

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E IMUNOLOGIA**

Thamyres Caroline Silva de Assis

**Produção e caracterização de um anticorpo monoclonal contra metaloprotease
do veneno da serpente *Bothrops atrox***

BELO HORIZONTE – MG
2022

Thamyres Caroline Silva de Assis

**Produção e caracterização de um anticorpo monoclonal contra metaloprotease
do veneno da serpente *Bothrops atrox***

Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação em Bioquímica e Imunologia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre.

Orientador: Dr. Carlos Delfín Chávez Olortegui

BELO HORIZONTE – MG

2022

043 Assis, Thamyres Caroline Silva de.
Produção e caracterização de um anticorpo monoclonal contra metaloprotease do veneno da serpente *Bothrops atrox* [manuscrito] / Thamyres Caroline Silva de Assis. – 2022.
75 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Carlos Delfin Chávez Olortegui.

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

1. Bioquímica e Imunologia. 2. Envenenamento. 3. Metaloproteinases. 4. Anticorpos Monoclonais. 5. Hemorragia. I. Olortegui, Carlos Delfin Chávez. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 577.1



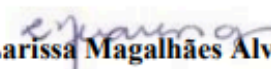
Universidade Federal de Minas Gerais
 Curso de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia ICB/UFMG
 Av. Antônio Carlos, 6627 – Pampulha
 31270-901 – Belo Horizonte – MG
 e-mail: pg-biq@icb.ufmg.br (31)3409-2615

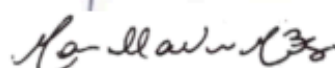


ATA DA DEFESA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE THAMYRES CAROLINE SILVA DE ASSIS. Aos nove dias do mês de junho de 2022 às 09:00 horas, reuniu-se de forma “on line” utilizando a plataforma “Zoom”, no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, a Comissão Examinadora da dissertação de Mestrado, indicada *ad referendum* do Colegiado do Curso, para julgar, em exame final, o trabalho intitulado “Produção e caracterização de um anticorpo monoclonal contra metaloprotease do veneno da serpente *Bothrops atrox*”, requisito final para a obtenção do grau de Mestre em Bioquímica e Imunologia, área de concentração: Bioquímica. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, Prof. Carlos Delfin Chávez Olórtegui, 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: Dra. . Larissa Magalhães Alvarenga (Universidade Federal do Paraná), aprovada; Dra. Marcella Nunes de Melo Braga (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada; Dr. Carlos Delfin Chávez Olórtegui - 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, 09 de junho de 2022.


 Dra. . Larissa Magalhães Alvarenga (Universidade Federal do Paraná)


 Dra. Marcella Nunes de Melo Braga (UFMG)


 Dr. Carlos Delfin Chávez Olórtegui - Orientador (UFMG)

Agradecimentos

À Universidade Federal de Minas Gerais, lugar de conhecimento plural, minha casa nos últimos 7 anos, por toda a vivência, estrutura e conhecimento fornecidos para minha formação e realização deste trabalho.

Ao Departamento de Bioquímica e Imunologia da UFMG, corpo docente, secretaria e demais funcionários, que contribuíram significativamente para obtenção do título de Mestre.

Ao Professor Dr. Carlos Chávez Olórtegui, por, desde a Iniciação Científica, confiar em mim e no meu trabalho, muitas vezes mais do que eu mesma confiei. Pela oportunidade de iniciar e consolidar minha carreira científica, pelo carinho e orientação durante todos esses anos.

À Dra. Tamara Fernandes Costa, por sempre aceitar e encarar todo e qualquer desafio comigo. Por ser minha dupla, parceira, irmã científica durante todos esses anos. Foram tantos perrengues, derrotas, conquistas e vitórias que não poderia existir pessoa melhor no mundo para viver tudo isso comigo. Obrigada por tudo, garotinha!

À Dra. Raissa Medina Santos por toda a amizade, disposição e vontade de ajudar. Seja na mesma cidade, ou atravessando o Atlântico, eu sei que posso contar com você sempre. Você me inspira muito!

Aos amigos do Laboratório de Imunoquímica de Proteínas, em especial à Dra. Carolina Rego Rodrigues, Mestre Letícia Lopes, Dr. Denis Molina, Mestre Rafael Saavedra Langer, Dra. Sabrina Lima, Mestre Priscila Araújo, Mestre Silvio Rincon Filho, por toda a ajuda prática e teórica, por estarem presentes todos os dias durante meus desabafos, e por todos os almoços, cervejinhas e cafés compartilhados. Com vocês, a vida acadêmica é mais leve e agradável.

À Dra Clara Guerra Duarte, por todo o apoio profissional e emocional, e por me mostrar que é possível levar a vida acadêmica e científica com leveza.

Ao Jamil, por toda a ajuda, bom humor, e por sempre disponibilizar reagentes e equipamentos.

A todos os meus amigos, em especial à Thais, por caminhar comigo durante tantos anos, me dando todo o suporte possível, partilhando todos os sentimentos ótimos e terríveis dessa fase.

À minha irmã Jéssica, por sempre trilhar o caminho para que eu possa passar em seguida, me dando conselhos e me tranquilizando sempre.

Aos meus pais e meu irmão Lucas, pelo amor incondicional, por sempre acreditarem na minha capacidade de fazer tudo o que eu quisesse me fornecendo a base para tudo.

Aos membros da banca examinadora, por terem aceitado o convite para contribuir com esta dissertação.

E a todos que, de alguma maneira, contribuíram para a concretização deste trabalho.

Resumo

O ofidismo é uma doença negligenciada que representa um sério problema de saúde pública em todo o mundo, apresentando altas taxas de morbidade e mortalidade. Dentre as principais serpentes causadoras de acidentes, as representantes do gênero *Bothrops* são responsáveis por quase 90% dos casos de acidentes ofídicos no Brasil, sendo a *Bothrops atrox* a principal serpente causadora de acidentes na região amazônica. Estes acidentes são conhecidos por causarem graves efeitos sistêmicos e locais, podendo resultar na amputação do membro afetado, e até levar à morte do paciente. Os sintomas observados no envenenamento ofídico ocorrem pela ação de diversas toxinas presentes no veneno. Entre elas, destacam-se as metaloproteases (SVMPs), as quais são uma família de proteínas presente no veneno das *Bothrops*, e outras serpentes da família Viperidae de uma forma geral. Comumente classificadas em três classes, baseadas em seus domínios proteicos mais importantes, as SVMPs são as principais toxinas responsáveis pelos efeitos hemorrágicos causados pelo envenenamento botrópico. O atual tratamento para tais acidentes é a soroterapia que, apesar de eficaz, possui problemas relacionados ao custo de produção, à ética animal e à possibilidade de reações adversas. Tendo em vista as adversidades relacionadas à soroterapia e o grande efeito hemorrágico provocado pelas metaloproteases de veneno de serpentes, o presente trabalho teve como objetivo o desenvolvimento de um anticorpo monoclonal com capacidade de neutralizar o efeito hemorrágico do veneno de *B. atrox*. Para isto, o veneno desta serpente foi usado como imunógeno para produção de anticorpos monoclonais. O anticorpo monoclonal selecionado (mAb 4H4D11) é capaz de reconhecer bandas de aproximadamente 50 e 35 kDa do veneno, e possui reatividade cruzada com outros venenos do gênero *Bothrops*, além do gênero *Lachesis*. mAb 4H4D11 é capaz de neutralizar parcialmente a atividade fibrinogenolítica de *B. atrox in vitro*, além da atividade hemorrágica *in vivo*. Os resultados deste trabalho podem contribuir com o desenvolvimento de antivenenos de nova geração, visando o melhoramento do tratamento dos acidentes ofídicos.

Palavras-chave: Veneno de *B. atrox*; metaloprotease; anticorpo monoclonal; hemorragia.

Abstract

Ophidism is a neglected disease that represents a serious public health problem worldwide, with high rates of morbidity and mortality. Among the main snakes, *Bothrops* genus is responsible for almost 90% of snakebites in Brazil, with *Bothrops atrox* being the main snake responsible for accidents in the Amazon region. These accidents are known to cause serious systemic and local effects, which can result in amputation of the affected limb, and even lead to the patient death. The symptoms observed in snakebite envenomation occur due to the action of several toxins present in the venom, and among them, metalloproteases stand out. Metalloproteases (SVMPs) are a family of proteins present in *Bothrops* venom and other snakes of Viperidae family. Commonly classified into three classes, based on their most important protein domains, SVMPs are the main toxins responsible for the hemorrhagic effects caused by bothropic envenomation. The current treatment for such accidents is serum therapy, which, despite being effective, has problems related to production cost, animal ethics and the possibility of adverse reactions. Considering the drawbacks related to serum therapy and the hemorrhagic effect caused by snake venom metalloproteases, the present work aimed to develop a monoclonal antibody capable of neutralizing the hemorrhagic effect of *B. atrox* venom. For this, the venom was used as an immunogen for the monoclonal antibody production. The selected monoclonal antibody (mAb 4H4D11) is able to recognize bands of approximately 50 and 35 kDa in the venom, and has cross-reactivity with other venoms from *Bothrops* genus, in addition to *Lachesis* genus. mAb 4H4D11 partially neutralizes the fibrinogenolytic activity of *B. atrox* venom *in vitro* and the hemorrhagic activity *in vivo*. The results of this work can contribute to the development of new generation antivenoms, aiming to improve the treatment of snakebites.

