bicarbonato de Amônio a 0,025M, pH:7,0.

No veneno de *P. australis* (Figura 11) é possível observar picos predominantes de 23,715, 24,008 e 25,301 min que correspondem respectivamente a 16,782%, 13,333% e 37,919% (Tabela 4) do perfil do veneno.

Figura 11 - Perfil cromatográfico de Exclusão Molecular do veneno total de *P. australis*, em coluna TosoHaas TSK 2000 (600x 7,5 mm) numa concentração de 2mg/ml em Bicarbonato de Amônio a 0,025M, pH:7,0.

O pico de maior predominância no veneno de *O. scutellatus* (Figura 12) possui tempo de retenção de 14,419 min, correspondente a 54,085% (Tabela 4) do perfil cromatográfico desse veneno.

Figura 12 - Perfil cromatográfico de Exclusão Molecular do veneno total de *O. scutellatus*, em coluna TosoHaas TSK 2000 (600x 7,5 mm) numa concentração de 2mg/ml em Bicarbonato de Amônio a 0,025M, pH:7,0.

Comparando todos os perfis, o pico mais predominante no veneno de *M. lemniscatus* apresenta um pico com o tempo de retenção de 26,666 min (Figuras 9, 13), equivalente a 38,681% no perfil (Tabela 4), muito próximo a um pico no veneno de *N. scutatus* (Figura 13) a 26,708 min equivalente, contudo a 2,386% do perfil de *Notechis* (Tabela 4). Existe também um pico com tempo de 22.579 min equivalente a 14.634 % do veneno de *Micrurus* muito próximo a um pico de 22.542 min do veneno de *Notechis*, equivalente porém a 2.244% do perfil.

Figura 13 - Sobreposição dos perfis cromatográficos de Exclusão Molecular dos venenos totais de *M. lemniscatus* em preto, *P. australis* em vermelho, *N. scutatus* em verde e *O. scutellatus* em azul, em coluna TosoHaas TSK 2000 (600x 7,5 mm) numa concentração de 2mg/ml em Bicarbonato de Amônio a 0,025M, pH:7,0.

Existe um pico em cada veneno com valores muito próximos no tempo de retenção, com grande variação em porcentagem de área do perfil. No veneno de *M. lemniscatus* existe um pico com tempo de retenção de 22,579 min equivalente a 14,634% do perfil, muito próximo a um do veneno de Notechis com tempo de 22,542 min equivalente contudo, à 2,244% do perfil. Esse pico do veneno de *Micrurus*, também encontra correspondência com um pico do veneno de *P. australis* com tempo de 22,458 min equivalente a 3,415% do perfil, e com um pico do veneno de *O. scutellatus* com tempo de 22,348, equivalente contudo à 0,596%. (Tabela 4).

Tabela 4 – Comparação dos perfis cromatográficos de Exclusão Molecular dos venenos totais de *M. lemniscatus*, *P. australis*, *N. scutatus* e *O. scutellatus*, em coluna TosoHaas TSK 2000 (600x 7,5 mm) numa concentração de 2mg/ml em Bicarbonato de Amônio a 0,025M, pH:7,0. Indicando os tempos de retenção e a área percentual no perfil.

M. lemniscatus			P. australis			O. scutellatus			N. scutatus		
Pico	T. Retenção	Area %	Pico	T. Retenção	Area %	Pico	T. Retenção	Area %	Pico	T. Retenção	Area %
RT12.467	12.467	4.056	RT11.940	11.940	0.169	RT12.173	12.173	4.055	RT12.074	12.074	0.430
RT14.361	14.361	3.391	RT13.687	13.687	5.209	RT14.419	14.419	54.085	RT13.995	13.995	14.933
RT17.231	17.231	0.847	RT16.145	16.145	10.019	RT17.426	17.426	6.420	RT16.023	16.023	3.222
RT18.339	18.339	0.929	RT22.042	22.042	8.713	RT18.440	18.440	3.737	RT17.208	17.208	7.928
RT19.733	19.733	3.319	RT22.458	22.458	3.415	RT19.980	19.980	2.279	RT18.134	18.134	25.290
RT20.749	20.749	0.955	RT23.715	23.715	16.782	RT22.348	22.348	0.596	RT19.544	19.544	9.314
RT21.754	21.754	4.002	RT24.008	24.008	13.333	RT24.484	24.484	6.516	RT22.542	22.542	2.244
RT22.579	22.579	14.634	RT25.301	25.301	37.919	RT25.311	25.311	4.611	RT23.150	23.150	11.318
RT23.614	23.614	10.550	RT31.458	31.458	1.170	RT27.556	27.556	7.083	RT26.708	26.708	2.386
RT26.666	26.666	38.681	RT46.172	46.172	3.271	RT31.297	31.297	3.460	RT27.610	27.610	7.351
RT31.758	31.758	1.997	Total		100.000	RT34.880	34.880	2.314	RT28.445	28.445	10.878
RT33.857	33.857	3.365				RT37.258	37.258	3.981	RT41.009	41.009	3.870
RT37.519	37.519	7.253				RT57.058	57.058	0.864	RT55.542	55.542	0.837
RT45.289	45.289	0.720				Total		100.000	Total		100.000
RT48.823	48.823	5.301									
Total		100.000									

