

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia

Andreza Alves Belo

**PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE UM ANTICORPO MONOCLONAL
CONTRA OS VENENOS DAS SERPENTES *Bothrops alternatus* e *Bothrops neuwiedi***

Belo Horizonte
2021

Andreza Alves Belo

**PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE UM ANTICORPO MONOCLONAL
CONTRA OS VENENOS DAS SERPENTES *Bothrops alternatus* e *Bothrops neuwiedi***

Tese apresentada ao Programa Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutora em Bioquímica e Imunologia

Orientador: Prof. Dr. Carlos Delfin Chávez Olórtegui

**Belo Horizonte
2021**

043

Belo, Andreza Alves.

Produção e caracterização de um anticorpo monoclonal contra os venenos das serpentes *Bothrops alternatus* e *Bothrops neuwiedi* [manuscrito] / Andreza Alves Belo. – 2021.

112 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Delfin Chávez Olórtegui.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia.

1. Bioquímica e imunologia. 2. Venenos de Crotalídeos. 3. Anticorpos Monoclonais. 4. Serina Proteases. 5. Testes de Neutralização. I. Olórtegui, Carlos Delfin Chávez. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 577.1



ATA DA DEFESA DA TESE DE DOUTORADO DE ANDREZA ALVES BELO. Aos vinte e cinco dias do mês de fevereiro de 2021 às 14:00 horas, reuniu-se no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, de forma “on line” pela plataforma “meet.google.com”, a Comissão Examinadora da tese de Doutorado, indicada *ad referendum* do Colegiado do Curso, para julgar, em exame final, o trabalho intitulado “Produção e Caracterização de um Anticorpo Monoclonal Contra os Venenos das Serpentes *Bothrops alternatus* e *Bothrops neuwiedi*”, requisito final para a obtenção do grau de Doutor em Ciências: Bioquímica. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, Prof. Carlos Delfin Chavez Olortegui, da Universidade Federal de Minas Gerais, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra à candidata para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após a Comissão se reuniu, sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição do resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações: Dr. Jader dos Santos Cruz (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada; Dr. Marco Túlio Ribeiro Gomes (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada; Dr. Eladio Oswaldo Flores Sanchez (FUNED), aprovada; Dra. Larissa Magalhães Alvarenga (Universidade Federal do Paraná), aprovada; Dr. Carlos Delfin Chavez Olortegui - Orientador (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada. Pelas indicações a candidata foi considerada:

APROVADA

REPROVADA

O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o Presidente da Comissão encerrou a reunião e lavrou a presente Ata que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 25 de fevereiro de 2021.

Dr. Jader dos Santos Cruz (UFMG)

Dr. Marco Túlio Ribeiro Gomes (UFMG)

Dr. Eladio Oswaldo Flores Sanchez (FUNED)

Dra. Larissa Magalhães Alvarenga (Universidade Federal do Paraná)

Dr. Carlos Delfin Chavez Olortegui - Orientador (UFMG)

AGRADECIMENTOS

À Deus em primeiro lugar, por me possibilitar a realização deste trabalho e pela presença constante em minha vida.

Ao professor Dr. Carlos Chávez Olórtégui pela oportunidade de desenvolver este projeto em seu laboratório, pela orientação, pelos conhecimentos compartilhados e pelo apoio.

À Dra Dayane Naves de Souza por toda a contribuição neste projeto e pelo auxílio nos experimentos.

Aos professores do departamento de Bioquímica e Imunologia que contribuíram para minha formação, e aos que, gentilmente, cederam espaço em seus laboratórios, bem como emprestaram equipamentos quando precisei.

À secretaria do departamento de Bioquímica e Imunologia, pela atenção e ajuda em todos os momentos, principalmente ao Orlando (*in memoriam*) pela paciência e disposição em me atender sempre que precisei.

À professora Dra. Larissa Alvarenga pela disponibilidade em me ensinar a técnica para produzir anticorpos monoclonais.

À Dra. Marcela Braga pela colaboração e disponibilidade em discutir os resultados.

À Dra. Clara Guerra pela valiosa contribuição e correções do artigo.

À Letícia e Tamara pela amizade, pela ajuda em vários momentos, pela agradável convivência e pelas boas risadas.

Ao Denis pelo auxílio em diversos momentos, e principalmente, com o artigo.

À Patrícia pela amizade, incentivo, pela ajuda em vários momentos, por me ouvir nos momentos que precisei e pelas discussões dos resultados.

À Ana Flor por me ensinar a cuidar e imunizar os camundongos, e à Giovana por me ensinar a cultivar as células, etapas fundamentais nesse trabalho.

Ao Jamil pela disponibilidade em ajudar, sempre com boa vontade e bom humor, e pela amizade.

A todos os colegas e amigos do Labimq, pela convivência, ensinamentos e por toda ajuda, principalmente, à Raíssa, Carol, Sabrina, Rafael, Maria José e Tamyres.

A todos os colegas do departamento de Bioquímica e Imunologia, pela companhia e auxílio.

À Labtest pela oportunidade e confiança e aos colegas do CDICT por toda ajuda quando precisei.

Ao professor Dr. Leonides Resende pelo incentivo e palavras amigas.

Ao Dr. Márcio Basques pelos valiosos ensinamentos e pela torcida.

Ao meu pai Edimar (*in memoriam*) por tudo que fez pra eu chegar até aqui e pelos ensinamentos.

À minha mãe, Lourdes, pelo amor incondicional, pela compreensão nos momentos que estive ausente, pelas orações, pelo incentivo e apoio fundamentais em minha vida.

Às minhas irmãs, Alessandra e Aline pela paciência, compreensão, carinho e por acreditarem em meu trabalho e torcerem por mim.

Aos meus sobrinhos, Arthur e Yasmin, por encherem minha vida de alegria e felicidade, pelo amor e carinho, e por acrescentarem um sentido todo especial à minha vida.

Ao Guilherme, pelo companheirismo, compreensão e paciência nos momentos que eu estava estudando, pelo incentivo e torcida neste último ano desta jornada.

A todos os meus familiares (avós, tios, primos) e amigos pelo carinho e por torcerem por mim.

Aos membros da banca, pela disponibilidade em participar e pelas correções.

Às agências financiadoras, CNPq, CAPES e FAPEMIG, pelo fomento.

E a todos que de alguma maneira contribuíram para a realização desse trabalho.

“É a possibilidade de realizar um sonho que torna a vida interessante.” (Paulo Coelho)

RESUMO

No Brasil a maioria dos acidentes ofídicos registrados é causada por serpentes peçonhentas do gênero *Bothrops*. O tratamento convencional para intoxicação causada por acidentes ofídicos é a utilização de soros hiperimunes, que contém anticorpos produzidos por cavalos. No entanto, a produção desses antivenenos é altamente heterogênea, e sua utilização pode causar vários efeitos adversos. A produção de anticorpos monoclonais contra componentes dos venenos de serpentes, que neutralizam os efeitos tóxicos dos venenos, é uma alternativa terapêutica a antissoros convencionais, para ajudar na imunoterapia dos pacientes e melhorar a reprodutibilidade entre os lotes. Neste trabalho foi produzido um anticorpo monoclonal (mAb), a partir da imunização de camundongos com um pool de venenos de serpentes do gênero *Bothrops* (*B. alternatus*, *B. jararaca*, *B. jararacussu*, *B. moojeni*, e *B. neuwiedi*). Os ensaios de ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) e *Western blot* demonstraram que o mAb reconheceu os venenos de *B. alternatus* e *B. neuwiedi*, e foi denominado mAb anti-*Ba/Bn*. O mAb anti-*Ba/Bn* inibiu a atividade coagulante e a atividade amidásica sobre o substrato sintético, BA_pNa, para serinoproteases, causadas pelos venenos de *B. alternatus* e *B. neuwiedi*. Com o objetivo de caracterizar o mAb anti-*Ba/Bn*, ele foi imobilizado em coluna de Sepharose e os antígenos dos venenos de *B. neuwiedi* e *B. alternatus* foram fracionados por cromatografia de imunoafinidade, obtendo assim, as frações *B. neuwiedi* (*BnF*) e *B. alternatus* (*BaF*). A *BnF* apresentou atividade proteolítica sobre o substrato, acoplado a um sistema FRET (Abz-FLPR_SFRQ-EDD_{np}), específico para serinoproteases. A *BnF* e *BaF* apresentaram atividade amidásica sobre o substrato BA_pNA. Estas atividades, proteolítica e amidásica, foram significativamente inibidas pelo PMSF, inibidor de serinoprotease. A *BnF* degradou a subunidade A α do fibrinogênio humano e parcialmente a subunidade B β . No ensaio de incoagulabilidade *in vivo* foi observado que o sangue dos animais que receberam 50 μ g e 100 μ g de *BnF* não coagulou após 60 minutos da coleta. A análise proteômica bottom-up confirmou a prevalência de serinoproteases na *BnF*. As sequências de aminoácidos, de peptídeos gerados por digestão trípica da *BnF*, mostraram alta similaridade/identidade com a porção N-terminal de serinoproteases *thrombin-like*. Estes resultados indicam que a proteína reconhecida pelo mAb é uma serinoprotease *thrombin-like*.

Palavras-chave: venenos de *Bothrops*; anticorpo monoclonal; serinoprotease de *B. neuwiedi* e *B. alternatus*; ensaio de neutralização; atividade coagulante.

ABSTRACT

In Brazil, the majority of registered snakebite accidents are caused by venomous snakes of the *Bothrops* genus. The conventional treatment for snakebite envenoming is the use of hyperimmune sera, which contains antibodies produced by horses. However, the production of these antivenoms is highly heterogeneous, and their use can cause several adverse effects. The production of monoclonal antibodies against components of snake venoms, which neutralize the toxic effects of venoms, is a therapeutic alternative to conventional antisera, to assist in the immunotherapy of patients and improve reproducibility between batches. In this work, a monoclonal antibody (mAb) was produced from the immunization of mice with a pool of venoms from *Bothrops* snakes (*B. alternatus*, *B. jararaca*, *B. jararacussu*, *B. moojeni*, and *B. neuwiedi*). The ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) and Western blot assays demonstrated that the mAb recognized the *B. alternatus* and *B. neuwiedi* venoms called mAb anti-*Ba/Bn*. The mAb anti-*Ba/Bn* inhibited the coagulant activity and the amidase activity on the synthetic substrate, BApNa, for serino proteases, caused by *B. alternatus* and *B. neuwiedi* venoms. In order to characterize the mAb anti-*Ba/Bn*, it was immobilized on a Sepharose column and the antigens from the *B. neuwiedi* and *B. alternatus* venoms were fractionated by immunoaffinity chromatography, thus obtaining the *B. neuwiedi* fractions (*BnF*) and *B. alternatus* (*BaF*). *BnF* showed proteolytic activity on the substrate, coupled to a FRET system (Abz-FLPRSFRQ-EDDnp), specific for serino proteases. *BnF* and *BaF* showed amidase activity on the BApNA substrate. These proteolytic and amidase activities were significantly inhibited by PMSF, a serino protease inhibitor. *BnF* degraded the human fibrinogen A α subunit and partially the B β subunit. In the *in vivo* incoagulability assay, it was observed that the blood of animals that received 50 μ g and 100 μ g of *BnF* did not clot after 60 minutes of collection. Bottom-up proteomic analysis confirmed the prevalence of serine proteases in *BnF*. The amino acid sequences, of peptides generated by *BnF* tryptic digestion, showed high similarity/identity with the N-terminal portion of *thrombin-like* serino proteases. These results indicate that the protein recognized by the mAb is a serino protease *thrombin-like*.

Keywords: *Bothrops* snake venoms; monoclonal antibody; serine protease of *B. neuwiedi* and *B. alternatus* venom; neutralization assay; anticoagulant activity.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Incidência anual de algumas doenças tropicais negligenciadas.....	18
Figura 2 -	Acidentes causados por serpentes peçonhentas no Brasil no ano de 2019.....	18
Figura 3 -	Classes de toxinas e níveis de distribuição.....	20
Figura 4 -	Principais toxinas da glândula de veneno de <i>B. alternatus</i>	21
Figura 5 -	Mecanismo de ação das proteases de venenos de serpentes.....	24
Figura 6 -	Mecanismo de ação das fosfolipase A ₂	25
Figura 7 -	Mecanismo de ação das hialuronidases.....	26
Figura 8 -	Toxicidade causada por envenenamento por mordida de serpente.....	27
Figura 9 -	Esquema geral do fluxo de trabalho contemplando a sequência de realização das etapas.....	33
Figura 10 -	Representação esquemática dos ensaios imunológicos realizados para caracterização dos anticorpos monoclonais.....	37
Figura 11 -	Representação esquemática dos ensaios realizados para avaliar os antígenos obtidos através da purificação por afinidade do veneno <i>B. neuwiedi</i>	44
Figura 12 -	Purificação do veneno <i>B. neuwiedi</i> por imunoafinidade.....	46
Figura 13 -	Reatividade dos soros dos camundongos frente ao <i>pool</i> de venenos botrópicos por ELISA.....	59
Figura 14 -	ELISA do 1º screening após fusão de células.....	60
Figura 15 -	Avaliação da produção de anticorpo monoclonal durante 180 dias pelo método de ELISA.....	62
Figura 16 -	Reatividade do anticorpo monoclonal contra os diferentes venenos do <i>pool</i> de <i>Bothrops</i> (<i>B. alternatus</i> , <i>B. neuwiedi</i> , <i>B. jararaca</i> , <i>B. jararacussu</i> e <i>B. moojeni</i>).....	64
Figura 17 -	<i>Western blot</i> do <i>pool</i> de venenos de <i>Bothrops</i> (PVB), <i>B. neuwiedi</i> (B.n), <i>B. alternatus</i> (B.a), <i>B. moojeni</i> (B.m), <i>B. jararaca</i> (B.j) e <i>B. jararacussu</i> (B.ju) frente ao anticorpo monoclonal.....	65
Figura 18 -	Isotipagem do anticorpo monoclonal anti- <i>B. alternatus/B. neuwiedi</i>	66
Figura 19 -	Atividade fosfolipásica induzida pelo veneno de <i>B. neuwiedi</i> e ensaio de neutralização utilizando o monoclonal anti- <i>B. alternatus/B. neuwiedi</i>	68

Figura 20 -	Atividade hemorrágica induzida pelo veneno de <i>B. neuwiedi</i> e ensaio de neutralização utilizando o monoclonal anti- <i>B. alternatus/B. neuwiedi</i>	69
Figura 21 -	Ensaio de atividade coagulante do veneno de <i>B. neuwiedi</i>	70
Figura 22 -	Atividade coagulante induzida pelo veneno de <i>B. neuwiedi</i> e ensaio de neutralização utilizando o monoclonal anti- <i>B. alternatus/B. neuwiedi</i>	71
Figura 23 -	Atividade fosfolipásica induzida pelo veneno de <i>B. alternatus</i> e ensaio de neutralização utilizando o monoclonal anti- <i>B. alternatus/B. neuwiedi</i>	73
Figura 24 -	Ensaio de atividade coagulante do veneno de <i>B. alternatus</i>	74
Figura 25 -	Atividade coagulante induzida pelo veneno de <i>B. alternatus</i> e ensaio de neutralização utilizando o anticorpo monoclonal anti- <i>B. alternatus/B. neuwiedi</i>	75
Figura 26 -	<i>Western blot</i> da fração <i>Bothrops neuwiedi</i> e de <i>B. neuwiedi</i> , frente ao monoclonal anti- <i>B. alternatus/B. neuwiedi</i>	77
Figura 27 -	Ensaio de atividade hemorrágica de <i>B. neuwiedi</i> e da fração <i>Bothrops neuwiedi</i>	78
Figura 28 -	Ensaio de atividade coagulante da fração <i>Bothrops neuwiedi</i>	79
Figura 29 -	Ensaio de atividade proteolítica da fração <i>Bothrops neuwiedi</i> sobre os substratos para serinoprotease e metaloprotease.....	80
Figura 30 -	Ensaio de neutralização da atividade proteolítica da fração <i>Bothrops neuwiedi</i> sobre o substrato para serinoprotease.....	81
Figura 31 -	Ensaio de atividade fibrinogenolítica da fração <i>Bothrops neuwiedi</i>	82
Figura 32 -	Ensaio de atividade fibrinogenolítica da fração <i>Bothrops neuwiedi</i> em diferentes concentrações.....	83
Figura 33 -	Ensaio de atividade fibrinogenolítica da fração <i>Bothrops neuwied</i> em diferentes tempos incubação.....	84
Figura 34 -	Figura 34 - Ensaio de atividade fibrinogenolítica da fração <i>Bothrops neuwiedi</i> em diferentes temperaturas de incubação.....	85
Figura 35 -	Atividade amidásica da fração <i>Bothrops neuwiedi</i> sobre o BApNA.....	86

Figura 36 -	Diferentes famílias de proteínas identificadas por espectrometria de massa da <i>BnF</i>	88
Figura 37 -	Alinhamento do peptídeo da <i>BnF</i> com serinoproteases <i>thrombin-like</i> de venenos de serpentes do gênero <i>Bothrops</i>	89
Figura 38 -	Ensaio de atividade coagulante da fração <i>B. alternatus</i>	90
Figura 39 -	Ensaio de neutralização da atividade amidásica da fração <i>Bothrops alternatus</i> sobre o BApNA.....	91

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Hibridomas selecionados no 1º <i>screening</i> realizado por ELISA.....	61
Tabela 2 - Incoagulabilidade <i>in vivo</i>	87

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	<i>One-way analysis of variance</i>
BaF	<i>Bothrops alternatus fraction</i> (fração <i>Bothrops alternatus</i>)
BnF	<i>Bothrops neuwiedi fraction</i> (fração <i>Bothrops neuwiedi</i>)
BSA	<i>Bovine serum albumin</i> (albumina bovina)
CPPI	Centro de Produção e Pesquisa de Imunobiológicos
DFP	Diisopropilfluorofosfato
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMC	Dose mínima coagulante
DMH	Dose mínima hemorrágica
DP	Desvio padrão
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
FAD	Flavina adenina dinucleotídeo
FMN	Flavina mononucleotídeo
FRET	<i>Fluorescence Resonance Energy Transfer</i>
FUNED	Fundação Ezequiel Dias
HAT	Hipoxantina, Aminopterina e Timidina
HPLC	<i>High performance liquid chromatography</i>
IgG	Imunoglobulina G
LAAO	L-aminoácido oxidase
LC-MS/MS	Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa em <i>tandem</i>
mAb	<i>Monoclonal antibody</i> (anticorpo monoclonal)
mAb anti-B.a/B.n	Anticorpo monoclonal anti- <i>B. alternatus/B. neuwiedi</i>
OPD	Ortofenilenodiamina
PBS	Tampão fosfato salino

PLA2	<i>Phospholipase A₂</i> (Fosfolipase A ₂)
PMSF	Fluoreto de fenilmetilsulfonil
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio
SVMP	<i>Snake venom metalloprotease</i> (Metaloprotease)
SVSP	<i>Snake venom serine protease</i> (Serinoprotease)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
1.1 EPIDEMIOLOGIA DOS ACIDENTES OFÍDICOS	17
1.2 COMPOSIÇÃO DOS VENENOS BOTRÓPICOS E SINTOMAS DO ENVENENAMENTO	19
1.3 TRATAMENTO	27
2. OBJETIVOS	31
2.1 Geral	31
2.2 Específicos	31
3. MATERIAIS E MÉTODOS	32
3.1 ANIMAIS E VENENOS	32
3.2 PRODUÇÃO DOS ANTICORPOS MONOCLONAIS CONTRA OS VENENOS BOTRÓPICOS	32
3.2.1 Imunização dos camundongos e verificação da reatividade dos soros por ELISA	33
3.2.2 Cultivo de células de mieloma de camundongo (Sp2/0-Ag14)	34
3.2.3 Fusão dos esplenócitos e células Sp2/0-Ag14	35
3.2.4 Purificação dos anticorpos monoclonais	36
3.3 ENSAIOS IMUNOLÓGICOS	36
3.3.1 Análise da reatividade do anticorpo monoclonal pelo método ELISA	37
3.3.2 Análise da reatividade do anticorpo monoclonal por <i>Western blot</i>	38
3.3.3 Isotipagem do monoclonal anti- <i>B. alternatus/B. neuwiedi</i>	39
3.3.4 Verificação do potencial de neutralização dos anticorpos monoclonais	40
3.3.4.1 Neutralização da atividade fosfolipásica induzida pelo veneno de <i>B. neuwiedi</i>	40
3.3.4.2 Neutralização da atividade hemorrágica induzida pelo veneno de <i>B. neuwiedi</i>	41
3.3.4.3 Neutralização da atividade coagulante induzida pelo veneno de <i>B. neuwiedi</i>	41
3.3.4.4 Neutralização da atividade fosfolipásica induzida pelo veneno de <i>B. alternatus</i>	42
3.3.4.5 Neutralização da atividade coagulante induzida pelo veneno de <i>B. alternatus</i>	43
3.4 PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS ANTÍGENOS DE <i>B. neuwiedi</i>	43
3.4.1 Imobilização do Anticorpo Monoclonal em Matriz CNBr-Sepharose	44
3.4.2 Purificação dos antígenos de <i>B. neuwiedi</i> reconhecidos pelo anticorpo monoclonal anti- <i>B. alternatus/B. neuwiedi</i>	45
3.4.3 Análise do reconhecimento dos antígenos, purificados do veneno de <i>B. neuwiedi</i> , pelo anticorpo monoclonal anti- <i>B. alternatus/B. neuwiedi</i>	46
3.4.4 Caracterização da fração <i>Bothrops neuwiedi</i> (BnF)	47
3.4.4.1 Atividade hemorrágica	47
3.4.4.2 Atividade coagulante	47
3.4.4.3 Atividade proteolítica sobre substratos para serinoproteases e metaloproteases	48
3.4.4.4 Atividade fibrinogenolítica	49
3.4.4.5 Atividade fibrinogenolítica concentração dependente	50
3.4.4.6 Atividade fibrinogenolítica tempo dependente	50
3.4.4.7 Atividade fibrinogenolítica temperatura dependente	50
3.4.4.8 Atividade amidásica sobre o BapNa	51
3.4.4.9 Ensaio de incoagulabilidade	52
3.4.4.10 Identificação dos componentes proteicos por espectrometria de massa	53
3.5 AVALIAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS ANTÍGENOS DE <i>B. alternatus</i>	55
3.5.1 Purificação dos antígenos do veneno de <i>B. alternatus</i> reconhecidos pelo mAb anti- <i>B. alternatus/B. neuwiedi</i>	55
3.5.2 Caracterização da fração <i>Bothrops alternatus</i> (BaF)	56
3.5.2.1 Atividade coagulante	56
3.5.2.2 Atividade amidásica sobre o BApNA	56
3.6 Análise estatística	57
4. RESULTADOS	58

4.1	PRODUÇÃO DOS ANTICORPOS MONOCLONAIS CONTRA OS VENENOS BOTRÓPICOS	58
4.1.1	Imunização dos camundongos e verificação da reatividade dos soros por ELISA.....	58
4.1.2	Avaliação da reatividade dos anticorpos produzidos pelos hibridomas	59
	60	
4.1.3	Clonagem dos hibridomas selecionados	61
4.1.4	Avaliação da reatividade dos clones	61
4.2	ENSAIOS IMUNOLÓGICOS	64
4.2.1	Análise da reatividade do anticorpo monoclonal pelo método ELISA	64
4.2.2	Análise da reatividade do anticorpo monoclonal por <i>Western blot</i>	65
4.2.3	Isotipagem do monoclonal anti- <i>B. alternatus/B. neuwiedi</i>	66
4.2.4	Avaliação do potencial de neutralização do anticorpo monoclonal anti- <i>B. alternatus/B. neuwiedi</i>	67
	4.2.4.1 Ensaio de neutralização da atividade fosfolipásica induzida pelo veneno de <i>B. neuwiedi</i>	67
	4.2.4.2 Ensaio de neutralização da atividade hemorrágica induzida pelo veneno de <i>B. neuwiedi</i>	68
	4.2.4.3 Ensaio de neutralização da atividade coagulante induzida pelo veneno de <i>B. neuwiedi</i>	70
	4.2.4.4 Ensaio de neutralização da atividade fosfolipásica induzida pelo veneno de <i>B. alternatus</i>	72
	4.2.4.5 Ensaio de neutralização da atividade coagulante induzida pelo veneno de <i>B. alternatus</i>	73
4.3	PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS ANTÍGENOS DE <i>B. neuwiedi</i>	76
4.3.1	Análise do reconhecimento dos antígenos, purificados do veneno de <i>B. neuwiedi</i> , pelo anticorpo monoclonal anti- <i>B. alternatus/B. neuwiedi</i>	76
4.3.2	Caracterização dos antígenos da fração <i>Bothrops neuwiedi</i> (<i>BnF</i>)	77
	4.3.2.1 Atividade hemorrágica	77
	4.3.2.2 Atividade coagulante.....	78
	4.3.2.3 Atividade proteolítica sobre os substratos para serinoproteases e metaloproteases	79
	4.3.2.4 Atividade fibrinogenolítica	81
	4.3.2.5 Atividade fibrinogenolítica concentração-dependente.....	82
	4.3.2.6 Atividade fibrinogenolítica tempo-dependente	83
	4.3.2.7 Atividade fibrinogenolítica temperatura-dependente	84
	4.3.2.8 Atividade amidásica sobre o BApNA	85
	4.3.2.9 Ensaio de Incoagulabilidade	87
	4.3.2.10 Identificação dos componentes proteicos por espectrometria de massa.....	87
4.4	PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS ANTÍGENOS DE <i>B. alternatus</i>	89
4.4.1	Purificação dos antígenos de <i>B. alternatus</i> reconhecidos pelo anticorpo monoclonal anti- <i>B. alternatus/B. neuwiedi</i> 89	
4.4.2	Caracterização da fração <i>Bothrops alternatus</i> (<i>BaF</i>).....	90
	4.4.2.1 Atividade coagulante.....	90
	4.4.2.2 Atividade amidásica sobre o BApNA	90
5.	DISCUSSÃO	92
6.	CONCLUSÃO	100
7.	PERSPECTIVAS	101
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	102

1. INTRODUÇÃO

1.1 Epidemiologia dos acidentes ofídicos

O envenenamento por serpentes é um problema de saúde pública em muitos países tropicais e subtropicais em desenvolvimento. Cerca de 5,4 milhões de pessoas são mordidas anualmente, resultando em aproximadamente 100.000 mortes e 400.000 amputações (CHIPPAUX, 1998; WHO, 2020).

Os acidentes ofídicos são importantes responsáveis pela mortalidade e morbidade, principalmente de trabalhadores de áreas rurais dos países tropicais e subtropicais, como África subsaariana, sul e sudeste da Ásia, Papua Nova Guiné e América Latina (CHIPPAUX, 2011; HARRISON et al., 2009; MOHAPATRA et al., 2011).

A OMS, em 2017, classificou os acidentes ofídicos na Categoria A das Doenças Tropicais Negligenciadas. Essa nova situação poderá aumentar o acesso a novos financiamentos para pesquisas mais amplas e profundas e, também, expandir a acessibilidade dos antivenenos e a cooperação entre as partes interessadas, com o objetivo de melhorar a gestão de acidentes ofídicos nos países em desenvolvimento (CHIPPAUX, 2017). Comparado a outras doenças classificadas como tropicais negligenciadas, os acidentes ofídicos apresentam uma taxa de incidência superior a leishmaniose visceral, hanseníase e doença de Chagas (ARNOLD, 2016) (Figura 1).

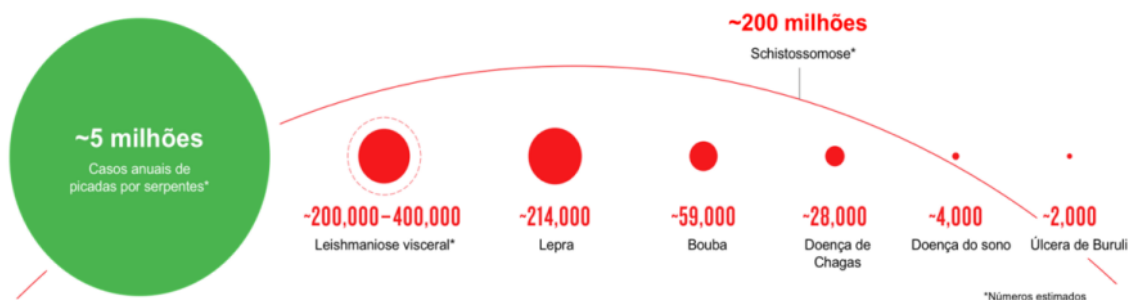


Figura 1 - Incidência anual de algumas doenças tropicais negligenciadas. A incidência dos acidentes ofídicos é superior à da maioria das doenças tropicais negligenciadas representadas, sendo inferior somente à Esquistossomose. (Adaptado de ARNOLD, 2016).

No Brasil, a maioria dos acidentes ofídicos registrados é causada por serpentes peçonhentas do gênero *Bothrops* spp., seguido por serpentes do gênero *Crotalus* spp., *Lachesis* spp. e *Micrurus* spp. (Figura 2). As serpentes do gênero *Bothrops* spp. foram responsáveis por 86,6% dos acidentes em 2019 (MINISTÉRIO DA SAÚDE DO BRASIL, 2019).

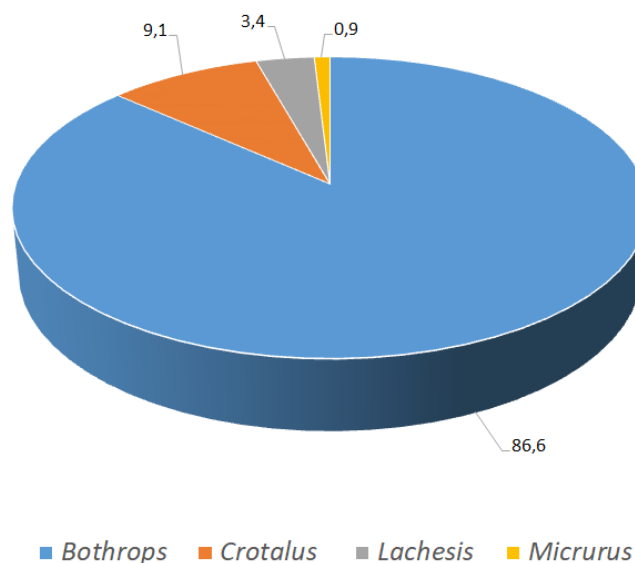


Figura 2 - Acidentes causados por serpentes peçonhentas no Brasil no ano de 2019. (Adaptado de MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2019 - Sistema de Informação de Agravos de Notificações, acesso em 21/03/2019).

Os acidentes botrópicos são causados por serpentes dos gêneros *Bothrops* spp., *Bothriopsis* spp. e *Botrocophias* spp., que formam o complexo *Bothrops* (CARRASCO et al., 2016). O complexo apresenta 29 espécies em todo o território nacional,

encontradas em diversos habitats, como rios e igarapés, áreas litorâneas e úmidas, agrícolas e periurbanas, cerrados e áreas abertas (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009).