Key words: *B. atrox* venom; metalloproteinase; monoclonal antibody; hemorrhage

Lista de figuras

Figura 1 - Notificações de acidentes causados por serpentes peçonhentas no Brasil entre os anos de 2011 e 2021.	14
Figura 2 - Distribuição de espécies do gênero botrópico no Brasil.	15
Figura 3 - <i>B. atrox</i> e sua distribuição geográfica.	15
Figura 4 - Composição dos venenos das serpentes das famílias Elapidae e Viperidae.	17
Figura 5 - Classes de toxinas identificadas no veneno de <i>B. atrox</i> .	18
Figura 6 - Mecanismo de ação das SVMPs hemorrágicas.	20
Figura 7 - Representação esquemática dos diferentes domínios das metaloproteases de classes I, II e III.	21
Figura 8 - Aspectos clínicos observados após o envenenamento botrópico.	22
Figura 9 - Representação esquemática da produção de soros antiveneno.	23
Figura 10 - Estrutura de uma molécula de anticorpo.	25
Figura 11 - Representação esquemática dos diferentes tipos de epítomos.	26
Figura 12 - Reatividade dos soros dos animais imunizados frente ao veneno de <i>B. atrox</i> .	36
Figura 13 - Screening dos sobrenadantes celulares dos hibridomas frente ao veneno de <i>B. atrox</i> .	37
Figura 14 - Avaliação da reatividade dos sobrenadantes celulares dos subclones (100 µL) contra <i>B. atrox</i> .	38
Figura 15 - SDS-PAGE da purificação de anticorpos a partir do sobrenadante celular do clone 4H4D11.	38
Figura 16 - Isotipagem do anticorpo monoclonal 4H4D11.	39

Figura 17 - Imunorreatividade do mAb 4H4D11 frente ao veneno de B. atrox por Western blot.	40
Figura 18 - Reatividade cruzada do mAb 4H4D11 frente a diferentes venenos botrópicos.	41
Figura 19 - SDS-PAGE de diferentes venenos botrópicos.	43
Figura 20 - Reatividade cruzada do mAb 4H4D11 contra diferentes venenos ofídicos.	43
Figura 21 - Ensaio de Spot em membrana contendo epítomos lineares de serinoprotease e metaloprotease P-III.	44
Figura 22 - Perfil cromatográfico do fracionamento do veneno de B. atrox.	45
Figura 23 - Perfil caseinolítico dos tubos coletados após purificação do veneno de B. atrox em coluna S-200.	46
Figura 24 - Perfil eletroforético dos tubos coletados na purificação do veneno de B. atrox.	47
Figura 25 - Ensaio de atividade fibrinogenolítica da fração P2 de B. atrox.	48
Figura 26 - Imunorreatividade do mAb 4H4D11 frente à fração 2 de B. atrox por Western blot.	49
Figura 27 - Neutralização da atividade fibrinogenolítica utilizando o mAb 4H4D11.	50
Figura 28 - Neutralização da atividade hemorrágica utilizando o mAb 4H4D11.	51

Lista de abreviações

- BCIP** – *5-bromo-4-cloro-3-indolyl-phosphate* (5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato)
- BSA** – *Bovine Serum Albumine* (Soro Albumina Bovina)
- CBS** – *Citrate Buffer Saline* (Tampão citrato salina)
- CO₂** – Dióxido de carbono
- DAB** – Diaminobenzidina
- DMEM** – *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (Meio de Eagle modificado por Dulbecco)
- ELISA** – *Enzyme-linked Immunosorbent Assay* (Ensaio de Imunoabsorção enzimática)
- F(ab')₂** – Fragmento de ligação ao antígeno
- Fg** – Fibrinogênio
- HAT** – Hipoxantina, Aminopterina e Timidina
- HRP** – *Horseradish peroxidase* (Peroxidase de Rábano Silvestre)
- HT** – Hipoxantina e Aminopterina
- ICB** – Instituto de Ciências Biológicas
- IgG** – Imunoglobulina G
- kDa** – Kilodaltons
- LAAO** – L-aminoácido oxidase
- mAb** – *Monoclonal antibody* (anticorpo monoclonal)
- MgCl₂** – Cloreto de magnésio
- MTT** – *(3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2*
- Nm** – Nanômetro
- OMS** – Organização Mundial da Saúde
- OPD** – *o-Phenylenediamine dihydrochloride* (Dicloridrato de o-fenilenodiamina)
- PBS** – *Phosphate Buffered Saline* (Tampão fosfato salina)
- PEG** – Polietilenoglicol
- PLA₂** – Fosfolipase A₂
- SDS** – *Sodium dodecyl-sulfate* (Dodecil-sulfato de sódio)
- SDS-PAGE** – *Sodium dodecyl-sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*
(Eletroforese em gel de poliácridamida com dodecil-sulfato de sódio)
- SFB** – Soro fetal bovino

SINAN – Sistema de Informação de Agravos de Notificação

SVMP – Snake Venom Metalloproteinase (Metaloprotease do veneno de serpente)

SVSP – Snake Venom Serine Proteinase (Serinoprotease do veneno de serpente)

Sumário

1. INTRODUÇÃO	13
1.1. Bothrops atrox E EPIDEMIOLOGIA	13
1.2. Composição do veneno e envenenamento botrópico	16
1.3. Antivenenos e novas tecnologias	22
1.4. Anticorpos monoclonais	24
2. JUSTIFICATIVA	28
3. OBJETIVOS	29
3.1. Objetivo geral	29
3.2. Objetivos específicos	29
4. MATERIAL E MÉTODOS	30
4.1. Venenos e animais	30
4.2. Dosagem de proteínas	30
4.3. Produção de anticorpos monoclonais	30
4.3.1. Imunização de camundongos	30
4.3.2. Reatividade dos soros imunes contra B. atrox por ELISA	30
4.3.3. Cultivo de células de mieloma de camundongo SP2/0	31
4.3.4. Fusão e obtenção de hibridomas	31
4.3.5. Screening e subclonagem	31
4.3.6. Purificação de anticorpos e SDS-PAGE	32
4.4. Imunorreatividade e reatividade cruzada	32
4.4.1. Elisa	32
4.4.2. Sds-page	33
4.4.3. Western blotting	33
4.4.4. Isotipagem do anticorpo monoclonal	33
4.4.5. Mapeamento de epítomos pelo método de Spot Síntese	33
4.5. Fracionamento do veneno de b. atrox	34
4.5.1. Ensaio de atividade caseinolítica	34
4.5.2. Ensaio de atividade fibrinogenolítica	35
4.6. Ensaio de neutralização	35
4.6.1. Ensaio de neutralização de atividade fibrinogenolítica	35
4.6.2. Ensaio de neutralização de atividade hemorrágica	35
5. RESULTADOS	36
5.1. Produção de anticorpos monoclonais	36
5.1.1. Subclonagem de hibridomas	37
5.2. Caracterização do anticorpo monoclonal	39
5.2.1. Western blot	39
5.2.2. Imunorreatividade e reatividade cruzada	40
5.2.3. Mapeamento de epítomos lineares pelo método de Spot Síntese	44
5.3. Fracionamento do veneno de b. atrox	44
5.3.1. Ensaio de atividade caseinolítica	45

5.3.2. Ensaio de atividade fibrinogenolítica	47
5.3.3. Western blot	48
5.4. Ensaaios de neutralização	49
5.4.1. Ensaio de neutralização de atividade fibrinogenolítica in vitro	49
5.4.2. Ensaio de neutralização de atividade hemorrágica in vivo	50
6. DISCUSSÃO	52
7. CONCLUSÕES	57
8. PERSPECTIVAS	58
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59
10. ANEXOS	75
10.1. Links dos artigos publicados em periódicos durante o mestrado	75
10.2. Depósito de pedido de patente	75

1. INTRODUÇÃO

1.1. *Bothrops atrox* E EPIDEMIOLOGIA

Ofidismo é o quadro clínico causado pelo envenenamento por serpentes peçonhentas. Estima-se que, anualmente, entre 1,8 e 2,7 milhões de pessoas são vítimas do ofidismo. Destas, 300.000 casos apresentam sequelas permanentes, e 95.000 evoluem para o óbito (GUTIÉRREZ *et al.*, 2017).

A maioria destas vítimas estão localizadas em regiões vulneráveis e de difícil acesso, em países subdesenvolvidos ou em desenvolvimento. Estes fatores contribuem negativamente no tratamento dos acidentes, devido à dificuldade na disponibilidade de assistência médica e no suprimento de medicamentos e antivenenos, além da dificuldade do cumprimento das políticas públicas de saúde e da realização de notificações ao sistema de saúde responsável (LONGBOTTOM *et al.*, 2018). Além disso, a mortalidade anual causada por envenenamentos ofídicos é muito maior do que a atribuída a várias doenças tropicais negligenciadas atualmente reconhecidas, incluindo a dengue hemorrágica, cólera, leishmaniose, esquistossomose, encefalite japonesa e doença de Chagas (WILLIAMS *et al.*, 2010). Por estas razões, em 2017, a Organização Mundial da Saúde reintroduziu os acidentes ofídicos na categoria A das doenças tropicais negligenciadas (CHIPPAUX *et al.*, 2017; LANCET, 2017)

No Brasil, são notificados anualmente mais de 25.000 acidentes ofídicos (SINAN, 2022). Entre as vítimas, destacam-se trabalhadores rurais do sexo masculino, com idade entre 15 e 49 anos. A letalidade dos acidentes é de 0,44% e a gravidade dos casos está diretamente relacionada com a idade das vítimas, sendo mais graves e letais em crianças de até 10 anos e idosos (SCHNEIDER, Maria Cristina *et al.*, 2021; SILVA, Ageane Mota da; BERNARDE; ABREU, 2015).

Quatro gêneros de serpentes estão envolvidos nos acidentes ofídicos de importância médica do Brasil: *Bothrops* (jararacas - responsáveis por 86% dos casos), *Crotalus* (cascavéis – responsáveis por cerca de 10% dos casos) e *Lachesis* (surucucus – responsáveis por 3% dos casos), pertencentes à família Viperidae. Única representante da família Elapidae, as *Micrurus* (corais verdadeiras) são responsáveis por 1% dos casos (SINAN, 2022) (Figura 1).

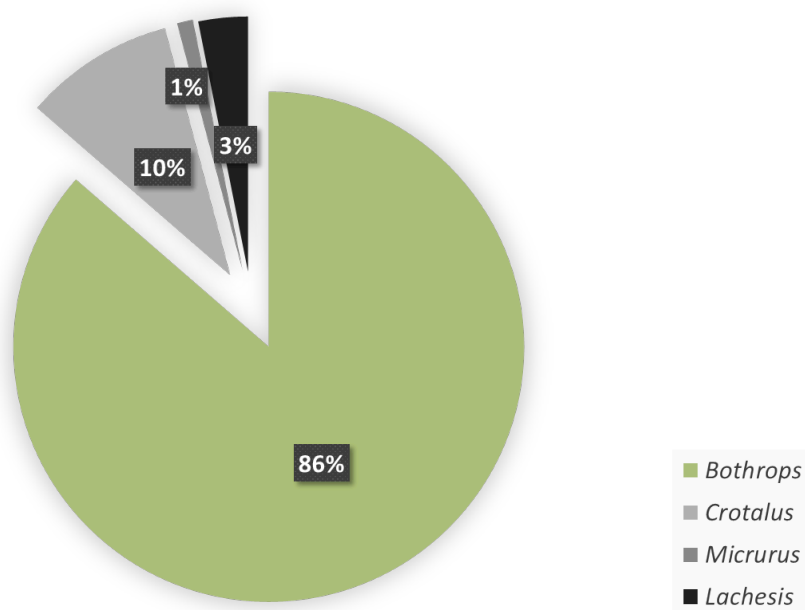


Figura 1: Notificações de acidentes causados por serpentes peçonhentas no Brasil entre os anos de 2011 e 2021. (Fonte: adaptado de SINAN - Sistema de Informações e Agravos de Notificação, 2022).