4.7. Soroneutralização

No experimento de soroneutralização com veneno de *Micrurus frontalis* foi possível observar que o soro polivalente CSL promove uma proteção comparável ao do soro antielapídico nacional, em todas as diluições de soro utilizadas (Tabela 5).

Quando realizado este protocolo com veneno de *Micrurus lemniscatus*, observamos que, ao contrário do soro comercial produzido no Brasil, que não neutralizou a toxicidade do veneno, o soro pentavalente produzido na Austrália inibiu a atividade letal deste veneno, contudo esse fenômeno não ocorre para as demais diluições do soro (Tabela 5).

Tabela 5 - Soroneutralização *in vitro* com veneno de *M. frontalis* e *M. lemniscatus* frente ao soro Nacional (grupos de 1 a 4) e frente ao soro Australiano (grupos 5 a 8) e grupo controle (9A e 9B)

Grupo	Veneno/animal	Soro (diluição)	Salina/animal	M. frontalis	M. lemniscatus
1	5 DL ₅₀	Puro (Nacional)		0/5*	4/5
2	5 DL ₅₀	1:1,5		0/5	5/5
3	5 DL ₅₀	1:2,25		0/5	4/5
4	5 DL ₅₀	1:3,375		0/5	3/5
5	5 DL ₅₀	Puro (CSL)		0/5	0/5
6	5 DL ₅₀	1:1,5		0/5	5/5
7	5 DL ₅₀	1:2,25		0/5	5/5
8	5 DL ₅₀	1:3,375		0/5	5/5
9A	5 DL ₅₀	0	100µl	2/3	3/3
9B	0	0	100µl	0/2	0/2

*Óbitos / Animais injetados, no mesmo grupo.

Na soroneutralização com o veneno de *Micrurus corallinus*, foi possível observar uma proteção semelhante de ambos os soros.

Quando investigado, se o soro antielapídico comercial bivalente produzido pelo Instituto Butantan, apresenta capacidade neutralizante contra os venenos dos elapídeos utilizados para a fabricação do soro pentavalente CSL, os resultados indicaram que, de quatro venenos estudados, apenas o veneno de *O. scutellatus* foi neutralizado pelo antielapídico produzido pelo Butantan (Tabela 6).

Tabela 6 - Soroneutralização com venenos de *P. textilis* (Pt), *O. scutellatus* (Os), *A. antarcticus* (Aa), *P. australis* (Pa), 3DL₅₀ por animal. Frente aos soros comerciais anti-elapídico bivalente nacional (IB), soro homólogo anti elapídico australiano e PBS.

	3DL ₅₀ **			
	Pt***	Os	Aa	Pa
PBS	4/5*	4/5	5/5	4/5
IB	5/5	0/5	3/5	4/5
Homólogo	5/5	0/5	0/5	0/5

*Óbitos / Animais injetados, no mesmo grupo. ** Valor de DL₅₀ por animal. *** Grupos de 5 animais cada.

Os resultados (Tabelas 6 e 7) sugerem que veneno de *Oxyuranus scutellatus* possui componentes em seu veneno que são parcialmente compartilhados por *M. corallinus* e *M. frontalis*, o que explica porque o soro antielapídico nacional foi capaz de inibir o veneno de *Oxyuranus scutellatus*. Para corroborar estes resultados, foi verificado que os efeitos tóxicos dos venenos de *M. corallinus* e *M. frontalis* são neutralizados pelo soro produzido contra o veneno de *O. scutellatus*.

Também verificamos, que o veneno de *M. frontalis* pode ser neutralizado pelos soros de *Pseudonaja textilis* e *Pseudechis australis* (Tabela 7).