1.2 Composição dos venenos botrópicos e sintomas do envenenamento

Os venenos de serpentes são uma complexa mistura farmacologicamente ativa de proteínas e polipeptídeos, produzidos e estocados em uma glândula altamente especializada. Também estão presentes citrato, íons metálicos, carboidratos, nucleotídeos e em menor proporção aminoácidos livres (RAMOS; SELISTRE-DE-ARAÚJO, 2006).

Dentre as proteínas com atividade enzimática isoladas de venenos botrópicos destacam-se as: L-aminoácido oxidases (LAAO), fosfolipases A₂ (PLA₂ - *Phospholipase A₂*), serinoproteases (SVSPs - *snake venom serine protease*) e metaloproteases (SVMPs - *snake venom metalloprotease*), cujas estruturas e mecanismos de ação vêm sendo elucidados por diferentes métodos (Figura 3). Estudos proteômicos e transcriptômicos revelaram que dentre as toxinas com alta atividade enzimática, as metaloproteases são as mais expressas em serpentes viperídeas e são as principais toxinas responsáveis pela hemorragia (CALVETE et al., 2009; GUTIERREZ et al., 2017; GUTIÉRREZ et al., 2009; LOMONTE et al., 2014; TASOULIS; ISBISTER, 2017; ZELANIS et al., 2010).

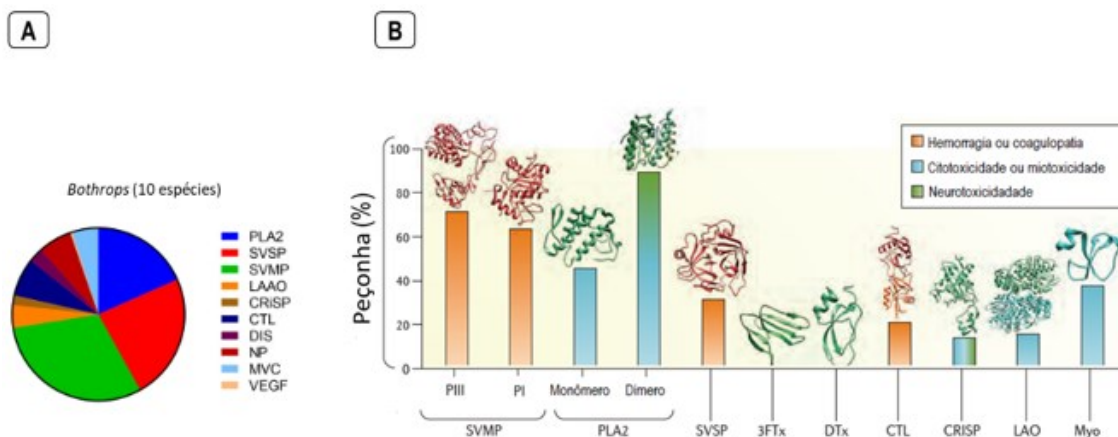


Figura 3 - Classes de toxinas e níveis de distribuição. **A)** Composição do veneno de *Bothrops* spp. baseado na análise proteômica de 10 espécies (Adaptado de Tasoulis e Isbister, 2017). **B)** Níveis de toxinas no veneno da família Viperidae (subfamília Viperanae e Crotalinae). O gráfico destaca as faixas de níveis de proteínas (expressos como % do proteoma total dos venenos). As barras são codificadas por cores de acordo com as atividades biológicas mais relevantes da família de toxinas correspondente. Gradientes de cor indicam dependência de concentração do efeito biológico (mesma cor) ou diferentes são codificadas por cores de acordo com as atividades biológicas mais relevantes da família de toxinas correspondente (Adaptado de Gutiérrez et al., 2017). Abreviações: SVMP, Metaloprotease do veneno de serpente (*snake venom metalloprotease*); PLA₂, Fosfolipase A2 (*phospholipase A₂*); SVSP, serinoprotease de veneno de serpente (*snake venom serine protease*); LAAO ou LAO, L- aminoácido oxidase (*L-amino acid oxidase*); CRiSP, proteína secretória rica em cisteína (*cysteine rich secretory protein*); CTL, Lectinas tipo C (*C-type lectin*); DIS, desintegrinas (*disintegrin*); NP, Peptídeo Natriurético (*natriuretic peptide*); VEGF, fator de crescimento endotelial vascular (*vascular endothelial growth factor*); MVC, menores componentes do veneno (*minor venom components*); DTx, dendrotoxina (*dendrotoxin*); 3FTx, Toxina three finger (*Three finger toxin*).

Essa mistura pode sofrer alteração em sua composição associada à variação de hábitat, dieta, sazonalidade, idade e gênero das espécies, e os mecanismos relacionados a estas modificações são pouco elucidados (CALVETE, 2011; GIBBS; SANZ; CALVETE, 2009; GUÉRCIO et al., 2006; MENEZES et al., 2006). Variação no proteoma/peptidoma do veneno baseada no gênero, também já foi verificada em *Bothrops jararaca*. Foi demonstrado que adultos machos e fêmeas apresentaram um perfil diferente na atividade proteolítica sobre o fibrinogênio e gelatina (ZELANIS et al., 2016).

Análise do transcriptoma de *Bothrops alternatus* demonstrou que as principais toxinas são metaloproteases (81%), principalmente a metaloprotease da classe P-III, peptídeo potencializador de bradicinina/peptídeo natriurético tipo-C (8,8%), fosfolipase A₂ (5,6%), essencialmente ácida, serinoprotease (1,9%) e lectinas tipo C (1,5%). Toxinas encontradas em menor quantidade foram L-aminoácido oxidase, proteínas secretoras ricas em cisteína (CRISPs), dipeptidilpeptidase IV, hialuronidase, toxinas *three finger* e oanina (Figura 4) (CARDOSO et al., 2010).

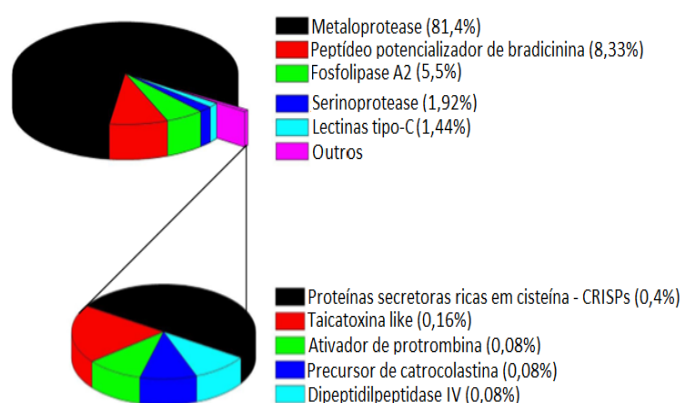


Figura 4 - Principais toxinas da glândula de veneno de *B. alternatus*. A parte superior mostra as toxinas encontradas em maior quantidade e a parte inferior, as toxinas encontradas em menor quantidade (Adaptado de CARDOSO et al., 2010).

Outro estudo analisou o proteoma de *Bothropoides pauloensis*, classificada inicialmente como *Bothrops neuwiedi pauloensis*, e verificou que as principais toxinas enzimáticas são metaloproteases (38,1%), fosfolipase A₂ (31,9%), serinoprotease (10,5%), L-aminoácido oxidase (2,8%) (RODRIGUES et al., 2012).

As LAAOs presentes nos venenos de serpentes são glicoproteínas ligantes de Flavina Adenina Dinucleotídeo (FAD) ou Flavina Mononucleotídeo (FMN), homodiméricas com massa entre 110 - 150 kDa (ZULIANI et al., 2009). No entanto, quando analisadas por SDS-PAGE, em condições redutoras e não-redutoras, a massa molecular varia de 50 - 70 kDa, indicando que os homodímeros não são ligados covalentemente (DU; CLEMETSON, 2002). Exibem preferência por aminoácidos

aromáticos e hidrofóbicos como a fenilalanina e a leucina (KANG et al., 2011). Vários estudos indicam que as LAAOs exercem um papel fundamental na toxicidade do veneno. Alguns sugerem que essas enzimas sejam responsáveis pela inibição da agregação plaquetária (SAKURAI et al., 2001), e outros que a agregação plaquetária e o efeito bactericida ocorram em função da produção do H_2O_2 produzido após sua atividade enzimática (LU et al., 2002; STÁBELI et al., 2004).

Os venenos botrópicos são ricos em enzimas proteolíticas, tais como metaloproteases e serinoproteases. Metaloproteases são enzimas hidrolíticas do tipo endopeptidases que dependem da ligação de um metal, geralmente o zinco, em seu sítio catalítico para manifestação de suas atividades. Estas enzimas variam amplamente em filogenia (de bactérias até mamíferos) e nas suas atividades *in vivo* (BLUNDELL, 1994).

Nos venenos de serpentes, as metaloproteases estão divididas em classes, baseadas na presença ou ausência de domínios (metaloprotease, desintegrina ou semelhante a desintegrina, rico em cisteína e domínio lectina), como a seguir: classe P-I (SVMPs que possuem apenas o domínio metaloprotease); PIIa a PIIe (possuem o domínio metaloprotease e domínios desintegrina. PIIIa a PIIIc (contêm o domínio metaloprotease, desintegrina-*like* e domínio rico em cisteínas e finalmente PIIId, anteriormente conhecida como PIV (contêm a estrutura de PIII e 2 domínios lectina tipo-C conectados por ligações dissulfeto) (ESCALANTE et al., 2011; FOX; SERRANO, 2005, 2008; OYAMA; TAKAHASHI, 2017). As diferenças na composição dos domínios explica a grande variação na massa molecular dessas proteases, que varia entre 22 e 100 kDa (GUTIÉRREZ; RUCAVADO, 2000). Já foi descrito também, que as metaloproteases do tipo P-III são as toxinas mais antigênicas do veneno do complexo *Bothrops*, e possuem alta identidade entre as espécies. Isto favorece a reatividade

cruzada entre os soros, em diferentes venenos, mesmo os que não foram adicionados ao *pool* de imunização (SOUSA et al., 2013).

As metaloproteases são responsáveis pela hidrólise dos componentes da membrana basal dos capilares, como o colágeno tipo IV, e matriz extracelular, enfraquecendo a estabilidade mecânica destes vasos, e provocando hemorragia, que é um dos principais efeitos do envenenamento por estas serpentes (Figura 5) (ESCALANTE et al., 2011; GUTIÉRREZ et al., 2016a; URS et al., 2013). A hemorragia sistêmica pode causar hipovolemia e choque cardiovascular (WARRELL, 2010). Estas enzimas também apresentam atividade fibrinogenolítica e fibrinolítica (BRAUD; BON; WISNER, 2000).

As serinoproteases são encontradas em vários animais, plantas e microrganismos e apresentam a tríade catalítica (Ser¹⁹⁵, His⁵⁷, Asp¹⁰²) conservada, que é um critério para classificar a proteína como serinoprotease (PERONA; CRAIK, 1995). Elas são inibidas pelos reagentes modificadores de serina como o PMSF (fluoreto de fenilmetilsulfonil) e DFP (diisopropilfluorofosfato) (SERRANO, 2013). A massa molecular das serinoproteases varia de 26 a 67 kDa, dependendo da quantidade de glicosilações (SERRANO; MAROUN, 2005). Elas são capazes de afetar a hemostasia pela interação com vários componentes do sistema da coagulação, seja por degradação proteolítica, por ativação ou inibição de fatores específicos envolvidos na coagulação, fibrinólise e agregação plaquetária (Figura 5) (MITRAKUL, 1979; URS et al., 2013). Serinoproteases *thrombin-like*, ou seja, que apresentam similaridade funcional com a trombina são encontradas em muitas espécies de serpentes. A maioria dessas enzimas não são inativadas pelo inibidor fisiológico, heparina-antitrombina III, e também, não ativam o fator XIII, que é estabilizador da fibrina, tornando o coágulo formado instável e frouxo. (CASTRO et al., 2004). Esta é uma propriedade interessante, que torna estas

serinoproteases fontes para desenvolvimento de novos agentes terapêuticos (KINI, 2006).

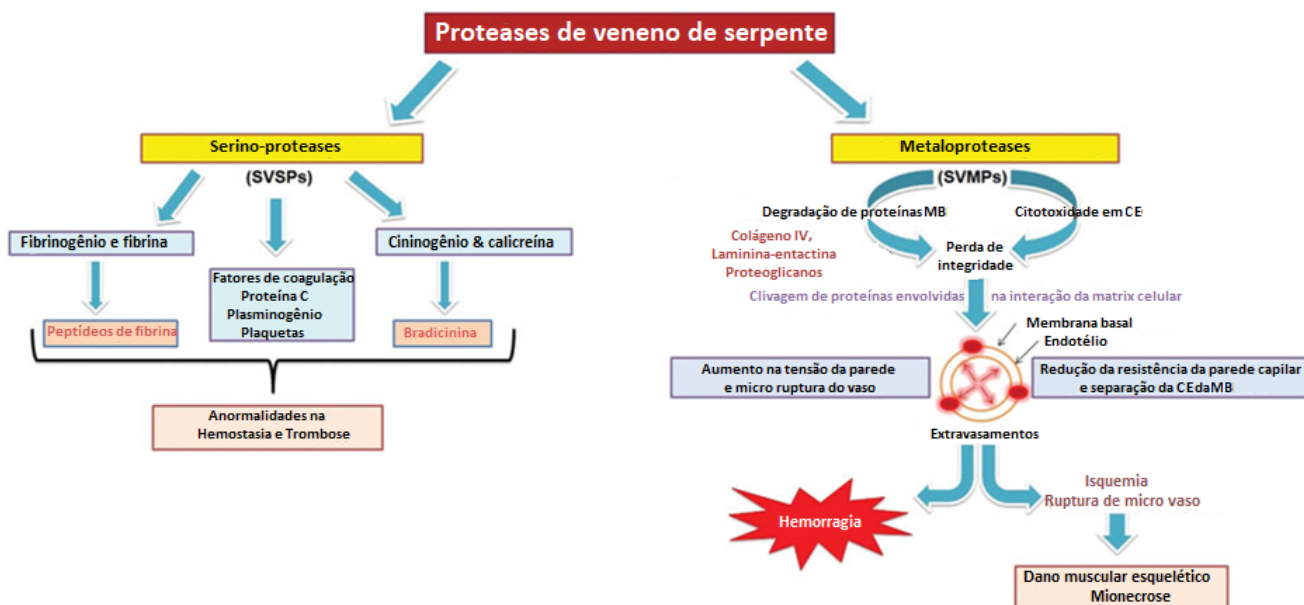


Figura 5 - Mecanismo de ação das proteases de venenos de serpentes. SVSPs: serino proteases de veneno de serpente (*snake venom serine protease*); SVMPS: Metaloproteases do veneno de serpente (*snake venom metalloprotease*); MB: membrana basal); CE: célula endotelial (Adaptado de URS et al., 2013).

Dentre essa variedade de enzimas que compõem o veneno, podemos também destacar as fosfolipases A_2 (PLA_2) que possuem a função de catalisar a hidrólise de fosfolípidos de membrana, liberando ácidos graxos livres e lisofosfolípidos, o que pode causar danos severos aos tecidos biológicos (HIGUCHI et al., 2007).

As fosfolipases A_2 podem ser encontradas em diversos sistemas biológicos e são enzimas que apresentam massa molecular entre 13 e 15 kDa (WARD et al., 2001). São importantes componentes miotóxicos dos venenos, que induzem degeneração nas células musculares, através da ligação e destruição das membranas das fibras musculares (MONTECUCCO; GUTIÉRREZ; LOMONTE, 2008; R. W. DIXON ;J. B. HARRIS, 1996). Algumas das fosfolipases A_2 atuam através da hidrólise dos fosfolípidos presentes na membrana plasmática, e outras, fosfolipases homólogas, cataliticamente inativas, atuam através de interações hidrofóbicas (GUTIÉRREZ;

OWNBY, 2003). Essas enzimas causam vários efeitos fisiológicos, como por exemplo, ações proinflamatórias, nociceptivas, edematogênicas e anticoagulantes (Figura 6) (KINI, 2006; NUNES et al., 2011; TAN; SAIFUDDIN; YONG, 1991; URS et al., 2013).

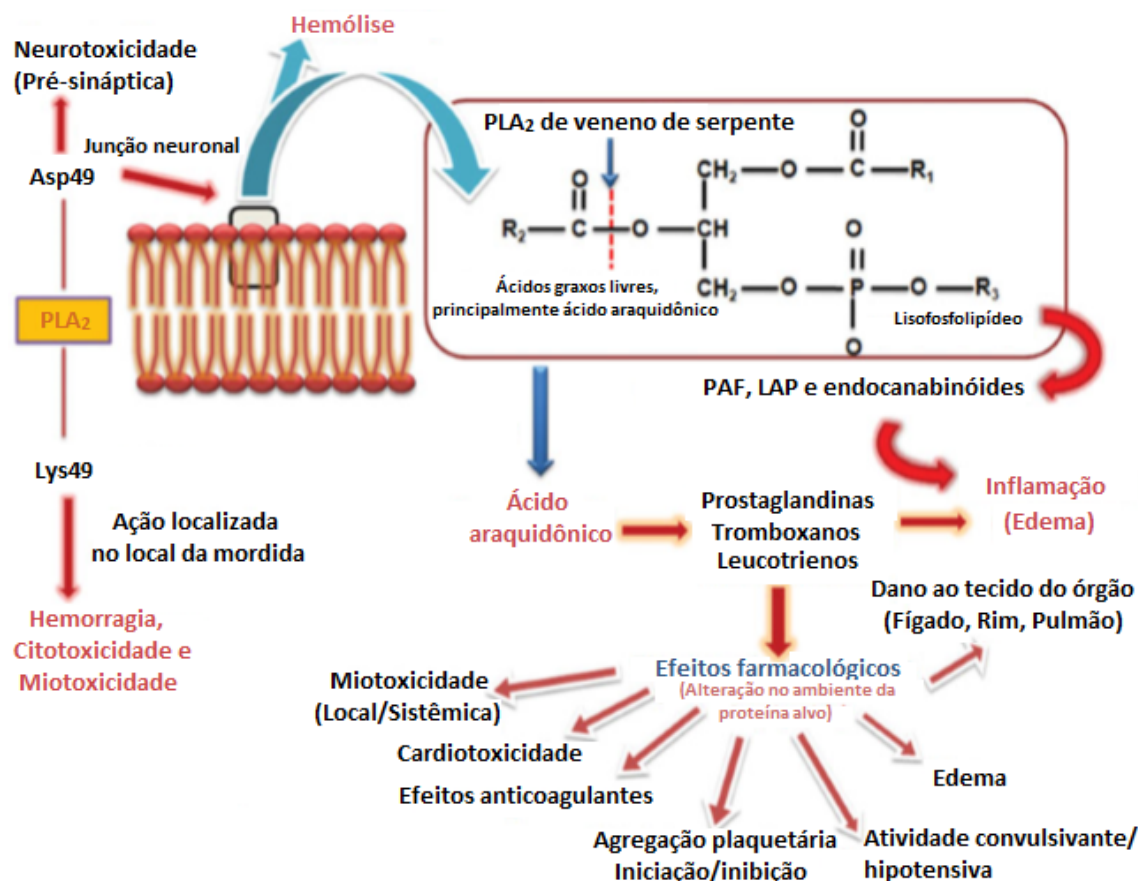


Figura 6 - Mecanismo de ação das fosfolipase A₂. PLA₂ : fosfolipase A₂ (*phospholipase A₂*); Asp49: Aspartato49 (*Aspartate49*); Lys49: Lisina49 (*Lysine49*); PAF: fator de ativação plaquetária (*platelet activating fator*); LPA: Lipoproteína A (*Lipoprotein-A*) (Adaptado de URS et al., 2013).

As hialuronidases desempenham importante papel no envenenamento, pois alteram a integridade da matriz extracelular através da degradação do ácido hialurônico, possibilitando assim, o espalhamento das demais toxinas e aumento dos sintomas (Figura 7) (FOX, 2013; GIRISH et al., 2002; URS et al., 2013). As hialuronidases, presentes em venenos de serpente, possuem peso molecular variando entre 33 kDa a 110

kDa, o que sugere heterogeneidade estrutural devido a modificações pós traducionais (CEVALLOS et al., 1992).

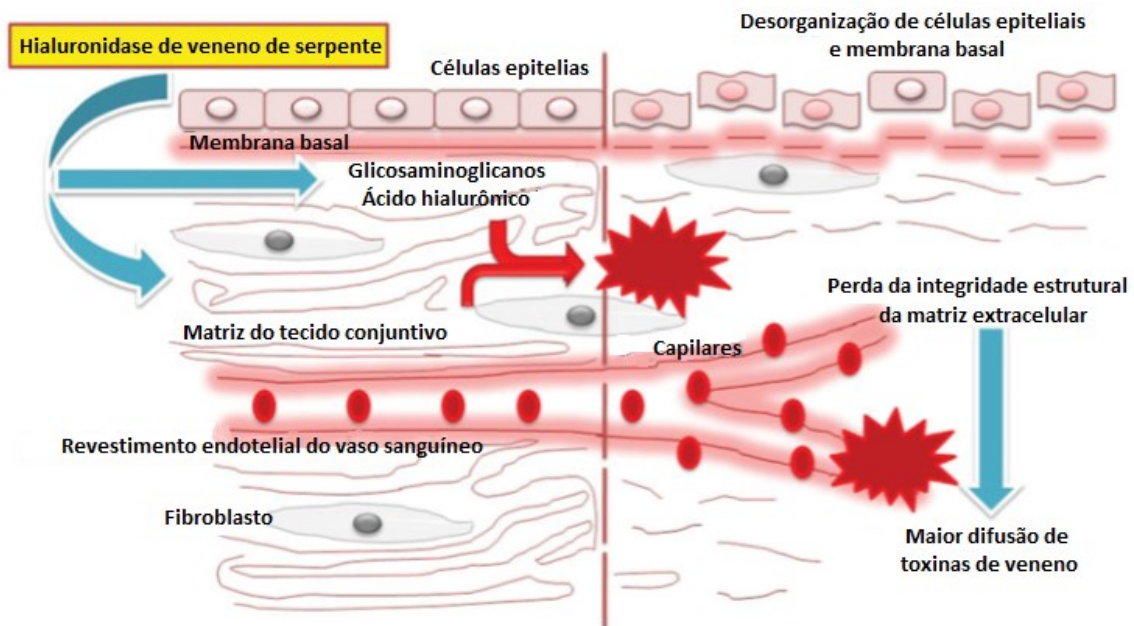


Figura 7 - Mecanismo de ação das hialuronidasas (Adaptado de URS et al., 2013).

A ampla variedade de manifestações clínicas está diretamente relacionada à alta complexidade e diversidade dos venenos de serpentes, que apresentam elevada variação bioquímica e toxicológica. De acordo com a descrição anterior, algumas toxinas causam dano tecidual local, caracterizado por edema, hemorragia e necrose, que podem resultar em sequela permanente e invalidez (Figura 8). Outras provocam manifestações sistêmicas como paralisia respiratória, hemorragia, coagulopatia, choque, insuficiência renal aguda, rabdomiólise e cardiotoxicidade (BRAUD; BON; WISNER, 2000; GUTIERREZ et al., 2017; URS et al., 2013; WHITE, 2005).

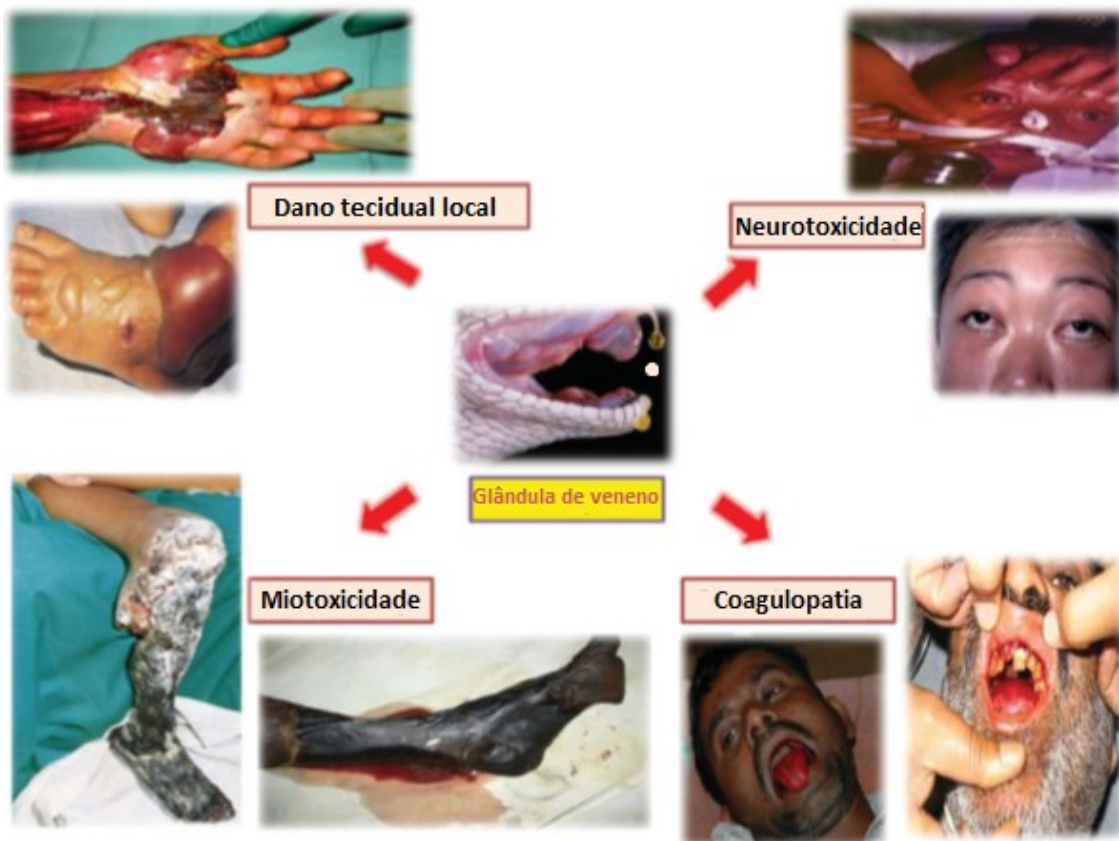


Figura 8 - Toxicidade causada por envenenamento por mordida de serpente (Adaptado de URS et al., 2013).

1.3 Tratamento

O tratamento para o envenenamento ofídico é feito através dos soros hiperimunes, que contém anticorpos produzidos por cavalos imunizados com antígenos específicos, preparados com os venenos das serpentes de interesse.

Diferentes antivenenos heterólogos são produzidos em muitos países com o objetivo de neutralizar os venenos das diferentes espécies animais (LAUSTSEN et al., 2018). No entanto, o fornecimento destes antivenenos em muitos países é insuficiente, o que gera sérias consequências econômicas e humanitárias (BROWN; LANDON, 2010). Além disso, os animais que são imunizados com os venenos para a produção dos soros têm baixa expectativa de vida e saúde debilitada. A produção dos antivenenos é altamente heterogênea e a melhora na sua qualidade, disponibilidade e acessibilidade

depende da ciência, tecnologia e da consciência das autoridades de saúde pública frente a relevância do problema (GUTIÉRREZ, 2012).

O soro anti-botrópico utilizado no Brasil é produzido pelo Instituto Butantan, Fundação Ezequiel Dias (FUNED), Centro de Produção e Pesquisa de Imunobiológicos (CPPI) e pelo Instituto Vital Brazil. A preparação do soro é feita através da imunização de cavalos com o *pool* de venenos: *Bothrops alternatus* (12,5%), *Bothrops jararaca* (50%), *Bothrops jararacussu* (12,5%), *Bothrops moojeni* (12,5%), e *Bothrops neuwiedi* (12,5%) (CARDOSO et al., 1993; QUEIROZ et al., 2008).

Para a obtenção do soro, o plasma dos cavalos é submetido à uma sequência de processos físicos e químicos para a purificação das imunoglobulinas (CHAIMOVICH, 2011). Os antivenenos produzidos em animais podem ser preparados de 3 maneiras diferentes: IgG total (150 kDa), fragmentos F(ab')₂ de imunoglobulina (100 kDa) ou fragmentos Fab de imunoglobulina (50 kDa), e tem perfil farmacocinético diferente devido a sua massa molecular (GUTIÉRREZ, J. M.; LEÓN, G.; LOMONTE, 2003). No entanto, a maioria dos anticorpos não está direcionado às toxinas do veneno de importância médica, e sim contra os antígenos aos quais o animal foi imunizado durante toda a vida. Assim, aproximadamente 70% das imunoglobulinas não são direcionadas contra componentes do veneno (LAUSTSEN et al., 2016a).

Em busca de melhorar tanto as questões relacionadas aos efeitos adversos da utilização dos antivenenos como as dificuldades na sua obtenção, disponibilidade e acessibilidade em várias partes do mundo, pesquisas de base biotecnológica têm sido realizadas, com o objetivo de produzir anticorpos em diferentes formatos para neutralizar toxinas de venenos (LAUSTSEN et al., 2018). Também, informações sobre a composição dos venenos, identificação e isolamento de toxinas têm contribuído para pesquisas de novos antivenenos baseados em moléculas pequenas, anticorpos e seus

fragmentos. O aumento no número dessas descobertas aponta para uma transição na utilização de antivenenos produzidos em animais para antivenenos baseados em biotecnologia moderna (LAUSTSEN et al., 2016b).

O desenvolvimento da tecnologia de hibridoma realizado por Köhler e Milsten em 1975, contribuiu muito para o desenvolvimento da medicina, pois abriu caminho para a produção de vários anticorpos monoclonais terapêuticos, e também, para aplicações relacionadas ao diagnóstico. Esta tecnologia consiste na fusão das células B do baço de camundongos imunizados, que secretam anticorpos, com células imortalizadas provenientes de mieloma de camundongo. Esse processo é realizado com o objetivo de torná-las imortais a fim de produzir quantidades ilimitadas de anticorpos com especificidade definida. Estes anticorpos são denominados monoclonais, uma vez que as células que os secretam são derivadas de um único clone produtor de imunoglobulinas idênticas (BAYER-GARNER; COTTLER-FOX; SMOLLER, 2003; KÖHLER; MILSTEIN, 1975). Desde o início da comercialização dos anticorpos monoclonais terapêuticos em 1986, a quantidade e variedade desses produtos biofarmacêuticos tem crescido significativamente, principalmente porque são altamente específicos (ECKER; JONES; LEVINE, 2015).

A produção de anticorpos monoclonais tem sido desenvolvida para complementar a utilização de drogas e vacinas ou até mesmo para suprir a necessidade de tratamento nos casos em que não existem terapias disponíveis. Além disso, a utilização de anticorpos é importante para combater doenças infecciosas nas quais alguns patógenos apresentam resistência a antibióticos, assim como na neutralização de efeitos tóxicos mediados por toxinas (IRANI et al., 2015).

A utilização de anticorpos monoclonais e/ou seus fragmentos tornam-se ótimas ferramentas para estudos antivenômicos que permitem obter maior conhecimento acerca

de quais toxinas são mais expressas em determinadas espécies e, com isso, tal abordagem pode abrir caminhos para novas pesquisas que visam o aperfeiçoamento na produção dos soros antiofídicos (CALVETE et al., 2009).

