

**ANTICORPOS IgY DE GEMAS DE OVOS DE GALINHAS: EVOLUÇÃO
DURANTE O PROCESSO DE IMUNIZAÇÃO NA PRODUÇÃO DE
ANTICORPOS ANTIOFÍDICOS**

DAVID GITIRANA DA ROCHA

Tese apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Biociências e Biotecnologia pela Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro.

ORIENTADOR: Dr. WILMAR DIAS DA SILVA

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO
ABRIL - 2016**

**ANTICORPOS IgY DE GEMAS DE OVOS DE GALINHAS: EVOLUÇÃO
DURANTE O PROCESSO DE IMUNIZAÇÃO NA PRODUÇÃO DE
ANTICORPOS ANTIOFÍDICOS**

DAVID GITIRANA DA ROCHA

Tese apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Biociências e Biotecnologia pela Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro

Avaliado em 20/04/2016

Dr. Wilmar Dias da Silva (Orientador – Instituto Butantan)

Dr. Milton Masahiko Kanashiro - LBR / UENF

Dra. Elena Lassounskaia - LBR/ UENF

Dr. Osvaldo Augusto Brazil Esteves Sant'Anna - LIq - Instituto Butantan

Dra. Mariana Novo Nunes Campos - Hospital Ferreira Machado

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO
ABRIL - 2016**

AGRADECIMENTOS

A Deus, por tudo.

Ao prof. Wilmar, pela orientação, paciência e incentivo de sempre. E por ser o responsável direto pela formação do profissional David.

Aos membros da banca, que contribuíram com a presença, com as sugestões e, principalmente, com o apoio: Osvaldo Brazil Sant'Anna, Mariana Novo, Milton Kanashiro e Elena Lassounskaia.

Aos professores, técnicos e membros do laboratório, amigos imprescindíveis: Elena Lassounskaia, Milton Kanashiro, Andrea Arnholdt, Jorge Petretski, Renato DaMatta, Fabio Olivares, Verônica Lanes, Claudia Letícia, Rita Escocard, Juliana Azevedo, Raul Ramos, Sara Schiundt, Pollyana Pimentel, Fabrício Moreira, Giliane Souza, Tatiana Biá, Willian Freitas, Thiago Frauches, Franz Borges, Antônio Alves, “Tahis” Louvain e os demais.

À família, essencial independente do momento: Rita Gitirana, Ana Gitirana, Cíntia Oliveira.

Aos amigos, sempre apoiando e criticando quando necessário: Rodrigo Santos, Douglas Mattos, Seldon Aleixo, Keysson Vieira, Renan Modesto, Thatiane Resende, Henrique Barros, Fabrício Barros, Ronan Facini, Rennê Duarte, Saulo Pireda e os demais.

SUMÁRIO

1 – INTRODUÇÃO	01
2 – ESTADO DA ARTE	04
2.1 - Envenenamento por Serpentes Peçonhentas	04
2.2 - Características Gerais das Serpentes, Seus Venenos e Tox	05
2.3 - Antivenenos e Tratamentos Auxiliares em Envenenamentos	10
2.4 - Imunoproteção com IgY – Histórico	11
2.5 - Produção de Anticorpos em Aves	13
2.6 - Diversidade de Anticorpos em Aves	15
2.7 - Características Gerais de IgY	17
2.8 - Imunização de Galinhas	21
2.9 - Metodologias para Extração de IgY.....	22
3 – OBJETIVOS	23
3.1 - Objetivo Geral	23
3.2 - Objetivos Específicos	23
4 – MATERIAL E MÉTODOS	24
4.1 - Isolamento de Crotoxina.....	24
4.2 - Imunização das Aves.....	24
4.3 - Coleta de Material.....	25
4.4 - Obtenção de IgY.....	25
4.5 - Quantificação de Proteínas	26
4.6 - Focalização Isoelétrica para Eletroforese 2-D	27
4.7 - SDS-PAGE	27
4.8 - Western Blotting	27
4.9 - ELISA	28
4.10 - Ensaio de Imunoproteção.....	28
4.11 - Obtenção de RNAm e Análise por PCR	29
4.12 - Seleção Clonal	29
4.13 - Sequenciamento	30
4.14 - Modelagem Molecular por Homologia Estrutural	30

5 – RESULTADOS	32
5.1 - Avaliação dos Venenos em Uso	32
5.2 - Avaliação das Imunizações por Grupos	34
5.3 - Imunoproteção em Modelo Murino	39
5.4 - Avaliação Individual das Aves	41
5.5 - Produção do Modelo de scFvs de IgY	52
6 – DISCUSSÃO	56
7 – CONCLUSÃO	62
8 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	63

SUMÁRIO DE FIGURAS

Figura 1 - Distribuição Geográfica de <i>Bitis arietans</i>	05
Figura 2 - Criança Picada por <i>Bitis arietans</i>	06
Figura 3 - Eritema Após Picada de <i>Crotalus durissus terrificus</i>	08
Figura 4 - Localização da Bursa de Fabricius.....	14
Figura 5 - Geração de Diversidade Em Anticorpos de Galinhas.....	16
Figura 6 - CDRs em scFv	17
Figura 7 - Diferenças Estruturais entre IgG e IgY.....	18
Figura 8 - Fotografia do Biotério de Aves	25
Figura 9 - Perfil Eletroforético dos Venenos Utilizados.....	32
Figura 10 - Perfil Bidimensional do Veneno de <i>Bitis arietans</i>	33
Figura 11 - Perfil Bidimensional do Veneno de <i>Crotalus durissus</i>	33
Figura 12 - Titulação dos Anticorpos por Grupos.....	35
Figura 13 - Avidéz dos Anticorpos por Grupos	36
Figura 14 - Afinidade dos Anticorpos por Grupos	38
Figura 15 - <i>Western Blotting</i> dos Venenos Utilizados	39
Figura 16 - Ensaio de Imunoproteção em Modelo Murino	40
Figura 17 - Titulação Individual do Soro das Aves na 3ª Imunização.....	42
Figura 18 - SDS-PAGE Para Avaliação de Métodos de Precipitação	43
Figura 19 - Titulação Individual dos Ovos das Aves na 3ª Imunização... 43	43
Figura 20 - Titulação Individual por Imunizações: Aves 2 e 3.....	45
Figura 21 - Titulação Individual por Imunizações: Aves 4 e 6.....	46
Figura 22 - Titulação Individual por Imunizações: Ave 7	47
Figura 23 - Avidéz Individual por Imunizações: Aves 2 e 3	48
Figura 24 - Avidéz Individual por Imunizações: Aves 4 e 6	49
Figura 25 - Avidéz Individual por Imunizações: Ave 7	50
Figura 26 - Afinidade Individual das Aves por Imunizações	51
Figura 27 - Análises de Amplificação, Digestão e Sequenciamento	53
Figura 28 - Sequências Obtidas de Fv de Cadeias Leves	54
Figura 29 - Modelo de scFv	55
Figura 30 - Visualização Lateral e Superior do scFv	55

SUMÁRIO DE TABELAS

Tabela 1 - Diferenças Gerais entre IgY e IgG	02
Tabela 2 - Recomendações para a Imunização de Galinhas	21
Tabela 3 - Primers Utilizados nas Reações de Amplificação	29
Tabela 4 - Calendário da 1ª Imunização Realizada	34
Tabela 5 - Calendário da 2ª Imunização Realizada	41

LISTA DE ABREVIATURAS

BSA – Albumina Sérica Bovina

CDR – Região Determinante de Complementaridade

DNA – Ácido Desóxirribonucléico (cDNA – DNA complementar)

DTN / NTD – Doença Tropical Negligenciada

ELISA – Ensaio de Imunoadsorção Ligado à Enzima

Fab – Fração de ligação ao antígeno do anticorpo

Ig – Imunoglobulina (IgA, IgD, IgE, IgG, IgM, IgY)

MHC – Complexo Principal de Histocompatibilidade

OMS / WHO – Organização Mundial da Saúde

PBS – Tampão Fosfato-Salino

RNA – Ácido Ribonucléico (mRNA – RNA mensageiro)

scFv – Fragmento Variável de Cadeia Simples do anticorpo

SDS-PAGE – Eletroforese em Gel de Poliacrilamida com Dodecil Sulfato de Sódio

RESUMO

Galinhas adultas foram imunizadas nove vezes, com intervalos de três semanas, com venenos de *Bitis arietans* ou *Crotalus durissus terrificus*. Na primeira imunização os venenos foram incorporados em Marcoll Montanide-BCG; na segunda, em Marcoll Montanide; e nas seguintes, foram diluídos em PBS. Sangue e ovos foram coletados após cada imunização. Amostras de sangue foram utilizadas como fontes de soro e linfócitos, enquanto ovos foram utilizados para isolar anticorpos IgY antivenenos (AvAbs). AvAbs foram quantificados por ELISAs e os componentes dos venenos reconhecidos por SDS-PAGE e *Western Blotting*. A taxa de tempo requerida para cada preparação de anticorpos reconhecer antígenos (Ags) específicos - avidéz, e a força com a qual IgY AvAbs interagem com os epítomos antigênicos dos venenos - afinidade, foram avaliados em modificações pontuais no método utilizado de ELISA. mRNAs isolados foram modelos para a sintetização de cDNA correspondente aos domínios variáveis de ambas cadeias L e H (V_L-V_H) de galinhas, que foram subsequentemente amplificados por PCR utilizando os conjuntos de *primers* VLF1/VLR1 e VHF1/VHR1. As sequências obtidas dos CDRs 1, 2 e 3 de AvAbs serão utilizadas para identificar sítios espectrais de combinação dos AvAbs antivenenos.

Os títulos de AvAbs, a menor quantidade de tempo de combinação com epítomos dos venenos e a afinidade com que interagem com estes epítomos antigênicos aumentam durante as imunizações, atingindo um platô após a 6^a imunização. O ensaio de letalidade foi feito com anticorpos da 9^a imunização utilizando camundongos *Swiss* jovens como modelo animal. As preparações de AvAbs exibiram potente atividade de neutralização da letalidade do veneno. Em conjunto, estes AvAbs de alta qualidade indicam IgY como promissor substituto imediato para as atuais IgG de mamíferos no tratamento de vítimas de picadas de serpentes. Uma vez que as sequências obtidas dos CDRs se encaixam perfeitamente na estrutura molecular tridimensional de IgY, podem ser usados como modelo para sintetizar scFvs derivados de AvAbs antitoxinas. Uma nova avenida, revestida de inovação, foi aberta para a biotecnologia dos AvAbs.

Palavras-chave: IgY, CDRs, ELISA, afinidade, scFvs.

ABSTRACT

Adult hens were nine times immunized, three weeks intervals, with *Bitis arietans* or *C. d. terrificus* venoms. For the first immunization the venoms were incorporated into Marcoll Montanide-BCG; on the second immunization, into Marcoll Montanide; and for others, were diluted in PBS. Blood and eggs were collected before each immunization. Blood samples were used as serum and lymphocytes source, while eggs served to isolate IgY antivenoms antibodies (AvAbs). AvAbs were quantified by ELISA and venom components recognized by SDS-PAGE-Western blotting assays. The length of time required for each IgY AvAbs preparation to recognize specific venom Ags - avidity, and the strength with which IgY AvAbs interacts with the venoms antigenic epitopes - affinity, were evaluated by punctual modifications into ELISA used method. The lymphocytes were used as mRNA sources. Isolated mRNAs were model to synthesize cDNA corresponding to the variable domains of both L and H chicken IgY chains (V_H - V_L), subsequently amplified by PCR using the VLF1/VLR1 and VHF1/VHR1 primer sets. Obtained CDRs 1, 2 and 3 of AvAbs sequences will be employed to identify spectral AvAbs antivenom combining sites.

The AvAbs titers, lesser-time to encounter the venoms epitopes and affinity with which interacts with these antigenic epitopes increase along immunization, attaining plateau after the 6th immunization. Lethality assay was determined in AvAbs from 9th immunization by using Swiss young mice as animal model. The AvAbs preparations exhibited potent venom lethal neutralization activity. Taken together, these high quality obtained AvAbs indicate IgY as promised immediate substituter for actual mammals IgG to treat victims of snake bites.

Since obtained CDRs sequences perfectly fit into three-dimensional molecular structure of IgY protein, CDRs can be used as model of synthesize scFv-derived antitoxin AvAbs. A new avenue, revested with innovation, was therefore opened to AvAbs biotechnology.

Keywords: IgY, CDRs, ELISA, affinity, scFvs.

1 – INTRODUÇÃO

O primeiro antiveneno usado com sucesso no tratamento de acidentados por animais peçonhentos foi produzido por Albert Calmette no final do século XIX. O método estabelecido para preparar antivenenos foi introduzido no Brasil por Vital Brazil no início do século XX e aperfeiçoado por outros pesquisadores. A primeira solução testada para imunizar animais com base em IgY foi produzida no final do século XIX. Pela simplicidade do experimento caiu no esquecimento científico por anos, voltando a ser citado apenas em 1959 (Russel & Burch, 1959).

Os antivenenos são produzidos em animais hiperimunizados com veneno integral colhido de animais peçonhentos, incluído em adjuvantes (WHO, 2010). Apesar da grande heterogeneidade entre as subunidades dos venenos animais, o número de componentes tóxicos é restrito a uma pequena fração dos mesmos (Guidolin *et al.*, 2013). Ou seja, a imunização com o veneno integral induz a formação de anticorpos inúteis. Ainda há produção de anticorpos dirigidos para domínios atóxicos das proteínas tóxicas. Tais anticorpos, somados às proteínas que escapam no processo de purificação, respondem pelos riscos de indução das reações adversas imediatas e tardias (Cardoso *et al.*, 1993; Warrell, 2010; Gutiérrez, 2012).

Atualmente, grandes grupos de pesquisa estão empenhados no melhoramento de soros antiofídicos (Gutiérrez *et al.*, 2013; Warrell, 2010). Dentre as mais diversas estratégias, a seleção de animais produtores de anticorpos com qualidade é das mais simples, mas não amplamente empregada. Galinhas produzem anticorpos eficientes em processos de neutralização de antígenos e constituem um bom modelo de produção, uma vez que sua manutenção em biotério é mais barata, e o sofrimento animal associado às imunizações e obtenção de anticorpos é minimizado em relação aos mamíferos regularmente empregados (Schade *et al.*, 2005).

Segundo Hau *et al.* (1980 e 1981), IgY de galinhas é mais eficiente que IgG de coelhos no reconhecimento de antígenos altamente conservados. Schade *et al.* (2005) afirmam que, por ser mais hidrofóbica que IgG, a ligação de IgY ao antígeno é mais estável. A inabilidade da IgY na ativação do Sistema Complemento de mamíferos é outra vantagem (tabela 1), além da redução significativa de procedimentos invasivos.

	IgG de Coelho	IgY de Galinha
Amostra de anticorpo	invasivo	não-invasivo
Quantidade da amostra	200mg/40ml de sangue	50-100mg/ovo 5-7 ovos/semana
Quantidade de anticorpos/mês	200mg	1000-2800mg
Interferência com imunoglobulinas de mamíferos (fatores reumatóides)	sim	não
Interferência com HAMA	sim	não
Interferência com Complemento de mamíferos	sim	não
Ligante de proteína A/G	sim	não

Tabela 1 – Diferenças gerais entre IgG de Coelho e IgY de Galinha. Adaptado de Schade *et al.* (2005).

Desde 1996 a tecnologia IgY vem sendo ampliada. Atualmente, anticorpos IgY são extensivamente utilizados em imunodiagnóstico e terapia (Dias da Silva & Tambourgi, 2010). Matheis & Schade (2011) utilizaram IgY para identificação e monitoramento de diferentes lotes de vacinas anti-Pertussis. Nguyen *et al.* (2010) estão produzindo vacinas anti H5N1 e H1N1 de administração intranasal através da tecnologia IgY, com resultados promissores em modelo murino. Hirai *et al.* (2010) produziram soro de IgY eficaz na proteção contra a cólera, de administração oral, também em modelo murino. Em nosso laboratório, produzimos soro antiofídico a partir de IgY contra os venenos de *Bitis arietans*, *Bitis nasicornis*, *Bitis rhinoceros*, *Naja mossambica* e *Naja melanoleuca* (Almeida *et al.*, 2008; Dias da Silva & Tambourgi, 2010), além de soros anti *Tityus stigmurus*, *Tityus bahiensis* e *Tityus serrulatus*, em parceria com o Instituto Butantan, com excelentes resultados em modelo murino, já utilizados para a imunoterapia de animais economicamente importantes em países da África e no Brasil.

Além do uso da molécula completa, produtos baseados em IgY podem ser biotecnologicamente melhorados. A tecnologia do anticorpo recombinante é aplicada em IgY de maneira facilitada, quando comparamos a estratégia utilizada para a produção de frações variáveis de cadeias simples de anticorpos (scFvs) a partir de uma molécula de IgG (van Wyngaardt *et al.*, 2004). Como a metodologia de obtenção de variabilidade na produção do repertório de anticorpos em aves é baseada em conversões gênicas de pseudogenes V, incorporados em rearranjos VJ (cadeia leve) ou VDJ (cadeia pesada) baseados em um único gene V, temos moléculas finais cujas frações variáveis possuem virtualmente a mesma sequência de aminoácidos em suas porções terminais. Desta forma, com uma única reação de PCR, todo o repertório nativo de IgY produzido por linfócitos circulantes pode ser amplificado (Chiliza *et al.*, 2008; van Wyngaardt *et al.*, 2004), reduzindo etapas em relação ao processo de obtenção de sequências utilizando células de mamíferos.

Este estudo visa analisar a evolução da resposta imune adaptativa humoral das aves imunizadas - em processo tradicional de produção de IgY, em grupos e de forma individual, através de características desejáveis à anticorpos protetores, como titulação, afinidade e avidéz aos antígenos em uso. A partir da seleção dos melhores anticorpos, sequências das porções variáveis de IgY relacionadas a estas imunizações foram obtidas para análises de CDRs e início da montagem de um banco de produção de scFvs antivenenos.

2 – ESTADO DA ARTE

2.1 – Envenenamento por Serpentes Peçonhentas

Incluído recentemente no *hall* de Doenças Tropicais Negligenciadas – DTNs (WHO, 2009), acidentes envolvendo serpentes peçonhentas estão globalmente associadas à pobreza (Harrison *et al.*, 2009). Em regiões de elevadas taxas de acidentes, o número de mortes induzidas por picadas de serpentes peçonhentas dobrou a mortalidade geral das DTNs, primariamente relacionadas à tripanossomíase africana, cólera, dengue hemorrágica, leishmaniose, encefalite japonesa e esquistossomose (Harrison *et al.*, 2009).

Embora antivenenos sejam produzidos por diversos laboratórios em todos os continentes, há altas taxas de morbidade e mortalidade, particularmente em países tropicais e subtropicais. A taxa de mortalidade anual no mundo, entre 50.000 e 100.000, é certamente subestimada, uma vez que muitos países não catalogam eficiente ou oficialmente tais números (Gutiérrez, Theakston & Warrel, 2006). As razões para os elevados níveis de mortalidade em países tropicais em desenvolvimento incluem escassez de antivenenos, serviços de saúde ineficientes, e dificuldades para o rápido acesso aos centros de saúde (Theakston & Warrel, 2000). Um grande número de vítimas sobrevive com seqüelas físicas e psicológicas permanentes devido aos efeitos danosos aos tecidos atingidos, que podem provocar ulcerações crônicas, osteomielite com transformação maligna, falha crônica renal, insuficiência pituitária-adrenal crônica, seqüelas neuronais provenientes de hemorragias intracranianas e trombose, choque (hipotensão) resultante de hipovolemia, além de amputações requeridas para excisar o efeito necrótico tecidual das peçonhas, dentre outras (Gutiérrez, Theakston & Warrel, 2006; Theakston, Warrel & Griffiths, 2003).

Seu veneno, altamente complexo, é composto basicamente por metaloproteinases, como a bitiscetina e a bitiscetina-2 (responsáveis pela degradação de laminina, fibronectina, componentes do colágeno IV e junções entre células endoteliais), fosfolipase A₂ miotóxica e hialuronidases (Warrel *et al.*, 1975; Obert *et al.*, 2006).

Os acidentes provocados por *Bitis arietans* tem por característica uma forte necrose local (figura 2), febre e vômito. Além destes aspectos gerais, podem ser observadas trombose, hemorragia sistêmica, epistaxe, hipotensão, depressão miocárdica, vasodilatação, taquicardia e bradicardia. Em nível celular, por sua vez, são comuns leucocitose de neutrófilos, anemia, hemólise microangiopática e trombocitopenia. A capacidade de coagulação do sangue, no entanto, parece não ser significativamente alterada.



Figura 2 – Criança picada por *Bitis arietans* na região palmar. A – após 1 hora; B – após 8 horas, sem tratamento; C – dias após, com o devido tratamento, sem sequelas aparentes. Adaptado de Warrel *et al.*, 1975.

Crotalus durissus terrificus

Também conhecida como cascavel sul-americana, é uma espécie típica da zona tropical sul-americana, frequentemente encontrada no sul brasileiro – principalmente nos estados de Minas Gerais, São Paulo e Paraná, onde são registrados o maior número de acidentes.

Por ter como hábitat as regiões de pasto e campo, típicos dos ambientes rurais brasileiros, os acidentes envolvendo *Crotalus durissus* spp. (com destaque especial para a subespécie *terrificus*) são corriqueiros em determinadas regiões, correspondendo a aproximadamente 10% dos acidentes registrados em 2001 pelo Ministério da Saúde (Sano-Martins *et al.*, 2001). No entanto, com a taxa de letalidade de 1,9% dos casos relatados, a maior observada dentre os gêneros de serpentes brasileiras, *Crotalus durissus terrificus* ganha destacada importância dentre as demais espécies (Bucarechi *et al.*, 2002).

O veneno de *Crotalus durissus terrificus* contém uma variedade de proteínas tóxicas, incluindo crotamina, crotoxina, giroxina, convulxina, fator agregador de plaquetas (PAF) e enzima semelhante à trombina (TLE). Clinicamente, a crotoxina ganha particular destaque, com pronunciado bloqueio neuromuscular provocado por sua atividade sobre as junções neuromusculares, que gradativamente conduzem à paralisia flácida (síndrome miastênica aguda) de intensidade variável. Não obstante, casos de rabdomiólise (injúria das fibras musculares esqueléticas dos tipos I e IIA, levando à mialgia – aumento massivo de mioglobulina sérica e creatinoquinase – e mioglobinúria) também são observados em decorrência da atividade oxidativa da toxina (Oguiura *et al.*, 2000; Sano-Martins *et al.*, 2001; Bucarechi *et al.*, 2002; Beghini *et al.*, 2008).

Outros efeitos degenerativos também podem ser observados em pacientes envenenados. Hipofibrinogenemia causada por TLE leva à incoagulabilidade parcial ou completa. Afibrinogenemia e trombocitopenia –

raramente observada – são decorrentes do efeito do PAF. Minton & Minton (1971) sugerem que a paralisia dos músculos flexores cervicais, característica marcante em indivíduos acidentados, é um sinal da atividade da crotamina.

Os sintomas locais da picada são inchaço, parestesia (formigamento ou anestesia) e eritema (figura 3), mas com pouca ou nenhuma necrose. O envenenamento sistêmico é caracterizado por ptose simétrica, oftalmoplegia externa, diplopia e paralisia facial, resultado das atividades neurotóxicas e miopáticas. Ainda podem ser observadas taquicardia, diaforese, anisocoria e falha renal aguda. Em casos fatais, pode ser observada midríase. Raramente, o envolvimento do diafragma envolve falha respiratória. Distúrbios na coagulação sanguínea, no entanto, envolvem cerca de 50% dos pacientes envenenados (Sano-Martins *et al.*, 2001; Bucarechi *et al.*, 2002).

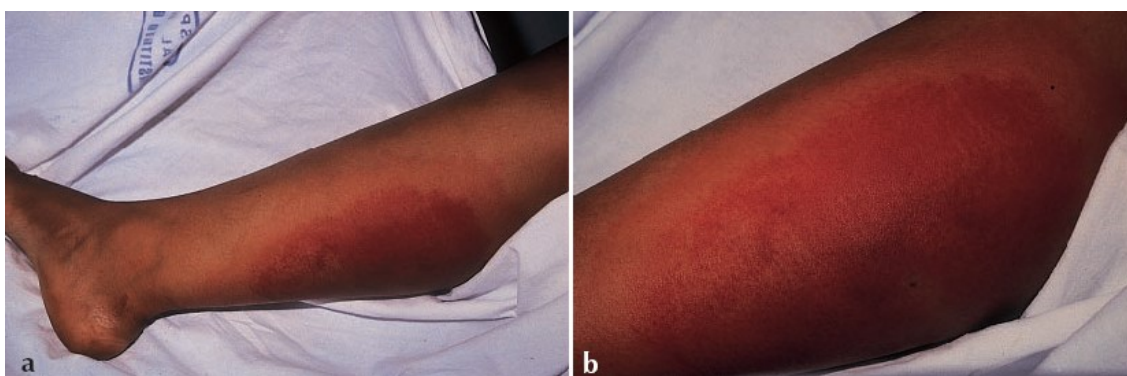


Figura 3 – Eritema extensivo em paciente, 3 horas após a picada por *Crotalus durissus terrificus* no Estado de São Paulo. Adaptado de Bucarechi *et al.*, 2002.