Tabela 7 - Soroneutralização com venenos de *M. frontalis* (Mf), 3DL₅₀ por animal, frente aos soros comerciais anti-elapídicos Nacional bivalente (IB), Australiano pentavalente (CSL5) e Soros monovalentes: Anti *Oxyuranus scutellatus* (Anti-Os), Anti *Pseudonaja textilis* (Anti-Pt), Anti *Notechis scutatus* (Anti-Ns) e Anti *Pseudechis australis* (Anti-Pa) e controle com PBS. E com veneno de *M. corallinus* (Mc), na mesma DL₅₀ frente aos quarto primeiros soros.

	3DL ₅₀ **	
	Mf***	Mc
PBS	5/5*	5/5
IB	0/5	0/5
CSL5	0/5	0/5
Anti-Os	0/5	0/5
Anti-Pt	0/5	
Anti-Ns	3/5	
Anti - Pa	0/5	

*Óbitos / Animais injetados, no mesmo grupo. ** Valor de DL₅₀ por animal. *** Grupos de 5 animais cada.

Logo, os dados sugerem que é possível a produção de um soro anti – *M. corallinus* e anti – *M. frontalis* usando veneno de *Oxyuranus scutellatus* (Tabelas 6 e 7) associando-se por medida de segurança, o veneno de *Pseudonaja textilis* ou *Pseudechis australis*, por neutralizarem a atividade tóxica do veneno de *M. frontalis* (Tabela 7).

Com o objetivo de verificar a capacidade neutralizante do soro produzido contra os venenos de *O. scutellatus* e *P. australis*, animais foram desafiados com os venenos de outros elapídeos. Estes últimos resultados mostraram que além de *M. corallinus* e *M. frontalis*, o soro OsPa é capaz de neutralizar os efeitos tóxicos de *Micrurus altirostris*, *M. fulvius*, *M. pyrrhocryptus*, e *M. nigrocinctus*.(Tabela 8)

Tabela 8 - Soroneutralização com venenos de *M. corallinus* (Mc), *M. lemniscatus* (MI), *M. altirostris* (Ma), *M. spixii* (Ms), *M. ibiboboca* (Mi), *M. fulvius* (Mf), *M. pyrrhocryptus* (Mp), *M. nigrocinctus* (Mn), 3DL₅₀ por animal. Frente aos soros comerciais anti-elapídicos Nacional bivalente (IB), Australiano pentavalente (CSL5), Soros monovalentes anti *Oxyuranus* com anti *Pseudechis* (OsPa), Soros monovalentes anti *Oxyuranus* com anti *Pseudechis* acrescido o soro anti *Notechis* (OsPaNs), e controle com PBS.

3DL ₅₀ **										
	Mc***	MI	Ma	Ms	Mi	Mf	Mp	Mn	MI	MI
PBS	5/5*	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5
IB	0/5	5/5	5/5	5/5	5/5	0/5	0/5	0/5	1/5	5/5
CSL5	0/5	0/5	0/5	4/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
OsPa		5/5	0/5	4/5	3/5	0/5	0/5	0/5		
OsPaNs									0/5	2/5

*Óbitos / Animais injetados, no mesmo grupo. ** Valor de DL₅₀ por animal. *** Grupos de 5 animais cada.

Os venenos de *M. lemniscatus* e *M. ibiboboca* não são neutralizados pelo soro OsPa, no entanto, o soro CSL foi capaz de neutralizar ambos os venenos, indicando que o efeito protetor se deve por conta de algum composto presente em alguma outra serpente utilizada na obtenção deste soro.

Com base nesse resultados, optamos por adicionar ao soro OsPa, o soro produzido contra o veneno de *N. scutatus* e verificou-se que este novo soro (OsPaNs) seria capaz de neutralizar, também os venenos de *M. ibiboboca* e parcialmente *M. lemniscatus*.

4.8. Imunização (ELISA)

No experimento, onde foi obtido o soro de animais imunizados com veneno irradiado e nativo, é possível observar que ambos os soros obtidos possuem o mesmo comportamento, frente aos venenos constituintes do antígeno nativo. (Figura 14) *O. scutellatus*, *P. australis* e *N. scutatus*

Figura 14 - ELISA - Perfil dos soros obtidos na última coleta, dos animais imunizados com o antígeno nativo (aNativo) e irradiado (aIrradiado). Frente aos venenos constituintes do antígeno nativo a 10ug/poço.