Espécies do gênero *Bothrops* estão distribuídas em todo o território brasileiro (Figura 2). Dentro deste gênero destaca-se a espécie *Bothrops atrox* (família Viperidae, subfamília Crotalinae). Popularmente conhecida como Jararaca do Norte, é uma espécie terrestre, de hábitos noturnos, que possui uma dieta generalista, composta principalmente por centopeias, peixes, sapos, lagartos, cobras, pássaros e pequenos mamíferos (MONTEIRO; CONTRERAS-BERNAL; *et al.*, 2020). Estas serpentes medem entre 75 e 125 centímetros de comprimento e possuem variações em suas cores, de acordo com a localização onde vivem (Figura 3A). Sua distribuição geográfica engloba países da América do Sul, como Bolívia, Brasil, Colômbia, Equador, Guiana Francesa, Guiana, Peru, Suriname e Venezuela (NOGUEIRA *et al.*, 2020) (Figura 3B).



Figura 2: Distribuição de espécies do gênero botrópico no Brasil. (Fonte: Tokarnia e Peixoto, 2006).

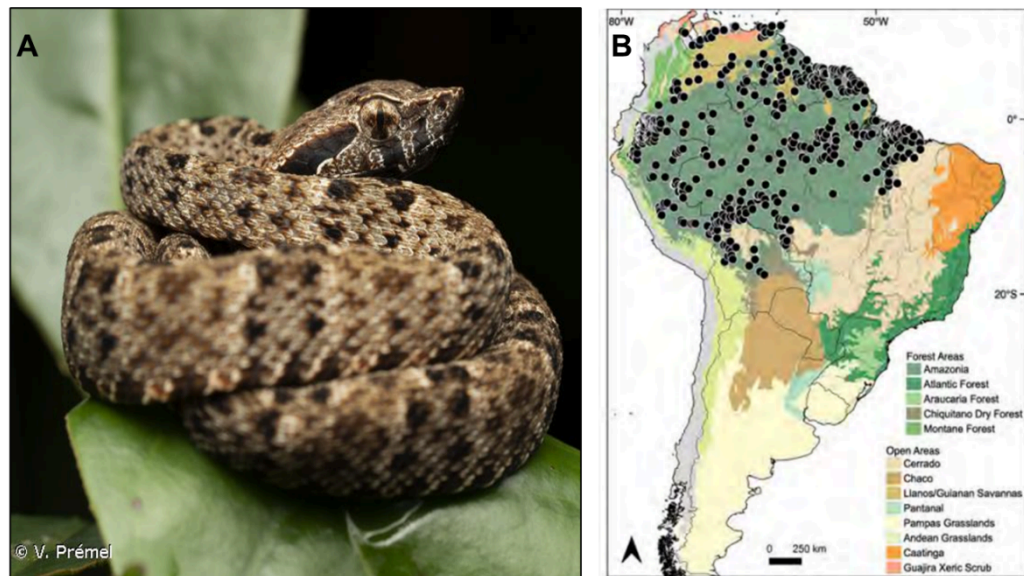


Figura 3: *B. atrox* e sua distribuição geográfica. (A) Foto de um espécime de *B. atrox*. Fotografia: V. Prémel, Inventaire National du Patrimoine Naturel. (B) Mapa da distribuição geográfica da serpente *B. atrox*. (Fonte: Nogueira *et al.*, 2020).

B. atrox é a principal serpente causadora de acidentes na região amazônica. A incidência média estimada de casos é de 52,8 a cada 100.000 habitantes/ano. Entretanto, este número pode aumentar significativamente, chegando a mais de 150 casos a cada 100.000 habitantes/ano em alguns municípios (FEITOSA *et al.*, 2015).

A região amazônica brasileira compreende apenas 8,7% da população total do Brasil. Entretanto, 44,6% dos acidentes ofídicos são relatados nesta região, tratando-se de uma incidência cinco vezes maior do que no resto do país (MONTEIRO *et al.*, 2020). Nesta região, os custos anuais associados a acidentes ofídicos representam mais de US\$ 8 milhões, dos quais US\$ 4,5 milhões incluem perda de produtividade, morte prematura e morbidade (MAGALHÃES *et al.*, 2020).

1.2. Composição do veneno e envenenamento botrópico

Os venenos ofídicos são compostos por enzimas e proteínas de diversas massas moleculares, além de aminas, lipídios, nucleosídeos e carboidratos. Também podem conter íons metálicos, como sódio, cálcio, potássio, magnésio e zinco, atuando como cofatores. Como o veneno é uma importante ferramenta para a alimentação das serpentes, seus componentes auxiliam na imobilização e digestão da presa. A composição do veneno pode variar consideravelmente entre as diferentes serpentes, devido a fatores como localização, idade, estação do ano e dieta (DALTRY; WÜSTER; THORPE, 1996; FRY *et al.*, 2009; POWELL, 2005).

Em relação aos componentes responsáveis pelos sintomas do envenenamento, os venenos das serpentes da família Elapidae são frequentemente caracterizados como paralíticos, por serem compostos, em maior parte, por neurotoxinas. Por sua vez, os venenos das Viperidae são classificados como hemorrágicos devido à presença de toxinas de ação hemorrágica e de coagulopatia (Figura 4) (JAMUNAA *et al.*, 2012).

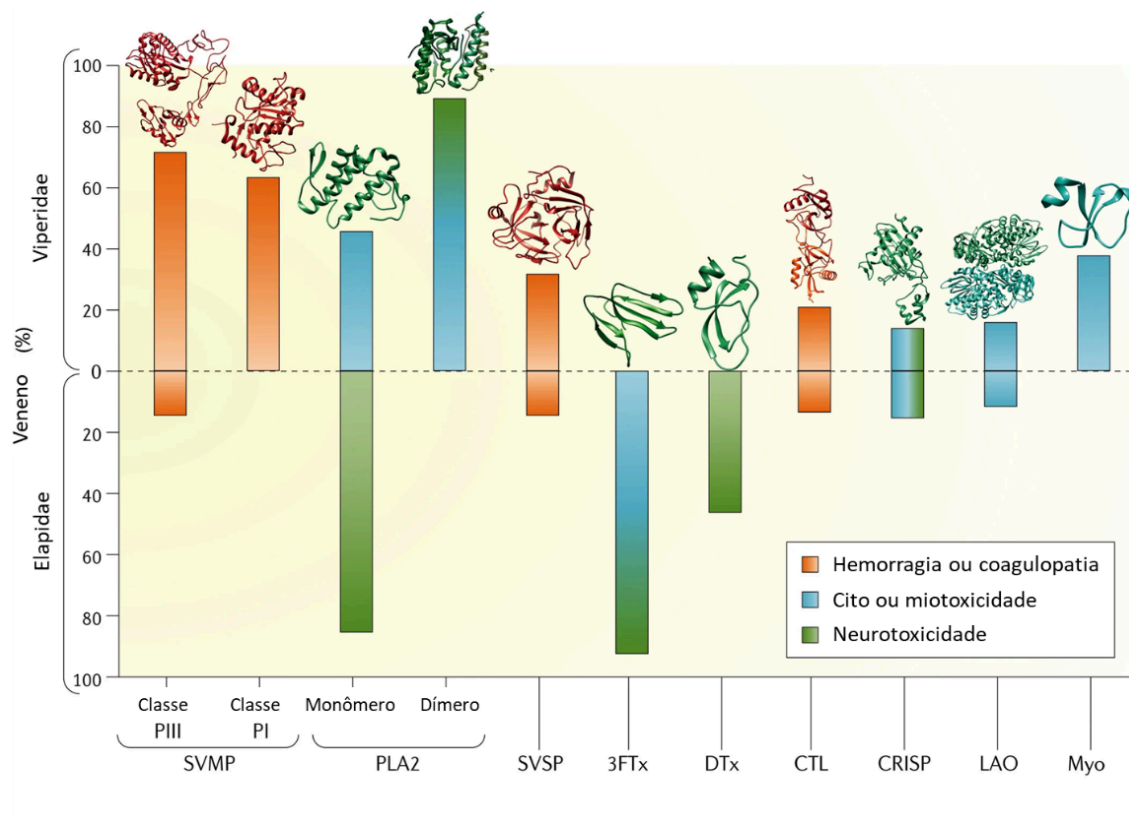


Figura 4: Composição dos venenos das serpentes das famílias Elapidae e Viperidae. Enquanto os venenos das serpentes elapídicas possuem uma grande concentração de toxinas de atividade neurológica, os venenos viperídicos são compostos principalmente por toxinas de ação hemorrágica. SVMP: Metaloprotease do veneno de serpente; PLA₂: Fosfolipase A₂; SVSP: Serinoprotease de veneno de serpente; LAAO ou LAO: L- aminoácido oxidase; CRISP: proteína secretória rica em cisteína; CTL: Lectinas tipo C; DIS: desintegrinas; NP: Peptídeo Natriurético; VEGF: fator de crescimento endotelial vascular; MVC: menores componentes do veneno; DTx: dendrotoxina; 3FTx: Toxina *three finger*. (Fonte: adaptado de Gutiérrez *et al.*, 2017).

As toxinas presentes no veneno botrópico podem ser classificadas como proteínas enzimáticas (metaloproteases, serinoproteases, fosfolipases A₂ e L-aminoácido oxidases) e proteínas não-enzimáticas (desintegrinas e lectinas). O perfil proteômico do veneno de *B. atrox* demonstra que as toxinas presentes em maior quantidade são metaloproteases, serinoproteases, L-aminoácido oxidases (LAAOs), lectinas do tipo C e fosfolipases A₂. A concentração de algumas destas toxinas pode variar de forma sutil entre fêmeas e machos. Entretanto, a fração de metaloproteases permanece conservada (Figura 5) (HATAKEYAMA *et al.*, 2020).