Em nível celular, os macrófagos têm sua atividade consideravelmente alterada. Segundo Cruz *et al.* (2005), em camundongos da linhagem BALB/c, a citotoxicidade celular foi consideravelmente incrementada (com uma dosagem de 25µg/ml de veneno) e a capacidade fagocítica reduzida, tal como a taxa de circulação (espalhamento). Também foi observado aumento na produção de H₂O₂ e de NO. A produção exacerbada de citocinas pró-inflamatórias, como TNF-α e IL-6, também foi notada, com picos de produção em 48 e 24 horas respectivamente, seguido de decréscimo. O nível de INF-γ – citocina-chave na resposta contra patógenos intracelulares – também foi elevado. Já a produção

de IL-10, uma citocina de atividade caracteristicamente antinflamatória em macrófagos e células dendríticas (antagonista de IL-1, IL-6 e TNF- α), não foi significativamente alterada. Sampaio *et al.* (2003) observaram também um aumento significativo no metabolismo de glicose e glutamina, e postularam que tais efeitos, seguidos da redução da capacidade fagocítica e de circulação dos macrófagos, são resultados relacionados à atividade da crotoxina.

Crotoxina

Inicialmente isolada por Slotta & Fraenkel-Conrat (1938), a crotoxina é o principal componente do veneno de *Crotalus durissus terrificus*, compondo 60-65% do seu peso seco. É uma β -neurotoxina multimérica heterogênea com atividade fosfolipásica pré e pós-sináptica de aproximadamente 23 KDa, formada por duas subunidades – uma ácida, denominada crotapotina, de 9 KDa, composta por outras 3 subunidades e sem ação enzimática ou tóxica; e uma básica, fosfolipase A₂ (PLA₂), composta por cadeia única de peso aproximado 14 KDa, com alta atividade enzimática, porém pouco tóxica (Vital Brazil, 1966; Bon *et al.*, 1979; Hendon & Fraenkel-Conrat, 1971). Há isoformas variantes da crotoxina, derivadas da forma de combinação de suas subunidades e encontradas naturalmente no veneno bruto, que mantém sua estrutura molecular e atividade farmacológica, mas altera seu padrão eletroforético (Faure *et al.*, 1994). A razão molar das subunidades na formação da crotoxina é 1:1 (Nakazone, 1978). Completa, a crotoxina tem efeito tóxico forte, embora ação enzimática mais fraca, que pode ser explicado pela ação sinérgica da crotapotina, que atua como uma chaperona básica inibindo interações secundárias fracas da PLA₂ e direcionando a ligação para junções neuromusculares (Faure *et al.*, 1993; Bon *et al.*, 1979). Segundo Vital Brazil (1982), a crotoxina é duas vezes mais tóxica que o veneno total.

A crotoxina atua sobre a junção neuromuscular, bloqueando a transmissão de impulsos nervosos (Vital Brazil, 1966). Também é responsável por efeitos miotóxicos em células do músculo estriado esquelético, levando a quadros de mionecrose (Gopalakrishnakone *et al.*, 1981). Pode causar

citotoxicidade, ao clivar a membrana plasmática de células liberando ácido araquidônico e lisofosfolídeos, dentre outros (Bennet *et al.*, 1994; Schaeffer & Gattaz, 2006). Já se sabe que a crotoxina é capaz de reduzir a circulação e a capacidade fagocítica de macrófagos (Sampaio *et al.*, 2003; Sampaio *et al.*, 2005; Sampaio *et al.*, 2006). Marcussi *et al.* (2011) observaram efeito genotóxico da crotoxina sobre linfócitos humanos. Bordon *et al.* (2012), analisando o potencial de ação da crotoxina, descreveram uma hialuronidase específica do veneno de *Crotalus durissus terrificus* envolvida com a difusão da toxina em tecidos periféricos. Além dos estudos acerca da atividade tóxica da crotoxina, alguns grupos se dedicam ao uso terapêutico da mesma. Mais recentemente, Muller *et al.* (2012) descreveram o uso de crotoxina no tratamento antiviral para casos de dengue e febre amarela *in vitro*.

2.3 – Antivenenos e Tratamentos Auxiliares em Envenenamentos

A administração intravenosa de antivenenos derivados de animais é o principal tratamento, e único específico, para envenenamento por picada de serpentes. Podem ser constituídos por moléculas completas de IgG, por fragmentos F(ab')₂, obtidos da digestão de IgG com pepsina, ou Fab a partir da digestão de IgG com papaína (Theakston, Warrel & Griffiths, 2003). A eficácia de antivenenos é restrita a espectros geográfico e biológico limitados, devido à grande diversidade imunoquímica das peçonhas (Gutiérrez, Theakston & Warrel, 2006).

Antivenenos são mais efetivos na neutralização de toxinas responsáveis por efeitos sistêmicos, assim como uma rápida reversão da toxicidade causada por neurotoxinas pós-sinápticas. Não são muito efetivos na reversão da neurotoxicidade provocada por fosfolipase A₂, de ação pré-sináptica, e na neutralização em tecidos danificados (Gutiérrez, Theakston & Warrel, 2006).

As condições de produção e armazenagem dos antivenenos são de extrema importância para o resultado final do tratamento (Laloo & Theakston, 2003). Após a administração, a terapia envolve uma série de intervenções

auxiliares, como ventilação assistida, administração de inibidores, reidratação, alcalinização e administração de antibióticos, dependendo do caso (Gutiérrez, Theakston & Warrel, 2006).

Apesar da eficácia dos antivenenos clássicos, inúmeros grupos de pesquisa estão desenvolvendo novas metodologias: (I) novas estratégias de imunização, como imunização de DNA ou o uso de toxinas relevantes purificadas como antígeno no lugar do veneno completo; (II) novos métodos de purificação de anticorpos, reduzindo o conteúdo protéico total; (III) aumento da segurança viral de antivenenos, introduzindo passos como pasteurização, estabilização por ácido caprílico e nanofiltração; (IV) utilização de novos modelos animais para a produção de antivenenos derivados, como camelos e galinhas; e (V) preparação de antivenenos que combinam anticorpos completos com nanocorpos (Gutiérrez, Theakston & Warrel, 2006).

2.4 – Imunoproteção com IgY – Histórico

A utilização de anticorpos para fins terapêuticos data de 1890, quando Behring e Kitasato demonstraram que a utilização de soro de um animal ativamente imunizado com toxina diftérica poderia proteger outro animal exposto até mesmo a uma dose letal da toxina. Com base neste trabalho inovador, em 1891, segundo relato, um menino alemão foi curado de um quadro de difteria a partir do uso de antitoxina diftérica (Singer & Underwood, 1962). Klemperer desenvolveu em 1893 um experimento demonstrando que o extrato de gemas de ovos de galinhas imunizadas repetidas vezes com cultura tetânica virulenta é capaz de conferir proteção em grupos de camundongos desafiados com doses letais da cultura tetânica. Ainda em 1893, a companhia farmacêutica Farberwerke Hoechst iniciou a produção de soro imune em ovelhas (Gronski, Seiler & Schwinck, 1991). A produção de soro imune em cavalos foi iniciada em 1894, com ação providencial na redução da mortalidade causada por difteria em Paris (MacNalty, 1954). Desde então, o manejo de mamíferos de médio e grande porte para a produção de soro imune aumentou, tal como a tecnologia visando à redução de efeitos colaterais em humanos

tratados com os mesmos (Llewelyn, Hawlins & Russell, 1992). No entanto, o resultado obtido por Klemperer não foi aproveitado pela comunidade científica até o início da preocupação ética no uso de animais em experimentação (Schade *et al.*, 2005), com destaque para Os Princípios da Técnica Experimental Humana (Russell & Burch, 1959). Nesta época, entre as décadas de 1940 e 1950, o mecanismo de produção de anticorpos em aves e mamíferos começava a ser elucidado, em muito devido à Teoria da Seleção Clonal proposta, acertadamente como sabemos hoje, pelo microbiologista australiano Sir Frank MacFarlane Burnet (Anderson & Mackay, 2013; Dias da Silva & Tambourgi, 2010). Nos vinte anos seguintes, o trabalho de Klemperer foi recuperado e o estudo com anticorpos de galinhas avançou (Schade *et al.*, 2005).

Em 1969, Leslie e Clem propuseram a mudança da nomenclatura no anticorpo majoritário do soro de galinhas, até então chamada de IgG de aves, para IgY, alegando que as imunoglobulinas das aves apresentavam cadeia pesada maior e antigenicamente distinta das encontradas em mamíferos. A ideia, embora inicialmente vista com desconfiança, ganhou credibilidade com o avanço nos estudos sobre estrutura e função dos anticorpos, além do fator filogenético, que aponta a presença de IgG em mamíferos, e IgY em aves, répteis, anfíbios e possivelmente peixes pulmonados (Warr, Magor & Higgins, 1995). A partir da década de 1980, IgY começou a ganhar maiores aplicações no cotidiano de pesquisa, e teve o termo “Tecnologia IgY” internacionalmente reconhecido em 1996 para identificar a produção e o uso destes anticorpos (Schade *et al.*, 2005). Ainda em 1996, o Centro Europeu para Validação de Metodologias Alternativas (ECVAM) recomendou o uso de IgY em detrimento de IgG visando o bem-estar dos animais envolvidos na produção de anticorpos (Schade *et al.*, 1997).

Anticorpos preparados em galinhas e isolados das gemas de ovos estão sendo usados como alternativa de anticorpos preparados em mamíferos. Preço de custo mais baixo, simplicidade dos métodos gerais de isolamento, identificação e caracterização das classes de imunoglobulinas, sobretudo da

classe IgY (correspondente à IgG de mamíferos), além de certas peculiaridades como a incapacidade de ativar complemento de mamíferos e de interagir com receptores para IgG em células de mamíferos estimulam a opção (Schade *et al.*, 2005). Dois outros fatores reforçam a preferência: (a) recomendações internacionais de proteção do bem estar animal direcionam o isolamento de anticorpos da gema de ovos. A agressão ao animal restringe-se às injeções de imunógenos, sem diferenças quanto à imunização de galinhas aos agentes patogênicos de doenças infecciosas freqüentes; e (b) o substancial progresso da avicultura em geral, particularmente no Brasil, disponibilizando *Gallus gallus* de diferentes linhagens de alta qualidade como produtoras de ovos.

2.5 – Produção de Anticorpos em Aves

Há dois momentos de grande relevância na evolução do Sistema Imune de vertebrados. O primeiro, chamado caracteristicamente de *Big Bang*, trata sobre a aparição de receptores de células T, produtos do MHC, enzimas requeridas para a recombinação dos segmentos gênicos, e um sistema combinatório de defesa baseado na aparição das genuínas imunoglobulinas. O segundo *Big Bang*, por sua vez, é caracterizado pelo desenvolvimento do sistema imune adaptativo em grandes vertebrados, com um set completo de isotipos pós-*switch* (Schluter, Bernstein & Marchalonis, 1997; Belov & Hellman, 2006).

O Sistema Imune de aves é o segundo mais evoluído dentre os animais, abaixo apenas do Sistema Imune de mamíferos. Pode ser dividido em inato, com respostas baseadas no reconhecimento de padrões moleculares, e adquirido, com montagem de resposta específica contra determinado antígeno ou patógeno. Respostas adaptativas específicas podem ser subdivididas em celulares (linfócitos T e B) e humorais (anticorpos produzidos por linfócitos B) (Tizard, 2013).

O Sistema Imune das aves é formado por órgãos primários (Bursa de Fabricius e Timo) e secundários (Baço, Glândula Harderiana, Linfonodos, Medula Óssea e Tecido Linfóide do trato alimentar). Na Medula Óssea são originadas as células-tronco tímicas e bursais. O Timo e a Bursa são os sítios de seleção, diferenciação e proliferação de linfócitos T e B, respectivamente. Anticorpos são produzidos por esta última classe de linfócitos. O local de proliferação de plasmócitos e células B de memória, além do armazenamento, é o Baço (Tizard, 2013; Janeway *et al.*, 2002).

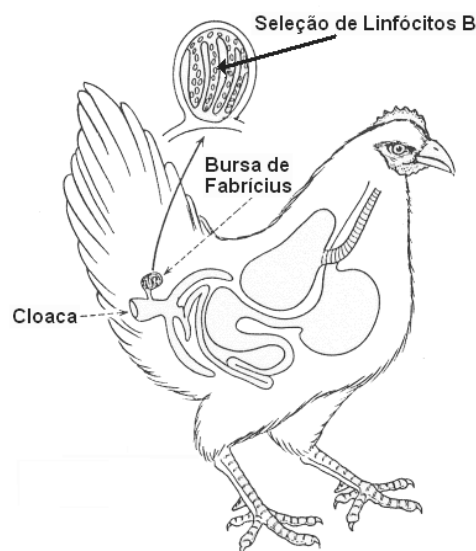


Figura 4 – Localização da Bursa de Fabricius em razão da Cloaca. Adaptado da internet (homepage2.nifty.com/cryomedicine/wdA_C.htm – Setembro de 2011).

A função da Bursa (figura 4) é produzir células B virgens que serão exportadas para a periferia. O processo de maturação de linfócitos bursais inclui a separação de células com rearranjos VDJ produtivos e expressando slg (imunoglobulina de superfície) das demais, além da seleção negativa contra antígenos próprios. Na bursa de aves jovens, a maior parte da proliferação celular (cerca de 90%) ocorre no córtex folicular, gerando células de vida curta. Os 10% restantes são provenientes da medula folicular, que contém antígenos derivados do estômago e geram células B de longa vida. Há precursores imediatos para a população de longa-vida de células B extra-bursais, responsáveis pela manutenção de linfócitos B circulantes após a involução da Bursa (Davison, Kaspers & Schat, 2008).

Na periferia, células B captam antígenos através de receptores, internalizam, processam, e apresentam em sua superfície em complexo com moléculas de MHC classe II. Células T auxiliares interagem com a célula B e geram o segundo sinal de ativação (CD40L – CD40). O linfócito B ativado responde à citocinas, induzindo proliferação clonal e secreção de Igs, (Janeway *et al.*, 2002).

Aves apresentam três isotipos de anticorpos que podem ser expressos na forma de receptores com domínios transmembrana ou secretados: IgM, IgA e IgY (Schade *et al.* 2005; Stavnezer & Amemiya, 2004; Lundqvist *et al.*, 2006). IgM é a única imunoglobulina distribuída universalmente entre todos os vertebrados, e desta forma é considerada como molécula ancestral de todas as classes de anticorpos (Lundqvist *et al.*, 2006; Marchalonis, 1977). Analisando características como expressão, função e homologia seqüencial, IgA pode ser encontrada apenas em aves e mamíferos. No entanto, enquanto a IgA de aves apresenta quatro domínios globulares constantes na cadeia pesada, a IgA de mamíferos apresenta três domínios globulares e uma região dobradiça comparativamente bem desenvolvida substituindo o referencial do segundo domínio globular da cadeia pesada encontrada em aves (Stavnezer & Amemiya, 2004). IgY, por sua vez, é a principal imunoglobulina de baixo peso molecular produzida por aves, empregado como principal mecanismo de defesa contra infecções sistêmicas. Tal como IgM e IgA de aves, e semelhante à IgE de mamíferos, é composta por quatro domínios globulares em sua cadeia pesada (Schade *et al.*, 2005; Stavnezer & Amemiya, 2004; Faith & Clem, 1973).

2.6 – Diversidade de Anticorpos de Aves

Em aves, o rearranjo gênico pouco contribui para a diversidade das regiões variáveis das cadeias leve e pesada. No entanto, pseudo-genes variáveis contribuem significativamente no processo de conversão gênica, gerando diversidade (figura 5). Mutações pontuais também influenciam o

processo de produção, além do processo de *switch* de classe de IgM para IgA ou IgY, dependendo do estímulo e local da resposta.

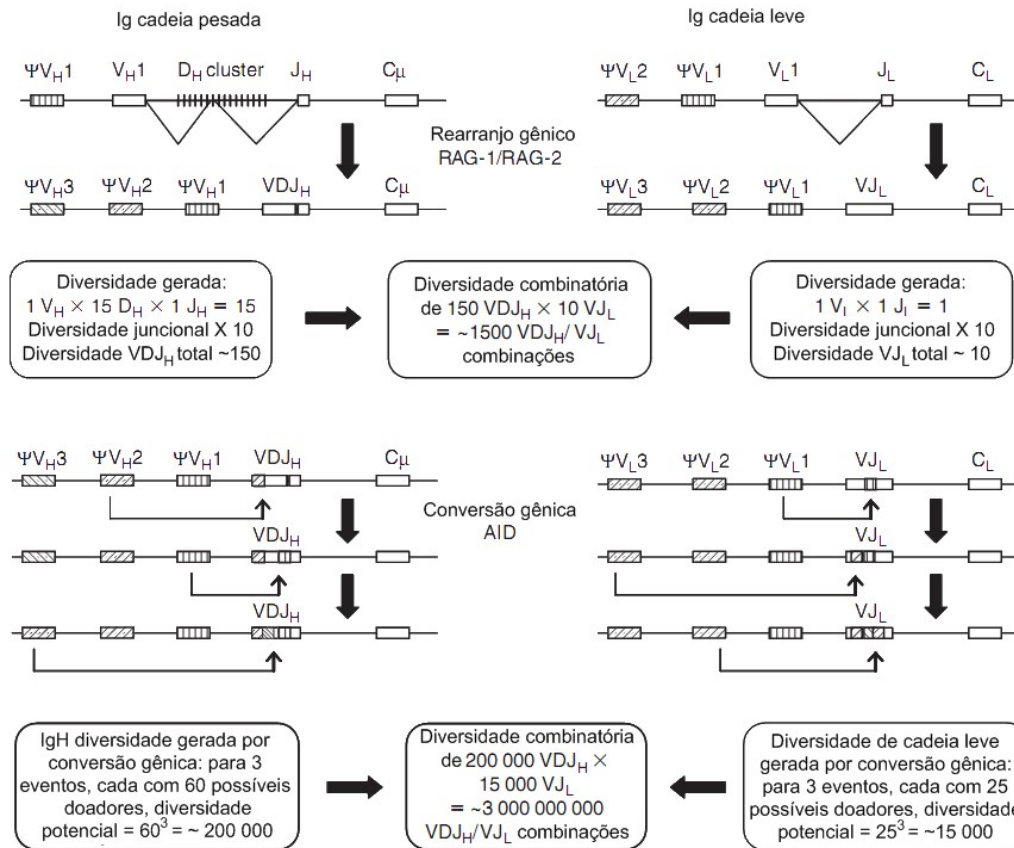


Figura 5 – Geração da diversidade de anticorpos em galinhas, com rearranjo gênico seguido de conversão gênica. Estimativas de diversidade como consequência de conversão gênica podem ser baixos, visto que eventos de conversão podem afetar vários números de aminoácidos, e mutações pontuais nas regiões variáveis não foram levadas em consideração. Adaptado de Davison, Kaspers & Schat, 2008.

A maior parte das diferenças sequenciais está confinada nas Regiões Determinantes de Complementaridade (CDRs), estruturalmente situadas na porção ligante do anticorpo e, portanto, diretamente relacionadas com a capacidade de reconhecimento de epítomos antigênicos. Alguns grupos trabalham com a produção de frações variáveis de cadeia simples (scFv), a partir de bibliotecas de mRNA em fagos, como substituição aos anticorpos completos. Chiliza, Van Wyngaardt e Du Plessis (2008) produziram scFv a partir do mRNA de galinhas para gerar reagentes visando a diagnose de alguns parasitas e vírus (figura 6).

PRIMER	GERMLINE				
PRIMER 1	FW1-H			CDR 1	FW2-H
	1	11	21	31	41
LAAQPALM	AAVTLDESGG	GLQTPGRALS	LVCKASGFTF	SSYNMGWVRQ	APGKGLEFVA
	CDR 2	FW3-H			CDR 3
51	61	71	81	91	101
GIDN-TGRYT	GYGSAVKGRA	TISRDNGQST	VRLQLNNLRA	EDTGTYCAK	AAGT-----
		LINK		GERMLINE	
CDR 3	FW4-H	LINK PRIMER		FW1-L	
111	121			1	11
-AGSIDAWGH	GTEVIVSS	GALTQPSSVSANLGGTV		ALTQPSSVSA	NPGGTVKITC
CDR 1	FW2-L		CDR 2	FW3-L	
21	31	41	51	61	71
SGDSSYYGWY	WYQQKAPGSA	PVTVIYDNTN	RPSNIPSRFS	GSKSGSTATL	TITGVRADDN
			PRIMER		
	CDR 3	FW4-L	PRIMER 2		
81	91	101			
AVYYCASTDS	ST-AGIFGAG	TTLTVL	GQPNAAAEQKLISEEDLNG		

Figura 6 – scFv (Fragmento variável de cadeia simples) desenvolvido por Chiliza *et al.* (2008). A primeira porção (Primer 1 – Link Primer) representa a sequência da porção variável da cadeia pesada de IgY; a segunda porção (Link Primer – Primer 2) representa a sequência da porção variável da cadeia leve. Os CDRs e suas respectivas sequências estão marcados em vermelho.

2.7 – Características Gerais de IgY

A estrutura molecular geral de uma IgY, constituída por duas cadeias leves e duas pesadas, é semelhante à de IgE de mamíferos. Entretanto, funcionalmente é relacionada à IgG de mamíferos. A cadeia pesada é formada por um domínio variável e quatro constantes, enquanto IgG apresenta apenas três domínios constantes (figura 7). Segundo Sun *et al.* (2001), o peso molecular (por espectrometria de massa) de uma molécula de IgY é de 167,25 KDa, enquanto IgG tem aproximadamente 160 KDa. No entanto, Sasse (1998) obteve resultado relativamente diferente utilizando eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE). A cadeia leve, com um domínio variável e um

constante, tem um peso molecular de 18,66 KDa; a cadeia pesada, com um domínio variável e quatro constantes, 65,1 KDa; e o fragmento Fab 45,4 KDa.

Há certo grau de homologia entre os domínios constantes 3 e 4 da cadeia pesada de IgY e os domínios 2 e 3 de IgG de mamíferos. O domínio 2 da cadeia pesada de IgY merece atenção especial. Este é reconhecido por representar a região “dobradiça” de IgG, que é pouco desenvolvida em IgY (Shimizu *et al.*, 1998). O pequeno desenvolvimento da região dobradiça pode resultar na redução de flexibilidade do Fab, que por sua vez pode ser a razão para algumas das diferenças entre IgY e IgG acerca do reconhecimento dos epítomos do antígeno (Warr *et al.*, 1995; Cser *et al.*, 1982; Noll *et al.*, 1982).

Tal como IgG, a porção Fc de IgY é o sítio de muitas funções biológicas efetoras. Segundo Shimizu *et al.* (1992), ela contém duas cadeias laterais de carboidratos, enquanto IgG apresenta apenas uma.

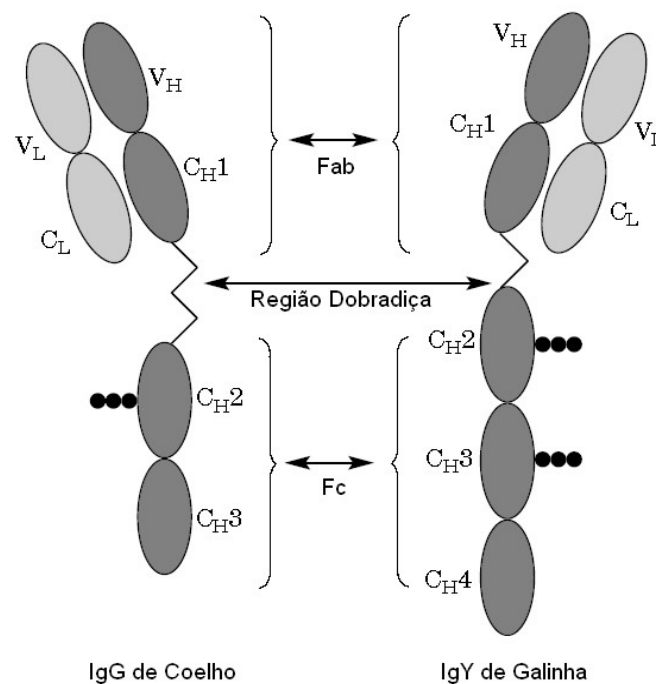


Figura 7 – Diferenças estruturais entre moléculas de IgG e IgY. V – domínio variável (V_L – referente à cadeia leve; V_H – referente à cadeia pesada); C – domínio constante (C_L e C_H – idem ao anterior). Figura adaptada de Schade *et al.* (2005).