Os anticorpos heterólogos (produzidos contra uma mistura dos venenos de *Oxyuranus*, *Pseudechis* e *Notechis* nativos ou irradiados) se mostraram imunorreativos frente ao veneno de *M. lemniscatus* (Figura 15) indicando reatividade cruzada.

Figura 15 - ELISA - Perfil dos soros obtidos na última coleta, dos animais imunizados com o antígeno nativo (aNativo) e irradiado (aIrradiado). Frente ao veneno de *M. lemniscatus* a 10ug/poço.

5. DISCUSSÃO

De acordo com Tan *et. al.* (1992), os venenos de *Micrurus* parecem exibir propriedades biológicas semelhantes a outros venenos de elapidae encontradas na Ásia e África.

Quando comparados diferentes venenos do gênero *Micrurus*, existe uma grande variação dos níveis de atividade enzimática entre as espécies. Contudo, todos os venenos possuem atividade de fosfolipase A₂, de acordo com estudo feito por Aird e Silva (1991).

Apesar das diferenças observadas no gel de eletroforese, existem semelhanças observadas, quando comparados os venenos de *M. frontalis* e *N. scutatus*. Ambos possuem alterações no padrão de migração após fervura, existindo proteínas com mesma massa antes e após denaturação (Figura 1). Estes foram testados inicialmente, em virtude dos resultados obtidos por Wisniewski *et. al.* (2003) onde o soro anti-*Notechis* neutraliza a letalidade do veneno de *M. fulvius*.

Quando comparados os venenos de *P. australis*, *N. scutatus*, *P. textilis*, *A. antarcticus*, *O. scutellatus*, *M. lemniscatus* e *M. frontalis*, também podem ser observadas proteínas de mesma massa (Figura 8), corroborando os dados obtidos por Tan (1992)

Ensaio de Cromatografia, comparando os venenos de *M. frontalis* e *N. scutatus* (Figura 7) e (Tabela 3), salientam as homologias encontradas em estudos anteriores (Wisniewski et al., 2003). E também indicam diferenças no padrão de eluição entre as proteínas desses venenos.

No mesmo ensaio com os venenos de *M. lemniscatus*, *P. australis*, *N. scutatus* e *O. scutellatus*, que por se tratar de um segundo experimento os perfis não podem ser comparados com os do experimento anterior, e apesar de certas diferenças no perfil cromatográfico de muitos picos, foi possível observar certas semelhanças (Figura 13) e (Tabela 4), o veneno de *M. lemniscatus* possui um pico com o tempo de retenção equivalente a 38,681% do perfil, muito próximo a um pico no veneno de *N. scutatus*, equivalente contudo a apenas 2,386% do perfil de *Notechis* (Tabela 4). Ou seja, parece que existem componentes similares, mas em concentrações relativas diferentes.

No ensaio de western blot a comparação entre as amostras fervidas e não fervidas indica mudança no padrão de migração, e na intensidade das bandas de menor massa molecular na amostra. Infere-se que essa alteração seja em decorrência da presença de epítomos conformacionais, que após a fervura perderam sua imunoreatividade. Contudo, esse processo ocorre em uma menor intensidade nas proteínas de maior massa molecular, provavelmente devido à predominância de epítomos não conformacionais. Quando o veneno de *Micrurus frontalis* foi exposto ao soro australiano CSL, ocorreu o reconhecimento de proteínas presentes no veneno com mesma massa molecular das reconhecidas pelo soro nacional (Figura 2), corroborando estudos, como os de Wisniewski *et. al.* (2003), onde foi observado que o soro anti-*Notechis* comercial neutraliza o veneno de *M. fulvius*, e Prieto da Silva *et. al.*, (2000), que demonstraram o reconhecimento do veneno de *N. scutatus* por western blot, frente ao soro anti- *M. corallinus*.

Quando comparados por ELISA, os soros anti-elapídico nacional e o anti-elapídico polivalente CSL, notou-se um nível elevado de reatividade cruzada entre os soros frente ao veneno de *Micrurus frontalis* com valores de absorbância muito próximos, gerando duas curvas semelhantes (Figura 3). Um fenômeno muito semelhante ocorreu quando o veneno de *Notechis scutatus* foi exposto ao soro nacional e ao soro australiano (Figura 4) evidenciando semelhanças entre os determinantes antigênicos presentes em ambos os venenos. No entanto, o fato de um anticorpo ou soro reconhecer um antígeno, não implica forçosamente na neutralização da atividade biológica deste antígeno. Assim, os soros foram também testados *in vivo*, confirmando a sua capacidade neutralizante.