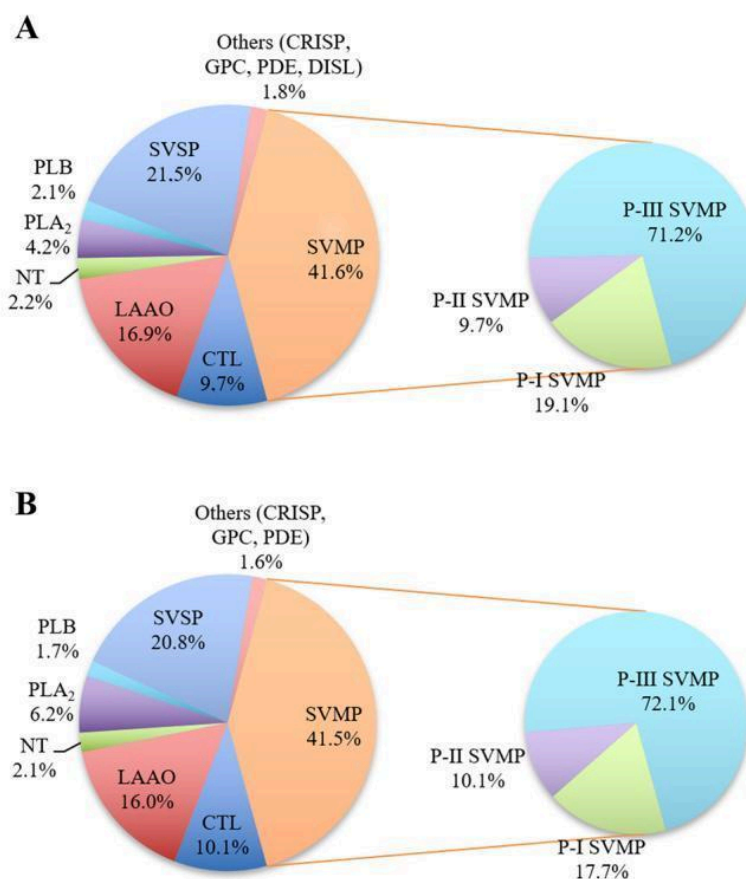


Figura 5: Classes de toxinas identificadas no veneno de *B. atrox*. (A) representantes fêmeas e (B) representantes machos. CRISP: proteína secretora rica em cisteína; CTL: lectina do tipo C; DISL: proteína do tipo desintegrina; GPC: ciclotransferases peptídeo glutaminil; LAAO: L-aminoácido oxidase; NGF: fator de crescimento nervoso; NT: nucleotidase; PDE: fosfodiesterase; PLA₂: fosfolipase A₂; PLB: fosfolipase B; SVMP: metaloprotease de veneno de serpente; SVSP: serinoprotease de veneno de serpente. (Fonte: Hatakeyama *et al.*, 2020).

As serinoproteases do veneno de serpentes, frequentemente chamadas de SVSPs (*Snake Venom Serine Proteinases*), são enzimas proteolíticas glicosiladas de caráter ácido, de massa molecular entre 23 e 67 kDa, que podem atuar em diversos componentes da cascata de coagulação e fibrinolíticos, além do sistema caliceína-cinina, causando um desbalanço no sistema hemostático da presa (MATSUI; FUJIMURA; TITANI, 2000; SERRANO; MAROUN, 2005).

As L-aminoácido oxidases (LAAOs) são flavoenzimas pertencentes à classe das oxidoreduções que catalisam a desaminação oxidativa de L-aminoácidos a α -cetoácidos, produzindo amônio e peróxido de hidrogênio (IZIDORO *et al.*, 2014). São glicoproteínas com massa molecular entre 110 e 150 kDa em condições não redutoras, e em torno de 50-70 kDa em condições redutoras, indicando se tratarem de proteínas homodiméricas associadas por ligações não-covalentes (DU; CLEMETSON, 2002). Já foram descritas para as LAAOs diferentes atividades biológicas, como antitumoral (TAN; BAY; GOPALAKRISHNAKONE, 2018), bactericida (SALAMA *et al.*, 2018; STÁBELI *et al.*, 2004) e leishmanicida (BARBOSA *et al.*, 2021). Já no envenenamento, estão envolvidas principalmente em atividades de dermonecrose (COSTAL-OLIVEIRA *et al.*, 2019) e apoptose (LEE *et al.*, 2014).

Lectinas tipo C são proteínas não-enzimáticas dependentes de ligação ao

cálcio, compostas por duas subunidades (α e β) covalentemente unidas que afetam principalmente a hemostasia (ARLINGHAUS; EBLE, 2012). As lectinas possuem sequências altamente conservadas entre si. Entretanto, pequenas variações em alguns resíduos de aminoácidos podem levar a atividades opostas, atuando como fatores anticoagulantes ou pro-coagulantes (ANDREWS *et al.*, 1989; ATODA; MORITA, 1989; RINCON-FILHO *et al.*, 2020).

As fosfolipases do tipo A_2 (PLA_2) são proteínas relativamente pequenas, com massa molecular entre 13 e 15 kDa. Essas enzimas catalisam a hidrólise de fosfolipídeos, produzindo lisofosfolipídeos e ácidos graxos livres (HIU; YAP, 2020). Desta forma, podem provocar neurotoxicidade (ROUAULT *et al.*, 2006; SILVA-CARVALHO *et al.*, 2022), miotoxicidade (GUTIÉRREZ *et al.*, 2008), cardiotoxicidade (ZHANG *et al.*, 2002), inibição da agregação plaquetária (DIAS *et al.*, 2018), anticoagulação (KINI, 2005) e edema (YAMAGUCHI *et al.*, 2001).

Representando a maior quantidade nos venenos de serpentes da família Viperidae (TASOULIS; ISBISTER, 2017), as metaloproteases (*snake venom metalloproteinases* – SVMP) tratam-se de endopeptidases que possuem uma sequência consenso de ligação ao zinco (HEXXHXXGXX), seguido por um motivo metionina-turn, uma região importante para a estabilização da estrutura tridimensional (BEE *et al.*, 2001; BODE; GOMIS-RÜTH; STÖCKLER, 1993).

As SVMPs são consideradas as toxinas que mais contribuem no dano local e hemorrágico provocados pelos acidentes ofídicos (PATEL; KONG; HAMILTON, 2022). Em 2005, Gutiérrez e colaboradores descreveram como as SVMPs hemorrágicas danificam a integridade de capilares sanguíneos por meio de dois passos. A princípio, essas enzimas hidrolisam substratos importantes da membrana basal ao redor das células endoteliais, levando a um enfraquecimento da estabilidade mecânica da membrana basal e a um aumento da distensibilidade da parede dos vasos. Em seguida, as forças hemodinâmicas que atuam sobre a circulação sanguínea induzem a uma distensão da parede do vaso, levando a ruptura e extravasamento (Figura 6).

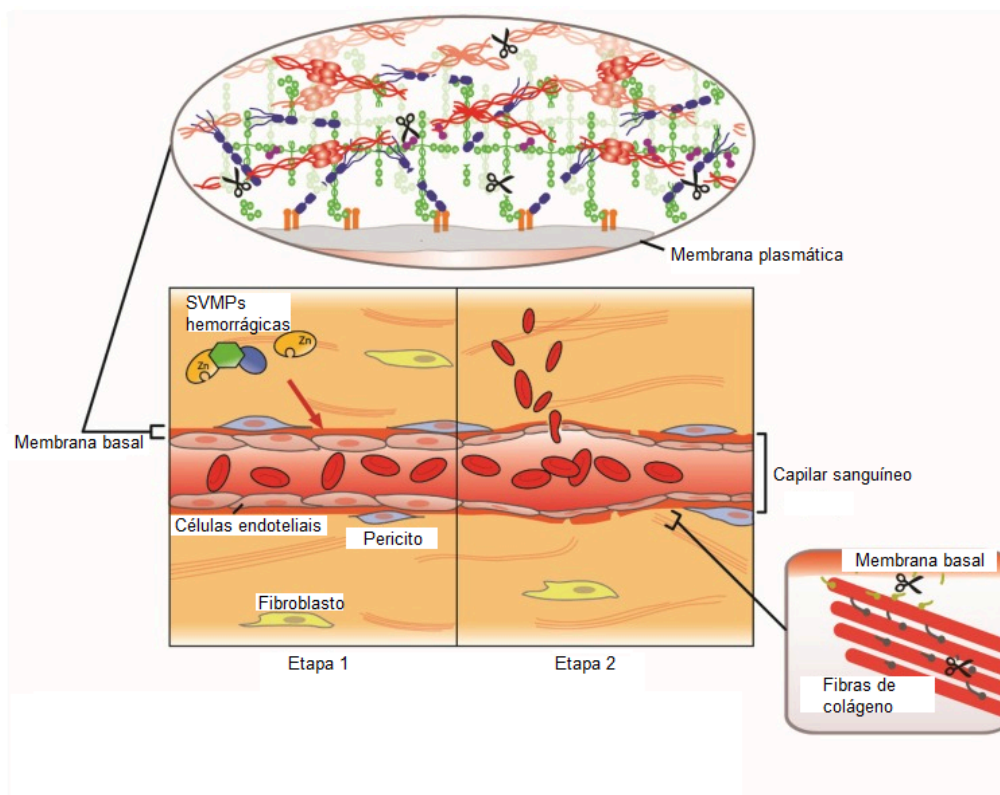


Figura 6: Mecanismo de ação das SVMPs hemorrágicas. A lesão do vaso sanguíneo ocorre em duas etapas. Na etapa 1, as SVMPs se ligam e hidrolisam componentes estruturais da membrana basal dos vasos, causando um enfraquecimento mecânico do vaso. Na segunda etapa, as forças hemodinâmicas, principalmente a pressão hidrostática, induzem uma distensão da parede vascular e, conseqüentemente, o vaso é rompido e o sangue extravasado. (Fonte: adaptado de Gutiérrez *et al.*, 2016).

Além do notável potencial hemorrágico (BOUKHALFA-ABIB, 2017; CAMACHO *et al.*, 2019; MOURA-DA-SILVA; BALDO, 2012; PRECIADO *et al.*, 2018), outras atividades também já foram descritas para as metaloproteases, como atividade fibrinogenolítica (FLORES *et al.*, 2016; OLIVEIRA *et al.*, 2021), apoptótica (BUSTILLO *et al.*, 2017; TANJONI *et al.*, 2005) e de inibição da agregação plaquetária (HSU, C. C., WU, W. B., HUANG, 2008).

A classificação mais atual categoriza as metaloproteases de serpentes em três classes distintas, baseada na complexidade destas proteínas (Figura 7). A primeira e mais simples é constituída por metaloproteases de classe I (P-I SVMPs) que possuem massa molecular entre 20 e 30 kDa e um único domínio catalítico metaloprotease (M). Por serem menores e possuírem apenas o domínio M, as P-I se difundem facilmente na matriz extracelular, levando, de uma forma geral, a uma menor toxicidade quando comparadas às metaloproteases P-III (GUTIÉRREZ *et al.*, 2005).

As enzimas pertencentes à classe II de metaloproteases (P-II SVMPs) possuem massa molecular entre 30 e 60 kDa e são mais complexas do que as P-I por possuírem, além do domínio metaloprotease, um domínio semelhante à desintegrina (D) na extremidade C-terminal (HAN *et al.*, 2007; LU *et al.*, 2005; ZHU *et al.*, 2010). Uma particularidade desta classe é a presença de um motivo de ligação

à integrina, chamado de motivo RGD (arginina-glicina-aspartato). Entretanto, este motivo não é totalmente conservado entre as P-II, possuindo variações como KGD (lisina-glicina-aspartato) e VGD (valina-glicina-aspartato). O motivo RGD está localizado num loop flexível que é capaz de interagir significativamente com integrinas, inibindo a agregação plaquetária (CALVETE *et al.*, 2005; CESAR *et al.*, 2019).