Parâmetros Físico-Químicos da IgY de Aves

O ponto isoelétrico (pI) da IgY varia em uma faixa de 5,7 a 7,6, enquanto o de IgG está entre 6,1 e 8,5 (Davalos-Pantoja *et al.*, 2000; Sun *et al.*, 2001). Ainda segundo Davalos-Pantoja, a molécula de IgY é mais hidrofóbica que a de IgG. Como é conhecido, a porção mais hidrofóbica de uma imunoglobulina é seu fragmento Fc. Assim, como este fragmento é maior em IgY, esta molécula termina sendo mais hidrofóbica. Tal característica pode ser demonstrada pela adsorção estável de IgY à partículas de látex. Além disso, em pH 8,0, a porção Fc é firmemente ligada à partículas de látex e mantém a atividade ligante específica (Davalos-Pantoja *et al.*, 2001).

IgY é mais sensível à desnaturação ácida que IgG de coelho, e perde mais rapidamente a atividade entre pH 3 e 4 (Shimizu *et al.*, 1992). Segundo Lee *et al.*, a adição de 50% de sorbitol foi capaz de suprimir quase totalmente a inativação de IgY induzida por ácido em pH 3.

A Imunoglobulina Y perde grande especificidade sob atividade de proteases pancreáticas, tripsina e quimotripsina. A adição de um agente alcalino como bicarbonato de sódio, ou solução rica em proteínas como clara e gema de ovo, aumenta consideravelmente a resistência de IgY à inativação ácida ou proteolítica (Schmidt *et al.*, 1989). IgY é menos resistente que IgG bovina à digestão com pepsina, porém mais resistente quanto às atividades de tripsina e quimotripsina (Hatta *et al.*, 1993).

Jaradat e Marquardt (2000) demonstraram que IgY é estável a 60 °C. Relataram ainda que esta estabilidade pode ser incrementada para 70 °C pela adição de açúcares, como 30 % de lactose, trealose ou sucrose, além da gema do ovo.

Não é possível designar padrões para a recuperação da atividade de IgY em baixos pHs, que assegurem uma ação específica no sítio designado para sua ação (Shimizu *et al.*, 1993).

Transferência de IgY para a Gema do Ovo

Segundo Rose *et al.* (1974), pequenas quantidades de IgA e IgM são transferidas para a clara do ovo. No entanto, Yamamoto *et al.* (1975) demonstraram quantidades substanciais de IgM e IgA na gema do ovo e IgY na clara. IgY é transferida preferencialmente para a gema por processos mediados por receptores (Mohammed *et al.*, 1998; Morrison *et al.*, 2001). A quantidade de IgY transferida é relativa à concentração de IgY sérica, e todas as populações desta imunoglobulina são transferidas.

Estes dois últimos grupos mostraram ainda que a porção Fc e a região da dobradiça são essenciais para a transferência de IgY do soro para a gema do ovo. Aparentemente, duas regiões têm importância crucial neste transporte: os resíduos de aminoácidos 251-254 (*Leu-Tyr-Ile-Ser* ou LYIS, situados na interface entre os domínios 2 e 3 da cadeia pesada) e 429-432 (*His-Glu-Ala-Leu* ou HEAL, no domínio 3 da mesma cadeia). Os carboidratos laterais associados à cadeia não interferem no transporte. Todas as imunoglobulinas encontradas na gema têm a seqüência HEAL. Interessantemente, segundo Schade *et al.* (2005), IgA humana apresenta a seqüência HEAL, enquanto IgA de aves (que não são transferidas para a gema) têm a seqüência HDGI (*His-Asp-Gly-Ile*), e IgG2b de humanos a HEGL (*His-Glu-Gly-Leu*).

Mohammed *et al.* (1998) postularam ainda que a passagem transovariana de IgY ocorre em cerca de 5 dias. A meia-vida de IgY circulante em uma galinha adulta é de, aproximadamente, 36 a 65 horas (Patterson *et al.*, 1962), consideravelmente menor que a meia-vida de IgG de ovelha, cerca de 15 dias (Woolley e Landon, 1995). A quantidade de IgY transferida para a gema é independente do tamanho do ovo (Dohms *et al.*, 1978; Bollen e Hau, 1997). No entanto, como IgY não é a única proteína selecionada do soro para a

gema, a quantidade de ovos postos pela galinha no decorrer da análise pode interferir na formação de uma curva analítica exata (Patterson *et al.*, 1962).

Dependendo do ensaio usado e sua sensibilidade, a concentração estimada total de IgY na gema varia entre 100 e 200 mg por ovo. Há uma controvérsia concernente às concentrações de IgY na gema e sérica. Segundo Woolley & Landon (1995), alguns autores afirmam que não há diferenças entre ambas, enquanto outros dizem que a concentração na gema é superior com razões de até 1,2 vezes. A concentração de IgY varia significativamente entre indivíduos e linhagens genéticas (como *Comb White Leghorn*, *SLU-1329* e *Rhode Island Red*).

2.8 – Imunização de Galinhas

Quatro fatores devem ser levados em conta para a imunização de galinhas: dose, adjuvante, intervalo e a própria ave. Há algumas indicações da OMS, descritas na tabela 2.

		Dose, Volume e Intervalo de Imunização	Comentários
Antígeno		0,10-1,00mg	certas vezes apenas 10µg
Ajuvante		AIF Espocol PCSL ACF	0,10-0,25ml 0,5ml 250µg 0,10-0,25ml
			mais usado em i.m. ou s.c. s.c. preferivelmente s.c. apenas com imunógenos fracos
Injeção	Volume	0,5-1,0ml	
	Intervalo	4-8 semanas	
	Número	2 (mais se necessário)	
	Rota	i.m., s.c. ou i.v.	

Tabela 2 – Recomendações para a imunização de galinhas.

AIF e ACF – Adjuvantes Incompleto e Completo de Freund; PCSL – *Pam₃Cys-Ser-(Lys)₄*; i.m. – intramuscular; i.v. – intravenoso; s.c. – subcutâneo. Adaptado de Schade *et al.* (2005)

Respostas imunes qualitativas não dependem de grande quantidade de antígeno, sendo possível até mesmo detectar resultados em imunizações com 0,1 µg de BSA (Larsson *et al.*, 1998). Cada antígeno tem uma dose ótima para gerar resposta, que é determinada via experimentação.

Adjuvantes são potencializadores de resposta por estimularem a resposta de linfócitos B e modularem a liberação do antígeno. Devido às distintas características químicas, sua eficácia é condicionada à via de imunização, modelo animal e efeitos secundários. As vias mais utilizadas são intramuscular, subcutânea, intraperitoneal e oral. Não é permitido o uso de adjuvantes para administrações intravenosas (Schade *et al.*, 2005).

Em galinhas, IgY é detectado no soro cerca de quatro dias após a imunização, chegando ao ápice de titulação entre seis e oito dias, com queda sequencial. A titulação sérica é incrementada com a aplicação de *boosters*. Tais reforços são aplicados dependendo do protocolo de imunização, com intervalos semanais, quinzenais e até mensais, dependendo do objetivo do experimento (Calzado *et al.*, 2003; Schade *et al.*, 2005).

2.9 – Metodologias para Extração de IgY

IgY pode ser extraída a partir do soro ou plasma. No entanto, sua extração a partir da gema dos ovos é a mais indicada (Rose *et al.*, 1974). Ovos podem ser coletados diariamente da mesma galinha e processados individualmente ou em razão de um grupo cuja imunização tenha sido similar. Mais de 100 mg de IgY purificada podem ser obtidas a partir de um simples ovo (Tressler e Roth, 1987). Galinhas poedeiras especializadas tem uma capacidade de produção de ovos superior a 10 meses, possibilitando a obtenção de grande quantidade de IgY específico contra determinado antígeno.

Diferentes métodos podem ser utilizados para extrair anticorpos de gemas. Há dois principais: precipitação por sulfato de amônio 29% (p/v) (Bhanushali *et al.*, 1994; Almeida *et al.*, 2008); e precipitação por polietileno glicol (PEG) (Pauly *et al.*, 2011). Em solução salina ou com proteínas que preservem sua integridade, IgY pode ser estocada a -4°C sem perda de atividade. Liofilizada, pode ser estocada por vários meses a -20°C.

3 – OBJETIVOS

3.1 – Objetivo Geral

Este trabalho teve por objetivo avaliar a evolução da afinidade dos anticorpos produzidos em galinhas poedeiras (*Gallus gallus*) durante o processo de imunização com veneno total de *Bitis arietans*, de *Crotalus durissus terrificus* e de seu componente tóxico mais relevante – crotoxina, visando aplicar possíveis melhorias à produção de soros antivenenos das espécies citadas, e possibilitar a construção de scFvs antivenenos de alta afinidade.

3.2 – Objetivos Específicos

- Avaliação imunoquímica dos anticorpos produzidos, por ELISA;
- Seleção das amostras dos melhores anticorpos para isolamento, amplificação e sequenciamento;
- Modelagem molecular de scFv antiveneno.

4 – MATERIAL E MÉTODOS

4.1 – Isolamento da Crotoxina

A obtenção da fração pura da crotoxina a partir do veneno cru de *Crotalus durissus terrificus* se deu a partir do protocolo estabelecido por Nascimento (1991), no Instituto Butantan. A separação foi feita por cromatografia de exclusão molecular em coluna de gel Sephadex G-75 4 cm x 100 cm (GE Healthcare), utilizando o cromatógrafo LC Gradient Pump (Pharmacia-LKB) no primeiro passo, e precipitação no seu ponto isoelétrico (pI 4,7) no segundo. A crotoxina foi dialisada e armazenada a -20°C .

4.2 – Imunização das Aves

As aves, da linhagem não-isogênica Hysex Brown, foram adquiridas com 2 meses de idade e mantidas sob condições adequadas em nosso biotério (Aviário/Biotério – P4). Para o início das imunizações, foi aguardado o início da postura.

As imunizações foram divididas em duas fases. Na primeira, as aves foram divididas em 3 grupos: um controle negativo (3 aves), um imunizado com o veneno de *Bitis arietans* (5 aves) e um com o veneno de *Crotalus durissus terrificus* (5 aves). Nesta primeira fase, os ovos foram processados por grupo. Na segunda fase, também houve divisão em três grupos: um controle negativo (uma ave), um imunizado com o veneno de *Crotalus durissus terrificus* (três aves), e um imunizado com a Crotoxina purificada (três aves). Nesta, os ovos foram processados por ave.

As aves inoculadas com o veneno de *Crotalus durissus terrificus* receberam 50 μg por imunização; as galinhas inoculadas com o veneno de *Bitis arietans* ou crotoxina receberam 20 μg por imunização. As imunizações tiveram intervalos de 21 dias. No período da oitava imunização da segunda fase, as aves apresentaram comportamento de quebra imediata dos ovos (pós-postura)

por 10 dias, até a pausa na postura. O motivo descoberto pelo prof. Dr. Humberto Pena Couto, especialista em avicultura e consultor do projeto, foi a substituição da fonte protéica original da ração até então utilizada. O problema foi sanado com a troca de fornecedor de ração e adição, por uma semana, de proteína de soja peletizada, para dar velocidade à recuperação das aves.



Figura 8 - Fotografia do biotério de aves (aviário) – LBR/CBB/UENF.

4.3 – Coleta de Material

Os ovos foram coletados por todo o período de imunização das aves para a extração de anticorpos IgY da gema, e armazenados a 4°C. Amostras de sangue por punção através da veia ulnar das aves foram coletadas e armazenadas para avaliação inicial da eficácia das imunizações e PCR.

4.4 – Obtenção de IgY

4.4.1 – Sulfato de Amônio

As gemas foram previamente separadas da clara e lavadas com água destilada (H₂O_{dd}). O extrato foi retirado por punção, diluído e acidificado (pH 5,0). A solução de gema foi deixada em repouso *overnight* a 4°C. O material

insolúvel foi removido por centrifugação a 10.000 g por 30 min. Ao sobrenadante foi adicionado 29% de sulfato de amônio, sob agitação. A solução foi mantida em temperatura ambiente, com pH reajustado para 7,4 - 7,5, sob agitação por 2h, e recentrifugada a 10.000 g por 30 min (Almeida *et al.*, 1998). O material resultante foi submetido a um processo de diálise por 5 dias, seguido de alíquotamento e armazenagem a 4°C, para análises posteriores.

4.4.2 – Polietilenoglicol (PEG) 6000

As gemas foram previamente separadas da clara e o extrato retirado por punção e transferido para um tubo. O volume foi calculado na balança (assumindo-se 1g = 1mL) e dois volumes de PBS 1X foram adicionados, seguidos de 3,5% de PEG 6000 em pó (p/v) acrescentados vagarosamente. A solução foi incubada sob leve agitação por 10 min em temperatura ambiente. Na seqüência, o tubo foi centrifugado por 13.000 x g a 4°C por 20 min. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo, e a este foi acrescido 8,5% de PEG 6000 em pó (equilibrando a solução em 12% de PEG 6000). Após nova incubação sob leve agitação por 10 min, o tubo foi centrifugado por 13.000 x g a 4°C por 20 min (mesmas condições anteriores). O sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspenso em 10 mL de PBS 1X e acrescido de 12% de PEG 6000 em pó. A nova solução foi centrifugada sob as mesmas condições previamente citadas. O pellet foi suspenso em PBS 1X, e este material foi submetido à um processo de diálise por 3 dias, seguido de alíquotamento e estocagem para análises futuras.

4.5 – Quantificação de Proteínas

O conteúdo protéico da solução contendo IgY purificada foi determinado pelo método do ácido bicinconínico (BCA - adaptado de Lowry, 1959), utilizando BSA (Albumina Sérica Bovina) para gerar a curva padrão de análise, segundo metodologia indicada pelo fabricante (Sigma-Aldrich).

4.6 – SDS-PAGE

Foram separadas alíquotas das soluções de IgY após o processo de diálise, e submetidas a SDS-PAGE 12% (Laemmli, 1970). As amostras foram preparadas em tampão de amostra, aplicadas no gel em volumes pré-definidos, e submetidas à uma corrente/amperagem iniciais de 80V/400mA por 80 a 100 min (PowerPac Basic, Bio-Rad). Após a corrida, o gel foi corado com Azul de Coomassie (Hoefer Caliber) e descorado em seguida, para análise.

4.7 – Focalização Isoelétrica para Eletroforese 2-D

Amostras proteicas dessalinizadas foram plicadas em fitas de acrilamida (IPG *strips*, Amersham Biosciences) para focalização isoelétrica (IEF) e imersas em tampão de focalização, *overnight*. A fita hidratada recebeu acúmulo de mEV na corrida de focalização (IPGphor Isoelectric Focusing System, Amersham Pharmacia Biotech), responsável pela separação protéica por pontos isoelétricos, por intervalo variando entre 5:30h (*strips* de 7 cm) e 7:30h (*strips* de 11 cm). Após a focalização, as fitas foram transferidas para um sistema de corrida por peso molecular em gel de poliacrilamida (item 4.6).

4.8 – Western Blotting

Alíquotas de IgY foram submetidas à eletroforese desnaturante. O gel foi submetido à eletrotransferência para uma membrana de nitrocelulose de 0,45 μ m (Millipore) segundo metodologia descrita por Towbin (1979). Em seguida, a membrana foi imersa em solução bloqueadora (PBS + 0,1% Tween + 5 % leite em pó desnatado) *overnight* a 4 °C (ou 1h a temperatura ambiente). A membrana foi incubada com IgY sob agitação constante por 2h, a temperatura ambiente. Logo após, foi lavada com PBST (PBS pH 7,4 + 0,1 % Tween 20) e incubada com anticorpo secundário, IgG de carneiro conjugado com peroxidase anti-IgY de galinha (Calbiochem-Novabiochem Corp.) por 1h em temperatura ambiente. A reação foi revelada com DAB (3,3'diaminobenzidina – Sigma Chemical Co.), e parada pela adição de água.

4.9 – ELISA

Placas de 96 poços de alta afinidade para ELISA (Microlon 200 – Greiner) foram sensibilizadas com o veneno específico (1µg/poço), em tampão carbonato/bicarbonato 0,05 M pH 9,6, *overnight* a 4 °C. Em seguida, lavadas com PBST 0,05 (PBS 1X + 0,05 % Tween, pH 7,4) e bloqueadas com PBS 1X com 1% de gelatina por 45 min a temperatura ambiente. Após o bloqueio, as placas foram lavadas com PBST 0,05 e os poços preenchidos com 100 µl de soro ou preparações contendo IgY purificada, com seus respectivos controles, em diluições variando entre 1:1.000 e 1:40.000 (IgY) e entre 1:100 e 1:12.800 (soro), em solução bloqueadora, por 45 min a 37 °C. Em seguida, nova lavagem com PBST 0,05 e incubação por 45 min (a 37 °C) com 50 µl de anticorpo secundário (IgG de carneiro anti-IgY conjugado com peroxidase, Calbiochem-Novabiochem Corp.). A reação foi revelada pela adição de 50µl de solução ácida de OPD (ortofenildiamida, Sigma Chemical Co.) incubada em temperatura ambiente por 10-15 min e interrompida pela adição de 50µl de ácido sulfúrico (H₂SO₄) a 3N.

Para análises de afinidade dos anticorpos, uma etapa de incubação com uréia 6M por 10 min a 37°C foi incluída após a incubação do antígeno com IgY, a 37°C por 45 min. O resultado foi expresso em grau de dissociação (%), a partir da dedução da queda observada pela ação da ureia em relação aos resultados obtidos sem o uso da mesma. Análises de avides, por sua vez, foram realizadas com diferentes intervalos de tempo (1, 2, 3, 4 e 5 minutos) na adição do anticorpo primário, durante o curso tradicional do ELISA.

4.10 – Ensaio de Imunoproteção

Camundongos da linhagem Swiss (SW) foram separados em três grupos para avaliação por veneno ou toxinas purificadas aplicadas: um controle negativo, e dois grupos com a imunoproteção de IgY (3ª e 9ª imunizações). Os camundongos foram inoculados com soluções de 200 µl. Os animais do grupo controle receberão 5 DL₅₀ dos venenos ou frações específicas. Os grupos

imunoprotégidos receberam a mesma quantidade de veneno, pré-incubados com solução de anticorpos, por 1 h a 37°C. Após a pré-incubação, a solução passou por centrifugação a 10.000 g por 30 min, para a precipitação e descarte de imunocomplexos, tóxicos.

4.11 – Obtenção do RNAm e Análise por PCR

Foram adicionadas 15 UI de heparina nas amostras de sangue selecionadas, para inibir a coagulação. Uma fração rica em leucócitos foi obtida a partir de um gradiente de Ficoll-Paque plus. Com a utilização do *Quick Prep Total RNA Extraction Kit* (GE Healthcare), o RNA das células foi extraído e armazenado a -80°C. Para a obtenção do cDNA foi utilizado o *kit illustra Ready-To-Go RT-PCR Beads* (GE Healthcare). Com o cDNA pronto, o protocolo seguiu com o PCR. Neste ponto, usamos o *illustra Ready-To-Go PCR Beads* (GE Healthcare), nas seguintes condições: 35 ciclos de 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 60°C e 1 minuto a 72°C, seguidos de extensão final de 5 minutos a 72°C. Os *primers* (tabela 3) utilizados para a amplificação da região de interesse (porção variável das cadeias pesadas e leves dos anticorpos IgY) – VHF1/VHR1e VLF1/VLR1, respectivamente – foram obtidos a partir de estudo realizado por Chiliza *et al.* (2008).

PRIMER	SEQUÊNCIA
VLF1	GACTCAGCCGTCCTCGGTGTCAG
VLR1	TGATGGTGGCGGCCGCATTGGGCTG
VHF1	CTGATGGCGGCCGTGACGTTGGAC
VHR1	CCGCCTCCGGAGGAGACGATGACTTCG

Tabela 3 – *Primers* utilizados para a amplificação das sequências-alvo.

4.12 – Seleção Clonal

As sequências amplificadas foram inseridas no vetor pGEM T *Easy* (Promega), de acordo com o protocolo fornecido pelo fabricante. Em seguida, *Escherichia coli* DH5 α competentes foram transformadas com o produto obtido.

Neste passo, as bactérias foram incubadas por 30 min em gelo. O vetor foi adicionado, e o sistema foi submetido ao método do choque térmico (42°C por 30 s, seguido de incubação em gelo por 90 s). Após a adição de 800 µl de meio LB (Luria Bertani), incubamos a 37°C por 1h. Após a transformação, as DH5α foram plaqueadas em meio LB sólido contendo 100 µg/ml de Ampicilina (agente de seleção indicado pelo fabricante do vetor) e X-Gal (cromóforo indicador de transformação de bactérias) *overnight*, e colônias simples selecionadas foram coletadas e recultivadas em meio LB líquido *overnight*.

Os plasmídeos foram recuperados com *GeneJet Extraction Kit* (Fermentas), e a sequência-alvo foi separada do plasmídeo em ensaio de digestão enzimática com EcoRI (Fermentas), de acordo com o protocolo fornecido pelo fabricante da enzima.

4.13 – Sequenciamento

A amplificação do material selecionado com ddNTPs foi o primeiro passo do protocolo de sequenciamento. O produto foi purificado para a retirada de sais, nucleotídeos e *primers*, em protocolo de precipitação por isopropanol 60%, lavagem do material com etanol 70%, secagem a 60°C por 10 min e ressuspensão em formamida. O material, puro, foi então submetido a eletroforese de capilar e lido pelo sequenciador automático de DNA (Applied Biosystems).

As sequências obtidas foram analisadas pelo programa *GeneRunner*, onde os três *frames* de leitura possíveis para cada sequência foram analisados. Os *frames* corretos foram selecionados e avaliados em BLASTp para a validação das sequências.

4.14 – Modelagem Molecular por Homologia Estrutural

A estratégia foi baseada no conceito de conservação da conformação estrutural de uma proteína em detrimento da sua sequência de aminoácidos

durante o processo evolutivo, considerando que pequenas mudanças na sequência, em geral, resultam apenas em modificações sutis na estrutura tridimensional. Quando uma sequência homóloga para a qual a estrutura resolvida esteja disponível é encontrada, como no caso observado entre as estruturas de IgY e IgG, o método de escolha para a predição da estrutura tridimensional da proteína-alvo é a própria modelagem comparativa ou por homologia (Höltje *et al.*, 2003). A modelagem seguiu quatro passos básicos: busca de proteínas homólogas, alinhamento das seqüências, construção e otimização dos modelos, e a validação dos mesmos.

O molde utilizado foi a estrutura do anticorpo IgG-F10 (PDB 3FKU). A construção e otimização do modelo foi realizada no Modeller (Sali *et al.*, 1995) utilizando o comando ALIGN2D. A otimização molecular foi atingida pela aplicação da mecânica molecular. O modelo foi validado pelo programa Procheck (Laskowski *et al.*, 1993) que avaliou parâmetros estereoquímicos como ângulos torsionais da cadeia principal, cadeia lateral, maus contatos estéricos, energia das ligações de hidrogênio, planaridade das ligações peptídicas e desvios da geometria tetraédrica dos carbonos α , dentre outros. A observação da estrutura final foi feita com PyMOL.

5 – RESULTADOS

5.1 – Avaliação dos Venenos em Uso

O perfil eletroforético dos venenos de *Bitis arietans* e *Crotalus durissus terrificus* foi analisado em SDS-PAGE 15% e 2DE-PAGE (figuras 9, 10 e 11). Os venenos são constituídos majoritariamente por componentes de baixo peso molecular. Com o auxílio do programa ImageJ, disponível para download grátis, pudemos calcular a distribuição dos componentes por peso a partir de análise densitométrica do gel (figura 9). As figuras 10 e 11 representam a quantidade de componentes dos venenos, indicadores de complexidade. O material não apresentou sinais de degradação.