No ensaio preliminar de soroneutralização foi possível observar que o soro polivalente CSL promove uma proteção comparável ao do soro anti-elapídico nacional frente aos venenos de *Micrurus frontalis* e, com veneno de *Micrurus lemniscatus* o soro pentavalente protegeu 100% dos animais quando usado puro enquanto o do butantan não apresentou proteção (Tabela 5). Contudo, foi realizada uma soroneutralização complementar (Tabela 8), pois no grupo controle com *Micrurus frontalis*, apenas 66% dos animais morreram, o que acreditamos ser decorrente do fato do veneno utilizado ser muito antigo, com provável comprometimento da atividade tóxica (Tabela 5).

Através de resultados (Tabelas 6, 7 e 8) de soroneutralizações complementares, realizadas pelo Instituto Butantan (IB), foi possível observar que, o soro pentavalente CSL promove proteção contra todos os veneno de *Micrurus* aqui estudados com exceção do veneno de *M spixii*, onde houve 80% de mortes, enquanto com o soro nacional todos os animais morreram. (Tabela 8) Observamos também que uma formulação contendo volumes equivalentes dos soros monovalentes comerciais produzidos a partir dos venenos de *O. scutellatus* ou *P. australis* promoveu a neutralização dos venenos dos seguintes elapídeos: *M. corallinus*; *M. frontalis*; *M. fulvius*; *M. nigrocinctus*; *M. pyrrhocryptus* e *M. altirostris*. Posteriormente, a adição de um soro comercial produzido a partir do veneno de *N. scutatus* promoveu a neutralização total do veneno de *M. ibiboboca* e, parcial do veneno de *M. lemniscatus*.

Logo, pode ser sanado o problema, da necessidade de um soro anti-elapídico de maior cobertura como proposto por Tanaka et. al. (2010)

No experimento de imunização dos animais foi utilizado o adjuvante ISA 50, e as respectivas curvas de títulos de anticorpo, quando comparadas as curvas anti-nativo e anti-irradiado são muito próximas, como demonstrado anteriormente por Clissa, (1999); Hati, (1990) e Ferreira junior et. al.(2005).

6. CONCLUSÕES

- A análise dos venenos de *Micrurus frontalis* e *Notechis scutatus* por eletroforese, Western blot e ELISA evidenciou as semelhanças entre os venenos e a reatividade cruzada entre os soros.
- Existe reatividade cruzada dos venenos de *Micrurus frontalis* e *M. lemniscatus* frente ao soro comercial polivalente anti-Elapídico australiano e ao soro comercial produzido no Brasil.
- Além de reagir com os componentes do veneno de *Micrurus*, os soros monovalentes, pentavalente e as combinações de soro monovalentes do soro australiano testados neutralizaram uma diversidade de venenos maior do que aquela neutralizada pelo soro ora em uso no Brasil.
- O soro australiano pentavalente, testado, protege contra todos os venenos com exceção de *M. spixii*
- O soro australiano poderia ser uma proposta viável como alternativa para produção de soro anti-elapídico Brasileiro.
- O veneno de elapídeos australianos tem grande potencial como substituto do escasso antígeno hoje utilizado para a produção do soro nacional.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

ABIB, H.; LARABA-DJEBARI, F. Effects of ^{60}Co gamma radiation on toxicity and hemorrhagic, myonecrotic, and edema-forming activities of *Cerastes cerastes* venom. **Canadian journal of physiology and pharmacology**, v. 81, n. 12, p. 1125–1130, 2003a.

ABIB, L.; LARABA-DJEBARI, F. Effect of gamma irradiation on toxicity and immunogenicity of *Androctonus australis hector* venom. **Canadian journal of physiology and pharmacology**, v. 81, n. 12, p. 1118–1124, 2003b.

AIRD, S.D.; DA SILVA, N.J. Comparative enzymatic composition of Brazilian coral snake (*Micrurus*) venoms. **Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology**, v. 99, n. 2, p. 287–294, 1991.

BAPTISTA, J.A.; SPENCER, P.J.; OLIVEIRA, J.E.; CASARE, M.S.; NASCIMENTO, N. Immune response against antigens irradiated with ^{60}Co gamma-rays. **Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry**, v. 269, n. 3, p. 565–569, 2006.