A classe III (P-III SVMPs) compreende as proteínas mais complexas e de maior massa molecular, geralmente entre 60 e 100 kDa. (FOX; SERRANO, 2009). Além dos domínios metaloprotease e semelhante à desintegrina, as P-III contam com uma região rica em cisteína, responsáveis por seus efeitos hemorrágicos (GUTIÉRREZ *et al.*, 2016; HATI *et al.*, 1999). As P-III são proteínas relativamente diversas por sofrerem modificações pós-traducionais, como homodimerização e adição/remoção de domínios (SANCHEZ *et al.*, 2017).

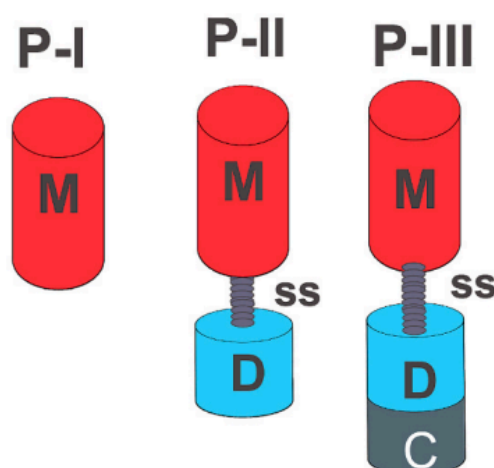


Figura 7: Representação esquemática dos diferentes domínios das metaloproteases de classes I, II e III. As P-I consistem apenas no domínio metaloprotease (M); P-II possuem domínio metaloprotease (M), sequência espaçadora (SS) e domínio semelhante à desintegrina (D); P-III são constituídas por M, SS, D e região rica em cisteína (C). (Fonte: Olaoba *et al.*, 2020).

De uma forma geral, os sintomas do envenenamento ofídico são desencadeados por efeitos auxiliares ou pela ação sinérgica dos componentes do veneno. Os efeitos auxiliares podem ser definidos como ações de componentes do veneno que não contribuem diretamente na toxicidade, mas que possuem outras funções que contribuem para isto, como modificar a entrega, meia-vida e distribuição do veneno. Por sua vez, o sinergismo é o fenômeno em que dois ou mais componentes do veneno interagem direta ou indiretamente, potencializando a toxicidade para níveis acima da soma de suas toxicidades individuais (LAUSTSEN, 2016).

Os sintomas do envenenamento botrópico são usualmente classificados entre efeitos locais e sistêmicos. Entre os efeitos locais, logo após o acidente, observa-se

um pequeno sangramento no local da mordida, onde também pode manifestar edema, vermelhidão, hematomas e dor, que se intensifica à medida que o edema aumenta. Nas primeiras 24 horas após o acidente, o edema pode envolver toda a extremidade afetada. Neste período também podem aparecer bolhas seroso-hemorrágicas e necrose tecidual. Entre os efeitos sistêmicos destaca-se a coagulopatia, além de equimose, sangramento espontâneo e hemorragia severa. De forma menos comum, são observados hipotensão e choque devido ao sangramento e perda de líquidos. As principais complicações sistêmicas que podem ocasionar óbito do acidentado são a lesão renal aguda, sangramento do sistema nervoso central e septicemia (Figura 8) (MALAQUE; GUTIÉRREZ, 2016; SAMPAIO *et al.*, 2016).



Figura 8: Aspectos clínicos observados após o envenenamento botrópico. Os principais sintomas e complicações locais observadas são: (A) ulceração e sangramento local, (B) bolhas seroso-hemorrágicas e (C) necrose tecidual. Em relação às complicações sistêmicas, é frequentemente observado (D) face urêmica, causada por insuficiência renal aguda e (E) hemorragia sistêmica, sendo evidenciada na imagem (seta) pelo sangramento no lábio (Fonte: adaptado de Sampaio *et al.*, 2016).

1.3. Antivenenos e novas tecnologias

Atualmente, a soroterapia é o único tratamento recomendado pela Organização Mundial da Saúde (OMS) para acidentes ofídicos (WHO, 2016). A terapia antiveneno utilizando soros hiperimunes foi apresentada pela primeira vez à Sociedade Francesa de Biologia em 1894, por Césaire Auguste Phisalix, Gabriel Bertrand e Albert Calmette (BOCHNER, 2016; GOYFFON; CHIPPAUX, 1894).

Para a produção de soros antivenenos, animais de grande porte, geralmente cavalos, são imunizados com doses crescentes, em ciclos de imunizações, com um veneno para a produção de um antiveneno monoespecífico, ou uma mistura de venenos, para a produção de um antiveneno poliespecífico. Estes ciclos de

imunizações levam a um aumento progressivo de anticorpos contra componentes do veneno produzidos pelos animais. Quando os animais atingem um título de anticorpos considerável, o sangue é coletado e o soro hiperimune é purificado. Para reduzir a possibilidade de reações adversas, as imunoglobulinas são clivadas, geralmente através da ação da enzima pepsina, gerando fragmentos F(ab')₂, as quais serão utilizadas para tratamento dos pacientes (Figura 9) (LALLOO; THEAKSTON, 2003).

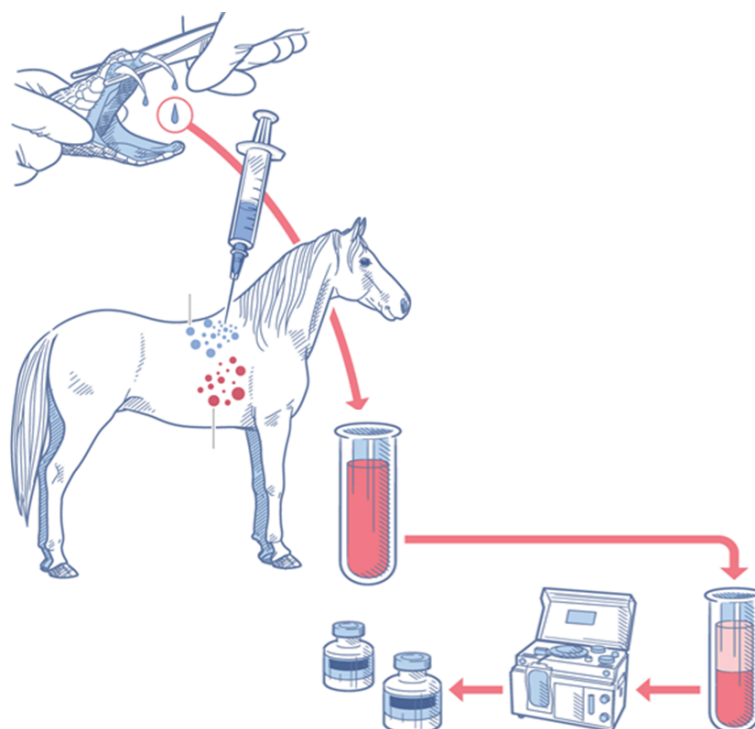


Figura 9: Representação esquemática da produção de soros antiveneno. Após a coleta, o veneno é administrado em animais de grande porte, geralmente cavalos. Após passarem por ciclos de imunizações e apresentarem uma titulação de anticorpos favorável, o sangue é coletado e o soro hiperimune é purificado. As imunoglobulinas são clivadas, gerando fragmentos F(ab')₂, que são utilizados para o tratamento de acidentes ofídicos. Ilustração: Luciano Veronezi, 2018.

Para a produção do antiveneno botrópico brasileiro, produzido pelo Instituto Butantan (São Paulo), pelo Instituto Vital Brazil (Rio de Janeiro) e pela Fundação Ezequiel Dias (Minas gerais), são utilizados em mistura os venenos das serpentes *B. jararaca* (50%), *B. jararacussu*, *B. alternatus*, *B. moojeni* e *B. neuwiedi*, 12,5% cada. Estima-se que 1 mL desta formulação contenha imunoglobulinas suficientes para neutralizar, no mínimo, 5,0 mg do veneno de referência (*B. jararaca*) (ARAÚJO *et al.*, 2017). Apesar de sua importância epidemiológica, o veneno de *B. atrox* não está incluso no *pool* de venenos utilizados para a produção do soro antiveneno brasileiro. À vista disso, alguns estudos sugerem que os antivenenos botrópicos produzidos no Brasil não neutralizem efetivamente o veneno de *B. atrox* (FURTADO *et al.*, 2010; MUNIZ *et al.*, 2000).

Ainda que os antivenenos de uma forma geral se mostrem eficazes, diversas

características intrínsecas envolvendo o processo de fabricação ou a natureza do soro antiveneno podem restringir sua eficácia clínica (BERMÚDEZ-MÉNDEZ *et al.*, 2018).

Um importante impasse na produção convencional dos antivenenos é o fato destes resultarem em uma mistura de anticorpos neutralizantes das atividades tóxicas do veneno e anticorpos contra os demais antígenos que o animal produtor teve contato durante sua vida (SEGURA, Alvaro *et al.*, 2013). Sendo assim, apenas uma pequena porcentagem de anticorpos são direcionados às toxinas do veneno, resultando numa redução do potencial neutralizante esperado para o soro antiveneno, além de poder provocar reações anafiláticas nos pacientes que recebem o soro (DESHPANDE *et al.*, 2013; NEGRIN *et al.*, 2021). Além disso, por serem inoculados com doses contínuas de venenos brutos, os animais produtores podem sofrer reações locais e sistêmicas, fazendo com que a expectativa de vida possa ser diminuída (ANGULO; ESTRADA; GUTIÉRREZ, 1997).

Apesar da eficácia ao combater os sintomas sistêmicos do envenenamento, é observada uma baixa eficiência dos antivenenos ofídicos quando se trata da neutralização dos sintomas locais do envenenamento (CARDOSO *et al.*, 1993).

A fim de reduzir os problemas envolvendo o tratamento de vítimas de acidentes ofídicos, grupos de pesquisa ao redor do mundo têm desenvolvido abordagens alternativas para novas gerações de antivenenos, assim como tentativas de melhorar a produção, bem como reduzir o número de animais utilizados e, conseqüentemente, o sofrimento destes. Neste sentido, é possível destacar a imunização de animais utilizando cDNA (HARRISON *et al.*, 2000; HASSON, 2017), toxinas recombinantes (Liu *et al.*, 2021), peptídeos sintéticos (DE CASTRO *et al.*, 2019) e produção de anticorpos monoclonais (SCHNEIDER *et al.*, 2014).