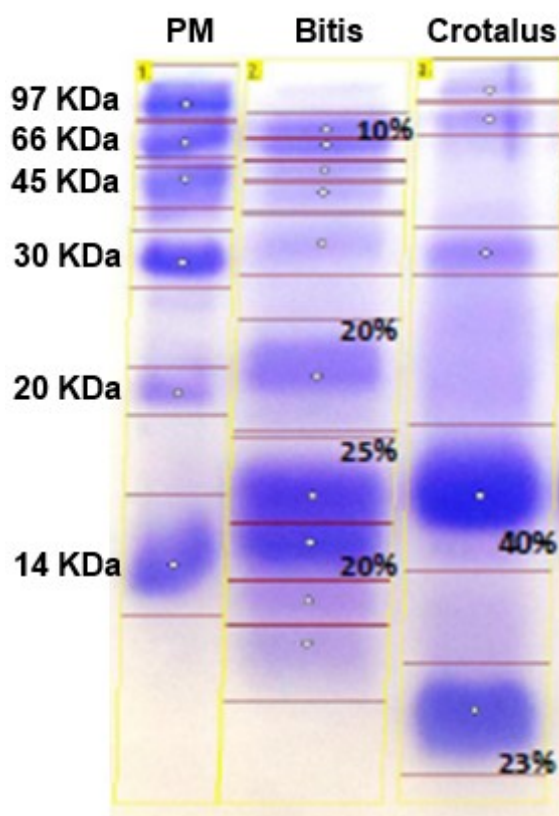


Figura 9 – Perfil eletroforético dos venenos em SDS-PAGE 15%. PM – Peso molecular; Bitis – *Bitis arietans*; Crotalus – *Crotalus durissus terrificus*. 20 µg de cada veneno foram corridos em seus respectivos poços.

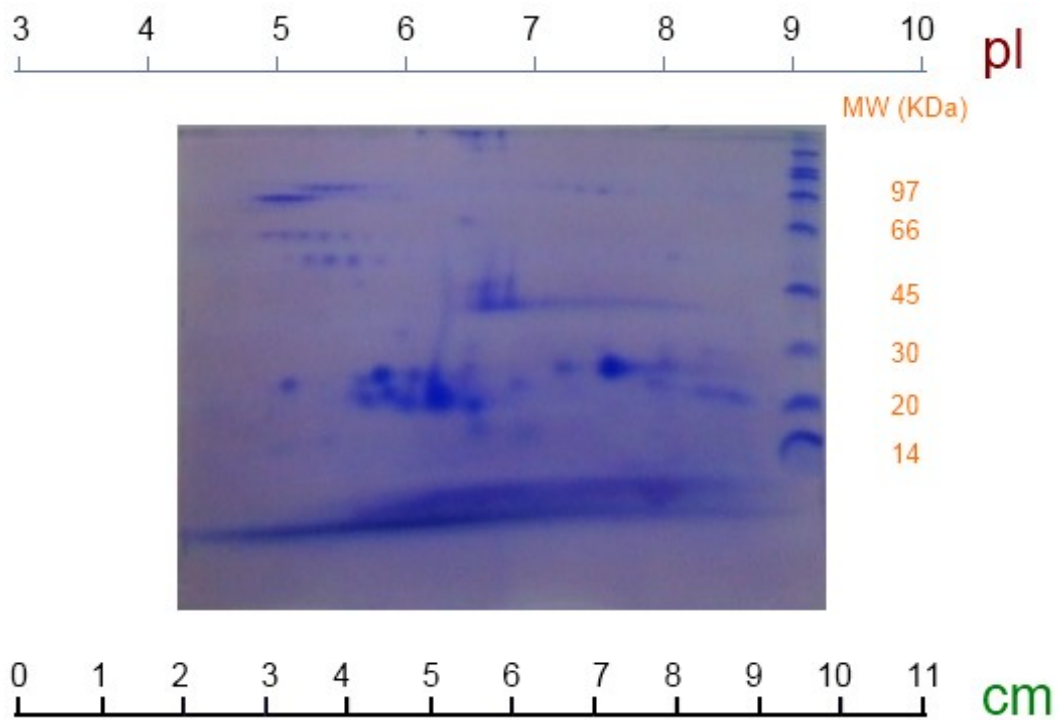


Figura 10 – Perfil bidimensional do veneno de *Bitis arietans*. Após focalização isoelétrica, a fita de acrilamida foi corrida em gel de poliacrilamida 12%.

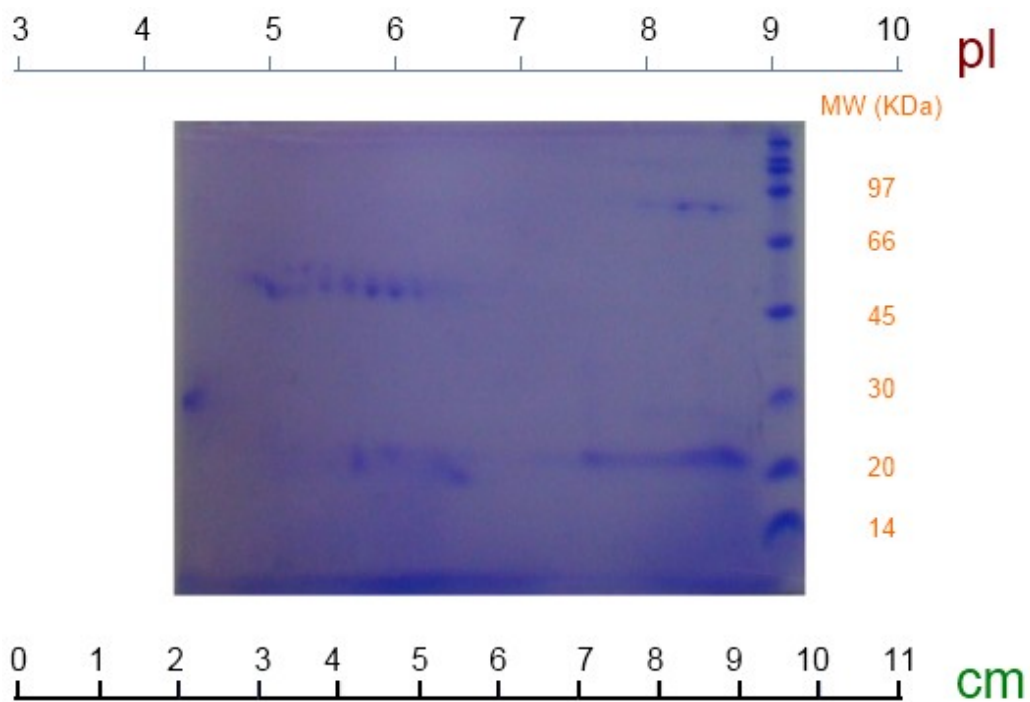


Figura 11 - Perfil bidimensional do veneno de *Crotalus durissus terrificus*. Após focalização isoelétrica, a fita de acrilamida foi corrida em gel de poliacrilamida 12%.

5.2 – Avaliação das Imunizações por Grupos

As imunizações seguiram as datas indicadas na tabela 4. Os anticorpos armazenados à época foram utilizados neste projeto para as avaliações qualitativas do material. Como descrito no item 4.2, as imunizações respeitaram o intervalo de 21 dias. Os extratos de gemas de ovos, de cada grupo, foram armazenados a -20°C até sua utilização. Os anticorpos foram precipitados segundo metodologia descrita no item 4.4.1, com sulfato de amônio, dialisados e quantificados.

CALENDÁRIO DE IMUNIZAÇÕES			
Nº	COMPLEMENTO	IMUNIZAÇÃO	COLETA DE OVOS
1	FCA + PBS 1X	02/03/2009	03/03 - 23/03
2	FIA + PBS 1X	23/03/2009	24/06 - 13/04
3	PBS 1X	13/04/2009	14/04 - 04/05
4	PBS 1X	04/05/2009	05/05 - 25/05
5	PBS 1X	25/05/2009	26/05 - 15/06
6	PBS 1X	15/06/2009	16/06 - 06/07
7	PBS 1X	06/07/2009	07/07 - 27/08
8	PBS 1X	27/07/2009	28/07 - 17/08
9	PBS 1X	17/08/2009	18/08 - 07/09

Tabela 4 – Datas referentes ao primeiro protocolo de imunização das aves. FCA – adjuvante completo de Freund; FIA – adjuvante incompleto de Freund; PBS – tampão fosfato-salino.

Segundo dados produzidos em estudos anteriores do grupo (Almeida *et al.*, 2008), nove imunizações são suficientes para a obtenção de um anticorpo com qualidade suficiente para seu uso na produção de soros antiofídicos. No entanto, análises de afinidade e avides não haviam sido realizadas.

Para corroborar a observação, foram avaliados por ELISA, além da titulação dos anticorpos extraídos das gemas dos ovos (figura 12), avides e afinidade. Como observado por Almeida, as titulações obtidas na nona imunização são superiores em relação às demais. As placas foram sensibilizadas com 1 µg de veneno por poço. As amostras foram aplicadas nas

placas, em duplicatas, a partir de 2 µg de anticorpos e com diluições seriadas até 64.000 vezes.

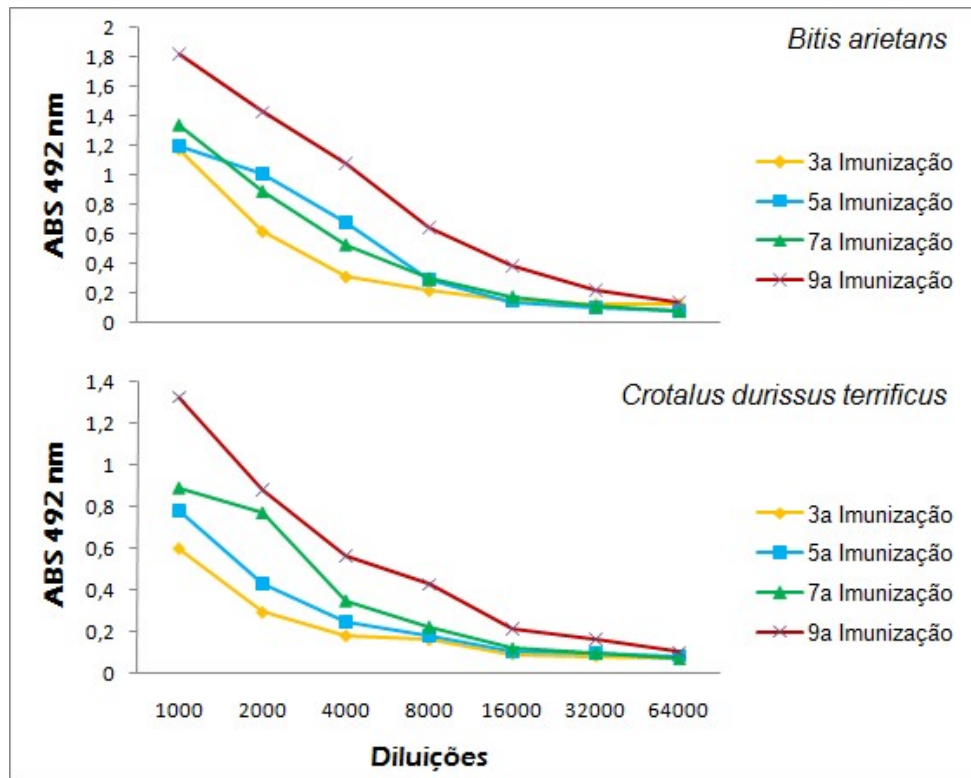


Figura 12 – Avaliação da titulação dos antivenenos produzidos, por ELISA. IgY das 5 aves de cada grupo foram precipitadas em conjunto, tornando a avaliação global. Os experimentos foram feitos em triplicata.

Para avaliar a avides dos anticorpos, durante os ELISAs, em poços selecionados e duplicatas, o equivalente a DO 0,6 obtida na titulação previamente feita foi calculado e aplicado nas placas sensibilizadas com o respectivo veneno, em intervalos de tempo selecionados (1, 2, 3, 4, 5 e 10 minutos). O resultado indica que anticorpos obtidos na nona imunização contra o veneno de *Bitis arietans* tem maior avides. Nos anticorpos obtidos de aves imunizadas com o veneno de *Crotalus durissus terrificus*, o resultado demonstra que IgY da sétima imunização tem avides similar à IgY da nona imunização.

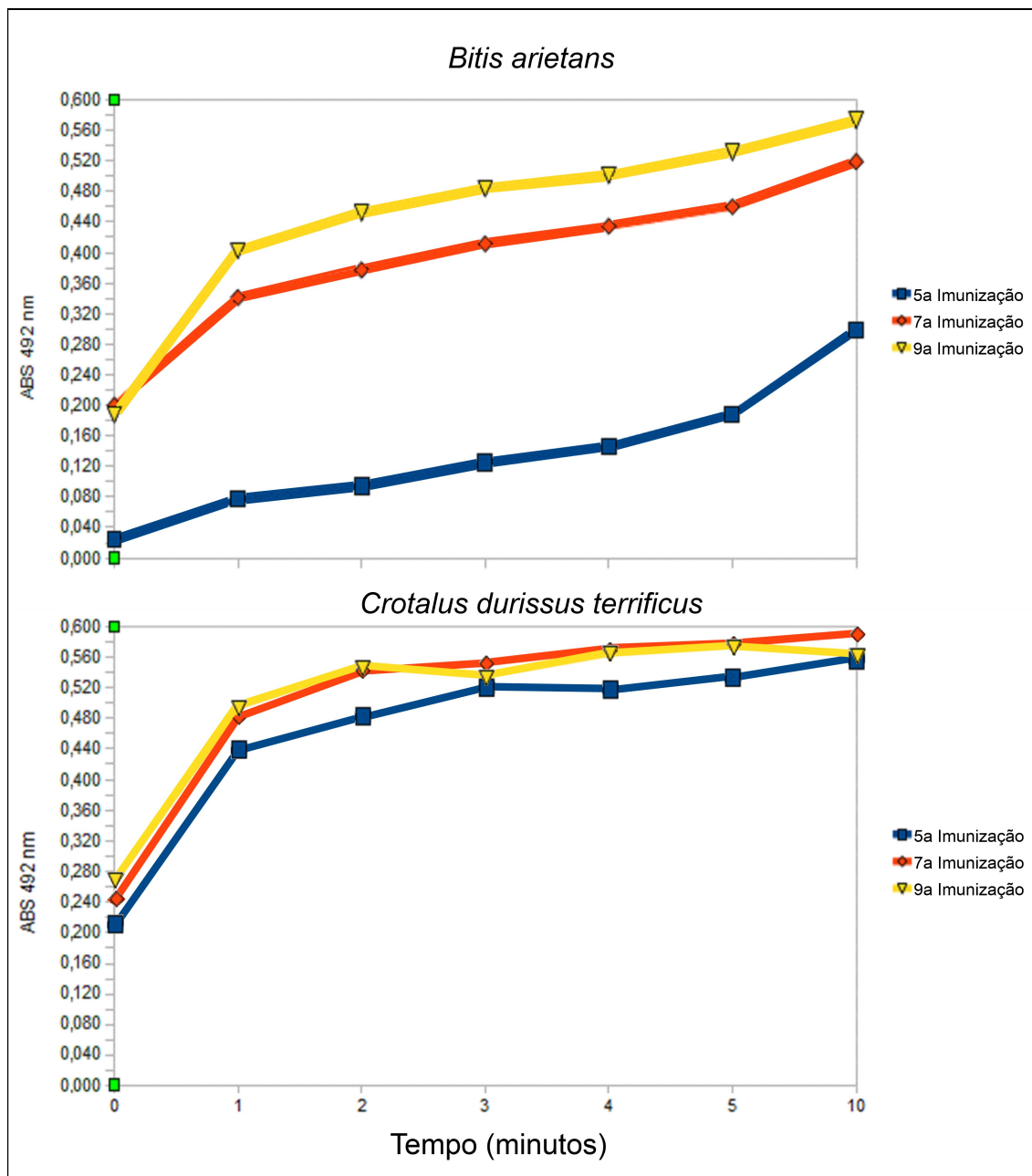


Figura 13 – Ensaio de avides dos anticorpos obtidos a partir do extrato de gemas de ovos. Os ELISAs foram feitos em função do tempo de contato entre anticorpo primário e venenos sensibilizados, de acordo com as respectivas imunizações.

O ensaio de afinidade, por sua vez, foi desenhado como um ELISA comparativo entre um ELISA indireto clássico e um ELISA indireto com adição de agente caotrópico (uréia 6 M) por 10 minutos, após a incubação do anticorpo primário (IgY) por 45 minutos e lavagem. Após a retirada do caotrópico e lavagem, o ELISA seguiu normalmente, com incubação do anticorpo secundário, lavagem e revelação. A diferença encontrada foi

convertida em queda porcentual, chamada de grau de dissociação (figura 14). Cada poço foi sensibilizado com 1 µg do respectivo veneno, e os anticorpos primários foram adicionados na mesma quantidade. O caotrópico tem por função desfazer ligações fracas. Assim, o grau de dissociação é uma medida direta da força de ligação do complexo antígeno-anticorpo e, quanto menor o valor, maior é a afinidade do grupo de anticorpos testados. No ensaio com IgY antiveneno de *Bitis arietans*, anticorpos da nona imunização apresentaram o menor grau de dissociação (29,03%), seguidos pelos da sétima imunização (30,03%) e quinta imunização (38,13%). Já no ensaio com IgY antiveneno de *Crotalus durissus terrificus*, os graus de dissociação verificados foram mais próximos. O menor foi o da nona imunização (29,19%), seguido pela sétima (32,01%) e quinta (32,93%).

Com resultados de titulação, avides e afinidade reunidos, podemos afirmar que em ambos os casos os anticorpos obtidos na nona imunização possuem maior qualidade e, portanto, são mais indicados para a produção de soros antiofídicos.

Os anticorpos da nona imunização foram utilizados para avaliar o reconhecimento dos respectivos venenos em membrana de nitrocelulose, visando identificar as regiões de maior impacto imunogênico (figura 15). Utilizando o programa ImageJ, mensuramos de forma semi-quantitativa (por densitometria) as porções majoritariamente reconhecidas e possíveis reações cruzadas. Neste ponto experimental, além dos venenos de *Bitis arietans* (Ba) e *Crotalus durissus terrificus* (Cdt), adicionamos o veneno de *Bothrops jararaca* (Bj) como controle. Observamos que as marcações mais fortes nos *blottings* são em áreas de proteínas de baixo peso molecular, como fosfolipases e metaloproteinases. Os anticorpos contra o veneno completo de *Bitis arietans*, por seu conteúdo amplo de constituintes observado no 2DE-PAGE, tem um número maior de especificidades possíveis e algumas proteínas importantes bem caracterizadas consideradas comuns a muitos venenos. Portanto, justifica o forte reconhecimento de componentes dos outros venenos analisados. De forma interessante, em relação à marcação observada no *blotting*, os

anticorpos foram analisados como duas vezes mais específicos ao veneno Ba em relação aos venenos Cdt e Bj. Esta característica indica que estes anticorpos, assim como avaliado por Almeida (2008), podem ser utilizados na produção de soros polivalentes.

IgY antiveneno de *Crotalus durissus terrificus*, por sua vez, apresentou um nível de especificidade 10 vezes superior em relação às marcações nos venenos Ba e Bj. Pelos conhecimentos sobre o componentes dos venenos de Cdt e seu baixo teor de constituintes, específicos, tais anticorpos são indicados para a produção de soros monovalentes.

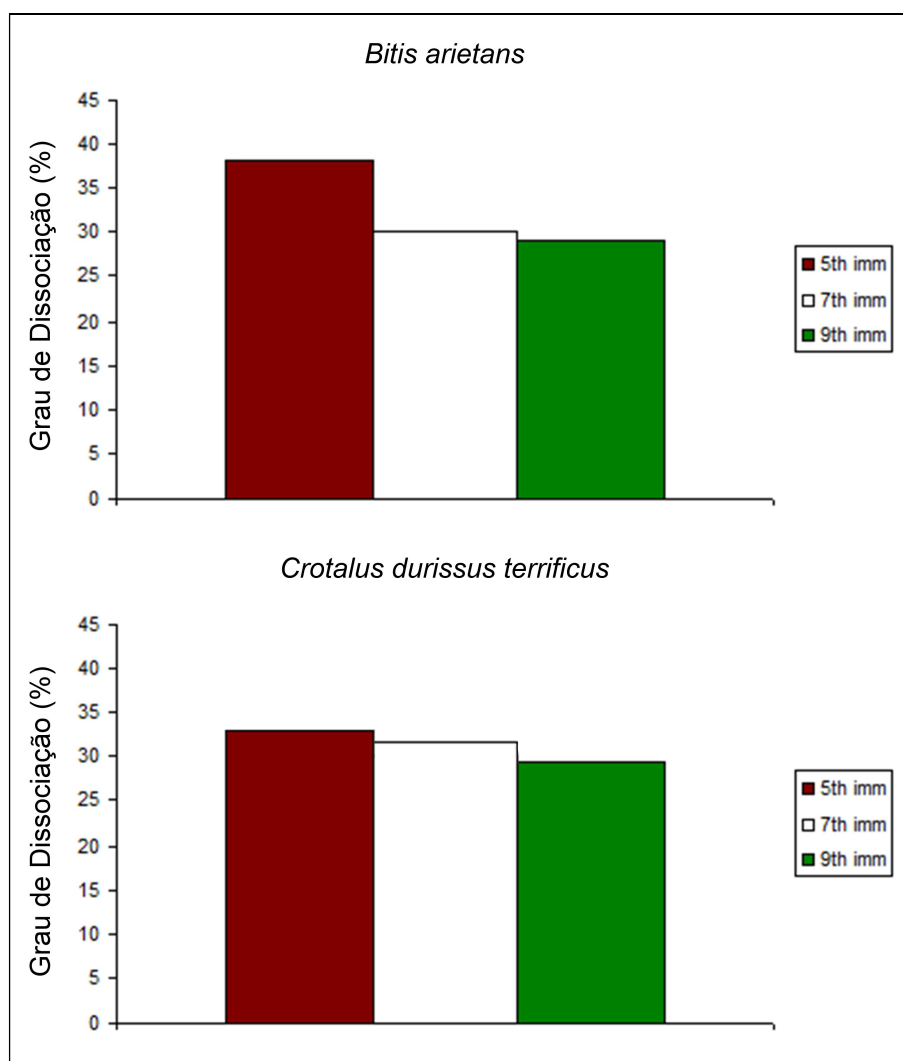


Figura 14 - Ensaio de afinidade dos anticorpos obtidos a partir do extrato de gemas de ovos. Os ELISAs foram feitos como comparativos entre o indireto clássico e o indireto com adição de uréia 6 M por 10 min após adição do anticorpo primário.

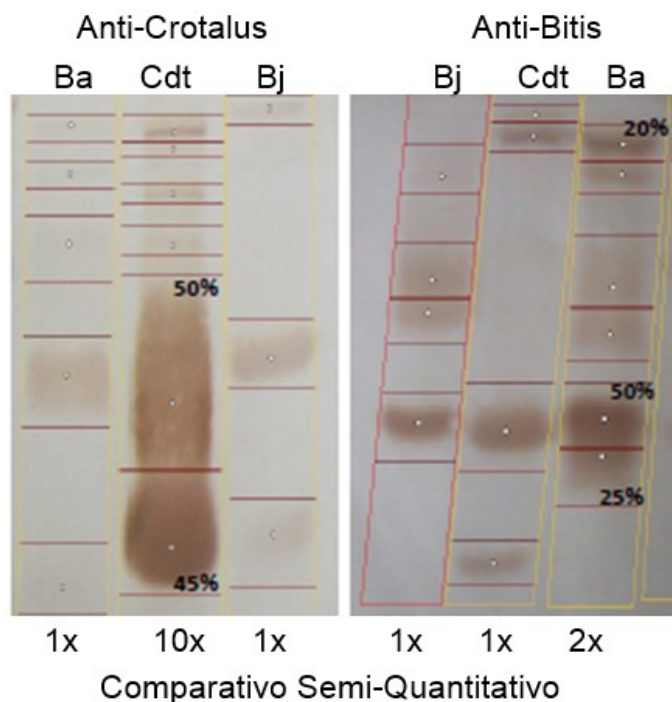


Figura 15 – *Western Blotting* dos venenos tratados com IgY anti-Crotalus e IgY anti-Bitis. O comparativo semi-quantitativo foi obtido por análise densitométrica usando o programa ImageJ.