A produção desses monoclonais, que podem neutralizar os efeitos tóxicos dos venenos, seria uma alternativa terapêutica a antivenenos convencionais. A utilização de anticorpos monoespecíficos ou misturas desses anticorpos poderia auxiliar no desenvolvimento de imunoterapias mais específicas, que permitiriam a utilização de uma menor quantidade de antivenenos (ALVARENGA et al., 2005; FRAUCHES et al., 2013).

Após a produção dos monoclonais, outra etapa importante e responsável pelo sucesso da utilização terapêutica, é a humanização desses anticorpos, o que possibilita a utilização em humanos com menor ocorrência de efeitos colaterais. Os anticorpos monoclonais humanizados são compostos pela região determinante de complementariedade proveniente do anticorpo murino e o restante da molécula é de origem genética humana (JOHNSTON, 2007).

Com base nessa abordagem, o presente estudo busca a produção de anticorpos monoclonais com o objetivo de avaliar o seu potencial de reconhecimento frente a proteínas presentes em venenos botrópicos, a fim de propor uma estratégia que possibilite a utilização de terapia alternativa ou o enriquecimento do soro antiofídico com anticorpos anti-toxinas para a melhoria da soroterapia. Adicionalmente, este trabalho também objetiva verificar o potencial desses anticorpos em neutralizar as principais atividades biológicas dos venenos botrópicos, assim como identificar e caracterizar os antígenos reconhecidos pelos anticorpos monoclonais.

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

Produzir anticorpos monoclonais contra os venenos de serpentes do gênero *Bothrops* spp. como alternativas terapêuticas a soros equinos policlonais e bioferramentas no estudo e caracterização dos componentes dos venenos.

2.2 Específicos

- Selecionar hibridomas e clonar as células produtoras de anticorpos monoclonais contra proteínas presentes nos venenos botrópicos (*B. alternatus*, *B. jararaca*, *B. jararacussu*, *B. moojeni*, e *B. neuwiedi*);
- Obter anticorpos monoclonais purificados;
- Avaliar a imunorreatividade desses anticorpos frente aos diferentes venenos botrópicos e avaliar seu potencial de neutralização;
- Realizar a isotipagem dos anticorpos monoclonais;
- Caracterizar bioquimicamente os antígenos dos venenos botrópicos, obtidos por cromatografia de imunoafinidade realizada em coluna preparada com anticorpos monoclonais.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS E VENENOS

Camundongos Balb/c fêmeas (18-22 g), Swiss machos (18-22 g) e ratos Wistar (100-120 g) foram adquiridos no Biotério Central da Universidade Federal de Minas Gerais. Os animais foram mantidos em gaiolas coletivas e receberam água e ração *ad libitum*, sob condições ambientes controladas (temperatura de aproximadamente 23 °C e 12h de exposição a luz). Todos os experimentos foram conduzidos de acordo com as normas do Comitê de Ética em Experimentação animal da UFMG (CEUA/UFMG 152/2019).

Os venenos liofilizados de *B. alternatus*, *B. jararaca*, *B. jararacussu*, *B. moojeni* e *B. neuwiedi* foram fornecidos pela Fundação Ezequiel Dias (FUNED).

3.2 PRODUÇÃO DOS ANTICORPOS MONOCLONAIS CONTRA OS VENENOS BOTRÓPICOS

Para produzir anticorpos monoclonais contra venenos de serpentes do gênero *Bothrops*, primeiramente os camundongos foram imunizados com pool de venenos botrópicos, e em seguida foi realizada fusão dos esplenócitos dos camundongos e células de mielomas. Após a obtenção dos anticorpos monoclonais, foi realizada produção e purificação, e em seguida ensaios imunológicos e avaliação dos antígenos conforme esquema abaixo (Figura 9):

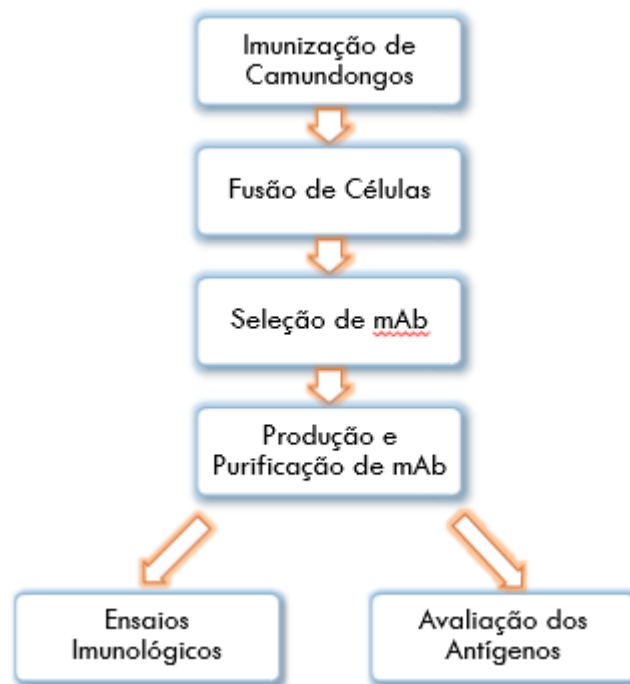


Figura 9 - Esquema geral do fluxo de trabalho contemplando a sequência de realização das etapas. Imunização dos camundongos, fusão de células, seleção de mAb, produção e purificação de mAb, ensaios imunológicos e avaliação dos antígenos. As últimas duas etapas serão descritas em outros tópicos. **mAb**: anticorpo monoclonal

3.2.1 Imunização dos camundongos e verificação da reatividade dos soros por

ELISA

Camundongos Balb/c foram imunizados com 4 doses do *pool* de veneno de cinco serpentes do gênero *Bothrops* spp., *B. alternatus* (12,5%), *B. jararaca* (50%), *B. jararacussu* (12,5%), *B. moojeni* (12,5%), e *B. neuwiedi* (12,5%). O intervalo entre a primeira e a segunda imunização foi de três semanas, entre a segunda e a terceira de dez dias e entre a terceira e a quarta de uma semana. As duas primeiras doses foram via subcutânea, e a terceira dose intraperitoneal, sendo a primeira com emulsão 1:1 (v/v) de 20 µg do *pool* de venenos e adjuvante de Freund completo e as demais com emulsão 1:1 (v/v) de 20 µg do *pool* de venenos e adjuvante de Freund incompleto. A quarta dose, um reforço endovenoso de 3 µg do *pool* de venenos em salina (NaCl 0,9% p/v), 3 dias antes da realização da etapa de fusão (ALVARENGA et al., 2003).

Sete dias após a terceira imunização os camundongos foram sangrados e a reatividade dos soros contra o *pool* de venenos foi avaliada por ELISA. Para realizar este ensaio, placas de poliestireno (Costar 3590) de 96 poços foram sensibilizadas, *overnight* entre 2 e 8 °C, com 0,5 µg/poço do *pool* de venenos de *Bothrops* spp. (*B. alternatus*, *B. jararaca*, *B. jararacussu*, *B. moojeni*, e *B. neuwiedi*) em tampão bicarbonato pH 9,6. O ensaio foi conduzido conforme previamente descrito por CHAVEZ-OLORTEGUI et al. (1991). As placas foram bloqueadas com 1% de albumina bovina (BSA) e 0,1% de tween 20 em tampão fosfato-salino (PBS) 50 mM. O soro dos camundongos na diluição 1:12800 (titulação prévia) foi incubado por uma hora a 37 °C. Na sequência, foi utilizado o anticorpo anti-mouse IgG conjugado com peroxidase (Anti-mouse IgG, Whole molecule, peroxidase-antibody produced in goat - Sigma) na diluição 1:3000. O substrato OPD (ortofenilenodiamina) foi utilizado para revelar a reação. A placa foi incubada no escuro por 30 minutos e a reação foi interrompida pela adição de 25 µL de ácido sulfúrico 2 M. A absorbância foi medida no leitor de microplacas (Biorad Modelo 680) a 490 nm.

O camundongo que apresentou soro mais reativo foi selecionado para receber o estímulo de imunização, ou seja, a dose de reforço, conforme citado anteriormente.

3.2.2 Cultivo de células de mieloma de camundongo (Sp2/0-Ag14)

A linhagem Sp2/0-Ag14, derivada de esplenócitos de camundongo Balb-c fusionados com mieloma, foi adquirida do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ). Estas células foram cultivadas em DMEM, *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* - high glucose, (Sigma-Aldrich), suplementado com soro fetal bovino 20% (v/v) (Sigma), 0,2% (v/v) de gentamicina (Gibco), nas primeiras 2 semanas. Após este período, o soro fetal bovino foi reduzido para 10% (v/v) e os demais componentes do meio de cultura

foram mantidos nas mesmas concentrações citadas anteriormente. Estas células foram mantidas em estufa a 37 °C, com atmosfera umidificada e gás carbônico (CO₂) a 5%.

3.2.3 Fusão dos esplenócitos e células Sp2/0-Ag14

Como descrito no item 3.2.1, após a dose de reforço endovenoso o camundongo selecionado foi eutanasiado e o baço foi removido. Os esplenócitos foram individualizados mecanicamente e fundidos às células Sp2/0-Ag14 com a utilização de polietilenoglicol 1500. As células foram distribuídas em 5 placas de 96 poços (Sarstedt) e foram cultivadas em DMEM, *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* - high glucose, (Sigma-Aldrich), suplementado com soro fetal bovino 20% (v/v) (Sigma-Aldrich), gentamicina 0,2% (v/v) (Gibco), penicilina/estreptomicina 100 U/mL/100 µg/mL (Gibco), glutamina 2 mM (Gibco), 2% de HAT Media Supplement (50x) Hibri-Max (Sigma-Aldrich), Hipoxantina, Aminopterina e Timidina, em estufa a 37 °C, com atmosfera umidificada e gás carbônico a 5%. Após a fusão das células, o meio de cultura foi trocado periodicamente, com intervalos de 3 ou quatro dias, ou quando o meio já se apresentava metabolizado (mudança de coloração).

Após 14 dias, a reatividade dos anticorpos produzidos pelos hibridomas (originados da fusão de células do baço do camundongo imunizado e de mieloma de camundongo), foi avaliada por ELISA, utilizando placas sensibilizadas com o *pool* de veneno de *Bothrops* spp., conforme descrito no item 3.2.1.

Os hibridomas mais reativos, selecionados por ELISA, foram submetidos a clonagem, por diluição limitante, para individualização das células. Estas foram contadas e plaqueadas em placas de 96 poços, contendo macrófagos intraperitoneais de camundongos não imunes, de modo a se obter apenas uma célula em cada poço. Foi selecionado o anticorpo monoclonal 1C9C11, correspondente ao poço reativo C11,

originado das células clonadas do poço C9 da placa mãe número 1. As células produtoras de anticorpos monoclonais foram expandidas e os sobrenadantes coletados para purificação do anticorpo.

3.2.4 Purificação dos anticorpos monoclonais

A purificação dos anticorpos (Imunoglobulina G) foi realizada com solução supersaturada de sulfato de amônio para concentração final de 50%. Cento e cinquenta mililitros desta solução foram gotejados lentamente ao mesmo volume de sobrenadante das células produtoras de anticorpo monoclonal, sob agitação lenta, em banho de gelo. A mistura foi incubada *overnight* entre 2 e 8 °C sob agitação. As imunoglobulinas precipitadas foram separadas por centrifugação (10000 xg por 30 minutos, a 4 °C). O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspendido em PBS 50 mM e dialisado contra PBS 5 mM, pH 7,4 (GRODZKI; BERENSTEIN, 2010). As imunoglobulinas foram quantificadas através da medida da absorbância em 280 nm e 260 nm no espectrofotômetro Biochrom Libra S22, utilizando a seguinte fórmula: Concentração de IgG (mg/mL) = 1,55 x A280 - 0,76 x A260 (WARBURG, O.; CHRISTIAN, 1941).

3.3 ENSAIOS IMUNOLÓGICOS

Com o objetivo de caracterização dos anticorpos monoclonais, foram realizados ensaios imunológicos de acordo com o esquema abaixo (Figura 10):

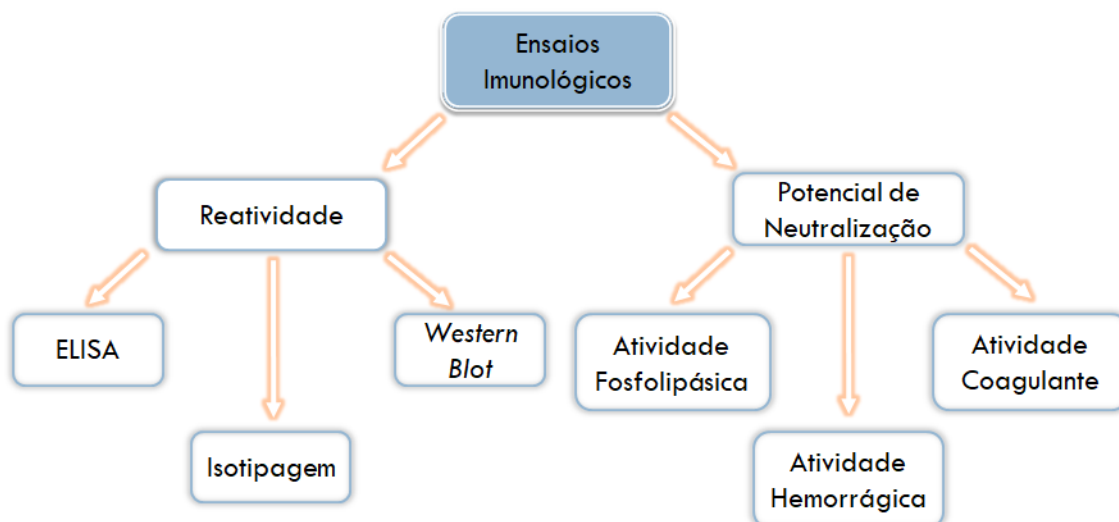


Figura 10 - Representação esquemática dos ensaios imunológicos realizados para caracterização dos anticorpos monoclonais. Avaliação da reatividade dos anticorpos por ensaios de ELISA e *Western Blot*, e isotipagem para verificar o tipo de IgG do monoclonal, e avaliação do potencial do monoclonal em neutralizar as atividades fosfolipásica, hemorrágica e coagulante.

3.3.1 Análise da reatividade do anticorpo monoclonal pelo método ELISA

A reatividade do anticorpo monoclonal obtido foi avaliada por ELISA, utilizando placas sensibilizadas com o *pool* de veneno de *Bothrops* spp., conforme descrito no item 3.2.1, com o objetivo de verificar a manutenção da produção deste anticorpo pelas células secretoras.

A reatividade do anticorpo monoclonal também foi avaliada utilizando placas de ELISA sensibilizadas *overnight* entre 2 e 8 °C, com 0,5 µg/poço dos venenos *B. alternatus*, *B. jararaca*, *B. jararacussu*, *B. moojeni* e *B. neuwiedi* separadamente. O sobrenadante das células produtoras do anticorpo monoclonal, diluído 1:4000, foi incubado por 1 hora a 37 °C. Na sequência foi utilizado o anticorpo de anti-mouse conjugado com peroxidase (Anti-mouse IgG, Whole molecule, peroxidase-antibody produced in goat - Sigma) na diluição 1:3000. O substrato OPD foi utilizado para revelar a reação. A placa foi incubada no escuro por 30 minutos e a reação foi

interrompida pela adição de 20 µL de ácido sulfúrico 2 M. A absorvância foi medida no leitor de microplacas (Biorad Modelo 680) a 490 nm.

3.3.2 Análise da reatividade do anticorpo monoclonal por *Western blot*

Com o objetivo de confirmar os resultados encontrados nos ensaios de ELISA e verificar a massa molecular da proteína, reconhecida pelo monoclonal, um *Western blot* foi realizado. Foram utilizados 5 µg de cada um dos cinco venenos que compõe o *pool* de *Bothrops* spp. (*B. alternatus*, *B. jararaca*, *B. jararacussu*, *B. moojeni*, e *B. neuwiedi*), e também, 5 µg do *pool* contendo estes venenos misturados. Estas amostras foram diluídas em tampão de amostra com redução (Tris-HCl 125 mM pH 6,8, glicerol 20% v/v, SDS 4% p/v, azul de bromofenol 0,010% p/v, β-mercaptoetanol 10% v/v). Em seguida, foram aquecidas a 100 °C por 5 minutos em banho-maria e aplicadas em um gel de eletroforese (SDS-PAGE) na concentração de 12,5% do gel de separação e 4% do gel de concentração, de acordo com LAEMMLI (1970). O tampão do eletrodo continha Tris-HCl 0,025 M, Glicina 0,19 M e SDS 0,1%, pH 8,3. A eletroforese foi realizada a uma voltagem de 200 V, até o indicador de azul de bromofenol alcançar o final do gel.

Após a eletroforese, as proteínas do gel foram transferidas para membranas de nitrocelulose (TOWBIN; STAEHELIN; GORDON, 1979). Posteriormente, a membrana foi bloqueada durante 1 hora com PBS-Tween 20 0,3% (v/v). Em seguida, a membrana foi lavada com PBS-Tween 20 0,05% (3 lavagens de 5 minutos) e incubada durante uma hora e meia com 1 µg/mL do anticorpo monoclonal diluído em PBS-Tween 20 0,05% (v/v). A membrana de nitrocelulose foi então lavada como descrito anteriormente e incubada por 1 hora com anticorpo anti-mouse conjugado com peroxidase (Anti-mouse IgG, Whole molecule, peroxidase-antibody produced in goat - Sigma) diluído

1:3000 em PBS-Tween 0,05%. Em seguida, a membrana foi lavada com PBS-Tween 0,05% como descrito previamente, e foi revelada por meio da adição do substrato para peroxidase (Diaminobenzidina/Cloronaftol - Sigma). Após a realização dos dois ensaios, que avaliaram a reatividade do anticorpo contra os venenos botrópicos, o monoclonal foi denominado mAb anti-*Bothrops alternatus/Bothrops neuwiedi* (mAb anti-*B. alternatus/B. neuwiedi* ou mAb anti-*Ba/Bn*).

3.3.3 Isotipagem do monoclonal anti-*B. alternatus/B. neuwiedi*

Para verificar a classe de imunoglobulina G (IgG) do monoclonal, foi realizada a isotipagem do anticorpo. São quatro os isotipos de IgG (IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4), cada um com domínios constantes estrutural e/ou funcional distintos.

A isotipagem do mAb anti-*B. alternatus/B. neuwiedi*, foi realizada utilizando a IsoStrip (Mouse Monoclonal Antibody Isotyping Kit - Roche), de acordo com as instruções do fabricante. Para realizar o ensaio, 1 µg do monoclonal foi diluído em 1 mL de PBS 50 mM contendo BSA 1%. Após diluição, 150 µL da solução foram adicionados ao tubo desenvolvimento, e incubados por 30 segundos entre 15 a 25 °C. Após este período, o tubo foi rapidamente agitado em vórtex, e em seguida a tira, com a parte preta direcionada para baixo, foi inserida no tubo desenvolvimento e mantida por um minuto. Na sequência, a tira foi retirada do tubo, e após 5 minutos, o resultado foi interpretado, de acordo com o aparecimento de uma banda azul, na região da tira contendo o isotipo de IgG ao qual o anticorpo pertence.

3.3.4 Verificação do potencial de neutralização dos anticorpos monoclonais

3.3.4.1 Neutralização da atividade fosfolipásica induzida pelo veneno de *B. neuwiedi*

Para detecção da atividade de fosfolipase indireta, foi utilizado o protocolo de MORENO et al. (1988), com modificações. O ensaio foi realizado em uma placa com gel de agarose contendo 1,2% (v/v) de eritrócitos de coelho, 1,2% (v/v) de gema de ovo como fonte de lecitina e 0,1 mM de CaCl₂. O veneno de *B. neuwiedi* degrada a lecitina presente no meio, acidificando-o. Conseqüentemente, essa redução do pH causa lise das hemácias presentes no gel de agarose, o que provoca a formação de um halo. A atividade indireta da fosfolipase foi determinada pela medida do diâmetro (em centímetros) dos halos translúcidos formados pelo veneno.

O veneno de *B. neuwiedi* foi colocado em contato com o gel em quantidade equivalente a 5 µg em tampão fosfato salino 50 mM pH 7,4 (PBS) para volume final de 32 µL.

Para verificar se o mAb anti-*B. alternatus/B. neuwiedi* inibia a atividade de fosfolipase indireta, o veneno de *B. neuwiedi* foi incubado a 37 °C por 60 minutos na mesma quantidade descrita acima, com o mAb anti-*B. alternatus/B. neuwiedi* nas proporções de 1:50 (5µg de *B. neuwiedi* e 250 µg de monoclonal) e 1:100 (5µg de *B. neuwiedi* e 500 µg de monoclonal). Após este período de pré-incubação, esta mistura foi colocada em contato com o gel e incubada a 37 °C em câmara úmida por 24 horas. A inibição da atividade fosfolipásica foi determinada pela medida do diâmetro (em centímetros) dos halos translúcidos formados pela mistura veneno e monoclonal, e foi comparada com o controle positivo (somente veneno). Foram realizados três ensaios independentes.

3.3.4.2 *Neutralização da atividade hemorrágica induzida pelo veneno de B. neuwiedi*

O ensaio de atividade hemorrágica foi realizado de acordo com MOLINA et al. (2018). Este ensaio foi realizado através de injeções intradérmicas no dorso dos ratos da linhagem Wistar. Os animais foram separados em três grupos distintos (controle negativo, controle positivo e teste) contendo dois animais em cada, sendo que cada animal recebeu duas injeções intradérmicas em lados opostos. No grupo controle positivo para hemorragia foram injetados 10 µg do veneno de *B. neuwiedi*, correspondente a duas doses mínimas hemorrágica (DMH) segundo CAMEY et al. (2002). No grupo controle negativo foi utilizada solução de PBS 50 mM, e no grupo teste foi injetado uma mistura de *B. neuwiedi* e mAb anti-*B. alternatus/B. neuwiedi* na proporção de 1:50 (10 µg de *B. neuwiedi* e 500 µg de monoclonal), para investigar a neutralização da hemorragia pelo anticorpo. O volume aplicado em cada animal foi de 50 µL. A mistura veneno e anticorpo foi incubada a 37 °C por uma hora antes da aplicação. Após duas horas da aplicação, os ratos foram eutanaziados, a pele do dorso foi removida e a área hemorrágica foi mensurada através do software Image J.

3.3.4.3 *Neutralização da atividade coagulante induzida pelo veneno de B. neuwiedi*

Para determinar a atividade coagulante do veneno de *B. neuwiedi* foram preparadas diferentes concentrações do veneno (0,5 µg; 1,5 µg; 2,5 µg e 3,5 µg) em volume final de 50 µL de uma solução contendo PBS 50 mM e CaCl₂ 10 mM, sendo realizadas triplicatas para cada concentração ensaiada. Em seguida, 50 µL das concentrações preparadas foram adicionados à 200 µL de plasma de coelho, colhido em anticoagulante citrato 3,6%, previamente incubado por 15 minutos a 37 °C. Na

sequência, o tempo necessário para a coagulação do plasma foi medido, em segundos, e a dose mínima coagulante (DMC) foi calculada. A DMC corresponde à menor dose de veneno capaz de coagular o plasma em 60 segundos à 37 °C (ASSAKURA, M. T; FURTADO, M. F.; MANDELBAU, 1992). Posteriormente, uma DMC (0,5 µg) do veneno de *B. neuwiedi* foi incubada a 37 °C por 60 minutos com mAb anti-*B. alternatus/B. neuwiedi*, nas proporções de 1:50 (0,5µg de *B. neuwiedi* e 25 µg de monoclonal) e 1:100 (0,5µg de *B. neuwiedi* e 50 µg de monoclonal), e depois 50 µL destas misturas foram adicionados a 200 µL do plasma citratado de coelho, previamente incubado por 15 minutos a 37 °C. Os tempos de coagulação do plasma foram medidos e comparados com o tempo obtido para o controle positivo (*B. neuwiedi*). Foram realizados três ensaios independentes.

3.3.4.4 Neutralização da atividade fosfolipásica induzida pelo veneno de *B. alternatus*

O ensaio foi realizado conforme citado no item 3.3.4.1.

O veneno de *B. alternatus* foi colocado em contato com o gel em quantidade equivalente a 5 µg em tampão fosfato salino pH 7,4 (PBS) para volume final de 32 µL.

Para verificar se o mAb anti-*B. alternatus/B. neuwiedi*, inibia a atividade de fosfolipase indireta, o veneno de *B. alternatus* foi incubado a 37 °C por 60 minutos na mesma quantidade descrita acima, com o mAb anti-*B. alternatus/B. neuwiedi* nas proporções de 1:50 (5µg de *B. alternatus* e 250 µg de monoclonal) e 1:100 (5µg de *B. alternatus* e 500 µg de monoclonal). Após incubação, o halo formado foi medido em centímetros. Foram realizados três ensaios independentes.

3.3.4.5 Neutralização da atividade coagulante induzida pelo veneno de *B. alternatus*

Para determinar a atividade coagulante do veneno de *B. alternatus* foram preparadas diferentes concentrações do veneno (15 µg; 20 µg; 30 µg; 35 µg e 40 µg) em volume final de 50 µL PBS 50 mM sendo realizadas triplicatas para cada concentração ensaiada. Em seguida, 50 µL das concentrações preparadas foram adicionados à 200 µL de plasma de coelho, colhido em anticoagulante citrato 3,6%, previamente incubado por 15 minutos a 37 °C. Na sequência, o tempo necessário para a coagulação do plasma foi medido, em segundos, e a dose mínima coagulante (DMC) foi calculada conforme descrito no item 3.3.4.3. Posteriormente, uma DMC (40 µg) do veneno de *B. alternatus* foi incubada a 37 °C por 60 minutos com o mAb anti-*B. alternatus/B. neuwiedi* nas proporções de 1:10 (40 µg de *B. alternatus* e 400 µg de monoclonal) e 1:20 (40 µg de *B. alternatus* e 800 µg de monoclonal). Em seguida, 50 µL destas misturas foram adicionados a 200 µL do plasma citratado de coelho, previamente incubado por 15 minutos a 37 °C, e o tempo de coagulação do plasma, em segundos, foi medido. Foram realizados três ensaios independentes.

3.4 PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS ANTÍGENOS DE *B.*

neuwiedi

Com o objetivo de continuar a caracterização do anticorpo monoclonal foi realizada purificação do veneno de *B. neuwiedi*, utilizando cromatografia de afinidade em coluna CNBr-Sepharose contendo o mAb anti-*B. alternatus/B. neuwiedi* acoplado. Após obtenção da fração purificada, foi realizada caracterização bioquímica desta fração, conforme o esquema abaixo (Figura 11):

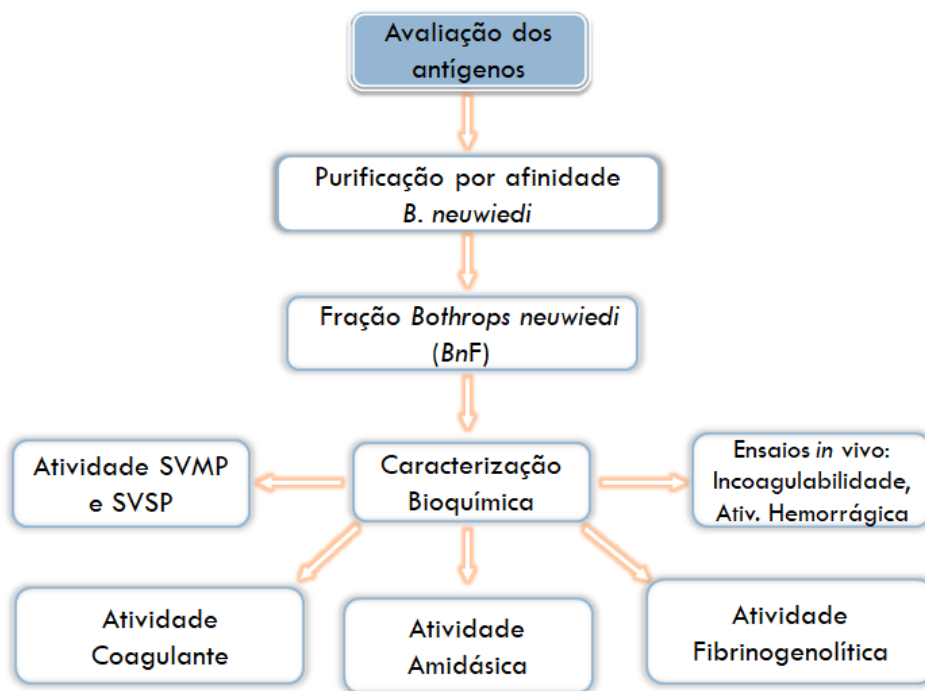


Figura 11 - Representação esquemática dos ensaios realizados para avaliar os antígenos obtidos através da purificação por afinidade do veneno *B. neuwiedi*. Purificação do veneno de *B. neuwiedi*, obtenção da fração *B. neuwiedi* e caracterização bioquímica através da realização das atividades SVMP e SVSP, coagulante, amidásica e fibrinogenolítica, e realização de ensaios *in vivo* (incoagulabilidade e atividade hemorrágica). **SVMP**: metaloprotease do veneno de serpente (*snake venom metalloprotease*); **SVSP**: serino proteases de veneno de serpente (*snake venom serine protease*).

3.4.1 Imobilização do Anticorpo Monoclonal em Matriz CNBr-Sepharose

A coluna de afinidade, contendo o mAb anti-*B. alternatus/B. neuwiedi* foi preparada de acordo com as recomendações do fabricante (Sigma). Previamente, 1 g da resina CNBr-Sepharose 4B foi ressuspendido em solução de HCl 1 mM, mantida sob leve agitação por 15 min e, em seguida, centrifugada por 3000 xg por 5 min à 4 °C. Posteriormente, a resina ativada foi lavada com tampão de acoplamento (0,1 M NaHCO₃, 0,5 M NaCl, pH 8,3) e centrifugada a 3000 xg por 5 min à 4 °C. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e a resina transferida para a solução contendo o anticorpo monoclonal (30 mg), previamente preparada. Esta mistura foi mantida sob leve agitação a 4 °C *overnight*. O derivado anticorpo-CNBr foi lavado com

tampão de acoplamento para a retirada do excesso de ligante, e em seguida, foi centrifugado a 3000 xg por 5 min à 4 °C. Após centrifugação, o sobrenadante foi descartado e a resina foi transferida para o tampão de bloqueio (Glicina 0,2 M pH 8, NaCl 0,5 M), a fim de bloquear os sítios de ligação remanescentes, e permaneceu sob agitação lenta por duas horas à temperatura ambiente. Finalizado o processo de acoplamento, a resina contendo anticorpos foi colocada em coluna e lavada 5 vezes alternadamente com tampão Acetato 0,1 M pH 4,0 contendo NaCl 0,5 M e com tampão de acoplamento.