1.4. Anticorpos monoclonais

Anticorpos são glicoproteínas produzidas por linfócitos B, e representam os principais efetores do sistema imune adaptativo. Pertencentes à superfamília imunoglobulina, consistem em duas cadeias pesadas (H) e duas cadeias leves (L) idênticas. Cada cadeia pesada possui cerca de 55 kDa. A cadeia leve, por sua vez, possui massa molecular de aproximadamente 25 kDa. Estas cadeias são ligadas covalentemente por pontes dissulfeto e consistem em regiões aminoterminais variáveis (V) que atuam no reconhecimento do antígeno e regiões carboxiterminais constantes (C), responsáveis por mediar as funções efetoras (Figura 10) (SCHROEDER; CAVACINI, 2010).

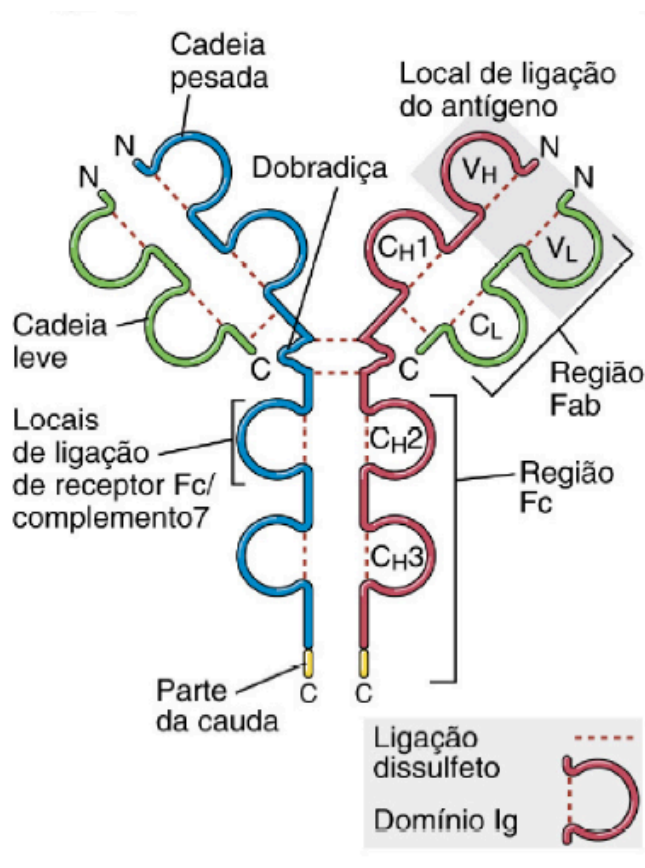


Figura 10: Estrutura de uma molécula de anticorpo. Representação esquemática de uma molécula de IgG secretada. O local de ligação do antígeno é formado pelos domínios V_L (região variável da cadeia leve) e V_H (região variável da cadeia pesada) (Fonte: Abbas, 2015).

Ao serem clivados por meio de ação de enzimas, como papaína e pepsina, os anticorpos se fragmentam em duas regiões de ligação ao antígeno Fab, ou em um único fragmento bivalente de ligação ao antígeno $F(ab')_2$. As moléculas de anticorpos podem ser divididas em classes e subclasses distintas, de acordo com sua função e estrutura da porção Fc. Estas classes, também chamadas de isotipos, são nomeadas IgA, IgD, IgE, IgG e IgM (Abbas, 2015).

A interação imunoglobulina-antígeno normalmente ocorre entre o paratopo, o local na imunoglobulina no qual o antígeno se liga e o epítopo, o sítio no antígeno que é vinculado. No caso de antígenos proteicos, os epítotos podem ser lineares, quando formados por resíduos de aminoácidos adjacentes, ou conformacionais, se formados por resíduos que não estão adjacentes na estrutura primária, mas se tornam espacialmente justapostos na estrutura terciária (Figura 11) (Abbas, 2015).

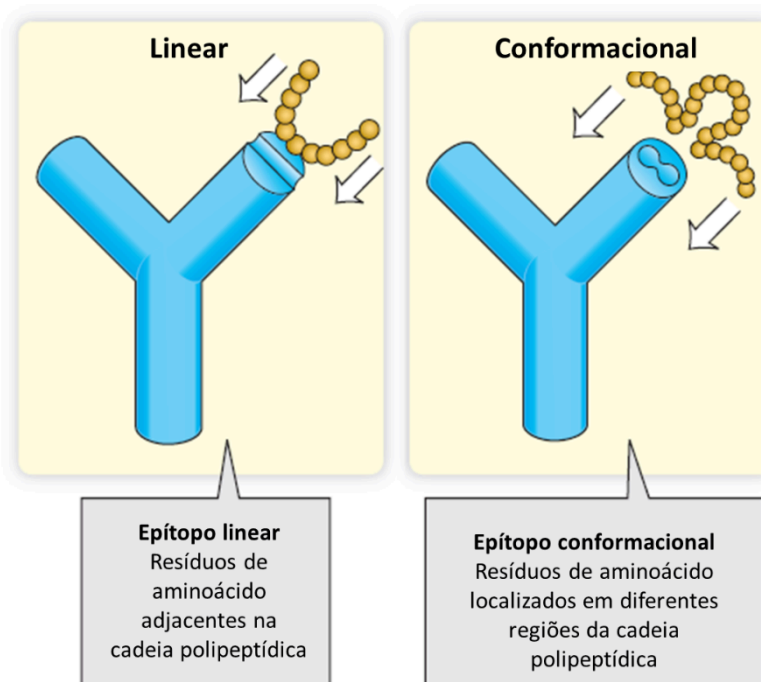


Figura 11: Representação esquemática dos diferentes tipos de epítomos. (Fonte: adaptado de Helbert, 2017).

A função do anticorpo refere-se ao efeito biológico que anticorpo tem em um patógeno ou sua toxina. As principais funções de anticorpos incluem neutralização de infecciosidade, fagocitose, citotoxicidade celular dependente de anticorpos e mediada por complemento, lise de patógenos ou de células infectadas (FORTHAL, 2014).

Tendo em vista suas importantes funções envolvendo a resposta imune, em 1975 a produção de anticorpos monoclonais por hibridoma foi descrita pela primeira vez (KÖHLER; MILSTEIN, 1975), uma descoberta que levou a um Prêmio Nobel 10 anos mais tarde (MILSTEIN, 1985). A técnica consiste na fusão de células B de um camundongo imunizado com uma linhagem celular imortalizada de mieloma. Cada uma das células fundidas – hibridomas – produz somente uma Ig derivada da célula B do animal imunizado. Estes anticorpos são pesquisados quanto à sua ligação ao antígeno de interesse, e em seguida, ocorre a seleção e expansão do clone com a especificidade desejada. O sobrenadante de cultura deste clone é então purificado para a obtenção dos anticorpos monoclonais (NELSON *et al.*, 2000).

Atualmente, os anticorpos monoclonais são amplamente utilizados para fins terapêuticos, principalmente no tratamento de cânceres, doenças autoimunes e doenças causadas por vírus, como o SARS-CoV-2 e Chikungunya (ADAMS; WEINER, 2005; BARNAS; LOONEY; ANOLIK, 2019; CRUZ-TERAN *et al.*, 2021; JIN; SIMMONS, 2019). Além disso, também podem ser aplicados à diferentes metodologias de ensaios diagnósticos, como ELISA (BALL; FINLAY, 1998), teste de fluxo lateral (QRIOUET *et al.*, 2021) e imunohistoquímica (CORDELL, 2022).

Considerando a grande evolução nas terapias baseadas em anticorpos e as

desvantagens associadas ao uso do antiveneno convencional, este trabalho teve como objetivo o desenvolvimento de um anticorpo monoclonal que neutralizasse atividades tóxicas do envenenamento causado pela serpente *B. atrox*, numa tentativa de contribuir para o avanço no desenvolvimento de antivenenos de nova geração para o tratamento de acidentes ofídicos.

2. JUSTIFICATIVA

Os acidentes causados por animais peçonhentos representam um importante problema de saúde pública em todo o mundo. Dentre eles, destacam-se os acidentes ofídicos. Desde 2017, estes acidentes voltaram a ser classificados como nível A das doenças tropicais negligenciadas, e causam, anualmente, mais mortes do que várias outras doenças também tropicais negligenciadas, como a dengue hemorrágica, leishmaniose, esquistossomose e doença de Chagas.

O gênero *Bothrops* engloba as espécies de serpentes conhecidas popularmente como jararacas. Estas serpentes estão distribuídas em todo o território nacional e são responsáveis pelo maior número de acidentes notificados envolvendo morbidade e mortalidade. *B. atrox* é a espécie responsável pelo maior número de casos na Amazônia brasileira e estima-se que esta serpente cause entre 50 e 150 casos a cada 100.000 habitantes na região. O manejo dos acidentes ofídicos nesta localidade é um desafio para o sistema público de saúde, uma vez que as picadas ocorrem, na maior parte dos casos, em regiões rurais e remotas, distante dos centros urbanos e unidades de saúde, o que torna difícil o resgate e tratamento do acidentado.

A soroterapia é, até o momento, o único tratamento recomendado pela OMS para casos de envenenamentos ofídicos. Ainda que cumpra seu papel ao neutralizar os sintomas sistêmicos, os soros antivenenos não têm se mostrado tão eficazes no tratamento dos sintomas locais do envenenamento. Ainda, a administração do soro pode levar a uma resposta anafilática, ocasionalmente evoluindo para a morte do paciente. Adversidades na produção, armazenamento e transporte dos soros antivenenos também são problemas importantes que tornam a produção limitada e de reduzida acessibilidade.

Novas tecnologias para a produção de antivenenos têm sido desenvolvidas em todo o mundo, na tentativa de melhorar o tratamento dos sintomas provocados por envenenamentos ofídicos. O desenvolvimento de proteínas recombinantes para imunização de animais produtores e de anticorpos neutralizantes direcionados às toxinas dos venenos são exemplos de novas abordagens. Neste sentido, este trabalho busca, por meio da técnica de hibridoma, desenvolver anticorpos monoclonais, utilizando o veneno de *B. atrox* como imunógeno, para avaliar seu reconhecimento e potencial neutralizante contra atividades biológicas do veneno, *in vitro* e *in vivo*.

Os resultados do presente estudo podem contribuir para o aprimoramento experimental de antivenenos de nova geração, produzindo anticorpos homogêneos, de especificidade definida, além de reduzir o uso e o sofrimento de animais, visando uma terapia alternativa para o tratamento de acidentes botrópicos.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Produzir e caracterizar anticorpos monoclonais capazes de neutralizar atividades enzimáticas do veneno de *Bothrops atrox*.