5.3 – Imunoproteção em Modelo Murino

Os ensaios foram realizados segundo metodologia indicada pela OMS (WHO, 2010) e descrita no item 4.10. As DL_{50} para os venenos de *Bitis arietans* e *Crotalus durissus terrificus* obtidos foram mensuradas em 0,048 $\mu\text{g/g}$ e 0,042 $\mu\text{g/g}$, respectivamente. Considerando que a avaliação foi feita em camundongos *Swiss* com média de peso de 20 g (3 semanas de idade), as doses letais para 50% da população testada foram de 0,96 μg e 0,85 μg , nesta ordem.

Cada grupo foi composto por 5 animais. Decidimos preparar material para experimentação com seis animais, considerando erros e perdas. Desta forma, na imunoproteção contra o veneno de *Bitis arietans*, 864 μg de IgY foram incubadas com 30 DL_{50} de veneno (28,8 μg) em uma solução de PBS 1x estéril com volume final de 1,2 ml, por 1 hora a 37°C. As soluções foram centrifugadas a 4000 x g por 30 minutos sob temperatura ambiente. O grupo controle negativo não foi incubado com IgY. O veneno, na mesma quantidade, foi submetido às mesmas condições dos demais grupos antes da inoculação.

Cada camundongo recebeu 200 µl da solução final via intraperitoneal. Apenas o grupo que recebeu a solução previamente tratada com IgY da 9ª imunização apresentou sobreviventes após 72 h de análise, com proteção total (figura 16).

A imunoproteção contra o veneno de *Crotalus durissus terrificus* seguiu o mesmo protocolo. 30 DL₅₀ de veneno (25,5 µg) foram pré-incubadas com 9600 µg de IgY, centrifugados, e 200 µl do sobrenadante foram injetados por camundongo via intraperitoneal. Novamente, após 72 h de análise, contando os grupos controle negativo, pré-tratado com IgY da 3ª imunização e pré-tratado com IgY da 9ª imunização, apenas camundongos do último sobreviveram, e os anticorpos foram capazes de conferir proteção total (figura 16). Este experimento foi autorizado pela comissão interna competente (Protocolo 077 – CEUA / UENF).

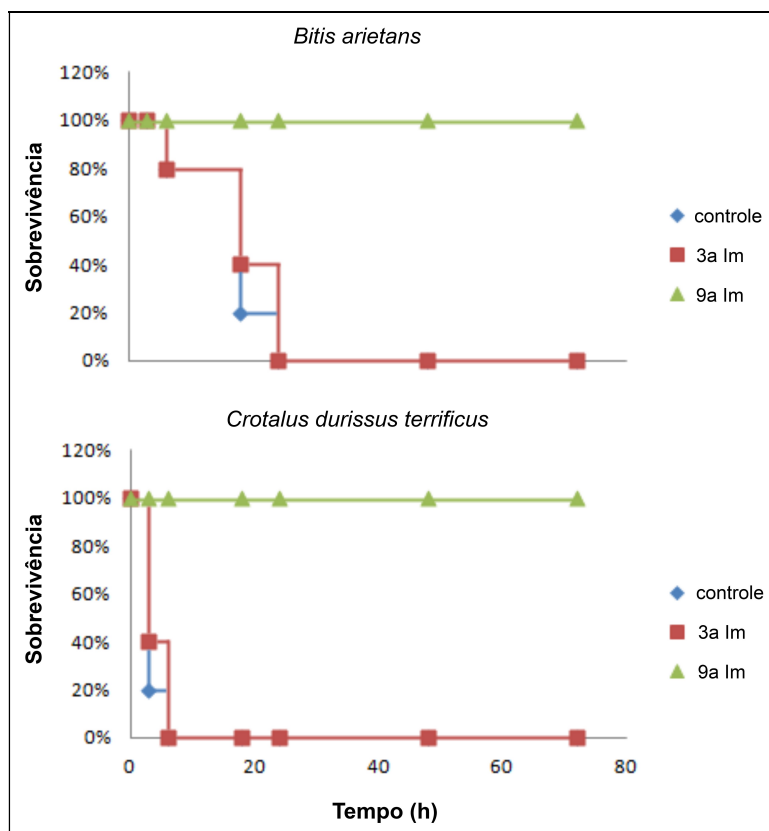


Figura 16 – Ensaio de imunoproteção com camundongos suíços. Cada grupo foi composto por 5 animais entre 18 e 22 g. O controle foi inoculado com PBS 1x estéril via intraperitoneal. Os grupos imunoprotetidos com anticorpos da 3ª e da 9ª imunização receberam a mesma quantidade de veneno, pré-incubado com a mesma quantidade de anticorpos.

5.4 – Avaliação Individual das Imunizações

Para as análises individuais, decidimos imunizar grupos de aves com venenos completos e frações imunologicamente relevantes. Como a quantidade de veneno de *Bitis arietans* disponível não era suficiente para novas imunizações e purificação de Bitiscetinas ou Hemorraginas (BHRa ou BHRb), esta etapa foi feita apenas com o veneno completo de *Crotalus durissus terrificus* e sua fração majoritária, crotoxina.

As imunizações seguiram as datas indicadas na tabela 4. O protocolo obedecido no primeiro grupo experimental foi repetido. Assim, como descrito no item 4.2, as imunizações respeitaram o intervalo de 21 dias. Os extratos de gemas de ovos, de cada ave, foram armazenados a -20°C até sua utilização. Os anticorpos foram precipitados segundo metodologia descrita no item 4.4, com sulfato de amônio e PEG 6000, dialisados e quantificados.

CALENDÁRIO DE IMUNIZAÇÕES			
Nº	COMPLEMENTO	IMUNIZAÇÃO	COLETA DE OVOS
1	FCA + PBS 1X	08/02/2013	13/02 - 28/02
2	FIA + PBS 1X	01/03/2013	06/03 - 21/03
3	PBS 1X	22/03/2013	27/03 - 11/04
4	PBS 1X	12/04/2013	17/04 - 02/05
5	PBS 1X	03/05/2013	08/05 - 23/05
6	PBS 1X	24/05/2013	29/05 - 13/06
7	PBS 1X	14/06/2013	19/06 - 04/07
8	PBS 1X	05/07/2013	10/07 - 22/08
9	PBS 1X	23/08/2013	28/08 - 12/09

Tabela 5 – Datas referentes ao primeiro protocolo de imunização das aves. FCA – adjuvante completo de Freund; FIA – adjuvante incompleto de Freund; PBS – tampão fosfato-salino.

Para verificar a eficiência das imunizações, três dias após a terceira imunização foi coletado, de cada ave, 1 ml de sangue por punção da veia ulnar da asa direita. O soro obtido de cada ave foi avaliado por ELISA para verificar a titulação individual de anticorpos (figura 17).

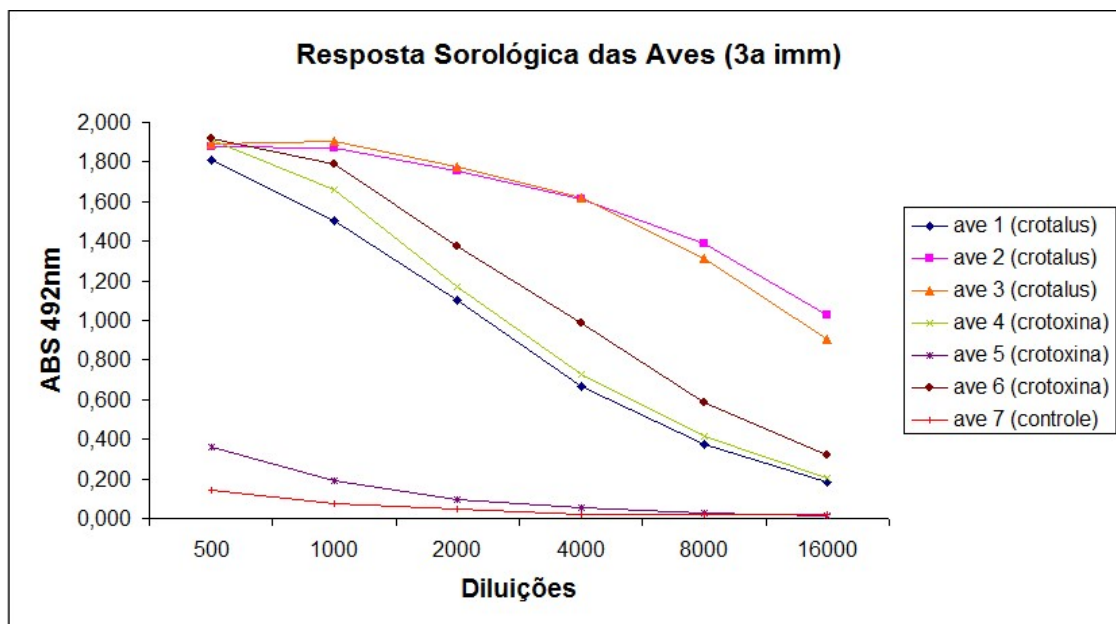


Figura 17 – Titulações obtidas por ELISA a partir do soro das aves imunizadas – 3ª imunização. Os experimentos foram feitos em duplicata.

Os resultados obtidos indicaram que a ave 5, imunizada com crotoxina, não apresentou resposta à imunização. As outras aves apresentaram os resultados esperados. Como passo adicional, verificamos a passagem de IgY para as gemas dos ovos produzidos neste período, indicado na tabela 4.

Os anticorpos foram precipitados e quantificados pelo método do ácido bicinconínico. Um gel de poliacrilamida (SDS-PAGE 12%) foi feito para avaliar a melhor metodologia de precipitação. Como pode ser avaliado na figura 18, a precipitação com PEG 6000 apresentou um grau de impurezas inferior e, portanto, foi escolhido para continuação dos experimentos.

IgY dos extratos de gemas de ovos precipitados tiveram sua titulação avaliada por ELISA. Tal como observado na figura 17, a ave 5 não apresentou resposta às 3 imunizações aplicadas (figura 19) e foi excluída do processo de produção de anticorpos.

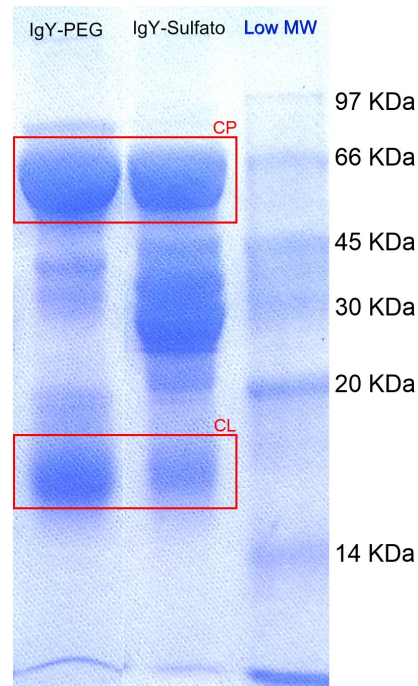


Figura 18 – Avaliação dos métodos de precipitação de anticorpos. SDS-PAGE 12% dos anticorpos de gema de ovos precipitados com 12% de PEG 6000 (canaleta esquerda) e 29% de Sulfato de Amônio (canaleta central). CP – Cadeia Pesada de IgY; CL – Cadeia Leve de IgY; Low MW – Marcador Molecular de Baixo Peso.

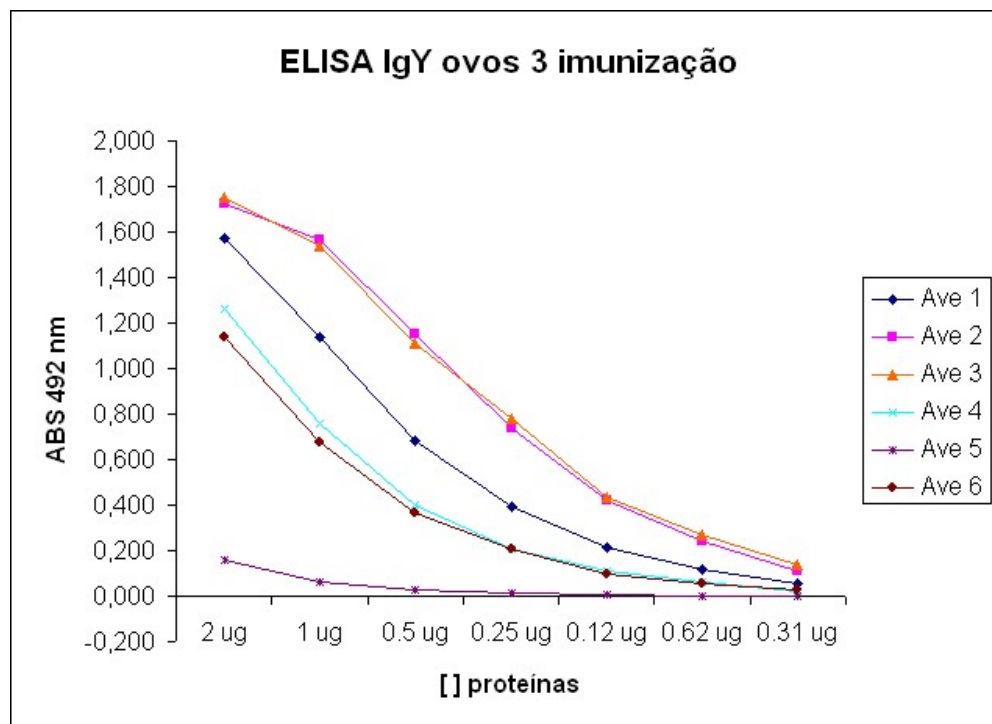


Figura 19 - Titulação dos anticorpos por ELISA. Anticorpos selecionados foram precipitados com sulfato de amônio de gemas de ovos das aves imunizadas – 3ª imunização. Os experimentos foram feitos em duplicata.

Os ovos das aves responsivas foram coletados de forma constante, e os anticorpos precipitados, quantificados e armazenados a -20°C até sua devida utilização, ao final do processo de imunização. A ave 1, durante o processo, faleceu. Segundo análise histológica, a causa foi desidratação. O sistema de abastecimento de água do biotério foi avaliado e as falhas sanadas. As outras aves não foram afetadas.

A análise do material obtido foi idêntica à feita no primeiro bloco experimental deste trabalho. O primeiro ponto de análise foi a titulação durante o processo de imunização (figuras 20 a 22). As aves, como esperado, não seguiram um padrão de resposta comum às imunizações. A ave 2, imunizada com o veneno completo de *Crotalus durissus terrificus* (Cdt), apresentou suas maiores titulações, similares, nas imunizações 3 e 9. A ave 3, também imunizada com o veneno completo de Cdt, apresentou titulações mais fortes nas imunizações 3 e 4 e, após uma queda nos índices observados, teve boa resposta também na imunização 9. A ave 4, imunizada com crotoxina (CTX), apresentou fortes titulações nas imunizações 3 e 9, com forte queda nas outras analisadas. A ave 6, também imunizada com CTX, apresentou um padrão de titulações comparável ao observado nos resultados do primeiro bloco de experimentações deste trabalho, com um avanço gradativo nas titulações da terceira à nona. Todas as análises de titulação, assim como as demais análises, foram feitas em placas sensibilizadas apenas com o veneno completo de Cdt. Para as análises, deve ser considerado que CTX é a toxina de fração majoritária no veneno de Cdt, responsável por 60 – 65% do peso seco do veneno. E que, em caso de acidentes envolvendo cascavéis, o paciente entrará em contato com o veneno completo.

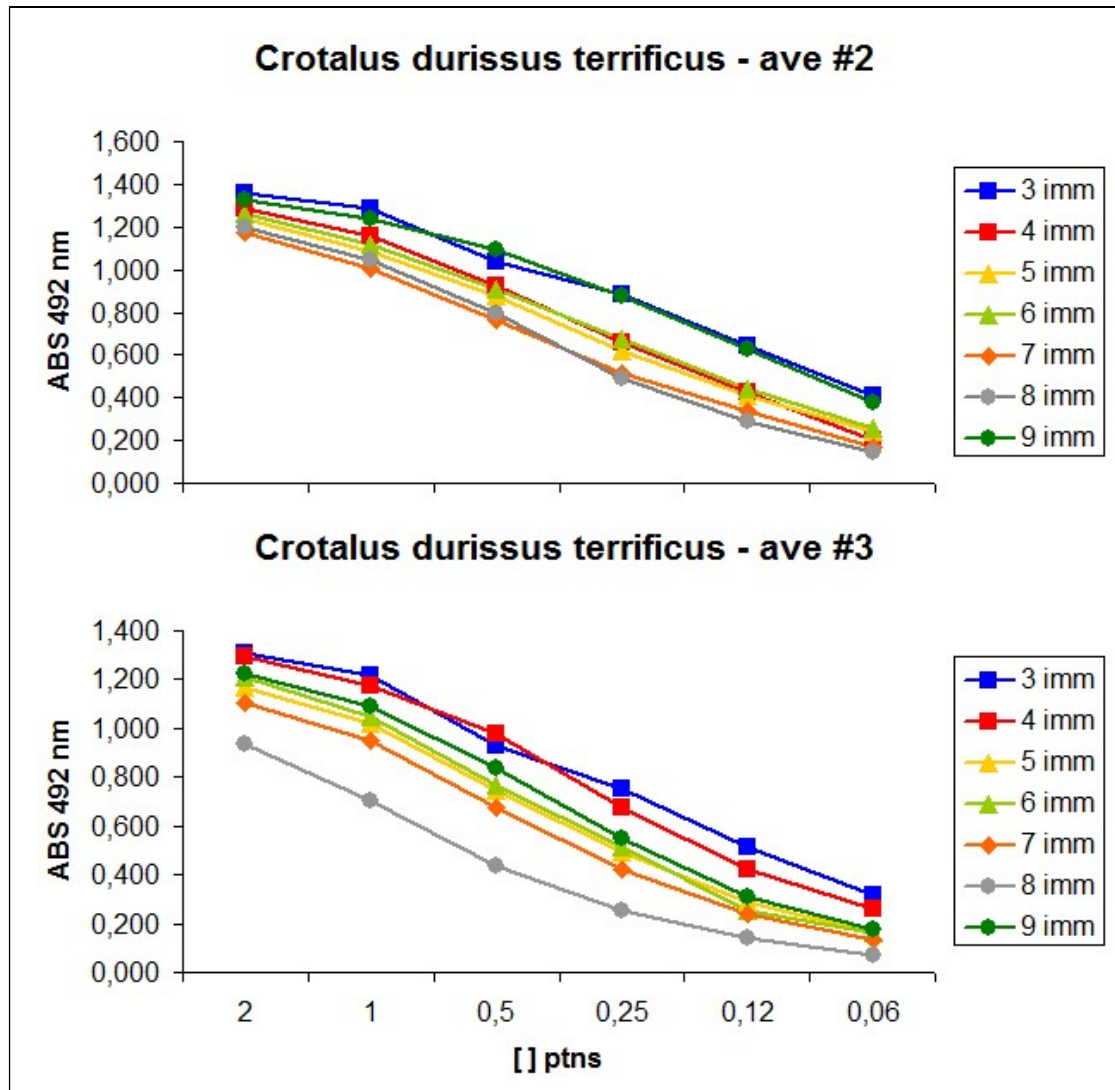


Figura 20 - Avaliação da titulação dos anticorpos obtidos por ELISA. Anticorpos seleccionados foram precipitados de gemas de ovos das aves imunizadas com PEG 6000. Os experimentos foram feitos em duplicata.

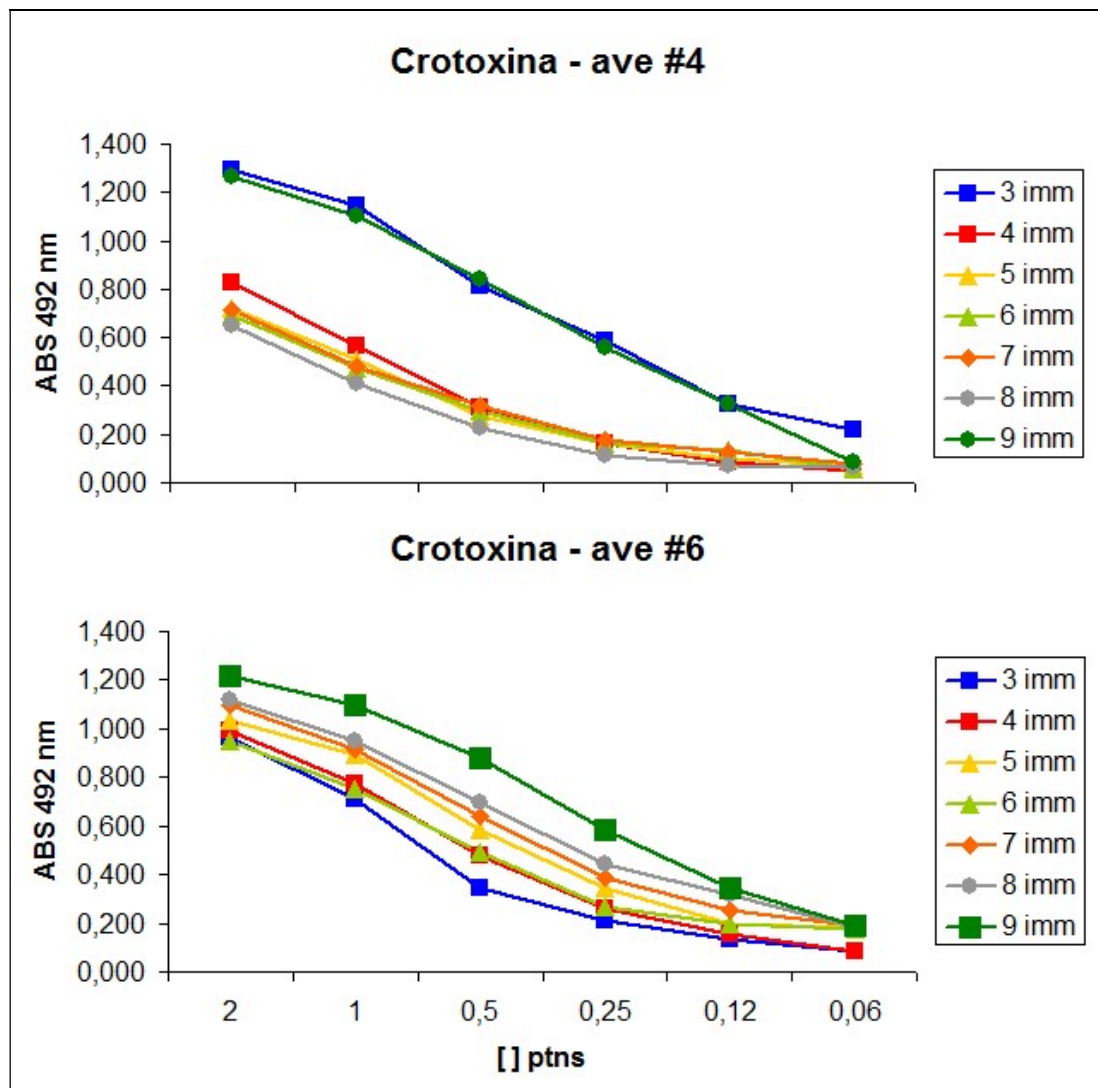


Figura 21 - Avaliação da titulação dos anticorpos obtidos por ELISA. Anticorpos seleccionados foram precipitados de gemas de ovos das aves imunizadas com PEG 6000. Os experimentos foram feitos em duplicata.

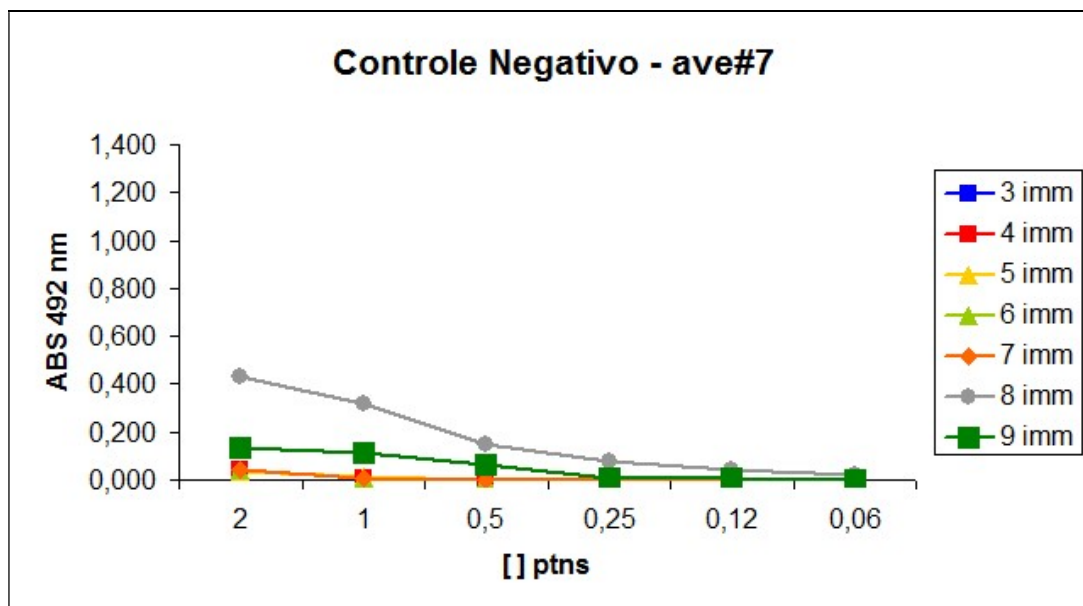


Figura 22 - Avaliação da titulação dos anticorpos obtidos por ELISA. Anticorpos selecionados foram precipitados de gemas de ovos das aves imunizadas com PEG 6000. Os experimentos foram feitos em duplicata.