3.4.2 Purificação dos antígenos de *B. neuwiedi* reconhecidos pelo anticorpo monoclonal anti-*B. alternatus/B. neuwiedi*

O veneno de *B. neuwiedi* (20 mg) foi dissolvido em 1 mL de tampão fosfato de sódio 20 mM, pH 7,0, foi centrifugado a 10000 xg por 10 minutos e o sobrenadante juntamente com mais 3 mL de tampão fosfato de sódio 20 mM foi incubado com a resina contendo o anticorpo monoclonal por 1 hora entre 2 e 8 °C. Em seguida, o líquido foi drenado e a coluna foi lavada com 30 volumes de tampão fosfato de sódio 20 mM. A fração do veneno ligada ao anticorpo presente na coluna foi eluída com glicina 0,1 M pH 2,8 e coletada em tubos Eppendorf contendo Tris 1 M pH 9,0 para elevar o pH para 7,0 (Figura 12). Este processo foi repetido por 15 vezes. A fração de antígenos reconhecida pelo anticorpo monoclonal foi denominada *Bothrops neuwiedi fraction* ou fração *Bothrops neuwiedi* (BnF). A absorbância a 280 nm foi mensurada e as frações correspondentes às várias repetições de purificação foram agrupadas. As amostras foram dialisadas contra PBS 10 mM, e posteriormente congeladas a - 20 °C.

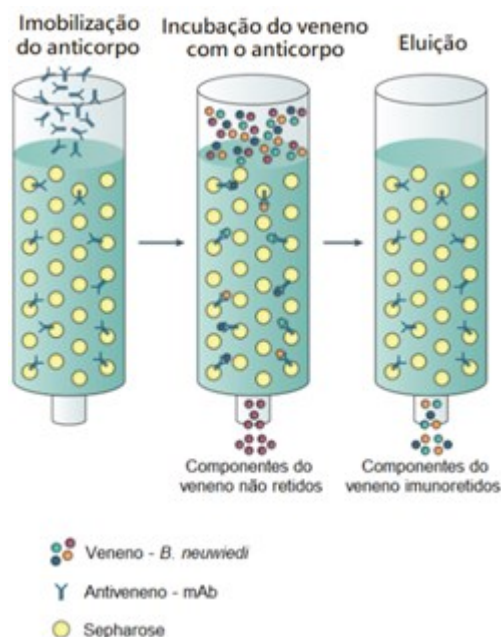


Figura 12 - Purificação do veneno *B. neuwiedi* por imunoafinidade. O veneno *B. neuwiedi* foi aplicado à coluna Sepharose contendo o mAb anti-*B. alternatus/B. neuwiedi* imobilizado. Após período de incubação do veneno com a resina, os componentes do veneno não retidos foram eluídos, e após lavagem da coluna com tampão os componentes retidos foram eluídos (fração *Bothrops neuwiedi*). **mAb:** anticorpo monoclonal anti-*B. alternatus/B. neuwiedi* (Adaptado de GUTIÉRREZ et al., 2017).

3.4.3 Análise do reconhecimento dos antígenos, purificados do veneno de *B. neuwiedi*, pelo anticorpo monoclonal anti-*B. alternatus/B. neuwiedi*

Para verificar o reconhecimento dos antígenos purificados, a partir do veneno de *B. neuwiedi*, pelo monoclonal anti-*B. alternatus/B. neuwiedi*, foi realizado um *Western blot*. Foram utilizados 5 µg da *BnF* e 5 µg do veneno de *B. neuwiedi*. Estas amostras foram diluídas em tampão de amostra com redução, aplicadas em um gel de eletroforese (SDS-PAGE), e em seguida, transferidas para membrana de nitrocelulose conforme descrito previamente no item 3.3.2.

3.4.4 Caracterização da fração *Bothrops neuwiedi* (BnF)

3.4.4.1 Atividade hemorrágica

O ensaio de atividade hemorrágica foi realizado conforme item 3.3.4.2. Os animais (camundongos Swiss machos) receberam injeções intradérmicas no dorso. Foram utilizados 3 grupos de animais. No grupo controle positivo da hemorragia (n=3) foram injetados 10 µg do veneno de *B. neuwiedi*, no grupo controle negativo (n=3) foi utilizada apenas solução de PBS 50 mM, e no grupo teste (n=3) foram injetadas 10 µg da fração *Bothrops neuwiedi*. Após 2 horas da aplicação os camundongos foram eutanaziados, a pele do dorso removida e a área hemorrágica foi mensurada utilizando o software Image J.

3.4.4.2 Atividade coagulante

A atividade coagulante das amostras foi realizada segundo ASSAKURA et al. (1992), com algumas modificações. Para essas reações foram utilizados 200 µL de plasma de coelho citratado, previamente incubado a 37 °C por 15 minutos, e as amostras a serem testadas foram diluídas em volume final de 50µL de uma solução contendo PBS 50 mM e CaCl₂ 10 mM. A DMC da fração *Bothrops neuwiedi* (9 µg), foi previamente determinada, assim como descrito anteriormente no item 3.3.4.3.

As amostras foram ensaiadas em triplicata nas concentrações de 4,5 µg, 9,0 µg e 13,5 µg da fração *Bothrops neuwiedi* em volume final de 50 µL em PBS 50 mM e CaCl₂ 10 mM. Assim que a amostra era adicionada ao plasma, o cronômetro era acionado registrando o tempo (em segundos) necessário para a formação da rede de fibrina. Os tempos obtidos foram comparados ao tempo do controle negativo, em que foi adicionado apenas PBS 50 mM e CaCl₂ 10 mM, utilizado para diluir a fração. Foram realizados 3 ensaios independentes.

3.4.4.3 Atividade proteolítica sobre substratos para serinoproteases e metaloproteases

A atividade proteolítica da fração *Bothrops neuwiedi* foi testada *in vitro* utilizando dois substratos acoplados a um sistema FRET (*Fluorescence Resonance Energy Transfer*): (1) o substrato Abz-LVEALYQ-EDDnp, apresenta a sequência de aminoácidos que a ligação peptídica pode ser clivada por SVMP na posição Ala14-Leu15 (SCHNEIDER et al., 2014); (2) o substrato Abz-FLPRSFRQ-EDDnp, que contém uma Arg na posição P1, possibilitando sua clivagem por SVSP (ZELANIS et al., 2015).

Para verificar a atividade de metaloproteases, o ensaio foi conduzido conforme descrito por SCHNEIDER et al. (2014), em microplaca de 96 poços, utilizando 1 µg do veneno de *B. neuwiedi* (controle positivo) ou 1 µg da fração *Bothrops neuwiedi* e os substratos a uma concentração final de 47 mM. A hidrólise foi medida a 340 nm de excitação e 440 nm de emissão em fluorímetro (Synergy 2, Biotek). Para mensurar a atividade de serinoproteases, as amostras foram pré-incubadas com EDTA 2 mM por 1 hora, para prevenir a degradação inespecífica por metaloproteases. Em seguida, o mesmo procedimento descrito anteriormente foi realizado, porém utilizando o substrato contendo o sítio de clivagem para serinoproteases.

Posteriormente, com o objetivo de investigar melhor a atividade de serinoproteases, a atividade proteolítica da fração *Bothrops neuwiedi* foi avaliada novamente utilizando o substrato para serinoprotease, no entanto, foi avaliada também, juntamente com o mAb anti-*B. alternatus* /*B. neuwiedi* na proporção de 1:25 (1 µg de *B. neuwiedi* e 25 µg de monoclonal) e com o inibidor de serinoprotease PMSF 0,1 mM/µg. Foram realizados três ensaios independentes.

3.4.4.4 Atividade fibrinogenolítica

A atividade fibrinogenolítica foi realizada de acordo com o método empregado por REGO et al. (2018) com modificações, e analisada através de eletroforese em gel (SDS-PAGE) na concentração de 10%. Uma solução contendo 2 mg/mL de fibrinogênio humano (*Fibrinogen From Human Plasma*, Sigma) foi preparada previamente em tampão Tris-HCl 25 mM, NaCl 150 mM, pH 7,4. Foram utilizados 5,0 µg da fração *Bothrops neuwiedi* e 25 µg de fibrinogênio. Como controle negativo foram utilizados apenas 25 µg de fibrinogênio e como controle positivo 5 µg do veneno de *B. neuwiedi* e 25 µg de fibrinogênio. As amostras foram diluídas em PBS 50 mM, para volume final de 12,5 µL. Após incubação das amostras (12,5 µL) com o fibrinogênio (12,5 µL) na estufa a 37 °C por 3 h, 12,5 µL de tampão de redução (Tris-HCl 125 mM pH 6,8, glicerol 20% v/v, SDS 4% p/v, azul de bromofenol 0,010% p/v, β-mercaptoetanol 10% v/v) foram adicionados às amostras e estas foram desnaturadas por ebulição durante 5 minutos. Em seguida, as amostras foram aplicadas no gel e a corrida foi realizada a 200V.

Juntamente com as amostras citadas anteriormente, 2 outras amostras, contendo a fração *Bothrops neuwiedi* e inibidores, também foram analisadas. Estas duas amostras foram previamente incubadas com o inibidor por 1 h a 37 °C antes da adição do fibrinogênio. Uma delas continha 5 µg da fração *Bothrops neuwiedi* e 5 mM de ácido etilenodiaminotetracético (EDTA, Labsynth), que é um inibidor de metaloprotease, e a outra, continha 5 mM de PMSF, que é um inibidor de serinoprotease. Como metaloprotease e serinoprotease podem ter atividade fibrinogenolítica, o EDTA e o PMSF foram utilizados com o objetivo de investigar a ação isolada de metaloprotease ou serinoprotease na fração *Bothrops neuwiedi*.

Terminada a migração, o gel foi corado em solução de *Coomassie Blue* - R250

0,25% em água, ácido acético 9% e metanol 45% e descorado em solução de ácido acético a 7% e etanol 35% para posterior análise.

3.4.4.5 Atividade fibrinogenolítica concentração dependente

Assim como descrito no item anterior, a atividade fibrinogenolítica da fração *Bothrops neuwiedi* foi testada em diferentes concentrações da proteína, com o objetivo de verificar qual seria a concentração ideal para ser utilizada nos demais experimentos. Foram utilizadas as seguintes concentrações da *BnF*, 0,5 µg; 1,0 µg; 2,5 µg; 5,0 µg; 10 µg e 20 µg, diluídas em PBS 50 mM, em um volume final de 12,5µL. A quantidade de fibrinogênio foi a mesma utilizada anteriormente, 25 µg. O tempo de incubação a 37 °C da *BnF* com o fibrinogênio foi de 1 h. Como controle negativo foi utilizado apenas o fibrinogênio (25 µg).

3.4.4.6 Atividade fibrinogenolítica tempo dependente

Assim como descrito no item 3.4.4.4, a atividade fibrinogenolítica da fração *Bothrops neuwiedi* foi verificada, no entanto, a fração juntamente com o fibrinogênio foi submetida a diferentes tempos de incubação (0 h; 0,5 h; 1 h; 3 h; 6 h e 24 h) a 37 °C, com o objetivo de verificar o tempo mínimo necessário para que a fração degrade o fibrinogênio. Neste experimento foram utilizadas 5,0 µg da *BnF* e 25 µg de fibrinogênio. Como controle negativo foi utilizado somente o fibrinogênio (25 µg), que foi incubado a 37 °C por 3 horas.

3.4.4.7 Atividade fibrinogenolítica temperatura dependente

Assim como descrito no item 3.4.4.4, a atividade fibrinogenolítica da fração *Bothrops neuwiedi* foi verificada, no entanto, antes da adição do fibrinogênio, a *BnF* foi

incubada em diferentes temperaturas (- 80 °C, 8 °C, 25 °C, 37 °C e 100 °C) em PBS 50 mM, durante 1 h, com o objetivo de verificar a estabilidade térmica da fração. Neste experimento foram utilizadas 5,0 µg da *BnF* e 25 µg de fibrinogênio. O tempo de incubação, da fração com o fibrinogênio foi de 1 h a 37 °C. Como controle negativo foi utilizado o fibrinogênio (25 µg).

3.4.4.8 Atividade amidásica sobre o *BapNa*

A atividade amidásica da fração *Bothrops neuwiedi* foi avaliada pelo método descrito por ASCENZI et al. (1981) utilizando o substrato cromogênico N α -Benzoil-DL-Arginina-*p*-nitroanilida (DL-BAPNA) (Sigma) (ERLANGER; KOKOWSKY; COHEN, 1961). Um estoque de 90 mM do substrato DL-BAPNA foi preparado em dimetilsulfóxido. No momento do ensaio, o estoque de DL-BAPNA foi diluído 1:100 em tampão Tris-HCl 100 mM, CaCl₂ 20 mM, pH 8,2, originando o substrato de uso a 0,9 mM. No ensaio foram utilizadas 25 µg da *BnF* diluída, no tampão de preparo do substrato de uso, para um volume final de 50 µL. Em seguida foram adicionados 700 µL do mesmo tampão utilizado no preparo do substrato de uso e 500 µL do substrato DL-BAPNA 0,9 mM. Esta mistura foi incubada por 30 minutos a 37 °C, e após este período a reação foi interrompida com 250 µL de ácido acético 60% (v/v).

A fim de avaliar se a atividade da *BnF* é neutralizada por um inibidor de serinoprotease e pelo mAb anti-*B. alternatus/B. neuwiedi*, um ensaio de neutralização foi realizado. Neste ensaio, foram utilizados, juntamente com 25 µg da *BnF*, 5 mM do inibidor de serinoprotease (PMSF), 250 µg do mAb anti-*B. alternatus/B. neuwiedi* (proporção 1:10 da fração em relação ao monoclonal) e 500 µg do mAb anti-*B. alternatus/B. neuwiedi* (proporção 1:20 da fração em relação ao monoclonal). A *BnF* foi previamente incubada a 37 °C por 30 minutos com o PMSF ou com o anti-*B.*

neuwiedi/B. alternatus. Após este período de pré-incubação, o ensaio foi conduzido como descrito no parágrafo anterior. Foram realizados três ensaios independentes.

A influência do pH sobre a atividade da fração *Bothrops neuwiedi* também foi avaliada. Foram utilizados 25 µg da *BnF*, ensaiados em diferentes pHs (6,0; 7,0; 8,2; 9,0 e 10).

As velocidades iniciais das reações foram determinadas pela medida da absorbância em 410 nm em função do tempo (30 minutos), utilizando-se para os cálculos o coeficiente de extinção molar $8800 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ para o produto p-nitroanilina. Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima (mg de *BnF*) necessária para a formação de 1 µmol do produto por minuto. Os valores foram expressos como atividade específica média (U/mg). No teste de avaliação da influência do pH, foi utilizada atividade relativa percentual em relação à atividade obtida em pH 8,2, considerada 100%. Para calcular a velocidade da reação as absorbâncias referentes à atividade do substrato separadamente ou substrato e substâncias associadas (PMSF e mAb anti-*B.n/B.a*), foram subtraídas das respectivas absorbâncias obtidas em cada reação contendo a fração *Bothrops neuwiedi*.

3.4.4.9 Ensaio de incoagulabilidade

Como as serinoproteases são capazes de afetar a hemostasia pela interação com vários componentes do sistema da coagulação, o ensaio de incoagulabilidade *in vivo* foi realizado através da injeção da fração *Bothrops neuwiedi* em camundongos Swiss machos. Por via intraperitoneal foram injetados 50 µL de PBS 50 mM no grupo controle negativo (n=3), e nos 3 grupos testes (n=3) foram injetados 10 µg, 50 µg e 100 µg da fração, diluídas em PBS 50 mM para um volume final de 50 µL. Após 3 horas da injeção os camundongos foram eutanaziados e o sangue foi retirado por punção

cardíaca. Após a retirada do sangue foi verificado se houve coagulação ou não após 60 minutos da coleta (THEAKSTON; REID, 1983).

3.4.4.10 Identificação dos componentes proteicos por espectrometria de massa

Para fazer a identificação das proteínas por espectrometria de massa foram utilizados 50 µg da fração *Bothrops neuwiedi*, ressuspensos em 3 M de uréia. Em seguida, as pontes dissulfeto foram reduzidas com 10 mM DTT por 1 h à temperatura ambiente. Na sequência, os grupos tióis foram alquilados com 40 mM de iodoacetamida, por 30 minutos à temperatura ambiente, protegido da luz. Depois desta incubação, elevou-se o pH para 8,0 com bicarbonato de amônio 50 mM (aproximadamente duas vezes o volume inicial). Então, adicionou-se 1 µg de tripsina (razão 1:50) na amostra e incubou-se por 16 h à temperatura ambiente. Após este período de incubação a amostra foi acidificada para 1% de ácido fórmico e os peptídeos tripticos foram dessalinizados e concentrados utilizando ZipTip C18/P10 (Millipore) conforme instruções do fabricante. O eluído foi seco em centrífuga a vácuo (*speedvac*).

A amostra foi ressuspensa em 0,1% de ácido fórmico e submetida a análise por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa em *tandem* (LC-MS/MS). Na primeira etapa, a amostra foi separada por fase reserva utilizando um sistema de duas colunas no HPLC EASY-nLC (Thermo Scientific). Os peptídeos foram eluídos em um gradiente de 7 a 34% de solução B (95% acetonitrila e 0,1% ácido fórmico) em 40 minutos, seguido de 5 minutos para atingir 45% de B, a um fluxo constante de 250 nL/min. O nano HPLC estava acoplado ao espectrômetro de massa Q-exactive HF (Thermo Scientific) que foi operado em modo positivo com resolução de 120.000 no MS e utilizando a aquisição dependente de dados (DDA) (Top12) com resolução de 15.000 FWHM.

Os dados brutos foram processados utilizando o software MaxQuant (versão 1.6.17.0) e a busca foi realizada pelo algoritmo Andromeda usando as proteínas depositadas no banco de dados UniProtKB *Bothrops* (Taxon ID: 8721) (1259 entradas, baixadas em Janeiro de 2020). As configurações padrão do MaxQuant foram utilizadas, incluindo: i) máximo de duas ausências de sítios de clivagens de tripsina, ii) carbamidometilação de cisteína como modificação fixa, iii) oxidação de metionina e acetilação de N-terminal da proteína como modificações variáveis, iv) tolerância de massa do precursor e dos fragmentos de 20 ppm e 4,5 ppm, respectivamente, v) 1% de *false discovery rate* (FDR) e vi) para quantificação proteica foram considerados apenas peptídeos únicos, incluindo aqueles contendo acetilação N-terminal da proteína. Além disso, a quantificação absoluta baseada em intensidade (Intensity based absolute quantification, iBAQ) possibilitou medir a abundância de proteínas. O valor iBAQ corresponde à normalização das intensidades proteicas pelo número de peptídeos trípticos teoricamente observáveis (SCHWANHÜSSER et al., 2011). Todas as proteínas contaminantes, proteínas invertidas e proteínas com mais de um número de acesso proteico foram removidas da análise, e apenas proteínas com pontuação ≥ 40 foram incluídas neste estudo.

Para verificar a existência ou não de homologia e nível de identidade das sequências obtidas da análise dos espectros, foi realizado alinhamento com proteínas do gênero *Bothrops* utilizando a ferramenta BLASTp (RÉDEI, 2008) na configuração “default”, e também, foram alinhadas utilizando o programa Clustal Omega (SIEVERS; HIGGINS, 2018).

3.5 AVALIAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS ANTÍGENOS DE *B. alternatus*

Como o mAb anti-*B.alternatus/B.neuwiedi* reconheceu os venenos de *B. neuwiedi* e *B. alternatus*, também foi realizada purificação do veneno de *B. alternatus* utilizando cromatografia de afinidade em coluna CNBr-Sepharose contendo o anticorpo monoclonal anti-*B. alternatus/B. neuwiedi* acoplado, conforme descrito no item 3.4.1, para continuar a caracterização do anticorpo monoclonal.

3.5.1 Purificação dos antígenos do veneno de *B. alternatus* reconhecidos pelo mAb anti-*B. alternatus/B. neuwiedi*

O veneno de *B. alternatus* (20 mg) foi dissolvido em 1 mL de tampão fosfato de sódio 20 mM, pH 7,0, centrifugado a 10000 xg por 10 minutos e o sobrenadante juntamente com mais 3 mL de fosfato de sódio 20 mM foi incubado com a resina contendo o mAb anti-*B. alternatus/B. neuwiedi* por 1 hora entre 2 e 8 °C. Em sequência, o líquido foi drenado e a coluna foi lavada com 30 volumes de tampão fosfato de sódio 20 mM. A fração do veneno ligada ao anticorpo presente na coluna foi eluída com glicina 0,1 M pH 2,8 e coletada em tubos Eppendorf contendo Tris 1 M pH 9,0 para elevar o pH para 7,0. As frações de antígenos reconhecidas pelo anticorpo monoclonal foram denominadas *B. alternatus* fraction ou fração *B. alternatus* (BaF). A absorvância à 280 nm foi mensurada e as frações agrupadas. Este processo foi repetido por 5 vezes. As amostras foram dialisadas contra PBS 10 mM e posteriormente congeladas a - 20 °C.

3.5.2 Caracterização da fração *Bothrops alternatus* (BaF)

3.5.2.1 Atividade coagulante

A atividade coagulante das amostras foi realizada conforme descrito no item 3.4.4.2. As amostras foram ensaiadas em triplicata nas concentrações de 40 μg e 80 μg da fração *Bothrops alternatus*. Assim que a amostra era adicionada ao plasma, o cronômetro era acionado registrando o tempo (em segundos) necessário para a formação da rede de fibrina. Os tempos obtidos foram comparados ao tempo do controle negativo, em que foi adicionado apenas PBS 50 mM e CaCl_2 10 mM, utilizado para diluir a fração. Foram realizados três ensaios independentes.

3.5.5.2 Atividade amidásica sobre o BApNA

A atividade amidásica da fração *Bothrops alternatus* foi avaliada conforme já descrito no item 3.4.4.8. No ensaio foram utilizados 25 μg da fração, diluída no tampão de preparo do substrato de uso, para um volume final de 50 μL .

Neste ensaio também foram utilizados, juntamente com 25 μg da fração, 5 mM de PMSF, 250 μg do mAb anti-*B. alternatus/B. neuwiedi* (proporção 1:10 da fração em relação ao monoclonal) e 500 μg do anticorpo monoclonal (proporção 1:20 da fração em relação ao monoclonal). Foram realizados três ensaios independentes.

As velocidades iniciais foram determinadas pela medida da absorbância em 410 nm em função do tempo (30 minutos), utilizando-se para os cálculos o coeficiente de extinção molar $8800 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ para o produto p-nitroanilina. Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima (mg da fração BaF) necessária para a formação de 1 μmol do produto por minuto. Os valores foram expressos como atividade específica média (U/mg). Para calcular a velocidade da reação, as absorbâncias referentes à atividade do substrato separadamente ou substrato e

substâncias associadas (PMSF e mAb anti-*B.a/B.n*), foram subtraídas das respectivas absorbâncias obtidas em cada reação contendo a fração.

3.6 Análise estatística

A análise estatística foi realizada utilizando o software GraphPad Prism 5.0. Os dados foram expressos como média \pm desvio padrão (DP). As variáveis foram analisadas utilizando o one-way analysis of variance (ANOVA) com pós-teste de Bonferroni, exceto para o primeiro ensaio de atividade proteolítica sobre os substratos para serinoproteases e metaloproteases. Para esse ensaio, os dois grupos foram comparados utilizando o teste t de Student. O valor de $p < 0,05$ indica diferença significativa dos resultados.

4. RESULTADOS

4.1 PRODUÇÃO DOS ANTICORPOS MONOCLONAIS CONTRA OS VENENOS BOTRÓPICOS

4.1.1 Imunização dos camundongos e verificação da reatividade dos soros por ELISA

A primeira dose do imunógeno contendo 20 µg do *pool* de venenos botrópicos (*B. alternatus*, *B. jararaca*, *B. jararacussu*, *B. moojeni* e *B. neuwiedi*) foi aplicada via subcutânea no dorso dos animais, e após a terceira exposição dos animais aos antígenos, uma amostra de sangue foi retirada e, posteriormente, a reatividade dos soros dos animais avaliada por ELISA. Como controle negativo foi utilizado soro de camundongo pré-imune e como controle positivo foi utilizado soro de um camundongo imunizado previamente.

A titulação dos soros coletados dos camundongos foi realizada frente ao *pool* de venenos botrópicos, utilizados para sensibilizar a placa de ELISA, e a reação se mostrou positiva até a última diluição ensaiada de 1:12800 (Figura 13). Após verificação do título, foi realizada uma dose reforço no camundongo 1, para realização da fusão dos esplenócitos com as células de mieloma. Este animal foi selecionado pelo valor absoluto mais alto da absorbância.

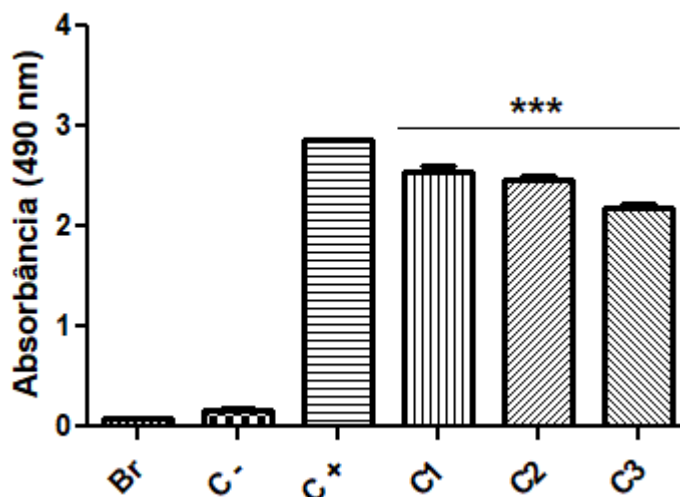


Figura 13 - Reatividade dos soros dos camundongos frente ao *pool* de venenos botrópicos por ELISA. A placa foi sensibilizada com o *pool* de venenos botrópicos (0,5 µg/poço) e incubada com o soro dos camundongos (1:12800) e em seguida com anti-mouse peroxidase (1:3000). O substrato OPD Sigma foi utilizado para revelar a reação. Os resultados apresentados correspondem à média das absorbâncias de duas replicatas. *** P < 0,001 vs. controle negativo. Br = branco; C - : Controle Negativo (soro de camundongo pré-imune); C + : Controle Positivo (soro de camundongo imunizado previamente); C1: Camundongo 1; C2: Camundongo 2; C3: Camundongo 3

4.1.2 Avaliação da reatividade dos anticorpos produzidos pelos hibridomas

Após a realização do processo de fusão das células, as mesmas foram plaqueadas em cinco placas de 96 poços, e permaneceram na estufa a 5% de CO₂ por 14 dias. Posteriormente, foi realizado o primeiro *screening* por ELISA, utilizando placas sensibilizadas com o *pool* de venenos de *Bothrops* spp. e o sobrenadante dos poços contendo os hibridomas. Dos poços reativos contra o *pool* botrópico: 31 apresentaram absorbância entre 1,000 e 1,399, 6 apresentaram absorbância entre 1,400 a 1,499 e 10 apresentaram absorbância entre 1,500 a 3,114 (Figura 14).

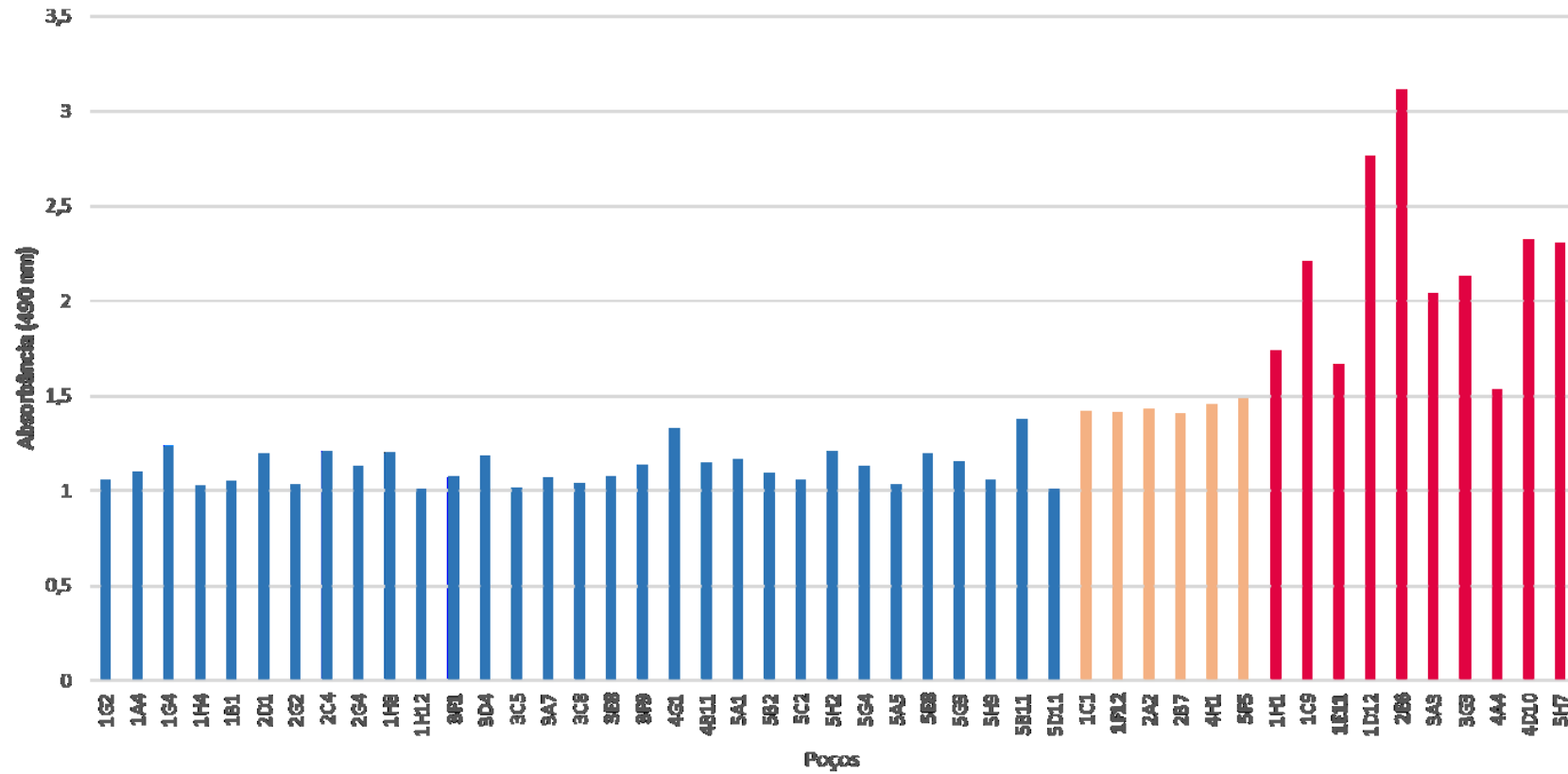


Figura 14 - ELISA do 1º screening após fusão de células. Hibridomas secretores de anticorpos: 31 poços entre 1,000 a 1,399 (azul); 6 poços com absorbâncias entre 1,400 a 1,499 (laranja) e 10 poços com absorbâncias entre 1,500 a 3,114 (vermelho). Os resultados apresentados correspondem às absorbâncias obtidas no teste de ELISA.

4.1.3 Clonagem dos hibridomas selecionados

Foram selecionados 10 hibridomas, com absorvâncias no teste de ELISA compreendidas entre 1,500 e 3,114 (Tabela 1), para serem clonados através da metodologia de diluição limitante. As células diluídas, originadas de cada poço reativo, foram distribuídas em meia placa de 96 poços.