3.2. Objetivos específicos

- Produzir anticorpos monoclonais por meio de técnica de hibridoma;
- Purificar e analisar a imunorreatividade e reatividade cruzada do anticorpo monoclonal produzido por *Western blot* e ELISA;
- Realizar a isotipagem do anticorpo monoclonal;
- Mapear os epítomos lineares reconhecidos pelo anticorpo monoclonal por meio de imunoenensaio de Spot Síntese;
- Testar a capacidade de neutralização do anticorpo monoclonal produzido através de ensaios *in vitro* e *in vivo*.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Venenos e animais

Camundongos *Swiss* e BALB/c foram mantidos no Centro de Bioterismo do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, Brasil, e receberam água e ração em condições ambientais controladas. Os ensaios realizados em camundongos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Minas Gerais (Licença nº 152/2019).

Amostras de veneno do gênero *Bothrops*, *Crotalus durissus terrificus*, *Micrurus frontalis* e *Lachesis muta muta* foram fornecidas pelo Instituto Nacional de Salud, pela Universidade Nacional Mayor de San Marcos e pela Fundação Ezequiel Dias.

4.2. Dosagem de proteínas

A concentração de proteínas dos venenos e anticorpos utilizados neste trabalho foi estimada pelo método desenvolvido por Lowry (1951) (DC™ Protein Assay – Bio-Rad) utilizando albumina sérica bovina (BSA) como padrão.

4.3. Produção de anticorpos monoclonais

4.3.1. Imunização de camundongos

Cinco camundongos BALB/c fêmeas de 4-6 semanas de idade foram imunizadas para a obtenção de células B produtoras de anticorpos contra proteínas do veneno de *B. atrox*. Antes do início das imunizações, os soros pré-ímmunes foram coletados para serem utilizados como controle negativo. Em seguida, 10 µg de veneno de *B. atrox* e adjuvante completo de Freund (v/v) foram utilizados na primeira dose. Para as injeções seguintes, a mesma quantidade de veneno foi diluída em hidróxido de alumínio a 6% (v/v). Todas as inoculações foram realizadas por via subcutânea com intervalos de 15 dias. Uma semana após a 5ª imunização, amostras de sangue dos camundongos foram coletadas e os soros foram testados por ELISA contra o veneno de *B. atrox* para análise de reatividade.

4.3.2. Reatividade dos soros ímmunes contra *B. atrox* por ELISA

Todos os protocolos de ELISA desenvolvidos no presente trabalho foram realizados utilizando a mesma metodologia descrita por Chavez-Olortegui *et al.*, (1991).

Placas de microtitulação (Costar) foram revestidas durante a noite a 4°C com 5 µg/mL de solução de veneno de *B. atrox* em tampão bicarbonato de sódio 0,02 M pH 9,6 e bloqueadas por 1 h a 37°C com 2% de leite em PBS. Após a lavagem

(0,01% Tween 20-PBS), foram adicionados os soros dos animais imunizados (1:200) e a placa foi novamente incubada por 1h a 37°C. Posteriormente, IgG anti-camundongo conjugado com HRP (Sigma-Aldrich) diluído 1:10.000 foi incubado nas mesmas condições descritas acima. A ligação do anticorpo foi detectada após a incubação da placa em ambiente protegido de luz por 30 min usando 100 µL de solução de OPD (dicloridrato de o-fenilenodiamina) (0,2 mg/mL em tampão citrato, pH 5,2, peróxido de hidrogênio a 0,04%). Após este período, a absorbância foi medida a 490 nm.

O animal cujo soro apresentou a maior reatividade contra o veneno recebeu uma injeção *booster* (3 µg de veneno de *B. atrox* em 50 µL de PBS, via intravenosa). Três dias após o *booster*, o animal foi eutanasiado e o baço coletado para ser utilizado na etapa de fusão para geração de hibridomas.

4.3.3. Cultivo de células de mieloma de camundongo SP2/0

Células sp2/0 (ATCC) foram mantidas a 37 °C numa atmosfera contendo 5% de CO₂ em meio de cultura DMEM (Dulbecco's modified Eagles Medium) contendo 10% de soro fetal bovino, 1% de L-glutamina e 1% de penicilina e estreptomicina.

4.3.4. Fusão e obtenção de hibridomas

O baço do animal selecionado foi macerado mecanicamente para separação dos esplenócitos, que foram reservados diluídos num tubo falcon em meio DMEM incompleto. O mesmo processo foi realizado utilizando o baço de um animal não-imune. Células de mieloma Sp2/0 também foram reservadas em tubo falcon numa diluição de 1x10⁷/mL em DMEM incompleto. As três amostras foram centrifugadas três vezes por 10 minutos a 180 G e 4 °C e o sobrenadante descartado a cada centrifugação. Para a última centrifugação, os esplenócitos imune e Sp2/0 foram vertidos no mesmo tubo.

Em seguida, 1 mL de polietilenoglicol (PEG) 50% foi adicionado ao tubo contendo esplenócitos imune + Sp2/0 ao longo de 1 minuto a 37° C, induzindo a fusão das células e formação dos hibridomas. Após 1 minuto em repouso, 20 mL de DMEM incompleto foram gotejados lentamente ao tubo, ao longo de 10 minutos. A amostra contendo hibridomas, foi centrifugada por 10 minutos a 800 rpm e 22°C, para retirar o PEG. Os hibridomas e os esplenócitos não-ímunes foram vertidos em garrafas contendo 100 mL de DMEM, hipoxantina, aminoptertina e timidina (HAT) e enriquecido com 20% de soro fetal bovino.

Os hibridomas foram plaqueados em 5 placas de 96 poços e cultivados por 15 dias. Em seguida, foi realizado o *screening* das placas para rastrear os poços que continham células secretoras de anticorpos reativos contra o veneno de *B. atrox*.

4.3.5. *Screening* e subclonagem

O meio de cultura foi trocado periodicamente, em intervalos de 3 a 4 dias.

Após 15 dias, 100 µL do sobrenadante celular dos hibridomas foram coletados para *screening* por ELISA indireto, utilizando o mesmo protocolo descrito anteriormente (4.3.2). Os poços contendo hibridomas secretores de anticorpos contra o veneno de *B. atrox* foram triados e os mais reativos foram subclonados por diluições limitantes. Para isto, as células foram diluídas (1 célula/100µL) em DMEM 20% FBS contendo hipoxantina e timidina (HT) e distribuídas (90µL/poço) em placas de cultura celular de 96 poços (Sarstedt). Quinze dias após a subclonagem, outro *screening* foi realizado. O clone mais reativo (mAb 4H4D11) foi selecionado, expandido e os anticorpos purificados.

4.3.6. Purificação de anticorpos e SDS-PAGE

Para a obtenção de anticorpos puros, o subclone selecionado foi expandido e o sobrenadante celular coletado. O sobrenadante (50 mL) foi purificado por cromatografia de afinidade, utilizando uma coluna HiTrap Protein G HP (GE *Healthcare*) no cromatógrafo Äkta start (GE *Healthcare*). A amostra foi aplicada à coluna diluída em tampão de ligação (fosfato de sódio 20 mM, pH 7) e os anticorpos purificados foram eluídos em tampão de eluição (glicina-HCl 0.1 M, pH 2.7). O pH da solução foi neutralizado com tampão Tris-HCl 1M, pH 9. Os anticorpos foram quantificados por nano-drop e estocados a -20° C até seu uso.

Para verificar a pureza e o perfil eletroforético do anticorpo, 10 µg da amostra purificada, em condições redutoras e não-redutoras foram aplicados num gel de gradiente de poliacrilamida (SDS-PAGE) a 10%, como descrito por Laemmli (1970). As proteínas foram separadas após corrida realizada a 120 V e observadas após coloração por Coomassie.

4.4. Imunorreatividade e reatividade cruzada

4.4.1. Elisa

A fim de testar o reconhecimento do mAb, foi realizado um ELISA, (como descrito em 4.3.2.), sensibilizando placas de microtitulação (Costar) *overnight* a 4°C com 5 µg/mL de venenos das serpentes utilizadas para a produção de soro anti-botrópico brasileiro (*B. jararaca*, *B. moojeni*, *B. newiedi*, e *B. jararacussu*) e peruano (*B. atrox*, *B. barnetti*, *B. pictus*, *B. brazili* e *B. hyoprora*). Como anticorpo primário (0,25 µg/poço), adicionou-se o mAb purificado ou mAb não-relacionado (controle negativo) contra metaloprotease do veneno da aranha *Loxosceles intermedia*, produzido previamente por nosso grupo .

O mesmo ensaio foi realizado para avaliar o padrão de reconhecimento frente à *B. atrox* macho, fêmea, jovem ou adulta, adicionando 5 µg/mL de cada um dos venenos e 0,05 µg/poço do mAb 4H4D11 ou mAb não-relacionado.

A possível reatividade do mAb frente aos venenos dos principais gêneros envolvidos em acidentes na América do Sul foi analisada revestindo as placas com 5 µg/mL de veneno das serpentes *B. atrox*, *L. muta muta*, *M. frontalis* e *C. d. terrificus*

e incubadas com 0,25 µg/poço do mAb 4H4D11 ou mAb não-relacionado. Todas as medidas foram realizadas em duplicata.

4.4.2. Sds-page

As proteínas dos venenos presentes no *pool* de antivenenos brasileiro e peruano foram analisadas, seguindo a mesma metodologia descrita em 4.3.6., utilizando 10 µg de cada um dos venenos, em condições não-redutoras, aplicados em gel 12,5%. Em ambos ensaios, as bandas foram visualizadas após corar o gel com *Coomassie blue*.

4.4.3. Western blotting

Para identificar a massa molecular da toxina reconhecida pelo mAb, foi realizado um SDS-PAGE com 10 µg de veneno de *B. atrox* em condições redutoras e não-redutoras. O marcador de massa molecular (Biorad) foi utilizado como padrão. A seguir, as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose de 0,22 µm (Biorad) a 100 V por 90 minutos, utilizando tampão de transferência 50 mM Tris-HCl, 380 mM glicina e 20% metanol (pH 8,3). A transferência foi confirmada utilizando o corante Ponceau.

A membrana de nitrocelulose contendo as proteínas transferidas foi bloqueada com PBS-Tween 0,3% *overnight*. A membrana foi lavada três vezes por 5 minutos com PBS-Tween 0,05% e incubada com 0,075 µg/mL do mAb purificado por 1 hora. Após uma segunda rodada de lavagens, a membrana foi incubada com IgG anti-camundongo conjugado com HRP (Sigma-Aldrich) diluído 1:15.000 por 1 hora. A membrana foi lavada três vezes com PBS-Tween 0,05% e duas vezes com PBS 1x. As bandas reconhecidas pelo mAb foram visualizadas a partir da adição de 5 mg de 3 3'-diaminobenzidina tetrahidrocloro (DAB), 10 mg de 4-cloro-1-naftol e 8,32 µL de peróxido de hidrogênio.