Com a titulação das diferentes etapas das imunizações aferidas, o passo seguinte foi o ensaio de avidéz. O protocolo seguido foi o utilizado no primeiro bloco de experimentação. Nas aves 2 e 3, imunizadas com veneno completo de Cdt, os anticorpos obtidos na terceira imunização apresentaram avidéz mais proeminente em relação aos demais (figura 23). Na ave 2 observamos um decréscimo na avidéz apresentada, com menor nível nas imunizações 7 e 8, voltando a aumentar na imunização 9 até os níveis apresentados nas imunizações 4 e 5. A ave 3 apresenta um padrão de resposta similar neste quesito, com menor nível na imunização 8 e aumento na imunização 9.

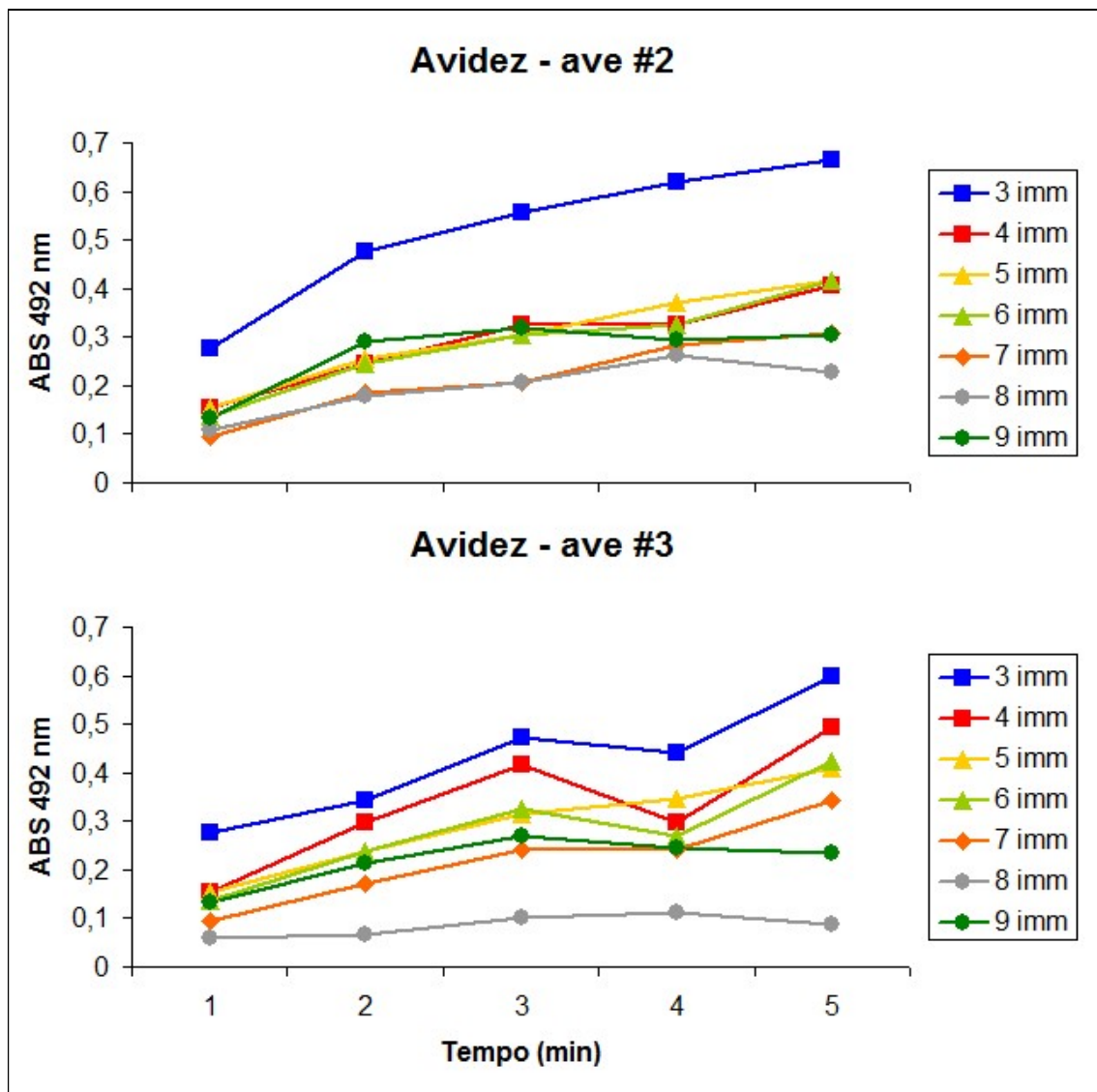


Figura 23 – Avaliação de avidez dos anticorpos por ELISA. Médias dos resultados obtidos em função do tempo. Anticorpos seleccionados foram precipitados de gemas de ovos das aves imunizadas com PEG 6000. Os experimentos foram feitos em duplicata.

As aves 4 e 6, imunizadas com CTX, apresentaram diferença na resposta de avidez observada (figura 24). A ave 4 apresentou maior avidez também na terceira imunização. No entanto, após queda observada nas imunizações seguintes, os anticorpos da nona imunização apresentaram avidez próxima à observada na imunização 3. A ave 6 apresentou baixos níveis de avidez em seus anticorpos, quando comparados aos das outras aves em experimentação. A nona imunização foi a mais forte no ensaio, que apresentou um padrão de crescimento na avidez a partir da terceira imunização, que pode ser relacionado ao observado no primeiro bloco experimental.

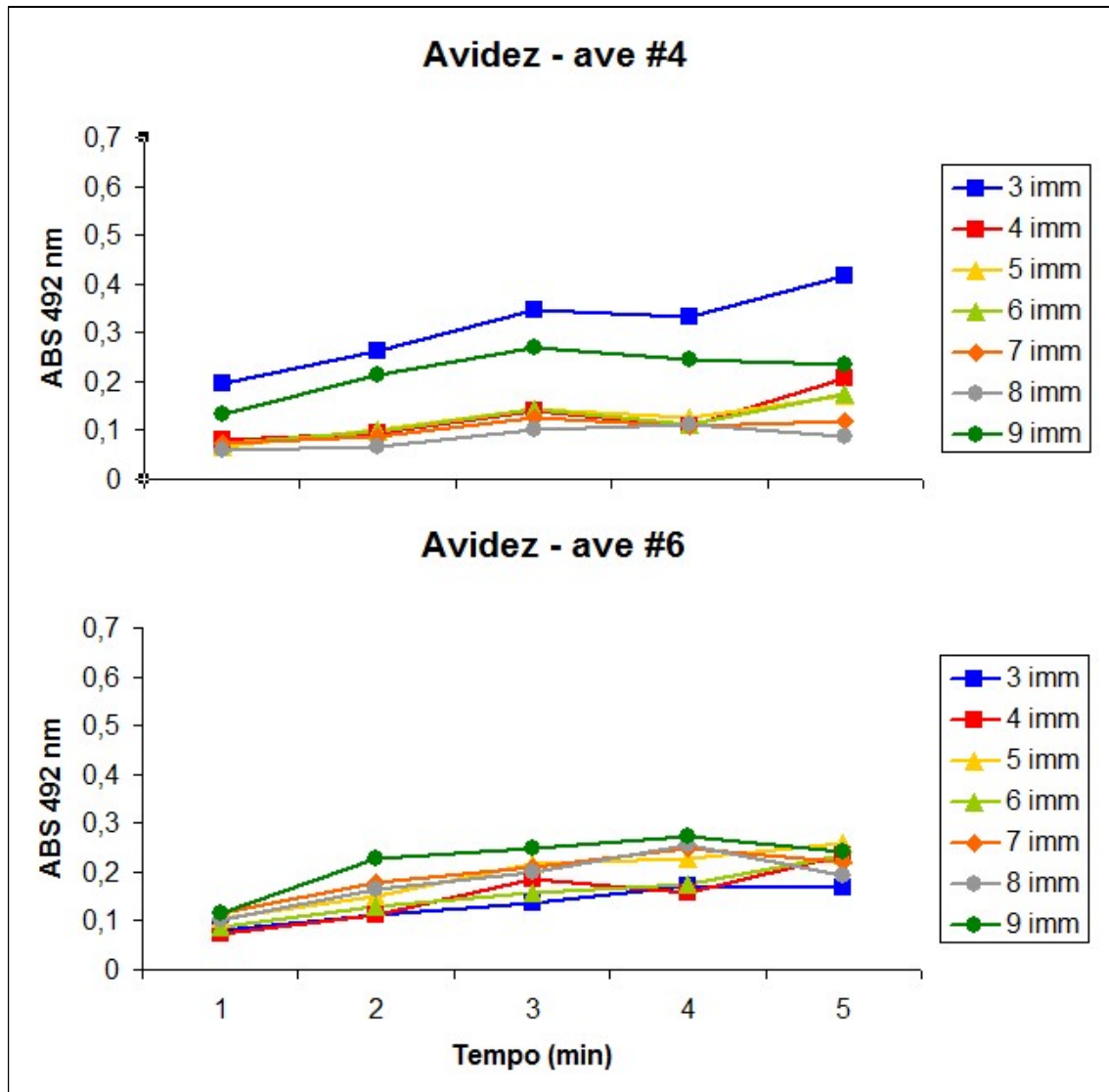


Figura 24 - Avaliação de avidéz dos anticorpos por ELISA. Médias dos resultados obtidos em função do tempo. Anticorpos selecionados foram precipitados de gemas de ovos das aves imunizadas com PEG 6000. Os experimentos foram feitos em duplicata.

No ensaio de avidéz da galinha que não foi imunizada - controle negativo (figura 25), o resultado obtido foi o esperado, e os anticorpos não foram ávidos contra o veneno completo de Cdt.

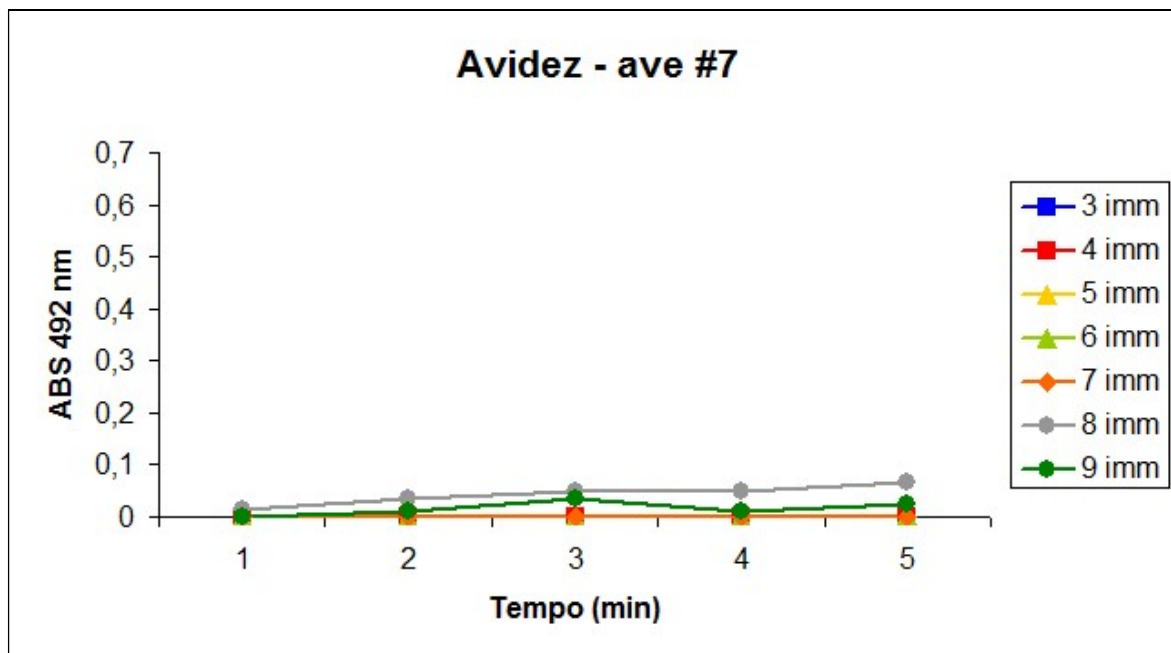


Figura 25 - Avaliação de avididade dos anticorpos por ELISA. Médias dos resultados obtidos em função do tempo. Anticorpos selecionados foram precipitados de gemas de ovos das aves imunizadas com PEG 6000. Os experimentos foram feitos em duplicata.

Para concluir a análise, os dados sobre a afinidade dos anticorpos foi coletado (figura 26). Na ave 2, os anticorpos de maior afinidade foram os obtidos na terceira imunização, e os de menor afinidade nas imunizações 7 e 8. Na ave 3, a maior força de ligação foi observada nos anticorpos das quarta e quinta imunizações, e os de menor força nas imunizações 7 e 9. Na ave 4, os anticorpos da terceira imunização foram os melhores, seguidos pelos da nona imunização. Os demais anticorpos apresentaram baixos níveis de afinidade. Os anticorpos da ave 6, por sua vez, apresentaram baixos níveis de afinidade. No entanto, a nona imunização apresentou afinidade equiparável aos melhores anticorpos das outras aves. A ave 7 apresentou 100% de dissociação após o tratamento com uréia 6 M, conforme esperado.

Com a análise de todos os dados imunoquímicos, juntando os dados de titulação, avididade e afinidade, os melhores anticorpos foram os da terceira imunização nas aves 2, 3 e 4. Na ave 6, o melhor anticorpo foi obtido na nona imunização.

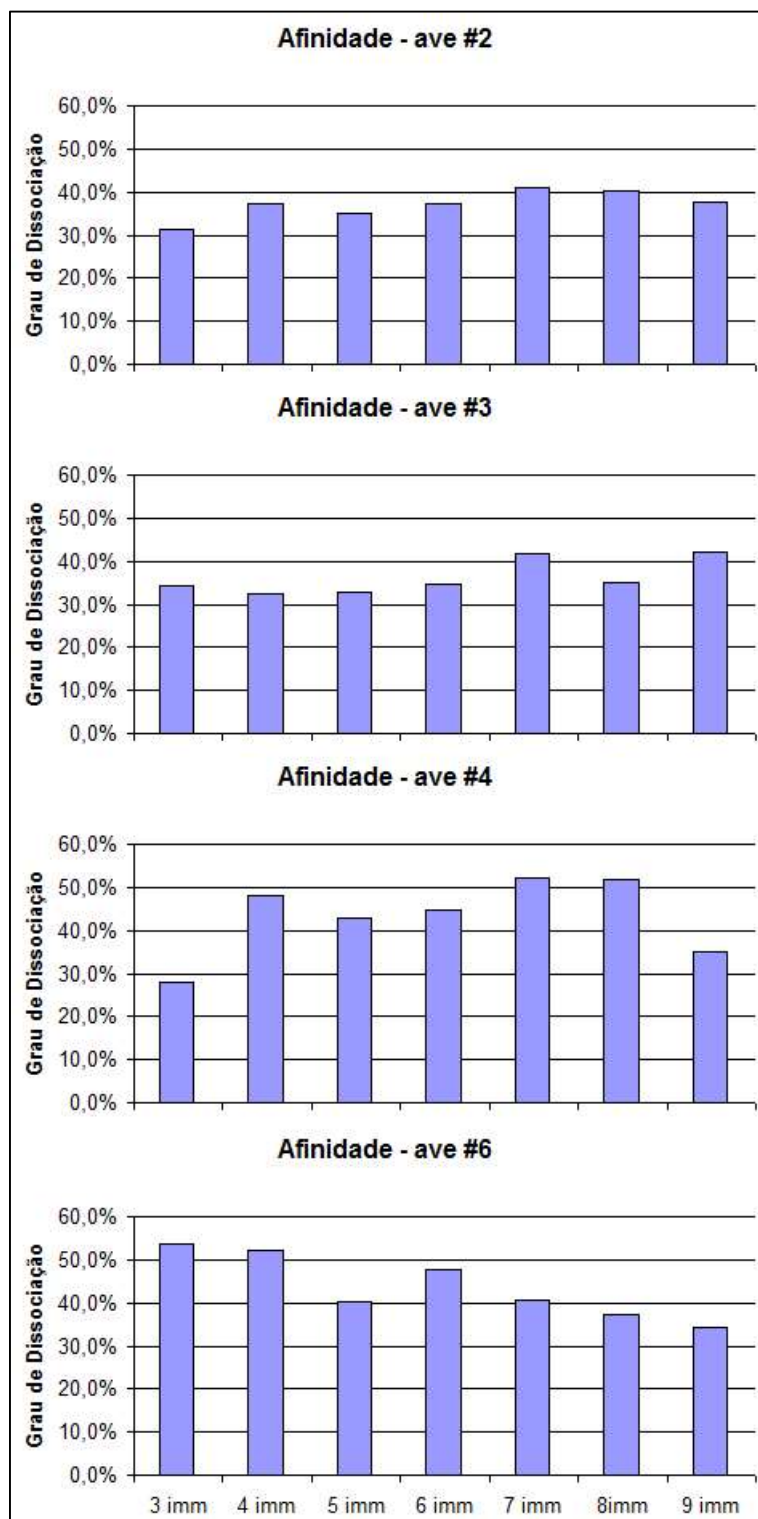


Figura 26 - Avaliação de afinidade dos anticorpos antivenenos. Grau de dissociação por ação de agente caotrópico (Ureia 6M). Resultados obtidos a partir da diferença entre amostras com e sem a ação do agente.

5.5 – Produção do Modelo de scFvs de IgY

Ao selecionarmos o nono ponto de imunização como o indicado para a produção dos melhores anticorpos na análise imunológica por grupos, utilizamos as amostras de sangue das aves correspondentes para a obtenção de mRNA de frações ricas em linfócitos após separação do material em gradiente de Ficoll-Paque Plus. O material foi convertido em cDNA e amplificado em RT-PCR. As amostras amplificadas relativas à porção variável da cadeia pesada apresentaram cerca de 390 pares de base. Já na porção variável da cadeia leve, as amostras apresentaram cerca de 330 pares de base (Figura 27 A).

Para o isolamento das sequências amplificadas, clonamos as mesmas em plasmídeos *pGEM T Easy* e transformamos bactérias *E. coli* DH5 α competentes utilizando a metodologia do choque térmico. Colônias isoladas crescidas em meio LB sólido foram coletadas, e os plasmídeos extraídos. Neste ponto, bactérias transformadas com sequências da cadeia pesada inseridas no plasmídeo não apresentaram bom crescimento, com a formação de duas colônias em todo o set experimental. As bactérias transformadas com sequências da cadeia leve de IgY inseridas nos plasmídeos apresentaram rendimento médio de 30 colônias isoladas por placa. A endonuclease EcoRI foi utilizada na digestão do plasmídeo para confirmar a presença da sequência clonada no vetor (figura 27B). As bandas superiores representam o plasmídeo digerido, e as inferiores o inserto de interesse.

O sequenciamento das amostras escolhidas foi feito com o *BigDye Terminator Cycle Sequencing* (Applied Biosystems), de acordo com as recomendações do fabricante. Um PCR-controle foi feita para a avaliação da reação de sequenciamento (figura 27 C), e indicou uma boa amplificação na presença dos quatro *primers* disponíveis (M13F, M13R, SP6 e T7). Os escolhidos para a reação de sequenciamento foram: M13F para a leitura normal, e M13R para a leitura reversa. Cada clone foi sequenciado duas vezes, e as sequências obtidas foram analisadas no programa *GeneRunner* para a identificação do início e do final do fragmento clonado, e do *frame* correto de

leitura. Os *frames* escolhidos foram analisados por BLASTp (Figura 28), alcançando entre 50% e 65% de homologia estrutural com sequências de IgG e IgE de mamíferos postadas no *GeneBank* (NCBI – Centro Nacional para Informação de Biotecnologia).

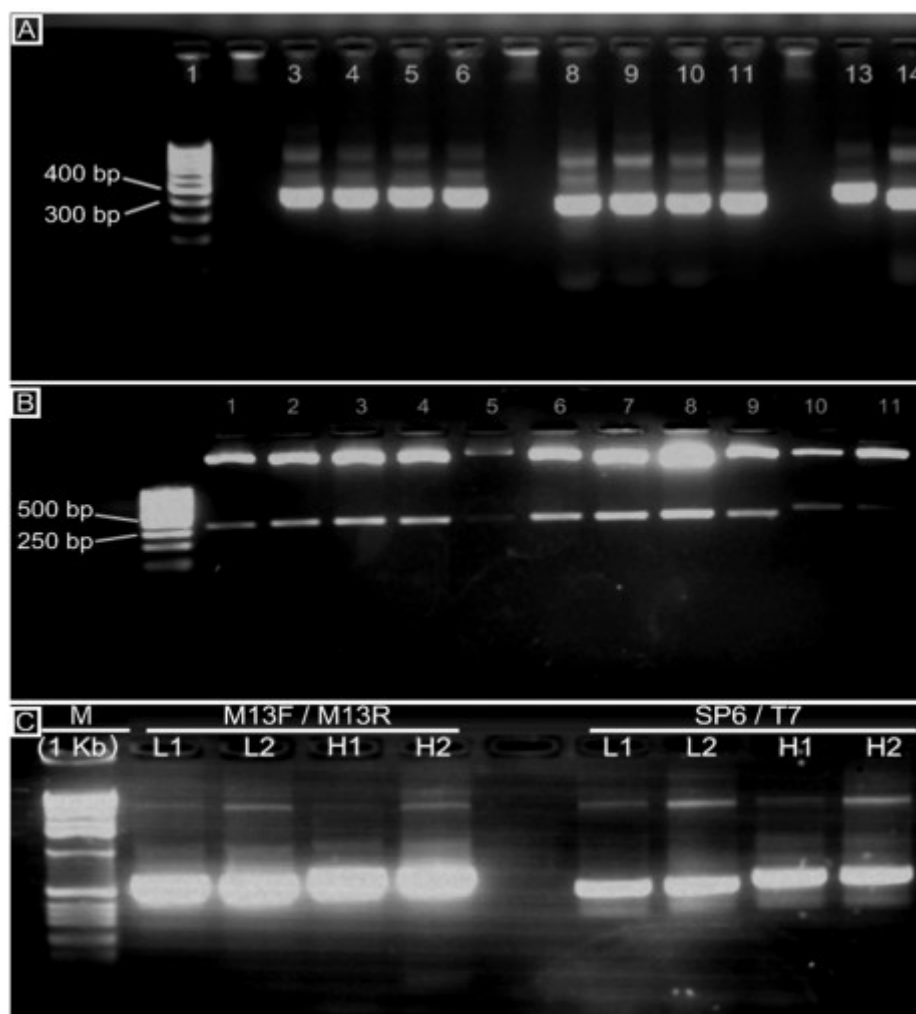


Figura 27 – Análise dos processos de amplificação, digestão e sequenciamento. (A) Gel de agarose 2% revelando o resultado de uma reação de polimerização em cadeia. Foram aplicados 5 μ l de cada amostra por poço. 1 – marcador molecular 100 pb; 3 a 6 e 13 – amostras relativas à porção variável da cadeia pesada da IgY; 8 a 11 e 14 – amostras relativas à porção variável da cadeia leve da IgY; (B) Reação de digestão de diferentes clones inseridos no vetor pGEM T easy com EcoRI. 5 μ l de cada amostra foram aplicados no gel de agarose (2%). 1 a 9 – cadeia leve; 10 e 11 – cadeia pesada; (C) Gel-teste de agarose 2% para a avaliação prévia da reação de sequenciamento. Os primers usados (M13F/M13R e SP6/T7) foram indicados pelo fabricante do vetor utilizado. L – porção variável da cadeia leve; H – porção variável da cadeia pesada.