Tabela 1: Hibridomas selecionados no 1º *screening* realizado por ELISA

Hibridomas Selecionados	Absorbância
1H1	1,739
1C9	2,209
1E11	1,664
1D12	2,760
2E6	3,114
3A3	2,044
3G3	2,132
4A4	1,534
4D4	2,322
5H7	2,303

Coluna **Hibridomas Selecionados** corresponde aos poços reativos selecionados e a coluna **Absorbância** corresponde às absorvâncias obtidas no teste de ELISA.

4.1.4 Avaliação da reatividade dos clones

Após a diluição limitante dos hibridomas selecionados, as células foram mantidas em estufa a 37 °C e 5% de CO₂ durante quinze dias e em seguida, os sobrenadantes das células foram utilizados para realizar o *screening* por ELISA, frente ao *pool* de venenos botrópicos. A partir dessa avaliação foi selecionado para caracterização o monoclonal 1C9C11, correspondente ao poço reativo C11, originado das células clonadas do poço C9 da placa mãe número 1.

As células produtoras de monoclonal foram expandidas para placas de 48, placas de 24 e placas de 6 poços, e depois para garrafas T-25 e T-75. O sobrenadante foi recolhido periodicamente e congelado para posterior purificação do anticorpo monoclonal.

Antes de realizar a troca do meio de cultura das células, uma alíquota contendo o meio era retirada e congelada em tubos Eppendorf com o objetivo de verificar periodicamente a manutenção da produção do anticorpo monoclonal através do ensaio de ELISA, utilizando placas sensibilizadas com o *pool* de venenos de *Bothrops* (PVB), conforme descrito no item 3.2.1. Verificou-se que a produção do anticorpo monoclonal se manteve estável em todo o período avaliado (180 dias) (Figura 15).

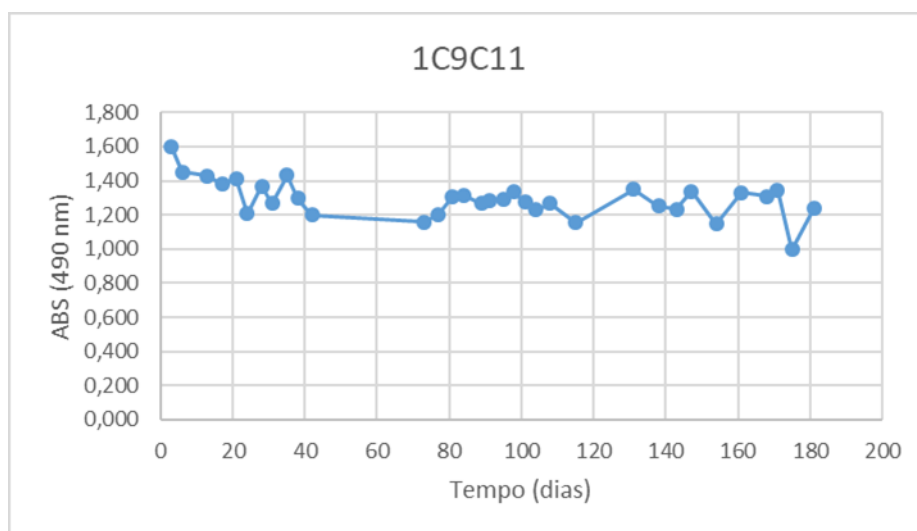


Figura 15 - Avaliação da produção do anticorpo monoclonal durante 180 dias pelo método de ELISA. A placa foi sensibilizada com 0,5 µg/poço do *pool* de venenos de *Bothrops* e incubada com 100 µL de sobrenadante do meio de cultura, contendo as células produtoras de monoclonal. Anti-mouse peroxidase (1:3000) foi utilizado como anticorpo secundário. O substrato OPD Sigma foi empregado para revelar a reação. Os resultados apresentados correspondem à média das absorbâncias de duas replicatas. **1C9C11**: anticorpo monoclonal selecionado.

Também foi realizado um teste para verificar a estabilidade do clone 1C9C11 após submetê-lo ao processo de congelamento em nitrogênio líquido e descongelamento. Neste teste verificou-se que o clone era estável, pois após esse procedimento a produção do monoclonal pelas células se manteve constante.

Posteriormente, os sobrenadantes coletados das células produtoras do anticorpo monoclonal passaram por processo de purificação e sua reatividade foi avaliada. Os resultados obtidos após esta etapa foram divididos em duas partes: caracterização imunológica do anticorpo monoclonal (Parte I) e avaliação e caracterização dos antígenos reconhecidos pelo anticorpo monoclonal (Parte II).

PARTE I: CARACTERIZAÇÃO IMUNOLÓGICA DO ANTICORPO MONOCLONAL

4.2 ENSAIOS IMUNOLÓGICOS

4.2.1 Análise da reatividade do anticorpo monoclonal pelo método ELISA

Após obtenção do monoclonal, o mesmo foi utilizado para verificar a capacidade de reconhecimento contra os venenos das espécies *B. alternatus*, *B. jararaca*, *B. jararacussu*, *B. moojeni* e *B. neuwiedi* separadamente, e também, frente ao *pool* destes venenos, através do método de ELISA.

De acordo com os resultados apresentados, observou-se que o sobrenadante das células produtoras do anticorpo monoclonal, na diluição 1:4000, continha anticorpos que reconheciam os venenos de *B. alternatus* e *B. neuwiedi*, assim como o *pool* de *Bothrops* (Figura 16).

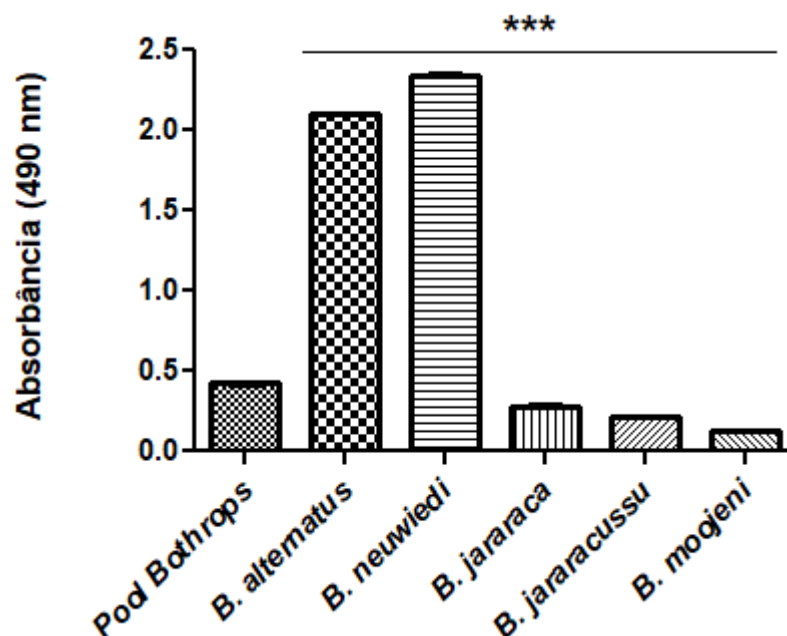


Figura 16 - Reatividade do anticorpo monoclonal contra os diferentes venenos do *pool* de *Bothrops* (*B. alternatus*, *B. neuwiedi*, *B. jararaca*, *B. jararacussu* e *B. moojeni*). As placas foram sensibilizadas com 0,5 µg/poço de cada veneno separadamente, e também, com o *pool* desses venenos. Posteriormente a placa foi incubada com o sobrenadante das células produtoras

do monoclonal, diluído 1:4000 e com anti-mouse peroxidase (1:3000). O substrato OPD Sigma foi utilizado para revelar a reação. Os resultados apresentados correspondem à média das absorbâncias de duplicatas. Os resultados foram expressos como média \pm DP. *** $P < 0,01$ vs. *Pool Bothrops*.

4.2.2 Análise da reatividade do anticorpo monoclonal por *Western blot*

Os venenos do *pool* de *Bothrops* spp., *B. neuwiedi*, *B. alternatus*, *B. moojeni*, *B. jararaca* e *B. jararacussu* foram submetidos a SDS-PAGE 12,5% em condições redutoras, e posteriormente transferidos para membrana de nitrocelulose. O ensaio foi conduzido como descrito no item 3.3.2. O *pool* botrópico foi utilizado como controle positivo.

Neste ensaio, o monoclonal, assim como no ensaio de ELISA, também apresentou reatividade contra os venenos de *B. neuwiedi* e *B. alternatus*, e não apresentou reatividade frente a *B. moojeni*, *B. jararaca* e *B. jararacussu* (Figura 17). Uma banda, com massa molecular entre 45 e 66 kDa, foi reconhecida no *pool* de *Bothrops* e nos venenos, de *B. neuwiedi* e *B. alternatus*.

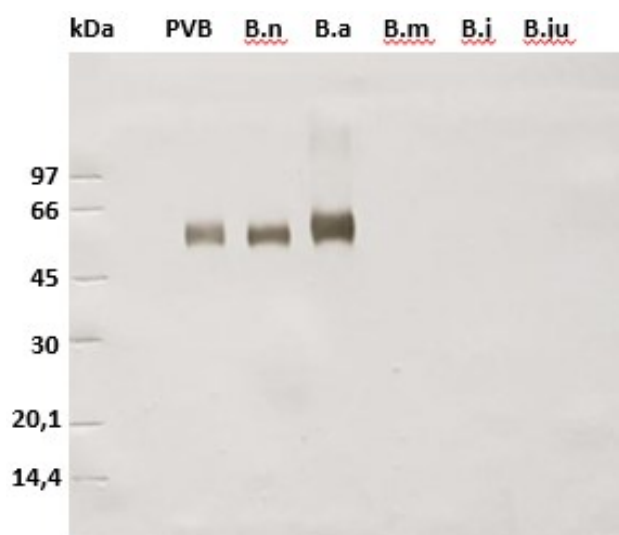


Figura 17 - *Western blot* do *pool* de venenos de *Bothrops* (PVB), *B. neuwiedi* (B.n), *B. alternatus* (B.a), *B. moojeni* (B.m), *B. jararaca* (B.j) e *B. jararacussu* (B.ju) frente ao anticorpo monoclonal. Foram utilizados 5 μ g de cada veneno, e também do *pool* de *Bothrops*. Os venenos foram aplicados em um gel de eletroforese (SDS-PAGE) 12,5% em condições redutoras, transferidos para a membrana de nitrocelulose e incubado com 1 μ g/mL de

tubo. Após 5 minutos, ocorreu o aparecimento de uma banda azul claro na região IgG1. A banda superior, azul mais intenso, representa o controle positivo.

4.2.4 Avaliação do potencial de neutralização do anticorpo monoclonal anti-*B.*

alternatus/B. neuwiedi

4.2.4.1 Ensaio de neutralização da atividade fosfolipásica induzida pelo veneno de B. neuwiedi

A atividade de fosfolipase pelo método indireto foi mensurada a partir da medição do halo formado pelo contato do veneno de *B. neuwiedi*, na quantidade de 5 µg, com o gel de agarose presente em uma placa contendo eritrócitos e lecitina. Como controle negativo foi utilizada solução de PBS 50 mM. O veneno de *B. neuwiedi* foi utilizado como controle positivo.

O ensaio de neutralização foi realizado utilizando a mesma quantidade do veneno de *B. neuwiedi* juntamente com o mAb anti-*B.a/B.n* nas proporções de 1:50 (5 µg de *B. neuwiedi* e 250 µg de monoclonal) e 1:100 (5 µg de *B. neuwiedi* e 500 µg de monoclonal). O objetivo deste ensaio foi verificar se o anticorpo mAb anti-*B. alternatus/B. neuwiedi* inibia a atividade de fosfolipases presentes no veneno de *B. neuwiedi*. Não foram observadas diferenças nos tamanhos dos halos das placas quando o anticorpo foi utilizado nestas proporções, demonstrando assim, que o anticorpo não apresentou atividade neutralizante contra as fosfolipases ativas presentes neste veneno (Figura 19).

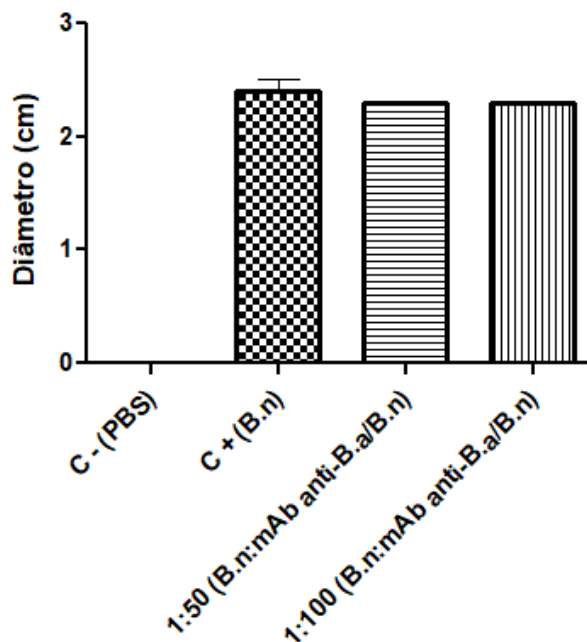


Figura 19 - Atividade fosfolipásica induzida pelo veneno de *B. neuwiedi* e ensaio de neutralização utilizando o anticorpo mAb anti-*B. alternatus/B. neuwiedi*. O veneno de *B. neuwiedi* (5 µg), utilizado como controle positivo, e as misturas veneno e mAb anti-*B.a/B.n* nas proporções de 1:50 (5 µg de *B. neuwiedi* e 250 µg de monoclonal) e 1:100 (5 µg de *B. neuwiedi* e 500 µg de monoclonal) foram aplicados no gel em volume final de 32 µL. Como controle negativo foi utilizada solução de PBS 50 mM. A placa foi mantida à 37°C em câmara úmida por 24 horas. Após incubação, o diâmetro do halo formado foi medido em centímetros (cm). Os resultados foram expressos como média do halo em centímetros (n=3) ± DP. **C - (PBS):** Controle Negativo; **C + (B. n):** Controle Positivo (*B. neuwiedi*); **1:50 (B.n:mAb anti-B.a/B.n)** e **1:100 (B.n:mAb anti-B.a/B.n):** mistura 1:50 e 1:100 de *B. neuwiedi* e mAb anti-*B. alternatus/B. neuwiedi*, respectivamente.

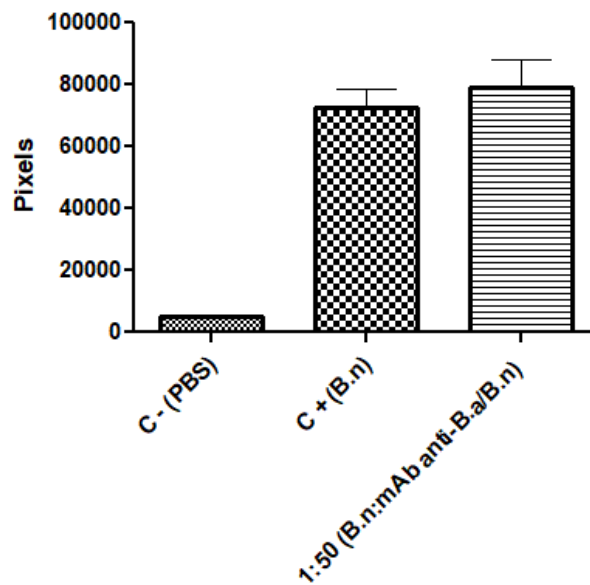
4.2.4.2 Ensaio de neutralização da atividade hemorrágica induzida pelo veneno de *B. neuwiedi*

A atividade hemorrágica do veneno de *B. neuwiedi* foi evidenciada após injeções intradérmicas, no dorso dos animais, de 10 µg de veneno. Foram observados halos hemorrágicos, e, portanto, este foi considerado o controle positivo do ensaio. Como controle negativo foi utilizada solução de PBS 50 mM.

O ensaio de neutralização foi realizado utilizando a mesma quantidade do veneno de *B. neuwiedi* juntamente com o mAb anti-*B.a/B.n* na proporção de 1:50 (10 µg de *B. neuwiedi* e 500 µg de monoclonal). O objetivo deste ensaio foi verificar se o mAb

anti-*B.a/B.n* inibia a atividade hemorrágica induzida pelo veneno de *B. neuwiedi*. Através da análise da pele removida do dorso dos animais não foi possível observar neutralização dos halos hemorrágicos induzidos pelo veneno, o que demonstra que o anticorpo não inibiu a hemorragia nas condições testadas (Figura 20)

A



B

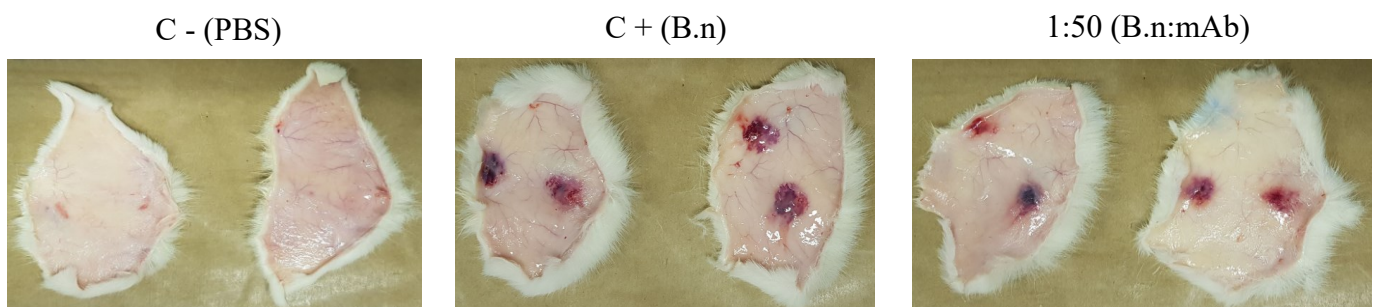


Figura 20 - Atividade hemorrágica induzida pelo veneno de *B. neuwiedi* e ensaio de neutralização utilizando o anticorpo monoclonal anti-*B. alternatus/B. neuwiedi*. O veneno de *B. neuwiedi* (10 μ g) e a mistura veneno e mAb anti-*B.a/B.n* na proporção 1:50 (10 μ g de *B. neuwiedi* e 500 μ g de monoclonal) foram aplicados no dorso dos animais e a pele removida após 2 h. **A)** Quantificação do halo hemorrágico formado após injeção das amostras, medido em pixels utilizando o software Image J. Os resultados foram expressos como média (n=4) \pm DP. **B)** Pele do dorso dos animais removida 2 h após injeção das amostras. **C - (PBS):** Controle Negativo; **C + (B. n):** Controle Positivo (*B. neuwiedi*); **1:50 (B.n:mAb anti-B.a/B.n):** mistura 1:50 de mAb *B. neuwiedi* e mAb anti-*B. alternatus/B. neuwiedi*.

4.2.4.3 Ensaio de neutralização da atividade coagulante induzida pelo veneno de *B. neuwiedi*

O teste da atividade coagulante foi realizado com várias concentrações do veneno de *B. neuwiedi* e a dose mínima coagulante (DMC) encontrada foi 0,5 µg (Figura 21).

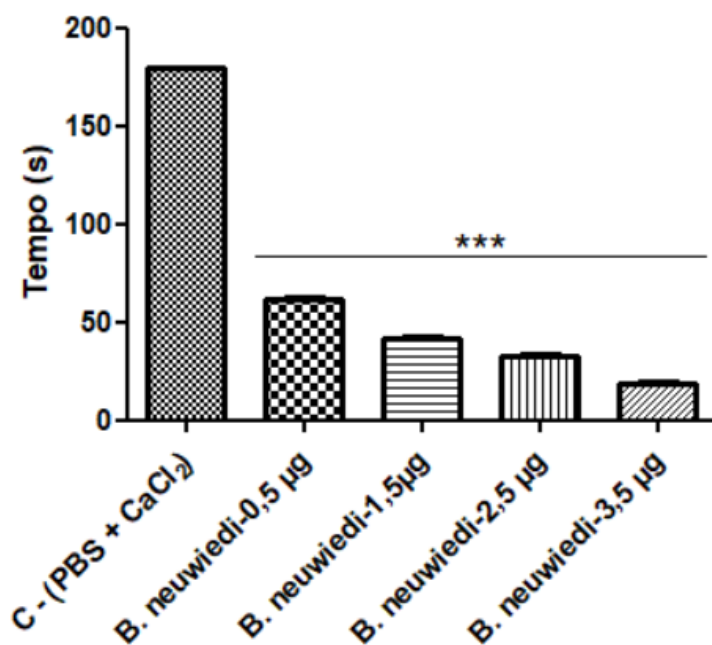


Figura 21 - Ensaio de atividade coagulante do veneno de *B. neuwiedi*. Diferentes concentrações de veneno foram ensaiadas para cálculo da DMC (Dose Mínima Coagulante). As amostras de veneno foram diluídas em solução contendo PBS e CaCl₂, e em seguida, 50 µL das soluções foram adicionados à 200 µL de plasma de coelho citratado, previamente incubado por 15 minutos a 37 °C. Após adição das amostras, o tempo necessário para a coagulação do plasma, foi medido (em segundos). Os resultados foram expressos como média do tempo em segundos (s) (n=3) ± DP. C - (PBS + CaCl₂): Controle Negativo. *** P < 0,0001 vs. controle negativo.

Em seguida foi realizado um teste com o veneno de *B. neuwiedi* na dose mínima coagulante de 0,5 µg e com mAb anti-*B.a/B.n* nas proporções de 1:50 (0,5µg de *B. neuwiedi* e 25 µg de monoclonal) e 1:100 (0,5µg de *B. neuwiedi* e 50 µg de monoclonal) para verificar se o mAb anti-*B.a/B.n* iria inibir a atividade coagulante do veneno. Foi verificado que o anticorpo monoclonal na proporção de 1:100 diminuiu a atividade coagulante do veneno de *B. neuwiedi*, pois o tempo de coagulação aumentou

(> 180 s) em relação ao tempo de coagulação quando apenas o veneno de *B. neuwiedi* foi ensaiado (65 s). Como controle negativo da atividade coagulante foi utilizada solução de PBS 50 mM e CaCl₂ 10 mM, e como controle positivo foi utilizado o veneno de *B. neuwiedi*. Para demonstrar a especificidade da inibição da atividade coagulante pelo mAb anti-*B.a/B.n*, foi utilizado outro anticorpo monoclonal, contra proteína do veneno de *Loxosceles intermedia* (mAb anti-Lid1), na proporção 1:100 (0,5µg de *B. neuwiedi* e 50 µg de mAb anti-Lid1). Foi observado que o monoclonal anti-Lid1 não inibiu a atividade coagulante do veneno (Figura 22).

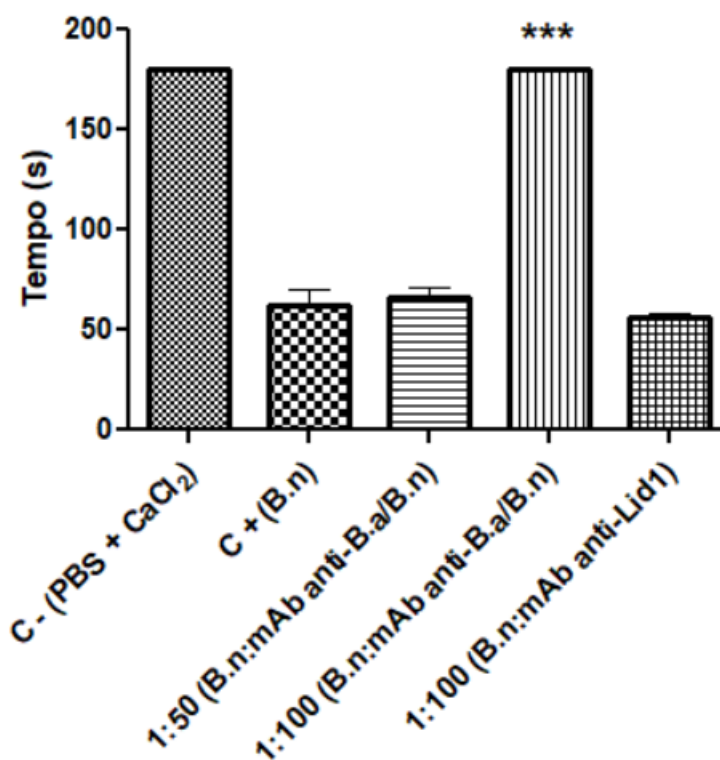


Figura 22 - Atividade coagulante induzida pelo veneno de *B. neuwiedi* e ensaio de neutralização utilizando o anticorpo monoclonal anti-*B. alternatus/B. neuwiedi*. O ensaio foi realizado utilizando a DMC (Dose Mínima Coagulante) de *B. neuwiedi* (0,5 µg) e a inibição da atividade foi verificada utilizando o mAb anti-*B.a/B.n*, nas proporções de 1:50 (0,5µg de *B. neuwiedi* e 25 µg de monoclonal) e 1:100 (0,5µg de *B. neuwiedi* e 50 µg de monoclonal). Estas misturas foram previamente incubadas a 37 °C por 60 minutos. Em seguida, 50 µL da solução foram adicionados a 200 µL do plasma citratado de coelho, previamente incubado por 15 minutos a 37 °C. Após adição das amostras, o tempo necessário para a coagulação do plasma foi medido (em segundos). Para evidenciar a especificidade do mAb anti-*B.a/B.n* foi utilizado outro monoclonal, contra proteína do veneno de *Loxosceles intermedia* (mAb anti-Lid1), na proporção 1:100 (0,5µg de *B. neuwiedi* e 50 µg de mAb anti-Lid1). Os resultados foram expressos como média do tempo em segundos (s) (n=3) ± DP. C - (PBS + CaCl₂): Controle

Negativo; C + (B. n): Controle Positivo (*B. neuwiedi*); **1:50 (B.n:mAb anti-B.a/B.n)** e **1:100 (B.n:mAb anti-B.a/B.n)**: mistura 1:50 e 1:100 de *B. neuwiedi* e mAb anti-*B. alternatus/B. neuwiedi*, respectivamente; **1:100 (B.n:mAb anti-Lid1)**: mistura 1:100 de *B. neuwiedi* e mAb anti-Lid1. *** P < 0,0001 vs. controle positivo.

Para avaliar se o mAb anti-*B.a/B.n* apresentava atividade coagulante, o mesmo foi testado separadamente nas mesmas quantidades utilizadas no ensaio de inibição (25 µg e 50 µg). Foi verificado que o mAb anti-*B.a/B.n* não apresentou atividade coagulante (tempo de coagulação > 180 s) (Dados não mostrados).

4.2.4.4 Ensaio de neutralização da atividade fosfolipásica induzida pelo veneno de *B. alternatus*

A atividade de fosfolipase indireta foi mensurada a partir da medição do halo formado pelo contato do veneno de *B. alternatus* (5 µg) com o gel de agarose presente em uma placa contendo eritrócitos e lecitina. O veneno de *B. alternatus* foi utilizado como controle positivo.

O ensaio de neutralização foi realizado utilizando a mesma quantidade do veneno de *B. alternatus* juntamente com o mAb anti-*B.a/B.n* nas proporções de 1:50 (5 µg de *B. alternatus* e 250 µg de monoclonal) e 1:100 (5 µg de *B. alternatus* e 500 µg de monoclonal). O objetivo deste ensaio foi verificar se o mAb anti-*B.a/B.n* inibia a atividade de fosfolipases presentes no veneno de *B. alternatus*. Não foram observadas diferenças nos tamanhos dos halos das placas quando o anticorpo foi utilizado, demonstrando assim, que o monoclonal não apresentou atividade neutralizante contra as fosfolipases ativas presentes neste veneno (Figura 23).

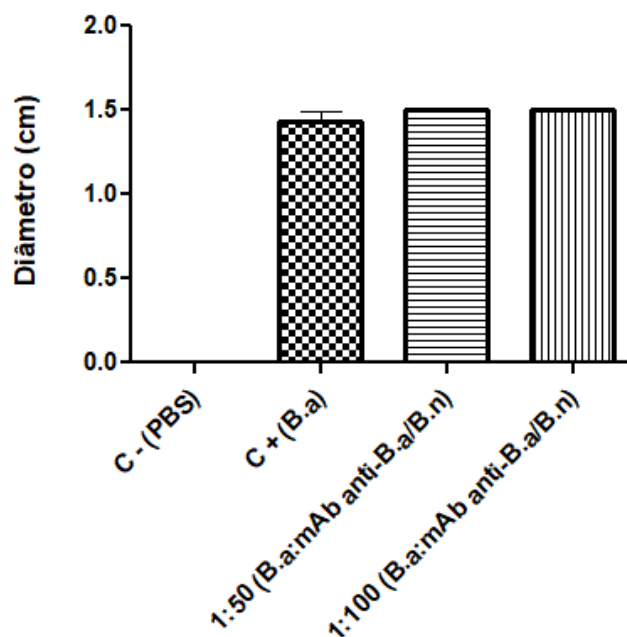


Figura 23 - Atividade fosfolipásica induzida pelo veneno de *B. alternatus* e ensaio de neutralização utilizando o monoclonal anti-*B. alternatus*/*B. neuwiedi*. O veneno de *B. alternatus* (5 µg), utilizado como controle positivo, e as misturas veneno e mAb anti-*B.a/B.n* nas proporções de 1:50 (5 µg de *B. alternatus* e 250 µg de monoclonal) e 1:100 (5 µg de *B. alternatus* e 500 µg de monoclonal) foram aplicados no gel em um volume final de 32 µL. Como controle negativo foi utilizada solução de PBS 50 mM. A placa foi mantida à 37 °C em câmara úmida por 24 horas. Após incubação, o halo formado foi medido em centímetros (cm). Os resultados foram expressos como média da medida do halo em centímetros (n=3) ± DP. **C - (PBS):** Controle Negativo; **C + (B. a):** Controle Positivo (*B. alternatus*); **1:50 (B.a:mAb anti-B.a/B.n)** e **1:100 (B.a:mAb anti-B.a/B.n):** mistura 1:50 e 1:100 de *B. alternatus* e mAb anti-*B. alternatus*/*B. neuwiedi*, respectivamente.

4.2.4.5 Ensaio de neutralização da atividade coagulante induzida pelo veneno de *B. alternatus*

O teste da atividade coagulante foi realizado com várias concentrações do veneno de *B. alternatus* e a dose mínima coagulante (DMC) encontrada foi de 40 µg (Figura 24).