BARBER, C.M.; ISBISTER, G.K.; HODGSON, W.C. Alpha neurotoxins. **Toxicon**, v. 66, p. 47–58, 2013.

BARROS, A.C.; FERNANDES, D.P.; FERREIRA, L.C.; DOS SANTOS, M.C. Local effects induced by venoms from five species of genus *Micrurus* sp. (coral snakes). **Toxicon**, v. 32, n. 4, p. 445–452, 1994.

BENNACEF-HEFFAR, N.; LARABA-DJEBARI, F. Evaluation of the effect of gamma rays on the venom of *Vipera lebetina* by biochemical study. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 81, n. 12, p. 1110–1117, 2003.

BERLING, I.; ISBISTER, G.K. Hematologic Effects and Complications of Snake Envenoming. **Transfusion Medicine Reviews**, 2014.

.

CECCHINI, A. L.; MARCUSSI, S.; SILVEIRA, L.B.; BORJA-OLIVEIRA, C.R.; RODRIGUES-SIMIONI, L.; AMARA, S.; STÁBELI, R.G.; GIGLIO, J.R.; ARANTES, E.C.; SOARES, A.M. Biological and enzymatic activities of *Micrurus* sp. (Coral) snake venoms. **Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology**, v. 140, n. 1, p. 125–134, 2005.

CHACÓN, D.; RODRÍGUEZ, S.; ARIAS, J.; SOLANO, G.; BONILLA, F.; GÓMEZ, A. Maintaining Coral Snakes (*Micrurus nigrocinctus*, Serpentes: Elapidae) for venom production on an alternative fish-based diet. **Toxicon**, v. 60, n. 3, p. 249–253, 2012.

CHIPPAUX, J.P.; WILLIAMS, V.; WHITE, J. Snake venom variability: Methods of study, results and interpretation. **Toxicon**, v. 29, n.11, p.1279-1303, 1991.

CISCOTTO, P.H.; RATES, B.; SILVA, D.; RICHARDSON, M.; SILVA, L.P.; ANDRADE, H.; DONATO, M.F.; COTTA, G.A.; MARIA, W.S.; RODRIGUES, R.J.; SANCHEZ, E.; DE LIMA, M.E.; PIMENTA, A.M. Venomic analysis and evaluation of antivenom cross-reactivity of South American *Micrurus* species. **Journal of Proteomics**, v. 74, n. 9, p. 1810–1825, 2011.

CLISSA, P.B.; NASCIMENTO, N. Toxicity and immunogenicity of *Crotalus durissus terrificus* venom treated with different doses of gamma rays. **Toxicon**, v. 37, p. 1131–1141, 1999.

CORRÊA-NETTO, C.; JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO IDE, L.; SILVA D.A.; HO, P.L.; LEITÃO-DE-ARAÚJO, M.; ALVES, M.L.; SANZ, L.; FOGUEL, D.; ZINGALI, R.B.; CALVETE, J.J. Snake venomomics and venom gland transcriptomic analysis of Brazilian coral snakes, *Micrurus altirostris* and *M. corallinus*. **Journal of Proteomics**, v. 74, n. 9, p. 1795–1809, 2011.

BONI-MITAKE M.; COSTA. H.; SPENCER, P.J.; VASSILIEFF, V.S.; ROGERO, J.R. Effects of 60 Co gamma radiation on crotoamine. **Brazilian Journal Of Medical And Biological Research**, v. 34, p. 1531–1538, 2001.

DA SILVA, D.C.; DE MEDEIROS, W. A.; BATISTA IDE, F.; PIMENTA, D. C.; LEBRUN, I.; ABDALLA, F. M.; SANDOVAL, M. R. Characterization of a new muscarinic toxin from the venom of the Brazilian coral snake *Micrurus lemniscatus* in rat hippocampus. **Life Sciences**, v. 89, n. 25-26, p. 931–938, 2011.

DE ROODT, A.R.; LAGO, N.R.; STOCK, R.P. Myotoxicity and nephrotoxicity by *Micrurus* venoms in experimental envenomation. **Toxicon**, v. 59, n. 2, p. 356–364, 2012.

FARMACOPEIA BRASILEIRA. 5ªed. Parte II, p. 1289, 2010.