Duas das sequências obtidas foram postadas no *GeneBank* (figura 29), sob os números GU815098 (Porção variável da cadeia pesada de IgY de galinha) e GU815099 (Porção variável da cadeia leve de IgY de galinha).

	VLF1	CDR1	CDR2	
Ba 01	TQPSSVSANPGETVKITC	SGGDSNYYGWYQQKAPGSAPVTVIY	DNTNRPSN	IPSRFSGSK 60
Ba 02	TQPSSVSANPGETVKITC	SGGDSNYYGWYQQKAPGSAPVTVIY	DNTNRPSN	IPSRFSGSK 60
Ba 08	TQPSSVSANPGETVKITC	SGGDSNYYGWYQQKAPGSAPVTVIY	DNTNRPSN	IPSRFSGSK 60
Ba 10	TQPSSVSANPGETVKITC	SGGDSNYYGWYQQKAPGSAPVTVIY	DNTNRPSN	IPSRFSGSK 60
Ba 05	TQPSSVSANPGETVKITC	SGGDSNYYGWYQQKAPGSAPVTVIY	DNTNRPSN	IPSRFSGSK 60
Ba 04	TQPSSVSANPGETVKITC	SGGDSNYYGWYQQKAPGSAPVTVIY	DNTNRPSN	IPSRFSGSK 60
Ba 06	TQPSSVSANPGETVKITC	SGGDSNYYGWYQQKAPGSAPVTVIY	DNTNRPSN	IPSRFSGSK 60
Ba 07	TQPSSVSANPGETVKITC	SGGDSNYYGWYQQKAPGSAPVTVIY	DNTNRPSN	IPSRFSGSK 60
Cdt 20	TQPSSVSANPGETVKITC	SGGDSNYYGWYQQKAPGSAPVTVIY	DNTNRPSN	IPSRFSGSK 60
Cdt 21	TQPSSVSANPGETVKITC	SGGDSNYYGWYQQKAPGSAPVTVIY	DNTNRPSN	IPSRFSGSK 60
Cdt 24	TQPSSVSANPGETVKITC	SGGDSNYYGWYQQKAPGSAPVTVIY	DNTNRPSN	IPSRFSGSK 60
Cdt 19	TQPSSVSANPGETVKITC	SGGDSNYYGWYQQKAPGSAPVTVIY	DNTNRPSN	IPSRFSGSK 60
Cdt 31	? SPSSVSANPGETVKITC	SGGDSNYYGWYQQKAPGSAPVTVIY	DNTNRPSN	IPSRFSGSK 60
Cdt 17	TQPSSVSANPGETVKITC	SGGDSNYYGWYQQKAPGSAPVTVIY	DNTNRPSN	IPSRFSGSK 60
Cdt 23	TQPSSVSANPGETVKITC	SGGDSNYYGWYQQKAPGSAPVTVIY	DNTNRPSN	IPSRFSGSK 60
Cdt 18	TQPSSVSANPGETVKITC	SGGDSNYYGWYQQKAPGSAPVTVIY	DNTNRPSN	IPSRFSGSK 60

	CDR3	-VLR1	
Ba 01	SGSTATLTIITGVQADDEAVYFCGNEDSTGTIAGFGAGTTLTVLGPNA	AAA	110
Ba 02	SGSTATLTIITGVQADDEAVYFCGNEDSTGTIAGFGAGTTLTVLGPNA	AAA	110
Ba 08	SGSTATLTIITGVQADDEAVYFCGNEDSTGTIAGFGAGTTLTVLGPNA	AAA	110
Ba 10	SGSTATLTIITGVQADDEAVYFCGNEDSTGTIAGFGAGTTLTVLGPNA	AAA	110
Ba 05	SGSTATLTIITGVQADDEAVYFCGNEDSTGTIAGFGAGTTLTVLGPNA	AAA	110
Ba 04	SGSTATLTIITGVQADDEAVYFCGNEDSTGTIAGFGAGTTLTVLGPNA	AAA	110
Ba 06	SGSTATLTIITGVQADDEAVYFCGNEDSTGTIAGFGAGTTLTVLGPNVG?G		111
Ba 07	SGSTATLTIITGVQADDEAVYFCGNEDSTGTIAGFGAGTTLTVLGPNA	AAA	110
Cdt 20	SGS?ATLTIITGVQADDEAV		78
Cdt 21	SGSTATLTIITGVQADDEAVYFCGNEDSTGTIAGFGAGTTLTVLGP	NA	106
Cdt 24	SGSTATLTIITGVQADDEAVYFCGNEDSTGTIAGFGAGTTLTV		103
Cdt 19	SGSTATLTIITGVQADDEAVYFCGNEDSTGTIAGFGAGTTLTVLGPNA	AAATI	112
Cdt 31	SGSTATLTIITGVQADDEAVYFCGNEDSTGTIAGFGAGTTLTVLGPNA	AAATI	111
Cdt 17	SGSTATLTIITGVQADDEAVYFCGNEDSTGTIAGFGAGTTLTVLGPNA	AAAT	111
Cdt 23	SGSTATLTIITGVQADDEAVYFCGNEDSTGTIAGFGAGTTLTVLGPNA	AAAT	111
Cdt 18	SGSTATLTIITGVQADDEAVYFCGNEDSTGTIAGFGAGTTLTVLGPNA	AAA	110

VLF1	GACTCAGCCGTCCTCGGTGTCAG
	T Q P S S V S
VLR1	TGATGGTGGCGGCCGATTGGGCTG
	CAGCCCAATGCGGCCGCCACCATCA (Inverso Complementar)
	Q P N A A A T I

Figura 28 – Sequências validadas por BLASTp referentes a porção variável da cadeia leve de IgY. Imunizações referenciais: Ba - *Bitis arietans*; Cdt - *Crotalus durissus terrificus*.

As sequências publicadas foram utilizadas para a modelagem de um scFv. Segundo o trabalho publicado em 2008 por Chiliza *et al.*, uma PCR de junção é necessária para a formação de uma cadeia única, capaz de adquirir a estrutura tridimensional da alça de reconhecimento do anticorpo original. Este protocolo está em fase de testes. A junção das porções foi realizada *in silico* (Figuras 29 e 30).

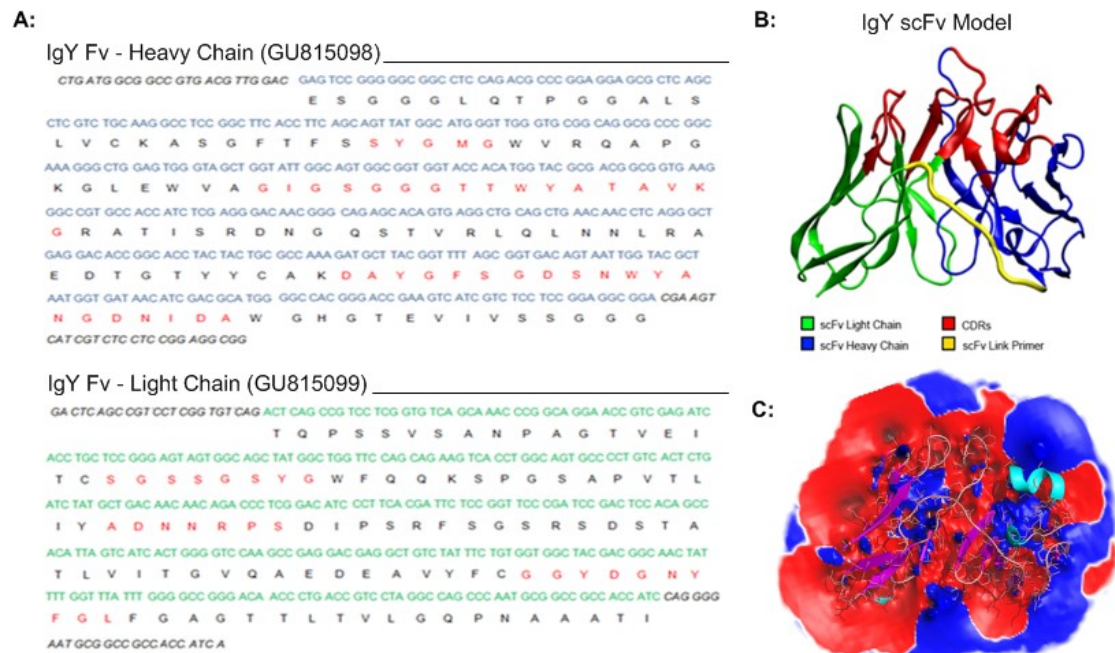


Figura 29 – scFv de IgY antiveneno de *Bitis arietans*. (A) Sequências do cDNA amplificado. Heavy Chain - Cadeia Pesada; Light Chain - Cadeia Leve. Sequências em vermelho representam os CDRs do anticorpo. (B) Modelo proposto de scFv, com representação da alça de reconhecimento do antígeno em vermelho. A sequência amarela foi inserida como primer de ligação, com 6 resíduos de aminoácidos apolares, para possibilitar o melhor rearranjo estrutural da molécula. (C) Regiões hidrofóbicas (azul) e hidrofílicas (vermelho) no scFv. A região hidrofílica corresponde às alças de CDRs.

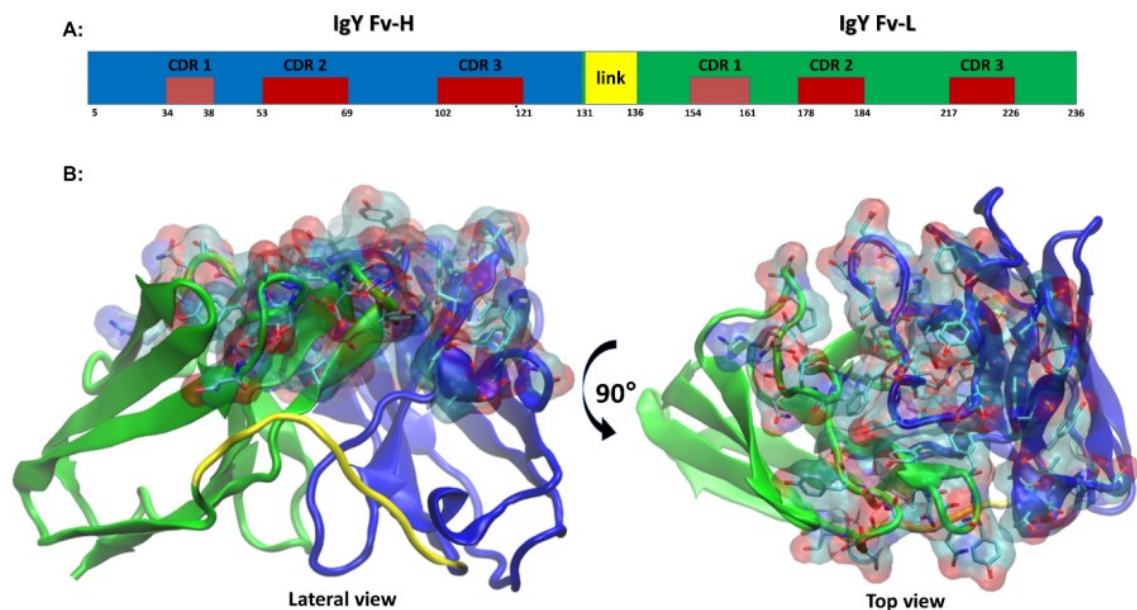


Figura 30 – Visões lateral e superior de uma simulação de contato com antígeno. Cadeia Pesada (IgY Fv-H) em azul, Cadeia Leve (IgY Fv-L) em verde, e link em amarelo.

6 – DISCUSSÃO

Antissoros são classicamente produzidos a partir do plasma de grandes mamíferos hiperimunizados com algumas doses não-letais de determinado veneno (WHO, 2010). Há também as novas metodologias, baseadas na purificação de extrato de gemas de ovos de aves imunizadas, com a mesma finalidade (Schade *et al.*, 2005). Tal técnica, uma inovação pensada no século XIX e indevidamente esquecida por ser simples (Klemperer, 1893), tem apresentado resultados similares, senão melhores, nos tratamentos de animais de valor econômico e humanos acidentados com animais peçonhentos (Schade *et al.*, 2005).

Para melhorar o quadro apresentado, vários grupos de pesquisa no mundo estão engajados em uma iniciativa global para erradicar mortes provocadas por envenenamento de pacientes após picadas de serpentes peçonhentas (Gutiérrez *et al.*, 2013; Gutiérrez, Theakston & Warrell, 2006). Dentre as várias iniciativas indicadas para aumentar a eficiência dos tratamentos, o ponto central é o melhoramento no processo de produção de soros antiofídicos (Gutiérrez *et al.*, 2013; Warrell, 2010). Tradicionalmente, IgG produzida em grandes e médios mamíferos são utilizados para a produção de antivenenos (Warrell, 2010; Gutiérrez, Leon & Burnouf, 2011). Entretanto, IgY de pássaros, particularmente galinhas, tem sua utilização em processo de ampliação (Schade *et al.*, 2005; Almeida *et al.*, 2008).

Estudos comprovam a ligação filogenética que aponta IgY de aves com IgE e IgG de mamíferos (Schade *et al.*, 2005; Alexander *et al.*, 2009). No entanto, a molécula de IgY ainda não tem seu mecanismo de ação completamente desvendado. Um claro exemplo é a função da porção Fc da molécula, que começou a ser desvendada. Pürzel *et al.* (2009) observaram que a ligação de IgY ao seu receptor CHIR-AB1 (receptor expresso na superfície de monócitos de aves) depende da interface de seus domínios Cu3 e Cu4, de forma semelhante à ligação de IgA ao seu receptor Fc α RI. Segundo Taylor *et al.* (2010), a estequiometria de ligação de IgY ao CHIR-AB1 é de 2:1,

enquanto a ligação de IgG e IgE aos receptores de Fc de leucócitos é de 1:1, indicando um grau de evolução filogenética no reconhecimento e, portanto, na resposta.

Para a produção de soros antiofídicos, a utilização de IgY já é comercial. Implementada pelo ECVAM em 1996 e em 1999 pelo governo suíço como técnica inovadora para a produção de soros (Schade *et al.*, 2005), a Tecnologia IgY é bem distribuída na Europa, além de países como Índia, Japão, Estados Unidos e Brasil. Warrell *et al.* (1975) relataram a importância da aplicação de soros antiofídicos no tratamento de acidentados com serpentes peçonhentas, e a produção de IgY para este fim é bem descrita na literatura.

Almeida *et al.* (1998) trataram sobre o desenvolvimento de anticorpos antivenenos em galinhas e sua purificação a partir dos ovos. O protocolo é simples, baseado na quebra de ovos, coleta das gemas, diluição, precipitação com sulfato de amônio 29% e diálise. Desde então, inúmeros grupos tem produzido soros antivenenos baseados em IgY. Com protocolo similar, Paul *et al.* (2007) produziram IgY antiveneno de *Echis carinatus*. De forma semelhante, na Índia, Meenatchisundaram *et al.* (2008) produziram IgY antivenenos de *Naja naja*, *Bungarus caeruleus*, *Vipera russeli* e *Echis carinatus*. Em nosso grupo, foram produzidos IgY antivenenos de *Bitis arietans*, *Bitis nasicornis*, *Bitis rhinoceros*, *Naja melanoleuca*, *Naja mossambica* (Almeida *et al.*, 2008) e *Crotalus durissus terrificus* (dados não-publicados). Araújo *et al.* (2010), também no Brasil, produziram IgY antiveneno de *Bothrops atrox*, visando a produção de soros antivenenos para consumo nacional. Na Venezuela, Alvarez *et al.* (2013) produziram IgY anti-*Tityus caripitensis* com o objetivo de produzir soros antiescorpiônicos. Andrade *et al.* (2013) estudaram a melhoria na produção de IgY anti-*Bothrops atrox* e anti-*Crotalus durissus terrificus* IgY de acordo com o tempo da vacinação empregue.

A despeito da grande heterogeneidade entre as subunidades de venenos animais, o número de componentes tóxicos é restrito a uma fração do mesmo (Utkin & Osipov, 2007; Warrell, 2010). Em outras palavras, imunizações

com o veneno completo induzem a formação de anticorpos inúteis. Há ainda a produção de anticorpos contra a porção atóxica de domínios protéicos (Guidolin *et al.*, 2013). Estes anticorpos, adicionados às proteínas que escapam do processo de purificação, são responsáveis pelo risco de indução de reações adversas imediatas e tardias (Cardoso *et al.*, 1993; Warrell, 2010; Gutiérrez, 2012). A imunização de animais contra frações tóxicas específicas dos venenos, como a crotalina de *Crotalus durissus terrificus*, pode ser um caminho para o aumento da eficácia de anticorpos, elevando o nível de produção de soros a partir do aumento de especificidade.

Outro fator que não é considerado na produção de soros antiofídicos é a qualidade intrínseca dos anticorpos, um dos temas deste trabalho. Como metodologia de avaliação há apenas o acompanhamento, por ELISA, da titulação dos animais utilizados na produção. Outros fatores determinantes para a eficácia do tratamento, como a afinidade e a avidéz dos anticorpos, não são sistematicamente avaliados.

Como pudemos observar neste trabalho, há no processo de imunização aves não responsivas, como a ave 5 no segundo bloco de experimentação. Estas aves são normalmente excluídas nos processos tradicionais de produção de anticorpos por não apresentarem titulação satisfatória nas imunizações iniciais, ou até mesmo não apresentarem titulação.

A titulação sérica, ou de ovos, no entanto, não é o suficiente para determinar os anticorpos que devem ser utilizados na produção de soros antiofídicos. A ave 6 do segundo bloco de experimentação, por exemplo, apresenta bons níveis de titulação sérica e nos ovos. Entretanto, ao avaliar a avidéz e a afinidade dos anticorpos contra o veneno trabalhado, chegamos à conclusão que os anticorpos desta ave possuem qualidade inferior aos das demais.

Levando em consideração os resultados observados no primeiro bloco de experimentação e comparando com as análises individuais dos animais no

segundo bloco, chegamos à conclusão que sem as análises de avidéz e afinidade individuais, a produção de soros antiofídicos mistura anticorpos de alta qualidade com anticorpos de baixa, reduzindo a qualidade do produto e, conseqüentemente, seu potencial terapêutico.

Quando consideramos o processo de imunização, podemos concluir que a redução na quantidade de veneno administrado por dose em animais pode ser reduzida sem perda de qualidade na produção de anticorpos, gerando economia na aplicação do protocolo e minimizando o sofrimento animal associado ao mesmo. Há ainda dois fatores importantes no número de imunizações de animais produtores de anticorpos. O primeiro é o desenvolvimento de uma resposta eficaz no animal, gerando anticorpos de alta qualidade. O segundo é a continuação da produção de anticorpos de alta qualidade. Com os resultados obtidos, podemos afirmar que simples verificações como análises de titulação, afinidade e avidéz, juntas, podem reduzir o tempo de produção de soros ao selecionar aves e imunizações específicas para integrar o produto final. Podemos, ainda, aumentar a qualidade do material produzido e até mesmo reduzir o número de ampolas empregadas no tratamento de acidentados, diminuindo os riscos de reações adversas imediatas e tardias.

Ainda sobre melhoria na qualidade do produto final, podemos trabalhar com processos de obtenção de anticorpos específicos para a montagem selecionada de antivenenos de alta capacidade neutralizante. A Tecnologia do Anticorpo Recombinante permite a produção de anticorpos de diversos formatos e especificidades baseados em uma biblioteca de reconhecimento antigênico. Holliger e Hudson (2005) dissertaram sobre sistemas de produção de fragmentos monovalentes de anticorpos (Fab e scFv) e variantes engenheiradas para melhor adaptação a diversos antígenos, como minicorpos, diacorpos, triacorpos e tetracorpos. A montagem de anticorpos monovalentes em processo industrial independente de animais significa um importante avanço biotecnológico, econômico e de bem-estar animal. Com a possibilidade de dotar anticorpos com características di, tri ou tetravalentes em uma única

molécula, inúmeras pesquisas foram iniciadas para avaliação do melhor modelo de aplicação.

A partir do trabalho de van Wyngaardt *et al.* (2004), que comparou a tecnologia de montagem de bibliotecas de porções variáveis de anticorpos entre potenciais doadores, alguns grupos de pesquisa iniciaram trabalhos com a produção de scFvs, principalmente para imunodiagnóstico. Chiliza *et al.* (2008) contruiu uma biblioteca de scFvs de IgY para o reconhecimento de epítomos de parasitas e vírus visando a montagem de *Kits*. Shin *et al.* (2009) desenvolveu scFvs de IgY policlonal para o reconhecimento, concentração e quantificação de *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis. Wemmer *et al.* (2010) desenvolveram uma biblioteca semi-sintética de scFv de IgY anti-HSP65 de *Mycobacterium bovis*, para uso em imunodiagnóstico. Miyamoto *et al.* (2007) identificou um epítomo envolvido na troca conformacional da proteína priônica pra seu formato *scrapie* a partir da construção de scFvs de IgY.

A tecnologia do Anticorpo Recombinante, especialmente a produção de scFv, ampliou o desenvolvimento de novas terapias para várias doenças. Estudos de neutralização de HIV-1 por heteroligantes scFv-Fc são promissores (Mouquet *et al.*, 2012). Sentman & Zhang (2011) produziram um conjugado scFv-NKG2D para incrementar a imunoterapia no tratamento de alguns tipos de câncer. Há também a produção de diacorpos, ou scFvs dimerizados, visando a neutralização de Citomegalovírus (Carlsson *et al.*, 2012) e scFv-Fc para a neutralização de HSV-1 (Diebolder *et al.*, 2014). Dependendo da finalidade do tratamento e da resposta imune desejável associada, várias modificações podem ser feitas com esta tecnologia para a melhor performance dos anticorpos.

Não existem, no entanto, publicações sobre a produção de antivenenos baseados em scFvs de IgY. Como mencionado anteriormente, a publicação de Chiliza *et al.* (2008) foi a base para a obtenção de dados sobre a formação de biblioteca IgY de scFvs contra venenos. Para tal, a obtenção da sequência de RNAm da porção variável das cadeias pesada e leve de IgY foi necessária,

uma vez que estes dados não estavam disponíveis no GenBank. Os protocolos de extração de RNAm disponível para as aves foram limitados à extração das células de baço (Chiliza *et al.*, 2008), tornando impossível o controle da expressão de transcrições no processo de imunização. O método desenvolvido em nosso laboratório mostra resultados semelhantes em comparação com os relatados na literatura. Desta forma, um novo protocolo foi criado para observar a evolução da resposta imunitária humoral contra um antígeno específico.

A análise dos transcritos seguiu, neste momento, o padrão de qualidade avaliado imunologicamente dos anticorpos gerados em imunizações com o veneno integral. Assim, os anticorpos selecionados foram os obtidos nas imunizações finais, especialmente na nona. O modelo de scFv de IgY antiveneno apresentado representa o começo dos estudos para uma nova abordagem na produção de soros antiofídicos de alta qualidade, baseados em anticorpos engenheirados para neutralização de epítomos específicos de toxinas selecionadas. A utilização de frações específicas de alguns venenos em processos de imunização pode contribuir no isolamento de anticorpos específicos e suas respectivas sequências, para montagem de uma biblioteca de especificidades que permita a montagem de soros mono ou polivalentes adequados para diversas regiões, com completo controle de qualidade e reduzindo reações adversas características dos tratamentos convencionais.

7 – CONCLUSÃO

Os resultados obtidos permitiram as seguintes conclusões:

- Aves com boa resposta de titulação não são necessariamente boas produtoras de anticorpos para soros antiofídicos.
- Análises simples, por ELISA, de afinidade e avides, são capazes de determinar anticorpos de alta ou baixa afinidade.
- A análise conjunta de titulação, avides e afinidade deve ser empregada para determinar os animais que devem ser utilizados na produção de soros antiofídicos.
- Um animal não produzirá necessariamente um anticorpo de alta qualidade em uma imunização tardia, e pode haver perda de qualidade em imunizações imediatamente posteriores.
- É possível, com metodologia simples e aplicável como controle de qualidade, aumentar significativamente a qualidade dos soros antiofídicos produzidos classicamente.
- O processo de acompanhamento da evolução dos CDRs no processo de imunização está estabelecido no laboratório.
- A montagem de uma biblioteca de cDNA de frações variáveis de IgY começará a ser montada, visando a produção de scFvs com aplicabilidade na composição de antissoros de alta qualidade, ou mesmo em testes que exijam alto grau de sensibilidade.

8 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alexander IT, Stella MF, Brian JS & Rosaleen AC. 2009. The crystal structure of an avian IgY-Fc fragment reveals conservation with both mammalian IgG and IgE. *Biochemistry* **48**: 556-562.