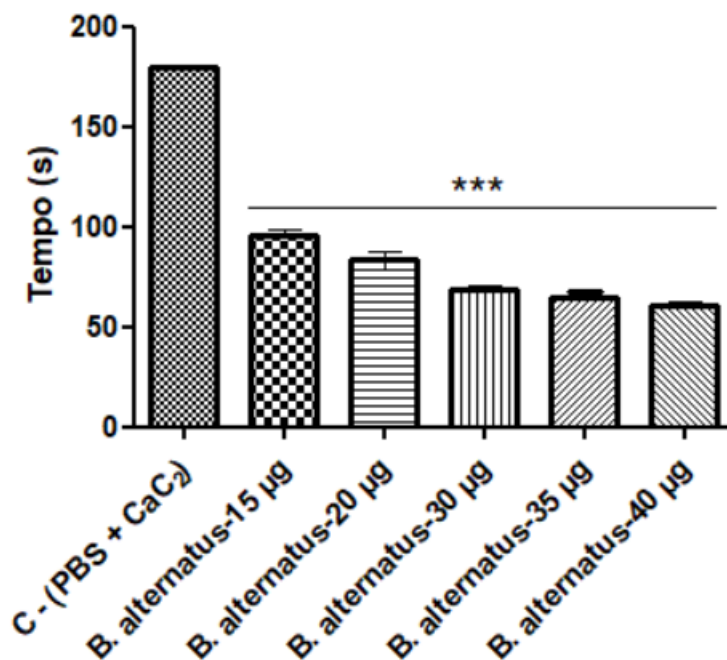


Figura 24 - Ensaio de atividade coagulante do veneno de *B. alternatus*. Diferentes concentrações do veneno de *B. alternatus* foram ensaiadas para cálculo da DMC (Dose Mínima Coagulante). As amostras foram diluídas em PBS, e em seguida, 50 µL das soluções foram adicionados à 200 µL de plasma de coelho citratado, previamente incubado por 15 minutos a 37 °C. Após adição das amostras o tempo necessário para a coagulação do plasma foi medido (em segundos). Os resultados foram expressos como média do tempo em segundos (s) (n=3) ± DP. C - (PBS + CaCl₂): Controle Negativo. *** P < 0,0001 vs. controle negativo.

Em seguida foi realizado um teste com o veneno de *B. alternatus* na dose mínima coagulante de 40 µg e com o mAb anti-*B.a/B.n* nas proporções de 1:20 (40 µg de *B. alternatus* e 800 µg de monoclonal), 1:50 (40 µg de *B. alternatus* e 2000 µg de monoclonal) e 1:100 (40 µg de *B. alternatus* e 4000 µg de monoclonal) para verificar se o mAb anti-*B.a/B.n* iria inibir a atividade coagulante do veneno. Como controle negativo foi utilizada solução de PBS 50 mM e CaCl₂ 10 mM, e como controle positivo o veneno de *B. alternatus*.

Foi verificado que o anticorpo monoclonal utilizado nas proporções de 1:20, 1:50 e 1:100 diminuiu a atividade coagulante do veneno de *B. alternatus*, pois o tempo de coagulação foi aumentado, em relação ao tempo necessário para coagulação quando o plasma foi incubado apenas com o veneno de *B. alternatus* (61 s) (Figura 25). O

mesmo foi observado para o veneno de *B. neuwiedi*, quando foi utilizado na proporção 1:100 (veneno:monoclonal).

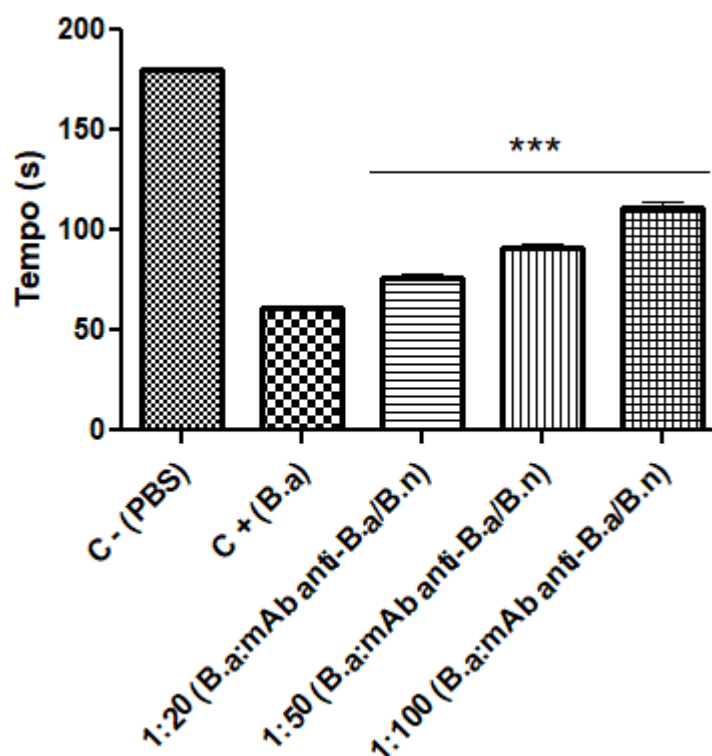


Figura 25 - Atividade coagulante induzida pelo veneno de *B. alternatus* e ensaio de neutralização utilizando o monoclonal anti-*B. alternatus*/*B. neuwiedi*. O ensaio foi realizado utilizando a DMC (Dose Mínima Coagulante) do veneno *B. alternatus* (40 µg), e a inibição da atividade coagulante foi verificada utilizando o mAb anti-*B.a/B.n*, nas proporções de 1:20 (40 µg de *B. alternatus* e 800 µg de monoclonal), 1:50 (40 µg de *B. alternatus* e 2000 µg de monoclonal) e 1:100 (40 µg de *B. alternatus* e 4000 µg de monoclonal). Estas misturas foram previamente incubadas a 37 °C por 60 minutos. Em seguida, 50 µL das soluções foram adicionados a 200 µL do plasma citratado de coelho, previamente incubado por 15 minutos a 37 °C. Após adição das amostras o tempo de coagulação do plasma foi medido (em segundos). Os resultados foram expressos como média do tempo em segundos (s) (n=3) ± DP. **C - (PBS):** Controle Negativo; **C + (B. a):** Controle Positivo (*B. alternatus*); **1:20 (B.a:mAb anti-B.a/B.n)**, **1:50 (B.n:mAb anti-B.a/B.n)**, e **1:100 (B.n:mAb anti-B.a/B.n)**: mistura 1:20, 1:50 e 1:100 de *B. alternatus* e mAb anti-*B. alternatus*/*B. neuwiedi*, respectivamente. *** P < 0,0001 vs. controle positivo.

PARTE II: AVALIAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS ANTÍGENOS RECONHECIDOS PELO ANTICORPO MONOCLONAL

4.3 PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS ANTÍGENOS DE *B. neuwiedi*

4.3.1 Análise do reconhecimento dos antígenos, purificados do veneno de *B. neuwiedi*, pelo anticorpo monoclonal anti-*B. alternatus/B. neuwiedi*

Após a purificação do veneno de *B. neuwiedi*, a fração *Bothrops neuwiedi* (BnF) e o veneno de *B. neuwiedi*, foram submetidos à eletroforese (SDS-PAGE) em condições redutoras, e em seguida, transferidas para membrana de nitrocelulose. Este ensaio foi conduzido como descrito no item 3.3.2, com o objetivo de verificar o reconhecimento da fração *Bothrops neuwiedi* pelo monoclonal. O *Western blot*, demonstrou que o mAb anti-*B.a/B.n* reconheceu a fração *Bothrops neuwiedi* e o veneno *B. neuwiedi*, como observado previamente. As bandas reativas, para as 3 amostras ensaiadas, apresentaram massa molecular similar, compreendida entre 45 e 66 kDa (Figura 26).

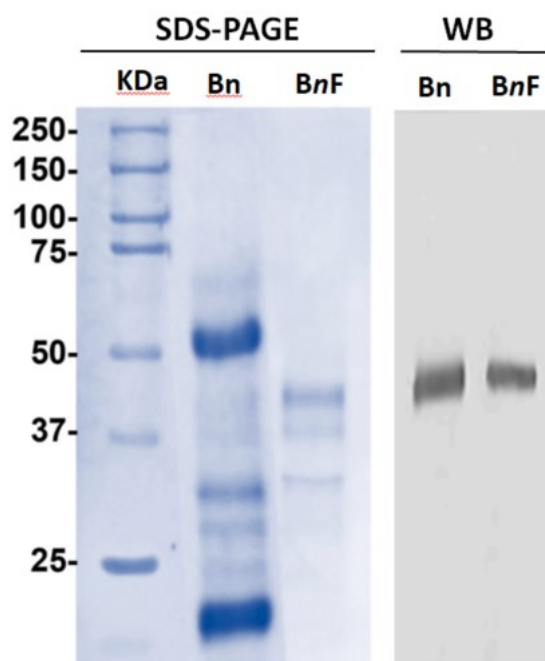


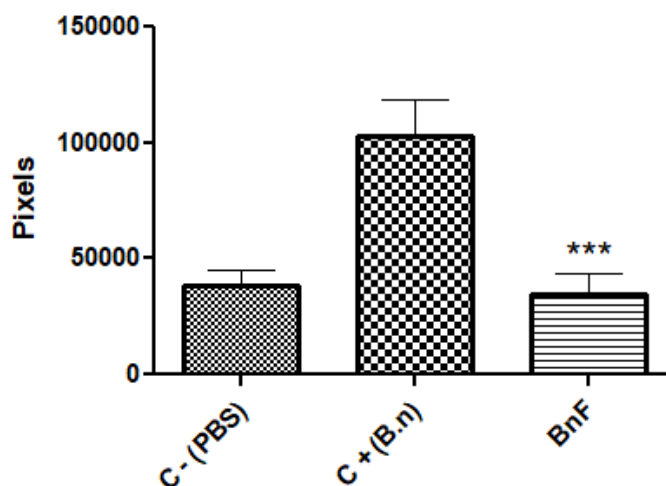
Figura 26 - SDS-PAGE e *Western blot* da fração *Bothrops neuwiedi* e de *B. neuwiedi*, frente ao anticorpo mAb anti-*B. alternatus/B. neuwiedi*. 5 μ g de cada uma das amostras, fração *Bothrops neuwiedi* e veneno de *B. neuwiedi* foram aplicados em um gel de eletroforese (SDS-PAGE) 12,5% em condições redutoras, transferidos para a membrana de nitrocelulose e incubados com 1 μ g/mL de mAb anti-*B.a/B.n*. Após lavagem, a membrana foi incubada com anti-mouse conjugado com peroxidase (diluído 1:3000). A membrana foi revelada utilizando diaminobenzidina/cloronaftol. **BnF**: fração *Bothrops neuwiedi*; **PVB**: Pool de venenos de *Bothrops* spp. (Controle Positivo); **B.n**: *Bothrops neuwiedi*.

4.3.2 Caracterização dos antígenos da fração *Bothrops neuwiedi* (**BnF**)

4.3.2.1 Atividade hemorrágica

Após injeções intradérmicas de 10 μ g do veneno de *B. neuwiedi* como controle positivo, de PBS 50 mM como controle negativo e de 10 μ g da fração *Bothrops neuwiedi*, foi possível verificar que nas condições testadas a *BnF* não induziu hemorragia na pele do dorso dos animais (Figura 27).

A



B

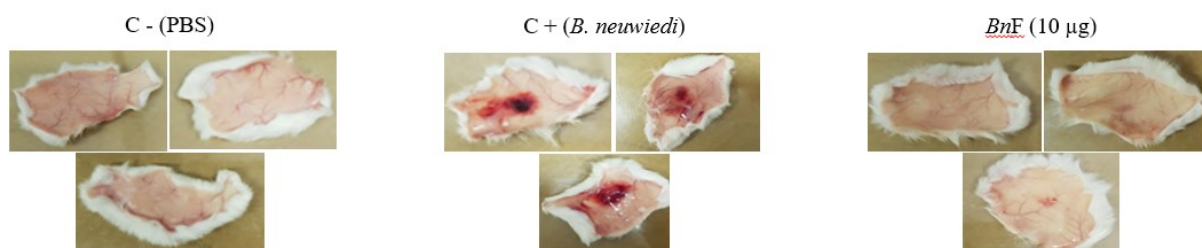


Figura 27 - Ensaio de atividade hemorrágica de *B. neuwiedi* e da fração *Bothrops neuwiedi*. 10 µg do veneno de *B. neuwiedi* ou da fração foram aplicados no dorso dos animais e a pele foi removida após 2 h. **A)** O halo hemorrágico formado foi quantificado em pixels utilizando o programa Image J. Os resultados foram expressos como média (n = 3) ± DP. *** P < 0,0004 vs. Controle positivo. **B)** Pele do dorso dos animais, removida 2 h após injeção das amostras. **C - (PBS):** Controle Negativo; **C + (B. n):** Controle Positivo (*B. neuwiedi*), **BnF:** Fração *Bothrops neuwiedi*.

4.3.2.2 Atividade coagulante

O ensaio de atividade coagulante da fração *Bothrops neuwiedi* foi realizado utilizando diferentes concentrações e a dose mínima coagulante foi calculada (9 µg). Como controle negativo da atividade coagulante foi utilizada solução contendo PBS 50 mM e cloreto de cálcio 10 mM.

Foi observado que a BnF, purificada por coluna de afinidade contendo o mAb anti-*B. alternatus/B. neuwiedi*, apresentou atividade coagulante concentração dependente, quando comparada ao controle negativo (Figura 28). Este resultado

corroborar o dado apresentado anteriormente (item 4.2.4.3), em que o anticorpo monoclonal inibiu a atividade coagulante do veneno de *B. neuwiedi*.

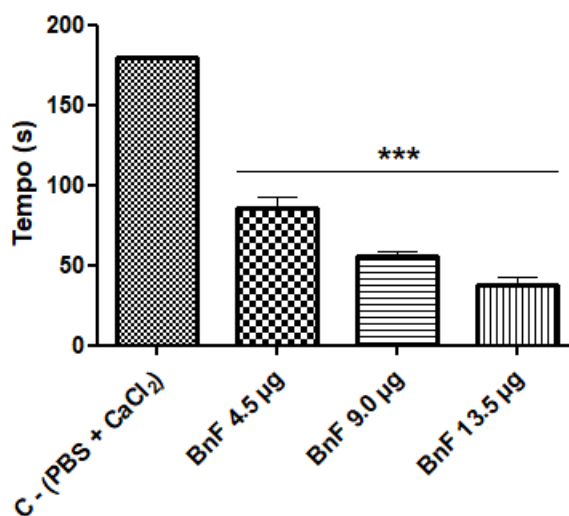


Figura 28 - Ensaio de atividade coagulante da fração *Bothrops neuwiedi*. Diferentes concentrações da fração *Bothrops neuwiedi* foram ensaiadas para cálculo da DMC (Dose Mínima Coagulante). As amostras contendo a fração foram diluídas em PBS e CaCl₂, e em seguida, 50 µL das diluições foram adicionados à 200 µL de plasma de coelho citratado, previamente incubado por 15 minutos a 37 °C. Após adição das amostras, o tempo necessário para a coagulação do plasma foi medido (em segundos). **C - (PBS + CaCl₂)**: controle negativo, **BnF**: fração *Bothrops neuwiedi*. Os resultados foram expressos como média do tempo em segundos (s) ± DP. (n=3) ± DP. *** P < 0,0001 vs. controle negativo.

4.3.2.3 Atividade proteolítica sobre os substratos para serinoproteases e metaloproteases

A atividade proteolítica da fração *Bothrops neuwiedi* foi avaliada *in vitro* utilizando dois substratos acoplados a um sistema FRET (*Fluorescence Resonance Energy Transfer*), um que pode ser clivado por serinoproteases e outro que pode ser clivado por metaloproteases. O veneno de *B. neuwiedi*, que contém serinoprotease e metaloprotease, foi utilizado como controle positivo dos ensaios.

A BnF apresentou alta atividade proteolítica quando o substrato para serinoproteases, Abz-FLPRSFRQ-EDDnp, foi utilizado (Figura 29A). Esta atividade foi semelhante à atividade do veneno de *B. neuwiedi*. Este resultado corrobora a capacidade da fração em coagular o plasma de coelho como apresentado anteriormente. No entanto,

a fração não apresentou atividade proteolítica sobre o substrato para metaloproteases, Abz-LVEALYQ-EDDnp (Figura 29B).

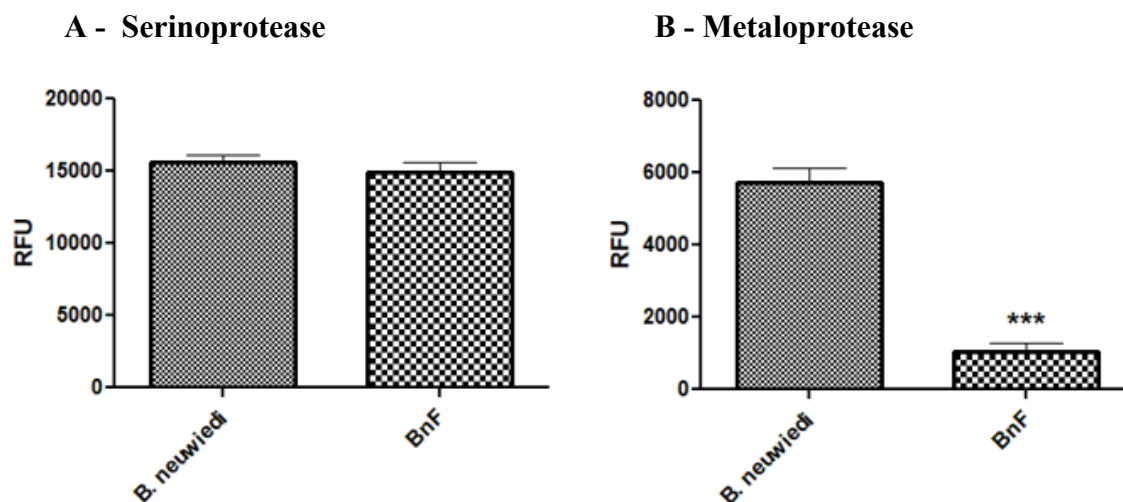


Figura 29 - Ensaio de atividade proteolítica da fração *Bothrops neuwiedi* sobre os substratos para serinoprotease e metaloprotease. O ensaio foi realizado em microplaca de 96 poços, utilizando 1 µg do veneno de *B. neuwiedi* (controle positivo) ou 1 µg da fração *Bothrops neuwiedi* e os substratos a uma concentração final de 47 mM. A atividade proteolítica foi representada em unidades arbitrárias de fluorescência (RFU) produzidas em 340 nm de excitação e 440 nm de emissão pela hidrólise do substrato acoplado ao sistema FRET. **A)** Substrato para serinoprotease: Abz-FLPRSFRQ-EDDnp e **B)** Substrato para metaloprotease: Abz-LVEALYQ-EDDnp. Os resultados foram expressos como média (n=3) ± DP. **BnF:** fração *Bothrops neuwiedi*. *** P < 0,0007 vs. controle positivo (*B. neuwiedi*).

Posteriormente, foi avaliado se a atividade proteolítica da BnF sobre o substrato para serinoprotease poderia ser inibida pelo mAb anti-*B. alternatus/B. neuwiedi* ou pelo inibidor de serinoprotease, PMSF. Foi observada redução significativa (77,6%) da atividade proteolítica da BnF quando a mesma foi associada ao PMSF. Por outro lado, o mAb anti-*B. alternatus/B. neuwiedi*, na proporção avaliada (1:25), não apresentou redução significativa (20,8%) da atividade proteolítica da BnF (Figura 30).

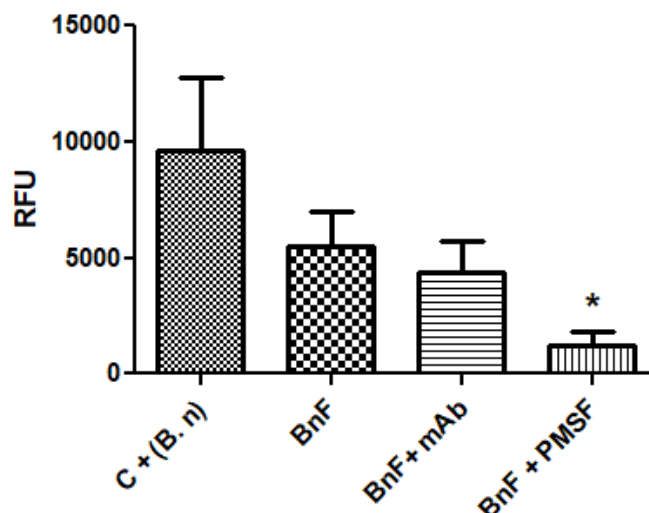


Figura 30 - Ensaio de neutralização da atividade proteolítica da fração *Bothrops neuwiedi* sobre o substrato para serinoprotease. O ensaio foi realizado em microplaca de 96 poços, utilizando 1 µg do veneno de *B. neuwiedi*, 1 µg da fração *Bothrops neuwiedi*, 1 µg da fração associada a 25 µg do monoclonal ou 1 µg da fração associada a 0,1mM de PMSF, e o substrato a uma concentração final de 47 mM. A atividade proteolítica foi representada em unidades arbitrárias de fluorescência (RFU) produzidas em 340 nm de excitação e 440 nm de emissão pela hidrólise do substrato acoplado ao sistema FRET. Substrato para serinoprotease: Abz-FLPRSFRQ-EDDnp. **C + (B.n)**: Controle Positivo (*Bothrops neuwiedi*); **BnF**: fração *Bothrops neuwiedi* (1 µg); **BnF + mAb**: 1 parte de fração *Bothrops neuwiedi* (1 µg) e 25 partes de mAb anti-*B. alternatus/B. neuwiedi* (25 µg); **BnF + PMSF**: fração *Bothrops neuwiedi* (1 µg) e PMSF (0,1 mM). Os resultados foram expressos como média (n=3) ± DP. * P < 0,05 vs. fração *Bothrops neuwiedi*.

4.3.2.4 Atividade fibrinogenolítica

Para avaliar a atividade fibrinogenolítica da fração *Bothrops neuwiedi* foram utilizados 5 µg desta fração e 25 µg de fibrinogênio. Como controle negativo foram utilizados apenas 25 µg de fibrinogênio e como controle positivo 5 µg do veneno de *B. neuwiedi* e 25 µg de fibrinogênio.

Em sua forma nativa o fibrinogênio humano é composto por 3 cadeias polipeptídicas, Aα (64 kDa), Bβ (56 kDa) e γ (47 kDa) (PUTNAM, 1975). Foi observado que a *BnF* degradou praticamente toda subunidade Aα do fibrinogênio e parcialmente a subunidade Bβ. Ao associar o EDTA, que é um inibidor de metaloprotease, a *BnF* ainda degradou a banda Aα do fibrinogênio. Ao passo que ao

associar o PMSF, que é um inibidor de serinoprotease, foi verificado que a *BnF* perdeu a capacidade de degradar a banda A α do fibrinogênio (Figura 31). Este resultado confirma que a atividade de serinoprotease da fração *Bothrops neuwiedi* que é responsável pela clivagem da cadeia do fibrinogênio.

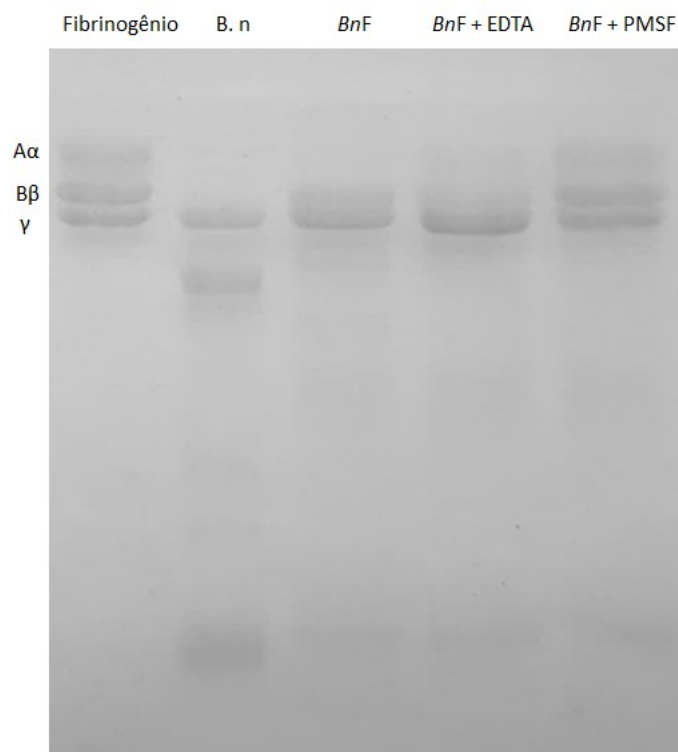


Figura 31 - Ensaio de atividade fibrinogenolítica da fração *Bothrops neuwiedi*. O fibrinogênio humano é composto por 3 cadeias polipeptídicas, A α (64 kDa), B β (55 kDa) e γ (47 kDa). 5 μ g da *BnF* e 25 μ g de fibrinogênio humano foram incubados por 3 h a 37 °C. Para avaliar o papel dos inibidores, a *BnF* (5 μ g) foi pré-incubada a 37 °C por 1 h na presença de EDTA 5 mM ou de de PMSF 5 mM. Em seguida, essas amostras foram incubadas com fibrinogênio (25 μ g) nas mesmas condições descritas anteriormente. Como controle negativo foi utilizado apenas o fibrinogênio (25 μ g) e como controle positivo, 5 μ g de *B. neuwiedi* e 25 μ g de fibrinogênio. Após incubação, a atividade fibrinogenolítica da fração foi avaliada por SDS-PAGE a 10%. A coloração do gel foi realizada utilizando o corante *Coomassie Blue R-250*. **B.n:** *B. neuwiedi*; **BnF:** fração *Bothrops neuwiedi*; **BnF + EDTA:** fração *Bothrops neuwiedi* + EDTA; **BnF + PMSF:** fração *Bothrops neuwiedi* + PMSF.

4.3.2.5 Atividade fibrinogenolítica concentração-dependente

Para avaliar a influência da concentração da fração *Bothrops neuwiedi* na degradação das bandas do fibrinogênio, 0,5 μ g; 1,0 μ g; 2,5 μ g; 5,0 μ g; 10 μ g e 20 μ g da

fração foram incubados separadamente com uma quantidade fixa de fibrinogênio (25 µg). Como controle negativo foi utilizado apenas o fibrinogênio (25 µg).

Foi verificado que a degradação do fibrinogênio é diretamente proporcional à concentração da *BnF*. Além disso, a partir de 5 µg desta fração a banda Aα foi praticamente toda degradada e a banda Bβ parcialmente (Figura 32). Por esse motivo, os ensaios de atividade fibrinogenolítica posteriores foram realizados utilizando 5 µg da fração *Bothrops neuwiedi*.

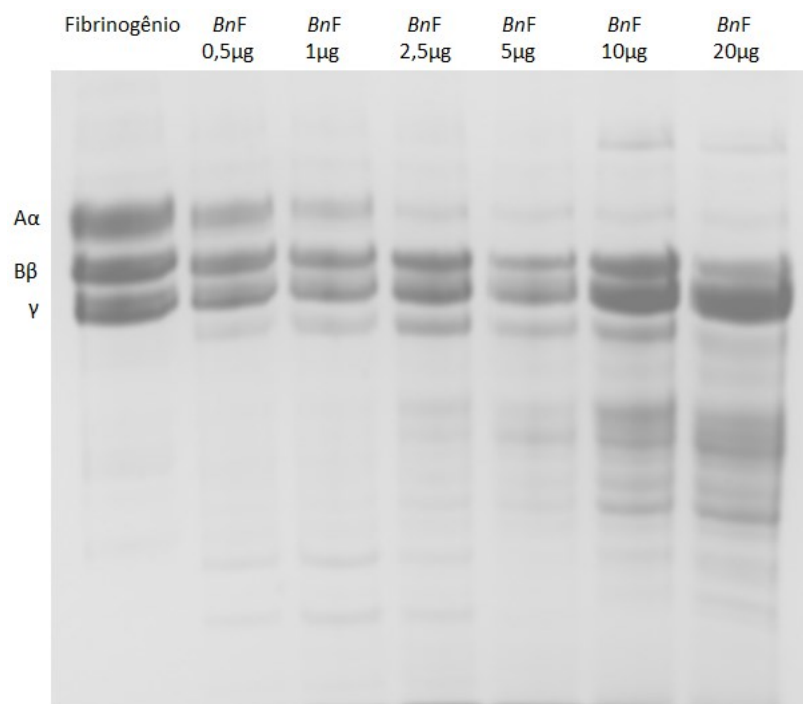


Figura 32 - Ensaio de atividade fibrinogenolítica da fração *Bothrops neuwiedi* em diferentes concentrações. A atividade fibrinogenolítica foi avaliada por SDS-PAGE a 10% utilizando diferentes concentrações (0,5 µg; 1,0 µg; 2,5 µg; 5,0 µg; 10 µg ou 20 µg) da fração *Bothrops neuwiedi* incubadas individualmente com 25 µg de fibrinogênio humano por 1 h a 37 °C. Como controle negativo foi utilizado apenas o fibrinogênio (25 µg). Após o período de incubação as amostras foram aplicadas no gel e a corrida foi realizada a 200 V. A coloração das proteínas foi realizada utilizando o corante *Coomassie Blue R-250*. **BnF**: fração *Bothrops neuwiedi*.

4.3.2.6 Atividade fibrinogenolítica tempo-dependente

Para avaliar a influência do tempo de incubação a 37 °C da fração *Bothrops neuwied* (5 µg) com o fibrinogênio (25 µg) na degradação das bandas, as amostras

foram incubadas por 0 h, 0,5 h, 1 h, 3 h, 6 h, 12 h e 24 h. Como controle negativo foi utilizado apenas o fibrinogênio (25 µg).

Foi verificado que a *BnF* foi capaz de degradar a banda Aα e parcialmente a banda Bβ em todos os tempos de incubação testados, exceto no tempo zero. Após 24 horas de incubação, a banda Bβ foi praticamente toda degradada (Figura 33). A partir da análise desses dados observou-se que o ensaio de atividade fibrinogenolítica pode ser realizado incubando a fração *Bothrops neuwied* com o fibrinogênio por no mínimo 0,5h.

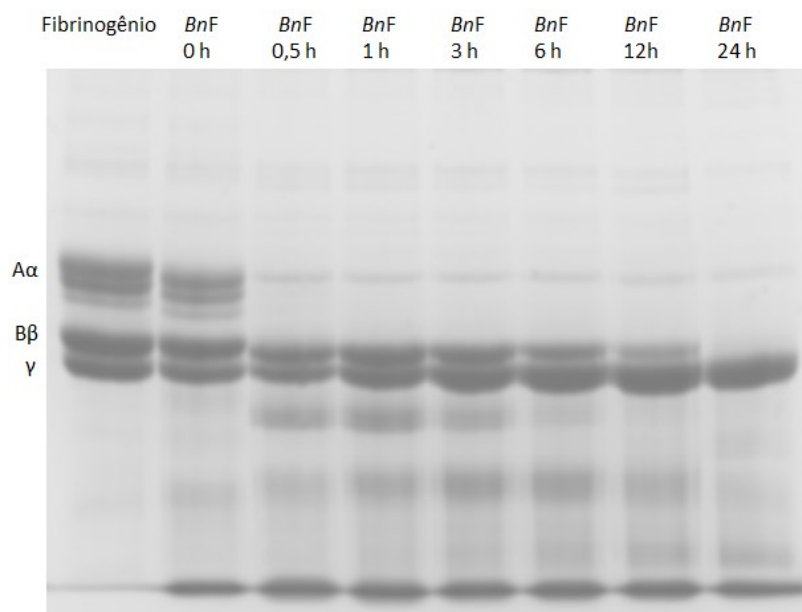


Figura 33 - Ensaio de atividade fibrinogenolítica da fração *Bothrops neuwied* em diferentes tempos de incubação. A atividade fibrinogenolítica foi avaliada por SDS-PAGE a 10%. A *BnF* (5 µg) foi incubada com o fibrinogênio humano (25 µg) a 37 °C por 0 h, 0,5 h, 1 h, 3 h, 6 h, 12 h ou 24 h). Após o período de incubação, as amostras foram aplicadas no gel e a corrida foi realizada a 200 V. A coloração das proteínas foi realizada utilizando o corante *Coomassie Blue R-250*. Como controle negativo foi utilizado apenas o fibrinogênio (25 µg). ***BnF***: *Bothrops neuwiedi*.