FEARN, S.; DOWDE, J.; TREMBATH, D.F. Body size and trophic divergence of two large sympatric elapid snakes (*Notechis scutatus* and *Austrelaps superbis*) (Serpentes:Elapidae) in Tasmania. **Australian Journal of Zoology**, v. 60, n. 3, p. 159–165, 2012.

FERREIRA JUNIOR R.S.; NASCIMENTO N.; MARTINEZ J.C.; ALVES J.B.; MEIRA D.A.; BARRAVIERA B. Immunization with native and cobalt 60-irradiated *Crotalus durissus terrificus* venom in swiss mice: assessment of the neutralizing potency of antisera. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 11, n. 3, p. 299–314, 2005.

FRANCIS, B.R.; DA SILVA JÚNIOR, N.J.; SEEBART, C.; CASAIS E SILVA, L.L.; SCHMIDT, J.J.; KAISER, I.I.. Toxins isolated from the venom of the Brazilian coral snake (*Micrurus frontalis frontalis*) include hemorrhagic type phospholipases A2 and postsynaptic neurotoxins. **Toxicon**, v. 35, n. 8, p. 1193-1203, 1997.

FRY, B.G.; WÜSTER, W.; KINI, R.M.; BRUSIC, V.; KHAN, A.; VENKATARAMAN, D.; ROONEY, A.P. Molecular evolution and phylogeny of elapid snake venom three-finger toxins. **Journal of Molecular Evolution**, v. 57, n. 1, p. 110–129, 2003.

Fundação Nacional de Saúde - FUNASA. **Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos**. 2ª ed. – Brasília; 2001.

GUARNIERI, M.C. Estudos dos efeitos da radiação gama de ^{60}Co nas propriedades bioquímicas, biológicas e imunológicas do veneno de *Bothrops jararaca*. **Tese (Doutorado) – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares**, São Paulo, 1992.

GUTIÉRREZ, J.M.; WILLIAMS, D.; FAN, H.W.; WARRELL, D.A. Snakebite envenoming from a global perspective: Towards an integrated approach. **Toxicon**, v. 56, n. 7, p. 1223–1235, 2010.

HATI, R.N.; MANDAL, M.; HATI, A.K. Active immunization of rabbit with gamma irradiated Russell's viper venom toxoid. **Toxicon**, v. 28, n. 8, p. 895–902, 1990.

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

MANOCK, S.R.; SUAREZ, G.; GRAHAM, D.; AVILA-AGUERO, M.L.; WARRELL, D.A. Neurotoxic envenoming by South American coral snake (*Micrurus lemniscatus helleri*): case report from eastern Ecuador and review. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 102, n. 11, p. 1127–1132, 2008.

MORAES, F.V.; SOUSA-E-SILVA, M.C.; BARBARO, K.C.; LEITÃO, M.A.; FURTADO, M.F. Biological and immunochemical characterization of *Micrurus altirostris* venom and serum neutralization of its toxic activities. **Toxicon**, v. 41, n. 1, p. 71–79, 2003.

MUNAWAR, A.; TRUSCH, M.; GEORGIEVA, D.; HILDEBRAND, D.; KWIATKOWSKI, M.; BEHNKEN, H.; HARDER, S.; ARNI, R.; SPENCER, P.; SCHLÜTER, H.; BETZEL, C. Elapid snake venom analyses show the specificity of the peptide composition at the level of genera *Naja* and *Notechis*. **Toxins**, v. 6, n. 3, p. 850–868, 2014.

MURATA, Y. Efeitos da radiação gama no veneno de *Crotalus durissus terrificus*. **Dissertação (Mestrado) – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares**, São Paulo, 1988.

NASCIMENTO, N.; SPENCER, P.J.; ANDRADE JR, H.F.; GUARNIERI, M.C.; ROGERO, J.R. Effects of gamma radiation on snake venoms. **Radiat. Phys. Chem.** v. 52, n. 1-6, p. 665 669, 1998.

NASCIMENTO, N.; SEEBART, C.S.; FRANCIS, B.; ROGERO, J.R.; KAISER, I.I. Influence of ionizing radiation on crotoxin: Biochemical and immunological aspects. **Toxicon**, v. 34, n. 1, p. 123–131, 1996.

OLIVEIRA, D.A.; HARASAWA, C.; SEIBERT, C.S.; CASAIS E SILVA, L.L.; PIMENTA, D.C.; LEBRUN, I.; SANDOVAL, M.R. Phospholipases A2 isolated from *Micrurus lemniscatus* coral snake venom: Behavioral, electroencephalographic, and neuropathological aspects. **Brain Research Bulletin**, v. 75, n. 5, p. 629–639, 2008.