Almeida CMC, Da Silva CL, Pena Couto H, Escocard RCM, Rocha DG, Sentinelli LP, Kipnis TL, Dias da Silva W. 2008. Development of process to produce polyvalent IgY antibodies anti-African snake venom. *Toxicon* **52**, 293-301.

Almeida CM, Kanashiro MM, Rangel Filho FB, Mata MF, Kipnis TL, da Silva WD. 1998. Development of snake antivenom antibodies in chickens and their purification from yolk. *Veterinary Record* **143**: 579–584.

Alvarez A, Montero Y, Jiménez E, Zerpa N, Parrilla P, Malavé C. 2013. IgY antibodies anti-*Tityus caripitensis* venom: Purification and neutralizations efficacy. *Toxicon* **74**: 208-214.

Anderson W & Mackay IR. 2013. Fashioning the immunological self: the biological individuality of F. Macfarlane Burnet. *J. Hist. Biol.*, epub.

Andrade FG, Eto SF, Ferraro ACNS, Marioto DTG, Vieira NJ, Cheirubim AP, Ramos SP, Venâncio EJ. 2013. The production and characterization of anti-bothropic and anti-crotalic IgY antibodies in laying hens: A long term experiment. *Toxicon* **66**: 18-24.

Araújo AS, Lobato ZIP, Chávez-Olórtegui C, Velarde DT (2010). Brazilian IgY-Bothrops antivenom: Studies on the development of a process in chicken egg yolk. *Toxicon* **55**: 739-744

Beghini DG, Damico DCS, da Cruz-Höfling MA, Rodrigues-Simioni L, Delatorre MC, Hyslop S, Marangoni S. 2008. Ability of rabbit antiserum against crotoxin to neutralize the neurotoxic, myotoxic and phospholipase A2 activities of crotoxin from *Crotalus durissus cascavella* snake venom. *Toxicology in vitro*, **22** (1):240-8

Behring EA & Kitasato S. 1890. Über das zustandekommen der diphterie-immunitat und der tetanus-immunitat bei thieren. *Dtsch. Med. Wochenschr.* **49**: 1113-4.

Belov K & Hellman L. 2006. Immunoglobulin genetics of *Ornithorhynchus anatinus* (platypus) and *Tachyglossus aculeatus* (short-beaked echidna). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A* **136**: 811–819.

Bennett CF, Chiang M, Lingardo LW, Wyatt JR. 1994. Sequence specific inhibition of human type II phospholipase A2 enzyme activity by phosphorothioate oligonucleotides. *Oxford Journals*, **22** (15): 3202-3209.

Bhanushali JK, Gilbert JM, McDougal LR, 1994. Simple method to purify chicken immunoglobulin. *G. Poult. Sci.* **73**, 1158-1161.

Bollen LS & Hau J. 1997. Immunoglobulin G in the developing oocytes of the domestic hen and immunospecific antibody response in serum and corresponding egg yolk. *In Vivo* **11**, 395–398.

Bon C, Changeux JP, Jeng TW, Fraenkel-Conrat H. 1979. Postsynaptic effects of crotoxin and its isolated subunits. *Eur. J. Biochem.* **99**, 471-481.

Bucarechi F, Herrera SRF, Hyslop S, Baracat ECE, Vieira RJ. 2002. Snakebites by *Crotalus durissus* ssp in children in Campinas, São Paulo, Brazil. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo*, **44** (3): 133-138.

Carlsson F, Trilling M, Perez F & Ohlin M (2012). A dimerized single-chain variable fragment system for the assessment of neutralizing activity of phage display-selected antibody fragments specific for citomegalovirus. *J. Immunol. Methods* **376**: 69-78.

Diebolder P, Keller A, Haase S, Schlegelmilch A, Kiefer JD, Karimi T, Weber T, Moldenhauer G, Kehm R, Eis-Hübinger AM, Jäger D, Federspil PA, Herold-Mende C, Dyckhoff G, Kontermann RE, Arndt MAE, Krauss J (2014). Generation of “Lymph Node Derived Antibody Libraries” (LYNDAL) for selecting fully human antibody fragments with therapeutic potential. *MAbs* **6** (1): 130-142.

Calzado EG, Marino EC, Chavez TS, Vazquez EL, Ochoa ZC, Schade R. 2003. Extraction of a monospecific Coombs-reagent from chicken eggs. *ALTEX* **20**, 21–25.

Cardoso JLC, Fan HW, França FOS, Jorge MT, Leite RP, Nishioka AS, Ávila A, Sano-Martins IS, Tomy SC, Santoro ML, Chudzinski AM, Castro SCB, Kamuguti AS, Kelen EMA, Hirata MH, Mirandola RMS, Theakston RDG, Warrell DA. 1993. Randomized Comparative Trial of Three Antivenoms in the Treatment of Envenoming by Lance-Headed Vipers (*Bothrops jararaca*) in São Paulo, Brazil. *Q J Med* **86**: 315-325.

Chiliza TE, Van Wyngaadt W, Du Plessis DH. 2008. Single-chain antibody fragments from a display library derived from chickens immunized with a mixture of parasite and viral antigens. *Hybridoma* **27** (6): 413-421.

Cser L, Gladkih IA, Hädige D & Ambrosius H. 1982. X-ray small-angle scattering study of general structure of chicken immunoglobulin Y. *Immunology Letters* **4**: 15–19.

Davalos-Pantoja L, Ortega-Vinuesa JL, Bastos-Gonzalez D & Hidalgo-Alvarez R. 2000. A comparative study between the adsorption of IgY and IgG on latex particles. *Journal of Biomaterial Sciences and Polymer Edition* **11**: 657–673.

Davalos-Pantoja L, Ortega-Vinuesa JL, Bastos-Gonzalez D & Hidalgo-Alvarez R. 2001. Colloidal stability of IgG- and IgY-coated latex microspheres. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **20**: 165–175.

Davison F, Kaspers B & Schat KA. 2008. Avian immunology. 1st Edition. *Academic Press* – Elsevier.

Dias da Silva W & Tambourgi DV. 2010. IgY: a promising antibody for use in immunodiagnostic and in immunotherapy. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **135** (3-4): 173-180.

Dohms JE, Saif YM & Bacon WL. 1978. Studies on metabolism and concentration of immunoglobulin G in the newly hatched turkey poult. *American Journal of Veterinary Research* **39**: 1466–1471.

Faith RE & Clem LW. 1973. Passive cutaneous anaphylaxis in the chicken. Biological fractionation of mediating antibody population. *Immunology* **25**: 151-164.

Faure G, Choumet V, Bouchier C, Camoin L, Guillaume JL, Monegier B, Bon C. 1994. The origin of the diversity of crotoxin isoforms in the venom of *Crotalus durissus terrificus*. *Eur. J. Biochem.* **223**: 161-164.

Faure G, Harvey AL, Thompson E, Saliou B, Radyany F, Bon C. 1993. Comparison of crotoxin isoforms reveals that stability of the complex plays a major role in its pharmacology action. *Eur. J. Biochem.* **214**: 491-496.

Gopalakrishnakone P, Hawgood BJ, Theakston RDG. 1981. Specificity of antibodies to the reconstituted crotoxin complex, from the venom of South American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*), using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and double immunodiffusion. *Toxicon* **19**, 131-139.

Gronski P, Seiler SR & Schwinck HG. 1991. Discovery of antitoxins and development of antibody preparations for clinical uses from 1890 to 1990. *Mol. Immunol.* **28**: 1321-32.

Guidolin FR, Tambourgi DV, Guidolin R, Marcelino JR, Okamoto CK, Magnoli FC, Queiroz GP, Dias da Silva W. 2013. Characterization of Anti-Crotalic Antibodies. *Toxicon* **66**: 7-17.

Gutiérrez JM. 2012. Snakebite Envenoming: A Public Health Perspective, Public Health - Methodology, Environmental and Systems Issues, Prof. Jay Maddock (Ed.), ISBN: 978-953-51-0641-8, *InTech*, Available from: <http://www.intechopen.com/books/public-health-methodology-environmental-and-systems-issues/snakebite-envenoming-a-public-health-perspective>

Gutiérrez JM, León G & Burnouf T. 2011. Antivenoms for the Treatment of Snakebite Envenomings: The Road Ahead. *Biologicals* **39** (3): 129-142.

Gutiérrez JM, Theakston RDG & Warrell DA. 2006. Confronting the Neglected Problem of Snakebite Envenoming: the Need for a Global Partnership. *PLoS Med.* **3**(6): e150.

Gutiérrez JM, Warrell DA, Williams DJ, Jensen S, Brown N, Calvete JJ, Harrison RA, for the Global Snakebite Initiative. 2013. The Need for Full Integration of Snakebite Envenoming Within a Global Strategy to Combat the Neglected Tropical Diseases. *PloS Negl. Trop. Dis.* **7**(6): e2162.

Gutiérrez JM, Williams D, Fan HW & Warrell DA. 2010. Snake Envenoming from a Global Perspective: Towards an Integrated Approach. *Toxicon* **56**: 1223-1235.

Hatta H, Tsuda K, Akachi S, Kim M & Yamamoto T. 1993. Productivity and some properties of egg yolk antibody (IgY) against human rotavirus compared with rabbit IgG. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* **57**: 450–454.

Harrison RA, Hargreaves A, Wagstaff SC, Faragher B, Laloo DG. 2009. Snake envenoming: a disease of poverty. *PLoS Negl Trop Dis* **3** (12): e569.

Harrison RA, Oliver J, Hasson SS, Bharati K, Theakston RDG. 2003. Novel sequences encoding venom C-type lectins are conserved phylogenetically and geographically distinct *Echis* and *Bitis* viper species. *Gene* **305**: 95-102.

Hau J, Westergaard JG, Svendsen P, Bach A, Teisner B. 1980. Comparison of the pregnancy-associated murine protein-2 and human pregnancy-specific β 1-glycoprotein. *Journal of Reproduction and Fertility* **60**: 115–119.

Hau J, Westergaard JG, Svendsen P, Bach A, Teisner B. 1981. Comparison of pregnancy-associated murine protein-1 and human pregnancy zone protein. *Journal of Reproductive Immunology* **3**: 341–349.

Hirai K, Arimitsu H, Umeda K, Yokota K, Shen L, Ayada K, Kodama Y, Tsuji T, Hirai Y, Oguma K. 2010. Passive oral immunization by egg yolk immunoglobulin (IgY) to *Vibrio cholerae* effectively prevents cholera. *Acta Med. Okayama* **64** (3): 163-170.

Holliger P & Hudson PJ (2005). Engineered Antibody Fragments and the Rise of Single Domains. *Nature Biotechnology* **23** (9): 1126-1136.

Höltje HD, Sippl W, Rognan D, Folkers G. 2003. Introduction to comparative protein modeling. In *Molecular Modeling: Basic Principles and Applications*. Weinheim: Wiley-VCH.

Janeway CA, Travers P, Walport M, Shlomchik M. 2002. *Imunobiologia: o sistema immune na saúde e na doença*. 5^a ed. *Artmed*.

Jaradat ZW & Marquardt RR. 2000. Studies on the stability of chicken IgY in different sugars, complex carbohydrates and food materials. *Food and Agricultural Immunology* **12**: 263–272.

Klemperer F. 1893. Ueber natürliche immunität und ihre verwerthung für die immunisirungstherapie. *Archiv für Experimentelle Pathologie und Pharmakologie* **31**: 356-382.

Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. **227**: 680-685.

Laloo DG & Thakston RD. 2003. Snake antivenoms. *J. Toxicol. Clin. Toxicol.* **41** (3): 277-90.

Larsson A, Carlander D, Wilhelmsson M. 1998. Antibody response in laying hens with small amounts of antigen. *Food and Agricultural Immunology* **10**: 29–36.

Laskowski RA, MacArthur MW, Moss DS, Thornton JM. 1993. PROCHECK: A Program To Check The Stereochemical Quality of Protein Structures. *J. Appl. Cryst.* **26**: 283-291

Leslie GA & Clem LW. 1969. Phylogeny of immunoglobulin structure and function. III. Immunoglobulins of the chicken. *J. Exp. Med.* **130**(6): 1337-1352.

Llewelyn MB, Hawlins RE & Russell SJ. 1992. Discovery of antibodies. *BMJ* **305**: 1269-72.

Lundqvist ML, Middleton DL, Radford C, Warr GW, Magor KE. 2006. Immunoglobulins of the non-galliform birds: Antibody expression and repertoire in the duck. *Dev. Comp. Immunol.* **30**(1-2): 93-100.

MacNalty AS. Emil von Behring, born March 15, 1854. 1954. *BMJ* **I**: 668-70.

Marchalonis JJ. 1977. Immunity in Evolution; 1st ed. Harvard: *Harvard University Press*.

Marcussi S, Santos PRS, Menaldo DL, Silveira LB, Santos-Filho NA, Mazzi MV, Silva SL, Stábeli RG, Antunes LMG, Soares AM. 2011. Evaluation of the genotoxicity of *Crotalus durissus terrificus* snake venom and its isolated toxins on human lymphocytes. *Mutation Research* **724**: 59-63.

Matheis W & Schade R. 2011. Development of an IgY-based rocket-immunoelectrophoresis for identity monitoring of Pertussis vaccines. *J. Immunol. Methods* **369** (1-2): 125-32.

Meenatchisundaram S, Parameswari G, Michael A, Ramalingam S (2008). Neutralization of the pharmacological effects of Cobra and Krait venoms by chicken egg yolk antibodies. *Toxicon* **52**: 221-227.

Miyamoto K, Kimura S, Nakamura N, Yokoyama T, Horiuchi H, Furusawa S, Matsuda H (2007). Chicken antibody against a restrictive epitope of prion protein distinguishes normal and abnormal prion proteins. *Biologicals* **35**: 303-308.

Mouquet H, Warncke M, Scheid JF, Seaman MS, Nussenzweig MC (2012). Enhanced HIV-1 neutralization by antibody heterologation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **109** (3): 875-880.

Mohammed SM, Morrison S, Wims L, Trinh KR, Wildeman AG, Bonselaar J, Etches RJ. 1998. Deposition of genetically engineered human antibodies into the egg yolk of hens. *Immunotechnology* **4**: 115–125.

Morrison SL, Mohammed SM, Wims LA, Trinh R & Etches R. 2001. Sequences in antibody molecules important for receptor-mediated transport into the chicken egg yolk. *Molecular Immunology* **38**, 619–625.

Muller VDM, Russo RR, Cintra ACO, Sartim MA, Alves-Paiva RM, Figueiredo LTM, Sampaio SV, Aquino VH. 2012. Crotoxin and phospholipase A2 from

Crotalus durissus terrificus showed antiviral activity against dengue and yellow fever viruses. *Toxicon* **59**: 507-515.

Nascimento N. 1991. Estudo comparativo entre crotoxina nativa e irradiada. Aspectos bioquímicos e farmacológicos. Dissertação de Mestrado – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares / Universidade de São Paulo. São Paulo.

Noll F, Lutsch G & Bielka H. 1982. Structure of IgG and IgY molecules in ribosome-antibody complexes as studied by electron microscopy. *Immunology Letters* **4**: 117–123.

Nguyen HH, Tumpey TM, Park H-J, Byun Y-H, Tran LD, Nguyen VD, Kilgore PE, Czerkinsky C, Katz JM, Seong BL, Song JM, Kim YB, Do HT, Nguyen T, Nguyen CV. 2010. Prophylactic and therapeutic efficacy of avian antibodies against influenza virus H5N1 and H1N1 in mice. *PloS ONE* **5** (4): e10152.

Obert B, Romijn RA, Houllier A, Huizinga EG, Girma JP. Characterization of bitiscetin-2, a second form of bitiscetin from the venom of *Bitis arietans*: comparison of its binding site with the collagen-binding site on the von Willerbrand factor A3-domain. 2006. *J. Thromb. Haemost.* **4** (7): 1596-601.

Oguiura, N, Camargo ME, da Silva ARP, Horton DSPQ. 2000. Quantification of crotamine, a small basic myotoxin, in south american rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*) venom by enzyme-linked immunosorbent assay with parallel-lines analysis. *Toxicon* **38**, 443-448.

Patterson R, Younger JS, Weigle WO & Dixon FJ. 1962. Antibody production and transfer to egg yolk in chickens. *Journal of Immunology* **89**, 272–278.

Paul K, Manjula J, Deepa EP, Selvanayagam ZE, Ganesh KA, Subba Rao PV 2007. Anti-*Echis carinatus* venom antibodies from chicken egg yolk: Isolation, purification and neutralization efficacy. *Toxicon* **50**: 893-900

Pauly D, Chacana PA, Calzado EG, Brembs B, Schade R. 2011. IgY technology: extraction of chicken antibodies from egg yolk by polyethylene glycol (PEG) precipitation. *JoVE* **51**.

Pürzel J, Schmitt R, Viertboeck BC, Göbel TW. 2009. Chicken IgY binds its receptor at the CH3/CH4 interface similarly as the human IgA: Fc alpha RI interaction. *The Journal of Immunology* **183** (7): 4554-9.

Rose ME, Orlans E, Buttress N. 1974. Immunoglobulin classes in the hen's egg: their segregation in yolk and white. *European Journal of Immunology* **4**: 521–523.

Russell WMS & Burch RL. 1959. The Principles of Humane Experimental Technique. *Methuen*.

Sali A, Potterton L, Yuan F, van Vlijmen H, Karplus M. 1995. Evaluation of comparative protein modeling by MODELLER. *Proteins* **23** (3): 318-326.

Sampaio SC, Brigatte P, Sousa-e-Silva MCC, dos-Santos EC, Rangel-Santos AC, Curi R, Cury Y. 2003. Contribution of crotoxin for the inhibitory effect of *Crotalus durissus terrificus* snake venom on macrophage function. *Toxicon* **41**: 899-907.

Sampaio SC, Rangel-Santos AC, Peres CM, Curi R, Cury Y. 2005. Inhibitory effect of phospholipase A2 isolated from *Crotalus durissus terrificus* venom on macrophage function. *Toxicon* **45**: 671-676.

Sampaio SC, Santos MF, Costa EP, Rangel-Santos AC, Carneiro SM, Curi R, Cury Y. 2006. Crotoxin induces actin reorganization and inhibits tyrosine phosphorylation and activity of small GTPases in rat macrophages. *Toxicon* **47**: 909-919.

Sano-Martins IS, Tomy SC, Campolina D, Dias MB, Amaral CFS, Rezende NA, Kamiguti AS, Warrell DA, Theakston RDG. 2001. Coagulopathy following lethal and non-lethal envenoming of humans by the South American rattlesnake (*Crotalus durissus*) in Brazil. *Q. J. Med.* **94**: 551-559.

Sasse M. 1998. *Experimente zur Induktion, Präparation und Charakterisierung aviärer vitelliner Antikörper gegen Endotoxine verschiedener gramnegativer Bakterien*. Doctoral Thesis. 140pp. Leipzig, Germany: Veterinary Medicine Faculty, University of Leipzig.

Schade R, Calzado EG, Sarmiento R, Chacana PA, Porankiewicz-Asplund J, Terzolo HR. 2005. Chicken Egg Yolk Antibodies (IgY-technology): A Review of Progress in Production and Use in Research and Human and Veterinary Medicine. *ATLA* **33**: 1-26.

Schade R, Staak C, Hendriksen C, Erhard MH, Hugel H, Koch G, Larsson A, Pollmann W, van Regenmortel M, Rijke E, Spielmann H, Steinbusch H & Straughan D. 1997. The production of avian (egg yolk) antibodies: IgY. The report and recommendations of ECVAM workshop 21. *ATLA* **24**: 925–934.

Schaeffer EL & Gattaz WF. 2006. Requirement of hippocampal phospholipase A2 for long-term memory. *J. Neural. Transm.* **114** (3): 379-385.

Schluter SF, Bernstein RM & Marchalonis JJ. 1997. Molecular origins and evolution of immunoglobulin heavy-chain genes of jawed vertebrates. *Immunol. Today* **18** (11): 543–549.

Schmidt P, Wiedemann V, Kühlmann R, Wanke R, Linckh E & Lösch U. 1989. Chicken egg antibodies for prophylaxis and therapy of infectious intestinal disorders. II. *In vitro* studies on gastric and enteric digestion of egg yolk antibodies specific against pathogenic *Escherichia coli* strains. *Journal of Veterinary Medicine B* **36**: 619–628.

Shimizu M, Nagashima H, Sano K, Hashimoto K, Ozeki M, Tsuda K & Hatta H. 1992. Molecular stability of chicken and rabbit immunoglobulin G. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* **56**: 270–274.

Shin SJ, Lee S-S, Manning EJB, Collins MT (2009). Production of and applications for a polyclonal IgY diagnostic reagent specific for *Mycobacterium avium* subsp. Paratuberculosis. *The Journal of Microbiology* **47** (5): 600-609.

Singer C & Underwood EA. 1962. A short history of medicine. 2nd ed. Oxford: Oxford University Press.

Slotta CH & Fraenkel-Conrat H. 1938. Purificação e cristalização do veneno da cobra cascavel. *Mem. Inst. Butantan* **12**, 505-513.

Stavnezer J & Amemiya CT. 2004. Evolution of Isotype switching. *Seminars in Immunology* **16**: 257-275.

Sun S, Mo W, Ji Y & Liu S. 2001. Preparation and mass spectrometric study of egg yolk antibody (IgY) against rabies virus. *Rapid Communication of Mass Spectrometry* **15**: 708–712.

Taylor AI, Sutton BJ & Calvert RA. 2010. Mutations in an avian IgY-Fc fragment reveal the locations of monocyte Fc receptor binding sites. *Developmental and Comparative Immunology* **34**: 97-101.

Theakston RD & Warrell DA. 2000. Crisis in snake antivenom supply for Africa. *Lancet* **356** (9247): 2104.

Theakston RD, Warrell DA, Griffiths E. 2003. Report of a WHO workshop on the standardization and control of antivenoms. *Toxicon* **41** (5): 541-57.

Towbin H, Stachelin T, Gordon J. 1979. Electrophoretic transfer of protein from polyacrilamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proc. Of Nat. Acad. Of Sci. USA.* **76**, 4350-4354.

Tressler RL & Roth TF. 1987. IgG receptors on the embryonic chick yolk sac. *J. Biol. Chem.* **262**, 15406-15412.

Utkin YN & Osipov AV. 2007. Non-Lethal Polypeptide Components in Cobra Venom. *Current Pharmaceutical Design* **13**: 2906-2915.

Van Wyngaardt W, Malatji T, Mashau C, Fehrsen J, Jordaan F, Miltiadou D, du Plessis DH (2004). A large semi-synthetic single-chain Fv phage display library based on chicken immunoglobulin genes. *BMC Biotechnology* **4**: 6.

Venom Supplies Pty Ltd. 2007. List of reptile specimens taken to be suitable for live import.

Vital-Brazil O. 1966. Pharmacology of crystalline crotoxin. II. Neuromuscular blocking action. *Mem. Inst. Butantan* **33**: 991-992.

Vital-Brazil O. 1982. Peçonhas. In: *Farmacodinâmica* (Corbett CE, 6 Ed.). Guanabara-Koogan, Rio de Janeiro, 1044-1074.

Warr GW, Magor KE & Higgins DA. 1995. IgY clues to the origins of modern antibodies. *Immunology Today* **16**: 392–398.

Warrell DA. 2010. Snake Bite. *Lancet* **375**: 77-88.

Warrell DA, Gutiérrez JM, Calvete JJ & Williams D. 2013. New Approaches & Technologies of Venomics to Meet the Challenge of Human Envenoming by Snakebites in India. *Indian J. Med. Res.* **138**: 38-59.

Warrell DA, Ormerod LD, Davidson NMCD. 1975. Bites by puff-adder (*Bitis arietans*) in Nigeria, and value of antivenom. *British Medical Journal* **4**: 697-700.

Wemmer S, Mashau C, Fehrsen J, van Wyngaardt W, du Plessis DH. 2010. Chicken scFvs and bivalent scFv-C(H) fusions directed against HSP65 of *Mycobacterium bovis*. *Biologicals* **38** (3): 407-14.

WHO Guidelines for the Production, Control and Regulation of Snake Antivenom Immunoglobulins. 2010. *WHO Press*, Geneva. 141p.

WHO Neglected Tropical Diseases: Snakebites (2009). Available: http://www.who.int/neglected_diseases/diseases/snakebites/en/. Acessado em 11 de Janeiro de 2014.

Yamamoto H, Watanabe H, Sato G & Mikami T. 1975. Identification of immunoglobulins in chicken eggs and their antibody activity. *Japanese Journal of Veterinary Research* **23**: 131–140.