4.3.2.7 Atividade fibrinogenolítica temperatura-dependente

Para avaliar a estabilidade térmica da fração *Bothrops neuwied*, a fração foi previamente incubada em PBS 50 mM por uma hora nas temperaturas de -80 °C, 8 °C, 25 °C, 37 °C e 100 °C. Na sequência, o teste da atividade fibrinogenolítica foi realizado incubando a *BnF* (5µg) com o fibrinogênio (25 µg) por 1 h a 37 °C.

A *BnF* degradou a banda $A\alpha$ do fibrinogênio em todas as temperaturas ensaiadas, exceto a 100 °C, demonstrando assim, a estabilidade da fração nas demais temperaturas (Figura 34).

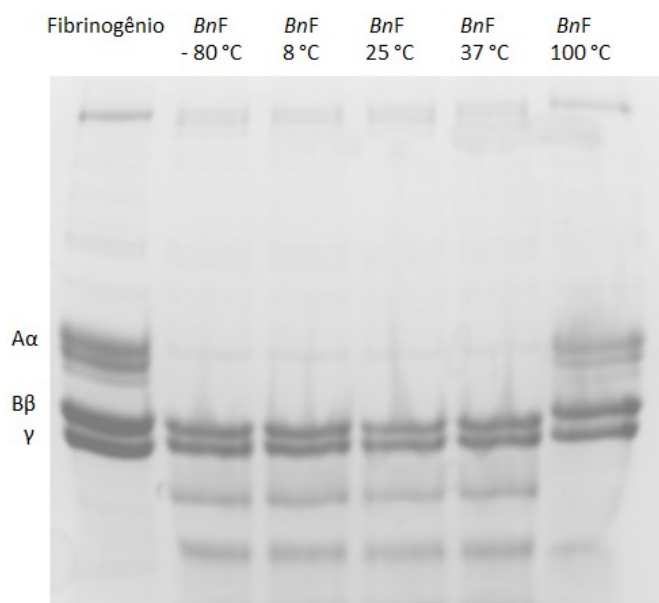


Figura 34 - Ensaio de atividade fibrinogenolítica da fração *Bothrops neuwiedi* em diferentes temperaturas de incubação. A atividade fibrinogenolítica foi avaliada por SDS-PAGE a 10%. A *BnF* (5 µg) foi previamente incubada por 1 h a -80 °C, 8 °C, 25 °C, 37 °C e 100 °C. Após este período, as amostras foram incubadas com o fibrinogênio (25 µg) por 1 h a 37 °C. Como controle negativo foi utilizado apenas o fibrinogênio (25 µg). Após o período de incubação as amostras foram aplicadas no gel e a corrida foi realizada a 200 V. A coloração das proteínas foi realizada utilizando o corante *Coomassie Blue R-250*. **BnF**: fração *Bothrops neuwiedi*.

4.3.2.8 Atividade amidásica sobre o BApNA

O substrato sintético BApNA é comumente utilizado para determinar atividade enzimática de serinoproteases em geral, como por exemplo, a tripsina. Foi observado que a fração *Bothrops neuwiedi* (25 µg) hidrolisou o BApNA, e quando associada previamente, por 30 minutos a 37 °C, ao PMSF (5 mM) foi observada inibição de 96,3% da atividade amidásica em relação à atividade da fração sem esta associação (Figura 35A). Este resultado reforça as evidências obtidas nos experimentos anteriores, de que a *BnF* é uma serinoprotease. Quando o anticorpo monoclonal *B. alternatus/B. neuwiedi* foi, também, associado previamente à *BnF* na proporção de 1:10 de fração (25

μg) em relação ao anticorpo monoclonal (250 μg) foi observada inibição de 41,9% da atividade amidásica em relação à atividade da fração isolada. Quando foi associado na proporção de 1:20 de fração (25 μg) em relação ao anticorpo monoclonal (500 μg) não observou-se diferença na inibição em relação à proporção de 1:10 (Figura 35A).

Ao avaliar a influência do pH sobre a atividade enzimática, observou-se que a *BnF* é estável em pH 8,2 e pH 9,0, e que houve uma redução da atividade relativa em 90%, 46% e 18% nos valores de pH 6,0; 7,0 e 10, respectivamente (Figura 35B).

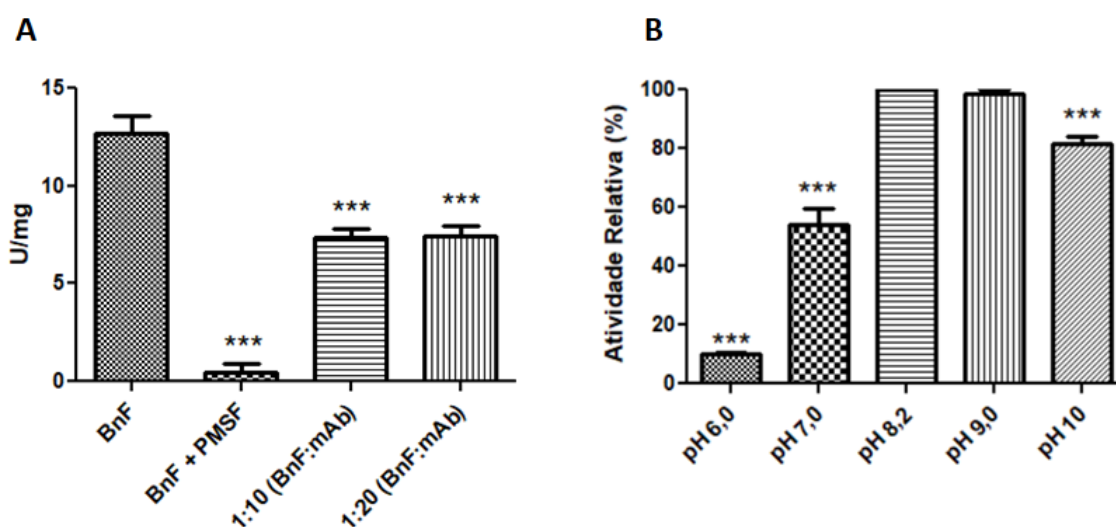


Figura 35 - Atividade amidásica da fração *Bothrops neuwiedi* sobre o BApNA. (A) Atividade amidásica da fração *Bothrops neuwiedi* sobre o substrato BApNA (0,36 mM). A *BnF* (25 μg) foi ensaiada separadamente, e também, associando previamente, o inibidor PMSF (5mM) e o mAb anti-*B. alternatus/B. neuwiedi*, nas proporções 1:10 e 1:20 (fração:monoclonal). As amostras foram incubadas a 37 °C por 30 minutos com o BApNA, e na sequência as absorbâncias foram lidas em 410 nm. Os resultados foram expressos em atividade específica (U/mg). **BnF** = fração *Bothrops neuwiedi* (25 μg), utilizada como controle positivo da atividade amidásica; **BnF + PMSF** = mistura da fração *Bothrops neuwiedi* (25 μg) e inibidor PMSF (5 mM); **1:10 (BnF:mAb)** = mistura 1:10 da fração *Bothrops neuwiedi* (25 μg) e mAb anti-*B. alternatus/B. neuwiedi* (250 μg); **1:20 (BnF:mAb)** = mistura 1:20 da fração *Bothrops neuwiedi* (25 μg) e mAb anti-*B. alternatus/B. neuwiedi* (500 μg). Os resultados foram expressos como média (n=3) \pm DP. *** P < 0,0001 vs. *BnF*. **(B)** Atividade amidásica da fração *Bothrops neuwiedi* sobre o substrato BApNA, em diferentes pHs (6,0; 7,0; 8,2; 9,0 e 10), representada em atividade relativa percentual em relação à atividade obtida em pH 8,2 (100%). Os resultados foram expressos como média (n=3) \pm DP. *** P < 0,0001 vs. atividade em pH 8,2.

4.3.2.9 Ensaio de Incoagulabilidade

Após 3 h da administração intraperitoneal de 10 µg, 50 µg e 100 µg da fração *Bothrops neuwiedi* e retirada do sangue dos animais, foi verificado que as amostras daqueles que receberam 50 µg e 100 µg da fração não coagulou após 60 minutos da coleta, e que o sangue dos animais do grupo controle negativo, que receberam apenas o PBS 50 mM, coagulou em aproximadamente 5 minutos. No grupo que recebeu 10 µg da *BnF*, foi observado que o sangue de um animal não coagulou após 60 minutos, e o dos outros dois animais coagulou em aproximadamente 5 minutos (Tabela 2).

Tabela 2 - Incoagulabilidade *in vivo*.

Animais	Coagulação do sangue após coleta			
	C - (PBS)	<i>BnF</i> (10 µg)	<i>BnF</i> (50 µg)	<i>BnF</i> (100 µg)
1	+	+	-	-
2	+	-	-	-
3	+	+	-	-

Os resultados da incoagulabilidade *in vivo* foram representados como positivo (+), para coagulação em até 5 minutos, e negativo (-), para ausência de coagulação em até 60 minutos após a coleta. **C - (PBS)**: controle negativo; ***BnF***: fração *Bothrops neuwiedi*. A coluna **Animais** representa o indivíduo de cada grupo.

4.3.2.10 Identificação dos componentes proteicos por espectrometria de massa

Para identificar os componentes da *BnF*, foi utilizada uma abordagem proteômica bottom-up, estimando a abundância de proteínas com base nos valores do iBAQ (SCHWANHÜSSER et al., 2011). Utilizando um score restrito, foram identificadas 24 proteínas que foram classificadas em oito classes de famílias de proteínas, incluindo serino protease, metaloprotease, lectina tipo C, glutaminil ciclase, fosfolipase A2, fosfolipase B-like, 5'-nucleotidase e L-amino oxidase ácida. Ao somar a intensidade do iBAQ de cada membro da família de proteínas, foi observada uma

prevalência de serino proteases na *BnF* (Figura 36A), representando 55% da composição da *BnF* (Figura 36B).

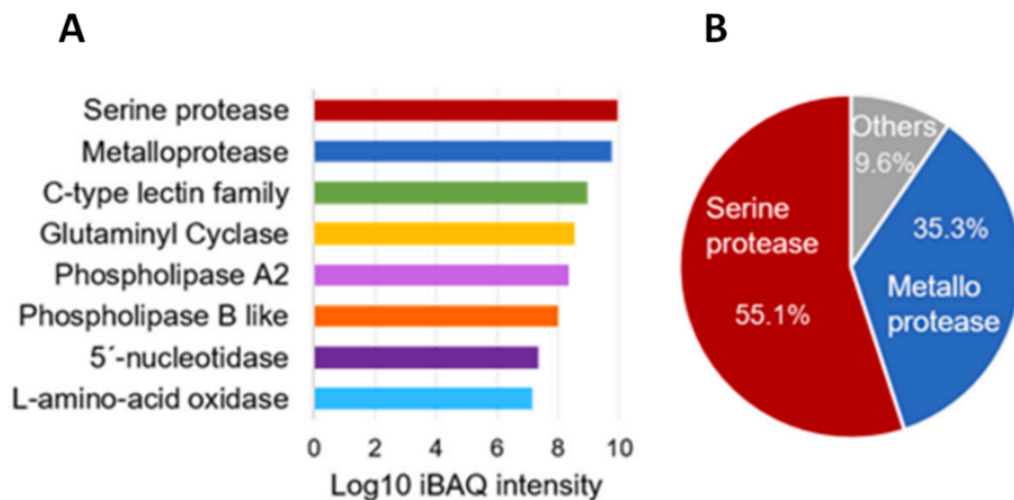


Figura 36 - Diferentes famílias de proteínas identificadas por espectrometria de massa da *BnF*. (A) Representação das oito classes de proteínas, que representa a soma das intensidades iBAQ transformadas em Log10 de cada membro da família. (B) Distribuição percentual das diferentes famílias de proteínas identificadas na *BnF*.

Ao comparar as sequências da análise dos espectros obtidos no LC-MS/MS com proteínas do gênero *Bothrops*, do banco de dados do UniProt, foram identificados também, dois peptídeos N-terminais, VIGGDECDINEHPFLAFMYYSR e VIGGDECDINEHR, que não foram incluídos na quantificação iBAQ. A partir do alinhamento, utilizando o programa BLASTP, destes peptídeos N-terminais foi identificado o fragmento de serinoprotease já descrito (VIGGDECDINEHPFL) para *Bothrops pauloensis* (COSTA et al., 2009), pertencente ao complexo *B. neuwiedi* (MACHADO; SILVA; SILVA, 2014).

A partir do alinhamento, do peptídeo maior (VIGGDECDINEHPFLAFMYYSR) localizado na porção N-terminal da *BnF*, com outras serinoproteases *thrombin-like*, como *leucurobin* de *B. leucurus* (P0DJ86), *batroxobin* de *B. atrox* (P04971), BpSP-1 de *B. pauloensis* (P0DJF1), *bothrombin* de *B. jararaca* (P81661), *barnettobin* de *B. barnetti* (K4LLQ2), BthaTL de *B. alternatus* (Q6IWF1), dentre outras, foi observada relevante

similaridade com estas proteínas, bem como presença de uma região conservada (Figura 37).

		ID (%)
BnF (<i>B. neuwiedi</i>)	¹ VIGGDECDINEHPFLAFMYYSR ²⁴	100.0
Leucurobin (<i>B. leucurus</i>)	¹ VIGGDECDINEHPFLAFMYYSR ²⁴	100.0
Batroxobin (<i>B. atrox</i>)	¹ VIGGDECDINEHPFLAFMYYSR ²⁴	100.0
BpSP-1 (<i>B. pauloensis</i>)	¹ VIGGDECDINEHPFL----- ¹⁵	100.0
Bothrombin (<i>B. jararaca</i>)	¹ VIGGDECDINEHPFLAFMYYSRQ ²⁴	95.7
Barnettobin (<i>B. barnetti</i>)	¹ VIGGDECDINEHPFLAFLY-SRG ²³	83.3
BthaTL (<i>B. alternatus</i>)	¹ VIGGDECDINEHRFLAFLY-PGR ²³	76.0
BITS01A (<i>B. insularis</i>)	¹ VVGGDECDINEHPFLAFLY-SHG ²³	75.0
BpirSP41 (<i>B. pirajai</i>)	¹ VVGGDECDINEHPFLAFLY-SHG ²³	75.0
HS112 (<i>B. jararaca</i>)	¹ VIGGDECDINEHRFLAFLY-AGG ²³	65.4
	* : * * * * * * * * * * * * * * * * * *	

Figura 37 - Alinhamento do peptídeo da BnF com serinoproteases *thrombin-like* de venenos de serpentes do gênero *Bothrops*. Alinhamento com leucurobin de *B. leucurus* (código Uniprot P0DJ86), batroxobin de *B. atrox* (código Uniprot P04971), BpSP-1 de *B. pauloensis* (código Uniprot P0DJF1), bothrombin de *B. jararaca* (código Uniprot P81661), barnettobin de *B. barnetti* (código Uniprot K4LLQ2), BthaTL de *B. alternatus* (código Uniprot Q6IWF1), BITS01A de *B. insularis* (código Uniprot Q8QG86), BpirSP41 de *B. pirajai* (código Uniprot P0DL27) e HS112 de *B. jararaca* (código Uniprot Q5W960). Os aminoácidos idênticos aos da BnF estão destacados em azul e aminoácidos com propriedades semelhantes estão destacados em verde. "*" significa aminoácidos idênticos, ":" aminoácidos com propriedades semelhantes, "espaço" de aminoácidos diferentes.

4.4 PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS ANTÍGENOS DE *B.*

alternatus

4.4.1 Purificação dos antígenos de *B. alternatus* reconhecidos pelo anticorpo

monoclonal anti-*B. alternatus/B. neuwiedi*

Cerca de 20 mg do veneno bruto de *B. alternatus* foram aplicados na coluna de afinidade mAb anti-*B. alternatus/B. neuwiedi*-Sepharose, previamente preparada de acordo com o item 3.4.1. As frações contendo os antígenos (fração *Bothrops alternatus* ou BaF) foram agrupadas, dialisadas, e utilizadas nos ensaios a seguir.

4.4.2 Caracterização da fração *Bothrops alternatus* (BaF)

4.4.2.1 Atividade coagulante

O ensaio da atividade coagulante da fração *Bothrops alternatus* foi realizado em duas concentrações diferentes. Como controle negativo foi utilizada solução contendo PBS 50 mM e cloreto de cálcio 10 mM. Foi observado que a fração *Bothrops alternatus*, purificada por coluna de afinidade contendo o anticorpo monoclonal *B. alternatus/B. neuwiedi*, não apresentou atividade coagulante nas concentrações de 40 µg e 80 µg, quando comparada ao controle negativo (Figura 38). Como as concentrações utilizadas já estavam elevadas, não foi possível repetir o ensaio com concentrações maiores.

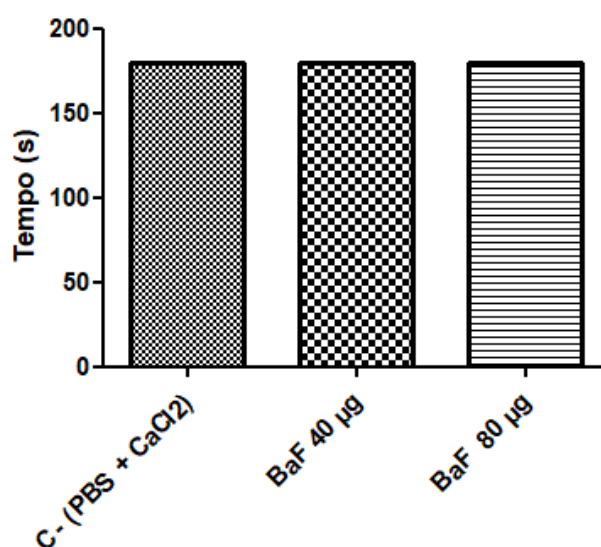


Figura 38 - Ensaio de atividade coagulante da fração *Bothrops alternatus*. O ensaio foi realizado utilizando 40 µg ou 80 µg da BaF. As diferentes concentrações da fração foram diluídas em PBS e CaCl₂, e em seguida, 50 µL de cada diluição foram adicionados à 200 µL de plasma de coelho citratado, previamente incubado por 15 minutos a 37 °C. Após adição das amostras o tempo necessário para a coagulação do plasma foi medido (em segundos). Os resultados foram expressos como média do tempo em segundo (s) ± DP (n=3). **C- (PBS + CaCl₂)**: controle negativo; **BaF**: fração *Bothrops alternatus*.

4.4.2.2 Atividade amidásica sobre o BApNA

A fração *Bothrops alternatus* apresentou atividade sobre o substrato sintético BApNA, utilizado para determinar atividade enzimática de serinoproteases em geral.

Quando o PMSF, foi associado à *BaF*, foi observada inibição de 78,9% da atividade amidásica em relação à atividade da fração isolada (Figura 38). Este resultado evidencia que a fração *Bothrops alternatus* também é uma serinoprotease.

A ação neutralizante do anticorpo monoclonal *B. alternatus/B. neuwiedi* também foi avaliada. Quando o mAb foi associado à *BaF* na proporção de 1:10 da fração (25 µg) em relação ao monoclonal (250 µg), foi observada inibição de 57,7% da atividade amidásica, em relação à atividade da fração. Ao associá-lo na proporção de 1:20 da fração (25 µg) em relação ao anticorpo monoclonal (500 µg), houve inibição de 100%, o que demonstra que o monoclonal inibiu completamente a atividade amidásica da fração (Figura 39).

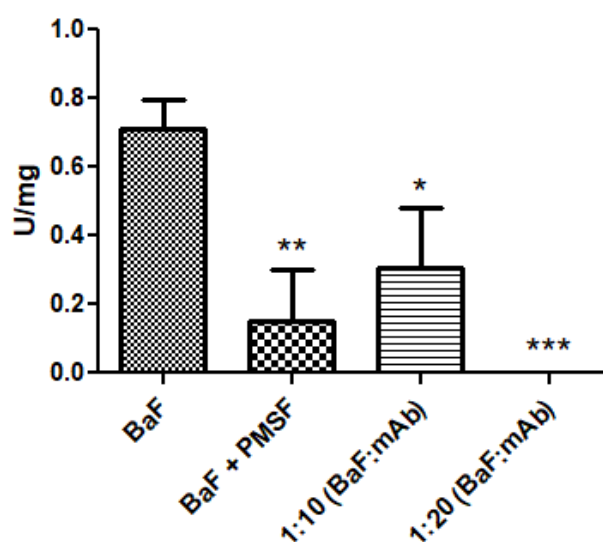


Figura 39 - Ensaio de neutralização da atividade amidásica da fração *Bothrops alternatus* sobre o BApNA. A *BaF* foi ensaiada separadamente, e também, associando previamente, o inibidor PMSF (5 mM) e o anticorpo monoclonal *B. alternatus/B. neuwiedi* nas proporções 1:10 e 1:20 (fração:monoclonal). As amostras foram incubadas a 37 °C por 30 minutos com o BApNA (0,36 mM), e na sequência as absorbâncias foram lidas em 410 nm. Os resultados foram expressos em atividade específica (U/mg). **BaF:** *Bothrops alternatus* (25 µg), utilizada como controle positivo da atividade amidásica; **BaF + PMSF:** mistura da fração *Bothrops alternatus* (25 µg) e inibidor PMSF (5 mM); **1:10 (BaF:mAb)** = mistura 1:10 da fração *Bothrops alternatus* (25 µg) e mAb anti-*B. alternatus/B. neuwiedi* (250 µg) e **1:20 (BaF:mAb)** = mistura 1:20 da fração *Bothrops alternatus* (25 µg) e mAb anti-*B. alternatus/B. neuwiedi* (500 µg). Os resultados foram expressos como média (n=3) ± DP. *** P < 0,0006 vs. *BaF*; ** P < 0,05 vs. *BaF*; * P < 0,05 vs. *BaF*.

5. DISCUSSÃO

No Brasil a maioria dos acidentes ofídicos registrados é causada por serpentes peçonhentas do gênero *Bothrops* spp. Atualmente, o soro antiofídico ainda é o único tratamento disponível, porém é cada vez mais evidente a necessidade de buscar terapias alternativas para o envenenamento ofídico, com o objetivo de reduzir efeitos adversos e aumentar sua eficácia.

No presente trabalho, que objetivou a produção de anticorpo monoclonal contra venenos de serpentes do gênero *Bothrops* spp., os camundongos foram imunizados com o *pool* botrópico contendo os venenos de *B. jararaca*, *B. alternatus*, *B. jararacussu*, *B. moojeni* e *B. neuwiedi*. O anticorpo monoclonal anti-*B. alternatus/B. neuwiedi* foi obtido após as etapas de produção e purificação e o mesmo reconheceu o *pool* botrópico e os venenos de *B. alternatus* e *B. neuwiedi*. As bandas reativas no ensaio de *Western Blot* apresentaram massa entre 45 e 66 kDa. Considerando esses valores e dados da literatura, concluímos que o monoclonal poderia estar reconhecendo metaloprotease, serinoprotease, LAAO ou hialuronidase (CEVALLOS et al., 1992; DU; CLEMETSON, 2002; GUTIÉRREZ; RUCAVADO, 2000; SERRANO; MAROUN, 2005).

Sendo assim, para caracterizar e evidenciar qual proteína é reconhecida pelo anticorpo, foram realizados testes de neutralização. O ensaio de neutralização da atividade fosfolipásica, em que utilizou-se o veneno de *B. neuwiedi* e *B. alternatus* e o anticorpo monoclonal, foi realizado como um teste confirmatório de que o mAb anti-*B. alternatus/B. neuwiedi* não reconhecia fosfolipase. Verificou-se que o monoclonal não neutralizou as fosfolipases ativas presentes nestes venenos.

As metaloproteases podem causar hemorragia (GUTIÉRREZ et al., 2016b), e pela faixa de massa molecular da banda reativa observada no *Western Blot*, o monoclonal poderia estar reconhecendo uma metaloprotease. Por isso, foi realizado o

teste de neutralização da atividade hemorrágica, para verificar se o monoclonal inibia esta ação do veneno de *B. neuwiedi*. O mAb anti-*B. alternatus/B. neuwiedi* não neutralizou a hemorragia causada pelo veneno. Em seguida, foi avaliada a neutralização da atividade coagulante, pois serinoproteases, principalmente as *thrombin-like* podem causar coagulação do plasma (COSTA et al., 2009; MARIA et al., 2013; VILCA-QUISPE et al., 2010; ZAQUEO et al., 2014), e o monoclonal também, poderia estar reconhecendo esta toxina. Primeiramente a DMC do veneno *B. neuwiedi* foi calculada (DMC = 0,5 µg), e foi verificado que o mAb anti-*B. alternatus/B. neuwiedi*, utilizado na quantidade de 100 vezes a DMC, inibiu a atividade coagulante. Para avaliar a neutralização da atividade coagulante do veneno *B. alternatus*, a DMC também foi calculada (DMC = 40 µg), e foi muito superior a DMC do *B. neuwiedi*. Em relação ao veneno de *B. alternatus*, o mAb anti-*B. alternatus/B. neuwiedi* inibiu a atividade coagulante quando foi utilizada quantidade de monoclonal pelo menos 20 vezes a DMC. Diante desse resultado, verificou-se uma possibilidade da proteína que o mAb anti-*B. alternatus/B. neuwiedi* reconhece estar relacionada ao processo de coagulação, podendo então ser uma serinoprotease (STÁBELI et al., 2004; URS et al., 2013)

O fato da DMC do veneno de *B. alternatus* ser maior que a DMC de *B. neuwiedi*, provavelmente está relacionado ao fato de o veneno de *B. alternatus* ter menor concentração de serinoprotease, conforme já descrito em estudos de transcriptoma e proteoma desses venenos (CARDOSO et al., 2010; RODRIGUES et al., 2012).

Para prosseguir a investigação a respeito do antígeno reconhecido pelo mAb anti-*B. alternatus/B. neuwiedi*, o anticorpo foi imobilizado em uma coluna, a fim de realizar processos de cromatografia de afinidade que possibilitassem a captura do antígeno presente no veneno de *B. neuwiedi*. A fração obtida foi denominada fração

Bothrops neuwiedi (BnF), e foi utilizada para realização de ensaios de caracterização bioquímica do antígeno reconhecido pelo anticorpo monoclonal.

Após a obtenção da fração *Bothrops neuwiedi* foi realizado *Western Blot*, e verificou-se que a banda reativa da fração apresentava massa entre 45 e 66 kDa, semelhante ao ensaio em que o mAb foi testado frente ao veneno de *B. neuwiedi* e ao *pool* botrópico.

A fração *Bothrops neuwiedi* não apresentou atividade hemorrágica, assim como a serinoprotease *thrombin-like*, BpSP-I, de *B. pauloensis* e a BmoosP de *B. moojeni* (COSTA et al., 2009; DE OLIVEIRA et al., 2016). Este resultado está de acordo com a não neutralização da atividade hemorrágica pelo mAb anti-*B. alternatus/B. neuwiedi*. No entanto, no ensaio da atividade coagulante foi verificado que esta fração apresentou atividade concentração dependente, com DMC de 9 µg. A DMC pode variar entre as diferentes serinoproteases, inclusive de uma mesma espécie. Em trabalhos realizados com 3 serinoproteases de *B. pirajai*, foram obtidas DMC de 1,7 µg, 3,5 µg e 20 µg para as serinoproteases BpirSP-39, BpirSP-41 e BpirSP-27, respectivamente (MENALDO et al., 2012; ZAQUEO et al., 2014). Este resultado da atividade coagulante da fração *Bothrops neuwiedi* corrobora o resultado em que o anticorpo monoclonal inibiu a atividade coagulante do veneno de *B. neuwiedi*.

Os principais componentes hemotóxicos dos venenos, que interferem na coagulação e hemostasia, são as serinoproteases e metaloproteases. As SVSP podem atuar sobre o fibrinogênio e fibrina, fatores da coagulação, proteína C, plasminogênio e plaquetas, e podem também, atuar sobre o cininogênio e calicreína, liberando bradicinina e causando assim, anormalidades na hemostasia e trombose. As SVMPs são responsáveis pela atividade hemorrágica, pois degradam a membrana basal proteica, provocando perda da integridade dos vasos e extravasamento do sangue. Também

possuem atividade fibrinogenolítica e de inibição da agregação plaquetária (URS et al., 2013). Então, foram realizados ensaios de atividade proteolítica sobre os substratos para serinoproteases e metaloproteases, utilizando estes dois substratos acoplados a um sistema FRET. A fração *Bothrops neuwiedi* apresentou atividade proteolítica sobre o substrato para serinoproteases, mas não apresentou atividade proteolítica sobre o substrato para metaloproteases. Este resultado corrobora a capacidade da *BnF* em coagular o plasma de coelho como apresentado anteriormente. Isso sugere que o anticorpo monoclonal pode estar reconhecendo uma serinoprotease relacionada ao distúrbio da coagulação durante o envenenamento, assim como já demonstrado em outros trabalhos, como, por exemplo, a capacidade de serinoproteases de *B. alternatus* e *B. moojeni* em coagular o plasma humano (MARIA et al., 2013).

Posteriormente, a atividade proteolítica da *BnF* foi avaliada utilizando o substrato para serinoprotease acoplado a um sistema FRET, no entanto, foram associados o mAb anti-*B. alternatus/B. neuwiedi* e o inibidor de serinoprotease, PMSF. Foi observado que o PMSF inibiu a atividade proteolítica da *BnF*, o que reforça a hipótese de que o antígeno reconhecido pelo monoclonal é uma serinoprotease. O mAb anti-*B. alternatus/B. neuwiedi* não inibiu a atividade proteolítica da *BnF* na proporção avaliada de 1:25 (fração:mAb). Para confirmar a atividade de serinoprotease e investigar se o mAb anti-*B. alternatus/B. neuwiedi* poderia inibi-la, o BApNA, um substrato sintético para serinoproteases, foi utilizado. A fração *Bothrops neuwiedi* apresentou atividade amidásica sobre o BApNA, o que também já foi descrito para outras serinoproteases *thrombin-like*, como a BpirSP-39, do veneno de *B. pirajai* (ZAQUEO et al., 2014). Quando o monoclonal foi associado nas proporções de 1:10 e 1:20 (fração:mAb), ocorreu uma inibição de aproximadamente 42%. Ao associar o PMSF à *BnF*, foi observada uma inibição de 96,3% da atividade amidásica. Alguns estudos que

avaliaram a atividade amidásica de serinoproteases e sua inibição pelo PMSF obtiveram dados similares. MASOOD et al. (2016), por exemplo, avaliaram a atividade amidásica de serinoprotease dos venenos de *B. brazili* e *B. atrox*, e o PMSF inibiu 70% e 50% da atividade, respectivamente. Em outro trabalho que a atividade amidásica de serinoprotease *thrombin-like* de *B. marajoensis* foi avaliada, esse mesmo inibidor neutralizou 70% da atividade (VILCA-QUISPE et al., 2010). Estes dados corroboram os resultados obtidos no presente estudo, reafirmando que a fração *Bothrops neuwiedi* é uma serinoprotease. Em relação à influência do pH sobre a atividade amidásica, foi observado que a *BnF* é estável em pH 8,2 e pH 9,0, e que houve redução de 90%, 46% e 18% na atividade em pH 6,0; 7,0 e 10, respectivamente.