PETERSON, M.E. Snake Bite: Coral Snakes. **Clinical Techniques in Small Animal Practice**, v. 21, n. 4, p. 183–186, 2006.

PRIETO DA SILVA, A.R.; YAMAGUSHI, I.K.; MORAIS, J.F.; HIGASHI, H.G.; RAW, I.; HO, P.L.; OLIVEIRA, J.S. Cross reactivity of different specific *Micrurus* antivenom sera with homologous and heterologous snake venoms. **Toxicon**, v. 39, n. 7, p. 949–953, 2001.

PYCROFT, K.; FRY, B.G.; ISBISTER, G.K.; KURUPPU, S.; LAWRENCE, J.; IAN SMITH, A.; HODGSON, W.C. Toxinology of venoms from five australian lesser known elapid snakes. **Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology**, v. 111, n. 4, p. 268–274, 2012.

REY-SUÁREZ, P.; FLORIANO, R.S.; ROSTELATO-FERREIRA, S.; SALDARRIAGA-CÓRDOBA, M.; NÚÑEZ, V.; RODRIGUES-SIMIONI, L.; LOMONTE, B. Mipartoxin-I, a novel three-finger toxin, is the major neurotoxic component in the venom of the redbellied coral snake *Micrurus mipartitus* (Elapidae). **Toxicon**, v. 60, n. 5, p. 851–863, 2012.

SÁNCHEZ, E.E.; LOPEZ-JOHNSTON, J.C.; RODRÍGUEZ-ACOSTA, A.; PÉREZ, J.C. Neutralization of two North American coral snake venoms with United States and Mexican antivenoms. **Toxicon**, v. 51, n. 2, p. 297–303, 2008.

SOUZA, F.A.; SPENCER, P.J.; ROGERO, J.R.; NASCIMENTO, N.; DAL PAI-SILVA, M.; GALLACCI, M. ^{60}Co gamma irradiation prevents Bothrops jararacussu venom neurotoxicity and myotoxicity in isolated mouse neuromuscular junction. **Toxicon**, v. 40, n. 8, p. 1101–1106, 2002.

SPENCER, P.J. Efeitos da radiação gama de ^{60}Co na estrutura molecular da bothropstoxina-1. **Tese (Doutorado) – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares**, São Paulo, 2000.

TAN, N.H.; PONNUDURAI, G. The biological properties of venoms of some American coral snakes (Genus micrurus). **Comparative biochemistry and physiology. B, Comparative biochemistry**, v. 101, n. 3, p. 471–474, 1992.

TANAKA, G.D.; FURTADO MDE, F.; PORTARO, F.C.; SANT'ANNA, O.A.; TAMBOURGI, D.V. Diversity of Micrurus snake species related to their venom toxic effects and the prospective of antivenom neutralization. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 4, n. 3, p. 1–12, 2010.

THEAKSTON, R.D.G.; LAING, G.D. Diagnosis of snakebite and the importance of immunological tests in venom research. **Toxins**, v. 6, n. 5, p. 1667–1695, 2014.

TOWBIN, H.; STAEBELIN, T.; GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 76, n. 9, p. 4350–4354, 1979.

UTKIN, Y. N. Three-finger toxins, a deadly weapon of elapid venom - Milestones of discovery. **Toxicon**, v. 62, p. 50–55, 2013.

VERGARA, I.; PEDRAZA-ESCALONA, M.; PANIAGUA, D.; RESTANO-CASSULINI, R.; ZAMUDIO, F.; BATISTA, C.V.F.; POSSANI, L.D.; ALAGÓN, A. Eastern coral snake *Micrurus fulvius* venom toxicity in mice is mainly determined by neurotoxic phospholipases A2. **Journal of Proteomics**, v. 105, p. 295–306, 2014.

WISNIEWSKI, M.S.; HILL, R.E.; HAVEY, J.M.; BOGDAN, G.M.; DART, R.C. Australian tiger snake (*Notechis scutatus*) and mexican coral snake (*Micrurus* species) antivenoms prevent death from United States coral snake (*Micrurus fulvius fulvius*) venom in a mouse model. **Journal of toxicology. Clinical toxicology**, v. 41, n. 1, p. 7–10, 2003.

WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO. **Progress in the characterization of venoms and standardization of antivenoms**. Geneva; WHO Offset Publication, n° 58. 1981.