A atividade fibrinogenolítica da *BnF* sobre o fibrinogênio humano foi avaliada, e foi observado que a fração degradou praticamente toda subunidade A α do fibrinogênio e parcialmente a subunidade B β , assim como observado para a serinoprotease BpirSP-39, ao degradar o fibrinogênio bovino (ZAQUEO et al., 2014). Ao associar o EDTA e PMSF, que são inibidores de metaloprotease e serinoprotease, respectivamente, foi verificado que o EDTA não impediu a degradação da banda A α do fibrinogênio. No entanto, foi observado que o PMSF, inibiu a degradação da banda A α do fibrinogênio pela *BnF*, sugerindo assim, que essa fração é uma serinoprotease. Além disso, observou-se que a atividade fibrinogenolítica da *BnF* é concentração dependente, e que o tempo de incubação com o fibrinogênio deve ser de no mínimo 30 minutos. Quanto à atividade fibrinogenolítica e à estabilidade em diferentes temperaturas, a *BnF* demonstrou-se estável a -80 °C, 8 °C, 25 °C e 37 °C. Essas características observadas em relação à atividade fibrinogenolítica se assemelham às características observadas para a serinoprotease *thrombin-like*, BpSP-I, de *B. pauloensis*, em que esta atividade foi

concentração e tempo dependente, apresentou estabilidade em temperaturas inferiores a 37 °C, e também foi inibida pelo PMSF (COSTA et al., 2009).

Quando o ensaio de incoagulabilidade *in vivo* foi realizado, verificou-se que o sangue dos animais que receberam 50 µg e 100 µg da fração *Bothrops neuwiedi* não coagulou após 60 minutos da coleta. Este resultado sugere que o fibrinogênio foi totalmente consumido após administração da *BnF* (SANO-MARTINS et al., 1994). De acordo com a literatura, serinoproteases com atividade semelhante à trombina (*thrombin-like*) degradam o fibrinogênio em fibrinopeptídeos, e apresentam propriedades procoagulantes *in vitro* e anticoagulantes *in vivo* (CASTRO et al., 2004). Este dado de incoagulabilidade após administração da fração corrobora o resultado da atividade coagulante *in vitro* da *BnF*, e também, os demais resultados que demonstram que esta fração é uma serinoprotease.

A análise proteômica revelou a prevalência da família de serino proteases na composição da *BnF*, incluindo a enzima *thrombin-like batroxobin* (P04971) de *B. atrox* (STOCKER; BARLOW, 1976). As sequências de aminoácidos dos peptídeos gerados a partir da digestão trípica da *BnF* mostraram alta similaridade/identidade com a parte N-terminal de resíduos de aminoácidos encontrados em várias serinoproteases *thrombin-like* de venenos de serpentes do gênero *Bothrops*. Dentre elas, as proteínas *leucurobin* (P0DJ86) de *B. leucurus* (MAGALHÃES et al., 2007), *batroxobin* (P04971) de *B. atrox* (STOCKER; BARLOW, 1976) e *bothrombin* (P81661) de *B. jararaca* (NISHIDA et al., 1994), que são serinoproteases *thrombin-like*, que clivam a cadeia alfa do fibrinogênio. Assim como foi observado para a fração *Bothrops neuwiedi*, que degradou a banda A α e parcialmente a banda B β no ensaio de atividade fibrinogenolítica. A *leucurobin* e a *bothrombin* são inibidas pelos inibidores de serinoproteases, PMSF e DFP, respectivamente (MAGALHÃES et al., 2007; NISHIDA et al., 1994), da mesma forma

que a fração *Bothrops neuwiedi*, que também foi inibida pelo PMSF. Outra serinoprotease com similaridade relevante foi a *Snake venom serinoprotease* BthaTL (Q6IWF1) de *B. alternatus*, que pode atuar no sistema hemostático. E também, a *Thrombin-like enzyme* BpSP-1 (P0DJF1) de *B. pauloensis* (COSTA et al., 2009) e *Thrombin-like enzyme barnettobin* (K4LLQ2) de *B. barnetti* (VIVAS-RUIZ et al., 2013). A *barnettobin* apresenta atividade coagulante *in vitro*, atividade anticoagulante *in vivo* e atividade amidásica, que é inibida pelo PMSF (VIVAS-RUIZ et al., 2013), mesmas características encontradas para a fração *Bothrops neuwiedi*. A BpSP-1, por sua vez, cliva a cadeia alfa do fibrinogênio e parcialmente a beta, além de induzir incoagulabilidade *in vivo* (COSTA et al., 2009), de forma similar à fração estudada.

Embora famílias adicionais de proteínas, como metaloproteases, tenham sido identificado na *BnF*, sua atividade não foi detectada na fração, mesmo utilizando técnicas sensíveis, como o ensaio utilizando o substrato acoplado ao sistema FRET. A presença destas proteínas pode estar associada a uma possível co-precipitação de proteínas não relacionadas com o mAb, quando foi utilizada solução supersaturada de sulfato de amônio. A co-eluição de proteínas não relacionadas na cromatografia de imunoafinidade também tem sido reconhecida, pois é possível que algumas toxinas interajam com outras proteínas do veneno (M. BRGLES, T. KURTOVIC, L. KOVACIC, I. KRIZAJ, M. BARUT, M.L. BALIJA; M. MARCHETTI-DESCHMANN, 2014) ou possam interagir diretamente com a matriz da coluna (GOMES et al., 2007). Outras abordagens para isolar IgG, como cromatografia de afinidade com proteína A/G ou otimização da preparação da coluna e condições de eluição (quantidade de IgG ligada, quantidade de veneno aplicado, tampões de eluição, etc.) podem favorecer um produto mais puro, mais ativo e com maior rendimento (KRISTINE H. DURKEE, BONG H. ROH, 1993; SINTIPRUNGRAT et al., 2016). No

entanto, considerando a complexidade molecular e a natureza das misturas de venenos, a imunoafinidade é de fato uma boa opção para isolar toxinas utilizando menos etapas e preservando sua atividade biológica com maior rendimento do que outros métodos comumente usados (THOMPSON; BURGESS, 2015). Além disso, a utilização de diferentes ensaios que indicam a atividade de SVSP *thrombin-like* da BnF, mostraram colectivamente a forte presença de serino protease nesta fração.

O mAb desenvolvido, apresentou alta especificidade para proteínas com massa molecular em torno de 50 kDa nos venenos de *B. alternatus* e *B. neuwiedi*, especificamente. Este mAb é capaz de neutralizar o efeito coagulante de *B. neuwiedi*, e além disso, a caracterização da fração do veneno de *B. neuwiedi* ligada a este mAb, indica que ele é direcionado a serino proteases *thrombin-like*. Este é um dos poucos mAbs direcionados a esta família de toxinas em venenos botrópicos e pode ser uma ferramenta útil para melhorar a terapia antiveneno e auxiliar na caracterização de novos componentes do veneno. Além disso, assim como a Batroxobina, que é uma droga desenvolvida a partir de uma serinoprotease *thrombin-like* de *B. moojeni*, e é empregada no tratamento de desordens trombóticas (SLAGBOOM et al., 2017), a fração *Bothrops neuwiedi*, obtida por coluna de afinidade contendo o mAb anti-*B. alternatus/B. neuwiedi*, pode ter uma ampla utilidade, visto que grande parte dos produtos farmacêuticos derivados de venenos de serpentes apresentam aplicações relacionadas à hemostasia.

6. CONCLUSÃO

Nossos resultados demonstraram que o mAb anti-*B. alternatus/B. neuwiedi* foi eficiente em reconhecer antígenos presentes nos venenos de *B. neuwiedi* e *B. alternatus* (imunorreatividade cruzada), bem como apresentou um potencial inibitório significativo da atividade enzimática sobre o substrato sintético, BApNA, para serinoproteases e sobre a atividade coagulante induzida pelos venenos de *B. neuwiedi* e *B. alternatus*, e pela fração *Bothrops neuwiedi*.

O anticorpo produzido, ligado à resina, possibilitou a purificação por afinidade de moléculas que causam alterações nos parâmetros da coagulação, sendo procoagulante *in vitro* e anticoagulante *in vivo*, cujos dados indicam ser uma serinoprotease *thrombin-like*. Desta maneira, tal anticorpo se mostrou excelente ferramenta molecular na obtenção de toxinas presentes no veneno de *B. neuwiedi* e *B. alternatus*.

Este trabalho poderá contribuir para o desenvolvimento de novos antivenenos, como alternativa terapêutica a antivenenos convencionais, e também, para o estudo de toxinas presentes em venenos de serpentes.

7. PERSPECTIVAS

Obter a sequência completa das proteínas purificadas dos venenos de *B. neuwiedi* e *B. alternatus*, realizar estudos estruturais comparativos com outras serinoproteases, e concomitantemente, realizar testes com substratos específicos relacionados à cascata da coagulação.

Avaliar o papel de glicosilações nas atividades das frações *Bothrops neuwiedi* e *Bothrops alternatus* sobre o BApNA.

Produzir outros anticorpos monoclonais direcionados a outras proteínas dos venenos botrópicos.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVARENGA, L. M. et al. Production of monoclonal antibodies capable of neutralizing dermonecrotic activity of *Loxosceles intermedia* spider venom and their use in a specific immunometric assay. **Toxicon**, v. 42, n. 7, p. 725–731, 2003.

ALVARENGA, L. M. et al. Molecular characterization of a neutralizing murine monoclonal antibody against *Tityus serrulatus* scorpion venom. **Toxicon**, v. 46, n. 6, p. 664–671, 2005.

ARNOLD, C. The Snakebite Fight. **Nature**, v. 537, p. 26–28, 2016.

ASCENZI, P. et al. Steady-state and pre-steady-state kinetics of the trypsin-catalysed hydrolysis of α -CBZ-l-lysine-p-nitrophenyl ester. **BBA - Enzymology**, v. 658, n. 1, p. 158–164, 1981.

ASSAKURA, M. T; FURTADO, M. F.; MANDELBAU, F. R. Biochemical and biological differentiation of the venoms of the lancehead vipers (*Bothrops atrox*, *Bothrops asper*, *Bothrops marajoensis* and *Bothrops moojeni*). **Compendium Biochemistry and Physiology**, v. 102, p. 727–732, 1992.

BAYER-GARNER, I. B.; COTTLER-FOX, M.; SMOLLER, B. R. Sweet syndrome in multiple myeloma: a series of six cases. **Journal of cutaneous pathology**, v. 30, n. 4, p. 261–4, 2003.

BLUNDELL, T. L. news and views families and drug design. v. 1, n. 2, p. 73–75, 1994.

BRAUD, S.; BON, C.; WISNER, A. **Snake venom proteins acting on hemostasis***Biochimie*, 2000.

BROWN, N.; LANDON, J. Antivenom: The most cost-effective treatment in the world? **Toxicon**, v. 55, n. 7, p. 1405–1407, 2010.

BUSS, N. A. P. S. et al. Monoclonal antibody therapeutics: History and future. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 12, n. 5, p. 615–622, 2012.

CALVETE, J. J. et al. Venoms, venomics, antivenomics. **FEBS Letters**, v. 583, n. 11, p. 1736–1743, 2009.

CALVETE, J. J. Proteomic tools against the neglected pathology of snake bite envenoming. 2011.

CAMEY, K. U.; VELARDE, D. T.; SANCHEZ, E. F. Pharmacological characterization and neutralization of the venoms used in the production of Bothropic antivenom in Brazil. **Toxicon**, v. 40, n. 5, p. 501–509, 2002.

CARDOSO, J. L. C. et al. Randomized comparative trial of three antivenoms in the treatment of envenoming by lance-headed vipers (*Bothrops jararaca*) in São Paulo, Brazil. **QJM**, v. 86, n. 5, p. 315–325, 1993.

CARDOSO, K. C. et al. A transcriptomic analysis of gene expression in the venom gland of the snake *Bothrops alternatus* (urutu). **BMC Genomics**, v. 11, n. 1, p. 605, 2010.

CARRASCO, P. A. et al. Nomenclatural instability in the venomous snakes of the *Bothrops* complex: Implications in toxinology and public health. **Toxicon**, v. 119, p. 122–128, 2016.

CASTRO, H. C. et al. Snake venom thrombin-like enzymes: From reptilase to now. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 61, n. 7–8, p. 843–856, 2004.

CEVALLOS, M. A. et al. Molecular mass determination and assay of venom hyaluronidases by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. **Toxicon**, v. 30, n. 8, p. 925–930, 1992.

CHAIMOVICH, H. Ciência , tecnologia e produção no Butantan. **Revista USP**, v. 89, p. 78–89, 2011.

CHAVEZ-OLORTEGUI, C. et al. In vivo protection against scorpion toxins by liposomal immunization. **Vaccine**, v. 9, n. 12, p. 907–910, 1991.

CHIPPAUX, J. P. Snake-bites: Appraisal of the global situation. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 76, n. 5, p. 515–524, 1998.

CHIPPAUX, J. P. Estimate of the burden of snakebites in sub-Saharan Africa: A meta-analytic approach. **Toxicon**, v. 57, n. 4, p. 586–599, 2011.

CHIPPAUX, J. P. Snakebite envenomation turns again into a neglected tropical disease! **Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases**, v. 23, n. 1, p. 1–2, 2017.

COSTA, F. L. S. et al. Biochemical and functional properties of a thrombin-like enzyme

isolated from *Bothrops pauloensis* snake venom. **Toxicon**, v. 54, n. 6, p. 725–735, 2009.

DE OLIVEIRA, F. et al. Biochemical and functional characterization of BmooSP, a new serine protease from *Bothrops moojeni* snake venom. **Toxicon**, v. 111, p. 130–138, 2016.

DU, X. Y.; CLEMETSON, K. J. Snake venom L-amino acid oxidases. **Toxicon**, v. 40, n. 6, p. 659–665, 2002.

ECKER, D. M.; JONES, S. D.; LEVINE, H. L. The therapeutic monoclonal antibody market. **mAbs**, v. 7, n. 1, p. 9–14, 2015.

ERLANGER, B. F.; KOKOWSKY, N.; COHEN, W. The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 95, n. 2, p. 271–278, 1961.

ESCALANTE, T. et al. Key events in microvascular damage induced by snake venom hemorrhagic metalloproteinases. **Journal of Proteomics**, v. 74, n. 9, p. 1781–1794, 2011.

FOX, J. W. A brief review of the scientific history of several lesser-known snake venom proteins: L-amino acid oxidases, hyaluronidases and phosphodiesterases. **Toxicon**, v. 62, p. 75–82, 2013.

FOX, J. W.; SERRANO, S. M. T. Structural considerations of the snake venom metalloproteinases, key members of the M12 reprolysin family of metalloproteinases. **Toxicon**, v. 45, n. 8, p. 969–985, 2005.

FOX, J. W.; SERRANO, S. M. T. Insights into and speculations about snake venom metalloproteinase (SVMP) synthesis, folding and disulfide bond formation and their contribution to venom complexity. **FEBS Journal**, v. 275, n. 12, p. 3016–3030, 2008.

FRAUCHES, T. S. et al. Bothropic antivenom based on monoclonal antibodies, is it possible? **Toxicon**, v. 71, p. 49–56, 2013.

GIBBS, H. L.; SANZ, L.; CALVETE, J. J. Snake population venomomics: Proteomics-based analyses of individual variation reveals significant gene regulation effects on venom protein expression in *sistrurus rattlesnakes*. **Journal of Molecular Evolution**, v. 68, n. 2, p. 113–125, 2009.

GIRISH, K. S. et al. **Snake venom hyaluronidase: An evidence for isoforms and extracellular matrix degradation** *Molecular and Cellular Biochemistry*, 2002.

GOMES, P. C. et al. The co-purification of a lectin (BJcuL) with phospholipases A2 from *Bothrops jararacussu* snake venom by immunoaffinity chromatography with antibodies to crotoxin. **Toxicon**, v. 49, n. 8, p. 1099–1108, 2007.

GRODZKI, A. C.; BERENSTEIN, E. Antibody Purification: Ammonium Sulfate Fractionation or Gel Filtration. In: **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**. [s.l.: s.n.], p. 15–26.

GUÉRCIO, R. A. P. et al. Ontogenetic variations in the venom proteome of the Amazonian snake *Bothrops atrox*. **Proteome Science**, v. 4, p. 1–14, 2006.

GUTIÉRREZ, J. M.; LEÓN, G.; LOMONTE, B. Pharmacokinetic-Pharmacodynamic Relationships of Immunoglobulin Therapy for Envenomation. v. 42, n. 8, p. 721–741, 2003.

GUTIERREZ, J. M. et al. Snakebite envenoming. v. 3, p. 1–21, 2017.

GUTIÉRREZ, J. M. et al. Experimental pathology of local tissue damage induced by *Bothrops asper* snake venom. **Toxicon**, v. 54, n. 7, p. 958–975, 2009.

GUTIÉRREZ, J. M. Improving antivenom availability and accessibility: Science, technology, and beyond. **Toxicon**, v. 60, n. 4, p. 676–687, 2012.

GUTIÉRREZ, J. M. et al. A comprehensive view of the structural and functional alterations of extracellular matrix by snake venom metalloproteinases (SVMPs): Novel perspectives on the pathophysiology of envenoming. **Toxins**, v. 8, n. 10, 2016a.

GUTIÉRREZ, J. M. et al. Hemorrhage caused by snake venom metalloproteinases: A journey of discovery and understanding. **Toxins**, v. 8, n. 4, 2016b.

GUTIÉRREZ, J. M.; OWNBY, C. L. Skeletal muscle degeneration induced by venom phospholipases A2: Insights into the mechanisms of local and systemic myotoxicity. **Toxicon**, v. 42, n. 8, p. 915–931, 2003.

GUTIÉRREZ, J. M.; RUCAVADO, A. Snake venom metalloproteinases: Their role in the pathogenesis of local tissue damage. **Biochimie**, v. 82, n. 9–10, p. 841–850, 2000.

HARRISON, R. A. et al. Snake envenoming: A disease of poverty. **PLoS Neglected**

Tropical Diseases, v. 3, n. 12, 2009.

HIGUCHI, D. A. et al. Purification and partial characterization of two phospholipases A2 from *Bothrops leucurus* (white-tailed-jararaca) snake venom. **Biochimie**, v. 89, n. 3, p. 319–328, 2007.

IRANI, V. et al. Molecular properties of human IgG subclasses and their implications for designing therapeutic monoclonal antibodies against infectious diseases. **Molecular Immunology**, v. 67, n. 2, p. 171–182, 2015.

JOHNSTON, S. L. Biologic therapies: What and when? **Journal of Clinical Pathology**, v. 60, n. 1, p. 8–17, 2007.

KANG, T. S. et al. Enzymatic toxins from snake venom: Structural characterization and mechanism of catalysis. **FEBS Journal**, v. 278, n. 23, p. 4544–4576, 2011.

KINI, R. M. Anticoagulant proteins from snake venoms: structure, function and mechanism. **Biochemical Journal**, v. 397, n. 3, p. 377–387, 2006.

KÖHLER, G.; MILSTEIN, C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. **Nature**, v. 256, n. 5517, p. 495–497, 1975.

KRISTINE H. DURKEE, BONG H. ROH, G. J. D. Immunoaffinity chromatographic purification of Russell' s viper venom factor X activator using elution in high concentrations of magnesium chloride.Pdf. **Protein Expression and Purification**, v. 4, p. 405–411, 1993.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680–685, 1970.

LAUSTSEN, A. et al. From Fangs to Pharmacology: The Future of Snakebite Envenoming Therapy. **Current Pharmaceutical Design**, v. 22, n. 34, p. 5270–5293, 2016a.

LAUSTSEN, A. H. et al. Biotechnological trends in spider and scorpion antivenom development. **Toxins**, v. 8, n. 8, 2016b.

LAUSTSEN, A. H. et al. Pros and cons of different therapeutic antibody formats for recombinant antivenom development. **Toxicon**, v. 146, 2018.

LOMONTE, B. et al. Venomous snakes of Costa Rica: Biological and medical

implications of their venom proteomic profiles analyzed through the strategy of snake venomomics. **Journal of Proteomics**, v. 105, p. 323–339, 2014.

LU, Q.-M. et al. L-amino acid oxidase from *Trimeresurus jerdonii* snake venom: Purification, characterization, platelet aggregation-inducing and antibacterial effects. **Journal of Natural Toxins**, 2002.

M. BRGLES, T. KURTOVIC, L. KOVACIC, I. KRIZAJ, M. BARUT, M.L. BALIJA, G. A.; M. MARCHETTI-DESCHMANN, B. H. Identification of proteins interacting with ammodytoxins in *Vipera ammodytes ammodytes* venom by immuno-affinity chromatography. **Anal. Bioanal. Chem.**, v. 406, p. 293–304, 2014.

MACHADO, T.; SILVA, V. X.; SILVA, M. J. DE J. Phylogenetic relationships within *Bothrops neuwiedi* group (Serpentes, Squamata): Geographically highly-structured lineages, evidence of introgressive hybridization and Neogene/Quaternary diversification. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 71, n. 1, p. 1–14, 2014.

MAGALHÃES, A. et al. Purification and properties of a coagulant thrombin-like enzyme from the venom of *Bothrops leucurus*. **Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology**, v. 146, n. 4, p. 565–575, 2007.

MARIA, L. et al. Toxicon Rapid purification of serine proteinases from *Bothrops alternatus* and *Bothrops moojeni* venoms. **Toxicon**, v. 76, p. 282–290, 2013.

MASOOD, R. et al. Serine proteinases from *Bothrops* snake venom activates PI3K/Akt mediated angiogenesis. **Toxicon**, v. 124, p. 63–72, 2016.

MENALDO, D. L. et al. Biochemical characterization and comparative analysis of two distinct serine proteases from *Bothrops pirajai* snake venom. **Biochimie**, v. 94, n. 12, p. 2545–2558, 2012.

MENEZES, M. C. et al. Sex-based individual variation of snake venom proteome among eighteen *Bothrops jararaca* siblings. **Toxicon**, v. 47, n. 3, p. 304–312, 2006.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Guia de Vigilância Epidemiológica**. [s.l.: s.n.].

MINISTÉRIO DA SAÚDE DO BRASIL. **ACIDENTE POR ANIMAIS PEÇONHENTOS - Notificações registradas no Sistema de Informação de Agravos de Notificação - BRASIL**. Disponível em: <<http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sinannet/cnv/animaisbr.def>>. Acesso em:

30 mar. 2019.

MITRAKUL, C. Effect of five Thai snake venoms on coagulation, fibrinolysis and platelet aggregation. **Southeast Asian J Trop Med Public Health**, v. 10, n. 2, p. 266–275, 1979.

MOHAPATRA, B. et al. Snakebite mortality in India: A nationally representative mortality survey. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 5, n. 4, p. 1–8, 2011.

MOLINA MOLINA, D. A. et al. Identification of a linear B-cell epitope in the catalytic domain of bothropasin, a metalloproteinase from *Bothrops jararaca* snake venom. **Molecular Immunology**, v. 104, n. August, p. 20–26, 2018.

MONTECUCCO, C.; GUTIÉRREZ, J. M.; LOMONTE, B. Cellular pathology induced by snake venom phospholipase A2 myotoxins and neurotoxins: Common aspects of their mechanisms of action. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 65, n. 18, p. 2897–2912, 2008.

MORENO, E. et al. A new method for the detection of phospholipase A2 variants: Identification of isozymes in the venoms of newborn and adult *Bothrops asper* (terciopelo) snakes. **Toxicon**, v. 26, n. 4, p. 363–371, 1988.

NISHIDA, S. et al. Purification and Characterization of Bothrombin, a Fibrinogen-Clotting Serine Protease from the Venom of *Bothrops jararacat*. **Biochemistry**, v. 33, n. 7, p. 1843–1849, 1994.

NUNES, D. C. O. et al. Isolation and functional characterization of proinflammatory acidic phospholipase A2 from *Bothrops leucurus* snake venom. **Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology**, v. 154, n. 3, p. 226–233, 2011.

OYAMA, E.; TAKAHASHI, H. Structures and Functions of Snake Venom Metalloproteinases (SVMP) from Protobothrops venom Collected in Japan. n. C, 2017.

PERONA, J. J.; CRAIK, C. S. Structural basis of substrate specificity in the serine proteases. **Protein Science**, v. 4, n. 3, p. 337–360, 1995.

PUTNAM, F. W. **The Plasm Proteins**. 2nd. ed. [s.l.] Academic Press, 1975.

QUEIROZ, G. P. et al. Interspecific variation in venom composition and toxicity of

- Brazilian snakes from Bothrops genus. **Toxicon**, v. 52, n. 8, p. 842–851, 2008.
- R. W. DIXON ;J. B. HARRIS. Myotoxic activity of the toxic phospholipase, notexin, from the venom of the Australian tiger snake. **J Neurophathol. Exp. Neurol.**, v. 55, n. c, p. 1230–1237, 1996.
- RAMOS, O. H. P.; SELISTRE-DE-ARAUJO, H. S. **Snake venom metalloproteases - Structure and function of catalytic and disintegrin domainsComparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology**, 2006.
- RÉDEI, G. P. Blast (basic local alignment search tool). In: **Encyclopedia of Genetics, Genomics, Proteomics and Informatics**. [s.l: s.n.].
- REGO, C. et al. Proteomic profile, biological activities and antigenic analysis of the venom from Bothriopsis bilineata smaragdina (“ loro machaco ”), a pitviper snake from Peru. **Journal of Proteomics**, v. 187, n. July, p. 171–181, 2018.
- RODRIGUES, R. S. et al. Combined snake venomomics and venom gland transcriptomic analysis of Bothropoides pauloensis. **Journal of Proteomics**, v. 75, n. 9, p. 2707–2720, 2012.
- SAKURAI, Y. et al. Inhibition of human platelet aggregation by L-amino acid oxidase purified from Naja naja kaouthia venom. **Toxicon**, v. 39, n. 12, p. 1827–1833, 2001.
- SANO-MARTINS, I. S. et al. Reliability of the simple 20 minute whole blood clotting test (WBCT20) as an indicator of low plasma fibrinogen concentration in patients envenomed by Bothrops snakes. **Toxicon**, v. 32, n. 9, p. 1045–1050, 1994.
- SCHNEIDER, F. S. et al. Use of a Synthetic Biosensor for Neutralizing Activity-Biased Selection of Monoclonal Antibodies against Atroxlysin-I, an Hemorrhagic Metalloproteinase from Bothrops atrox Snake Venom. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 4, p. 1–10, 2014.
- SCHWANHÜUSSER, B. et al. Global quantification of mammalian gene expression control. **Nature**, v. 473, n. 7347, p. 337–342, 2011.
- SERRANO, S. M. T. The long road of research on snake venom serine proteinases. **Toxicon**, v. 62, p. 19–26, 2013.
- SERRANO, S. M. T.; MAROUN, R. C. Snake venom serine proteinases: Sequence

homology vs. substrate specificity, a paradox to be solved. **Toxicon**, v. 45, n. 8, p. 1115–1132, 2005.

SIEVERS, F.; HIGGINS, D. G. Clustal Omega for making accurate alignments of many protein sequences. **Protein Science**, v. 27, n. 1, p. 135–145, 2018.

SINTIPRUNGRAT, K. et al. Immunoaffinity chromatography in antivenomics studies: Various parameters that can affect the results. **Toxicon**, v. 119, p. 129–139, 2016.

SLAGBOOM, J. et al. Haemotoxic snake venoms: their functional activity, impact on snakebite victims and pharmaceutical promise. **British Journal of Haematology**, v. 177, n. 6, p. 947–959, 2017.

SOUSA, L. F. et al. Comparison of Phylogeny, Venom Composition and Neutralization by Antivenom in Diverse Species of Bothrops Complex. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, n. 9, 2013.

STÁBELI, R. G. et al. Platelet aggregation and antibacterial effects of an L-amino acid oxidase purified from Bothrops alternatus snake venom. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, 2004.

STOCKER, K.; BARLOW, G. H. [18] The Coagulant Enzyme from Bothrops Atrax Venom (Batroxobin). **Methods in Enzymology**, v. 45, n. C, p. 214–223, 1976.

TAN, N. H.; SAIFUDDIN, M. N.; YONG, W. Y. The edema inducing activity of phospholipase A2 enzymes. **Biochem Int**, 1991.

TASOULIS, T.; ISBISTER, G. K. A review and database of snake venom proteomes. **Toxins**, v. 9, n. 9, 2017.

THEAKSTON, R. D. G.; REID, H. A. Development of simple standard assay procedures for the characterization of snake venoms. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 61, n. 6, p. 949–956, 1983.

THOMPSON, N. E.; BURGESS, R. R. Immunoaffinity Chromatography : Advantages and Limitations. p. 483–502, 2015.

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

URS, N. A. N. et al. Implications of phytochemicals in snakebite management: Present status and future prospective. **Toxin Reviews**, v. 33, n. 3, p. 60–83, 2013.

VILCA-QUISPE, A. et al. Isolation and characterization of a new serine protease with thrombin-like activity (TLBm) from the venom of the snake *Bothrops marajoensis*. **Toxicon**, v. 55, n. 4, p. 745–753, 2010.

VIVAS-RUIZ, D. E. et al. Coagulant thrombin-like enzyme (barnettobin) from *Bothrops barnetti* venom: Molecular sequence analysis of its cDNA and biochemical properties. **Biochimie**, v. 95, n. 7, p. 1476–1486, 2013.

WARBURG, O.; CHRISTIAN, W. Isolation and crystallization of enolase. **Biochem Z**, v. 310, p. 384–421, 1941.

WARD, R. J. et al. Refolding and purification of bothropstoxin-I, a Lys49-phospholipase A2homologue, expressed as inclusion bodies in *Escherichia coli*. **Protein Expression and Purification**, v. 21, n. 1, p. 134–140, 2001.

WARRELL, D. A. Snake bite. **The Lancet**, v. 375, n. 9708, p. 77–88, 2010.

WHITE, J. **Snake venoms and coagulopathy** **Toxicon**, 2005.

WHO. **Snakebite Envenoming - Epidemiology**. Disponível em: <<http://www.who.int/snakebites/epidemiology/en/>>. Acesso em: 14 abr. 2020.

ZAQUEO, K. D. et al. Isolation and Biochemical Characterization of a New Thrombin-Like Serine Protease from *Bothrops pirajai* Snake Venom. v. 2014, 2014.

ZELANIS, A. et al. Analysis of the ontogenetic variation in the venom proteome/peptidome of *Bothrops jararaca* reveals different strategies to deal with prey. **Journal of Proteome Research**, v. 9, n. 5, p. 2278–2291, 2010.

ZELANIS, A. et al. Snake venom serine proteinases specificity mapping by proteomic identification of cleavage sites. **Journal of Proteomics**, v. 113, p. 260–267, 2015.

ZELANIS, A. et al. Proteomic identification of gender molecular markers in *Bothrops jararaca* venom. **Journal of Proteomics**, v. 139, p. 26–37, 2016.

ZULIANI, J. P. et al. Snake venom L-amino acid oxidases: some consideration about their functional characterization. **Protein and peptide letters**, 2009.