4.4.4. Isotipagem do anticorpo monoclonal

A isotipagem do mAb foi feita utilizando o kit IsoStrip (Roche). O anticorpo purificado (1 µg/mL) foi diluído em PBS contendo 1% de BSA. A solução (150 µL) foi adicionada a um tubo de desenvolvimento e agitada rapidamente por 30 segundos. Em seguida, a strip foi inserida no tubo. Durante 5 minutos, os anticorpos migraram através da strip. Em seguida, o resultado foi visualizado por meio do surgimento de uma banda azul na região da strip contendo o isotipo ao qual o mAb pertence.

4.4.5. Mapeamento de epítomos pelo método de Spot Síntese

Para compreender o padrão estrutural de reconhecimento do anticorpo monoclonal frente aos seus possíveis antígenos, os epítomos lineares foram mapeados por meio de um imunoensaio de Spot síntese. Para isto, foi utilizada uma membrana de celulose onde foram sintetizados 302 spots contendo 15 resíduos de

aminoácidos em cada um deles, cada qual sobreposto ao outro por 12 aminoácidos, possuindo um avanço de 3 aminoácidos na sequência da proteína em relação ao peptídeo anterior.

A membrana compreende a sequência primária das proteínas Bothropasina, uma metaloprotease P-III (Uniprot accession number: O93523) e uma serinoprotease (Uniprot accession number: Q9PTU8), ambas do veneno da serpente *B. jararaca*. A membrana foi previamente sintetizada seguindo o protocolo descrito por Laune e colaboradores (2002), e produzida utilizando o aparelho de síntese automática ResPep SL (IntavisAG, Bioanalytical Instruments, Alemanha), a partir da colaboração com o Prof. Ricardo Andrez Machado de Ávila, na Universidade do Extremo Sul Catarinense (UNESC) e Universidade Federal do Paraná (UFPR).

Para o imunoensaio, a membrana foi bloqueada com uma solução contendo 3% de albumina de soro bovino e 5% de sacarose diluídos em tampão PBS-Tween 0,1% (tampão de bloqueio) por 18 horas sob agitação, como forma de impedir reconhecimentos inespecíficos. Em seguida, utilizou-se 1 µg/mL de mAb purificado em tampão de bloqueio em volume final de 15 mL incubado por 90 minutos, sob agitação. Como anticorpo secundário, utilizou-se anti-IgG de camundongo conjugada com fosfatase alcalina (Sigma) na diluição 1:2000 em volume final de 15 mL por uma hora, sob agitação. Para a revelação do ensaio, a membrana foi incubada com uma solução de MTT e BCIP diluídos em tampão CBS pH 7. A membrana foi escaneada, e as intensidades dos spots foram analisadas.

Para possibilitar a reutilização da membrana, realizou-se sua regeneração a partir de 3 lavagens por 10 minutos com dimetilformamida, 3 vezes por 2 minutos com água ultrapura, 3 vezes por 10 minutos com uma solução de ureia 8M, SDS 20% e 0,1% de β-mercaptoetanol, 3 vezes por 10 minutos com etanol 50% e ácido acético 10%. Por fim, a água foi eliminada da membrana lavando-a 3 vezes por 10 minutos com etanol 100% e em seguida armazenada a -20° C.

4.5. Fracionamento do veneno de *B. atrox*

O veneno foi fracionado por cromatografia de gel-filtração com a finalidade de identificar o reconhecimento do anticorpo produzido contra diferentes frações do veneno de *B. atrox*. Para isto foi utilizada uma coluna HiPrep Sephacryl S-200 HR (Sigma-Aldrich) no cromatógrafo Äkta start (GE *Healthcare*).

Uma solução contendo 200 mg de veneno de *B. atrox* em tampão acetato de sódio 50 Mm e cloreto de sódio 0,3 M (pH 7.5) foi centrifugada e filtrada. Em seguida, este material foi aplicado à coluna, e as frações foram eluídas de acordo com a massa molecular. O material eluído foi coletado em frações de 1 mL.

4.5.1. Ensaio de atividade caseinolítica

A presença de protease nas frações do veneno foi avaliada por meio de um ensaio de atividade caseinolítica, como descrito por Lomonte e Gutiérrez (1983), com modificações. Para o ensaio, incubou-se por 1 hora a 37°C, 250 µL de solução

de caseína a 1%, 225 µL de tampão tris 50 mM (pH 8) e 25 µL de cada tubo coletado no ensaio anterior. Em seguida, adicionou-se 500 µL de ácido tricloroacético a 5%. Após incubação por 15 minutos a temperatura ambiente, o material foi centrifugado por 10 minutos a 10.000 RPM. A absorvância do sobrenadante foi detectada em espectrofotômetro no comprimento de onda 280 nm.

4.5.2. Ensaio de atividade fibrinogenolítica

A análise das propriedades fibrinogenolíticas do veneno e das frações coletadas foi feita por meio do ensaio descrito por Edgar e Prentice (1973), com modificações. Uma mistura contendo 20 µL de solução de fibrinogênio humano a 2,5 mg/mL e 3 µg do veneno de *B. atrox* ou 3 µg da fração selecionada foram diluídos em tampão Tris-HCl 25 mM e NaCl 0,15 M (pH 7.4) e incubados por 1h a 37°C. Em seguida, 50 µL destas soluções foram adicionados a 50 µL de solução desnaturante (Ureia 10 M, β-mercaptoetanol a 4% e SDS a 4%) e incubados *overnight* a temperatura ambiente. As soluções (20 µL) foram utilizadas para realização de SDS-PAGE a 10%, sob condições redutoras. O gel foi corado com *Coomassie blue*.

4.6. Ensaio de neutralização

4.6.1. Ensaio de neutralização de atividade fibrinogenolítica

O potencial neutralizante do mAb contra a atividade fibrinogenolítica do veneno de *B. atrox* e da fração foi investigado por meio de um ensaio de neutralização *in vitro*. Para este ensaio, 3 µg do veneno ou da fração foram previamente incubados por 1 hora a 37°C com 25, 50 ou 100 µg da IgG purificada. As seguintes etapas do experimento foram realizadas de forma semelhante ao descrito no item 4.4.2.

4.6.2. Ensaio de neutralização de atividade hemorrágica

Para avaliar a capacidade de neutralização do mAb contra a atividade hemorrágica do veneno de *B. atrox*, foi realizado um ensaio *in vivo* como descrito por Kondo e colaboradores (1960). O veneno (10 µg) foi pré-incubado com 100 ou 150 µg de IgG purificada (proporções de 1:10 e 1:15, respectivamente) por 30 minutos a 37° C, num volume final de 50 µL. A mesma quantidade do veneno de *B. atrox* e uma solução de PBS foram incubados nas mesmas condições e utilizados como controles positivo e negativo, respectivamente.

As amostras foram administradas via subcutânea em camundongos *Swiss* e três horas após a injeção, os animais foram eutanasiados com uma dose letal de quetamina/xilazina. Em seguida, a pele dos animais foi removida para avaliação da hemorragia residual.

Para quantificar a neutralização da atividade hemorrágica, foi calculado o perímetro do halo hemorrágico observado em cada um dos animais. Considerou-se

100% de atividade hemorrágica a média do perímetro dos halos hemorrágicos observados no grupo de animais do controle positivo. Este valor foi usado como comparativo para calcular a porcentagem de atividade hemorrágica e a porcentagem de neutralização observada nos animais tratados com o mAb.

5. RESULTADOS

5.1. Produção de anticorpos monoclonais

Após 5 ciclos de imunização com 10 µg de veneno de *B. atrox*, amostras de sangue dos camundongos foram coletadas e os soros testados por ELISA contra o mesmo veneno para investigar a presença de anticorpos específicos. Os soros dos 5 animais testados (diluição 1:200) apresentaram reatividade contra o veneno de *B. atrox*. O soro pré-imune (PI), utilizado como controle negativo, não apresentou reatividade contra o veneno testado (Figura 12). O animal 5 foi escolhido para prosseguir com a fusão, pois apresentou a maior reatividade frente ao veneno.

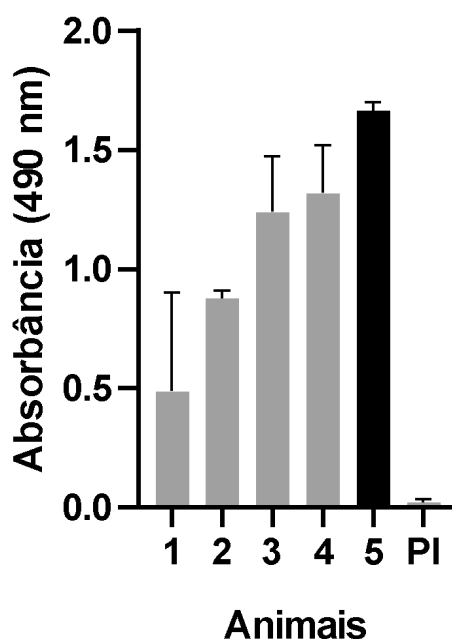


Figura 12: Titulação dos soros dos animais imunizados frente ao veneno de *B. atrox*. Avaliação dos soros individuais dos animais frente ao veneno de *B. atrox*. Uma placa de microtitulação foi sensibilizada com 0,5 µg/poço com veneno de *B. atrox*. Como anticorpo primário, foi utilizado o soro dos animais imunizados e, como anticorpo secundário, IgG anti-camundongo conjugado a HRP (1:10.000). A revelação foi feita utilizando OPD e determinada por meio de leitura no espectrofotômetro a 490 nm. (PI) Absorbância do soro pré-imune em diluição 1:200. (1-5) Absorbância dos soros dos animais imunizados na diluição 1:200. Em destaque o animal 5, que possuiu maior reatividade frente ao veneno.

Após o ELISA, o animal 5 recebeu uma dose reforço de 3 µg do veneno de *B. atrox* via intravenosa. Três dias após essa dose, o animal foi eutanasiado e as

células do baço foram utilizadas para serem fusionadas às células sp2/0. Os hibridomas formados após a fusão foram cultivados em placas de 96 poços em meio HAT.

Quinze dias depois, o sobrenadante de cultura foi coletado e utilizado para a realização de um *screening* no qual a reatividade dos sobrenadantes celulares (100 µL) foi testada contra o veneno de *B. atrox*. Quatro poços apresentaram anticorpos secretores (Figura 13). Destes, o hibridoma 4H4 foi o que obteve a maior absorbância e por esta razão, foi selecionado para a etapa de subclonagem.

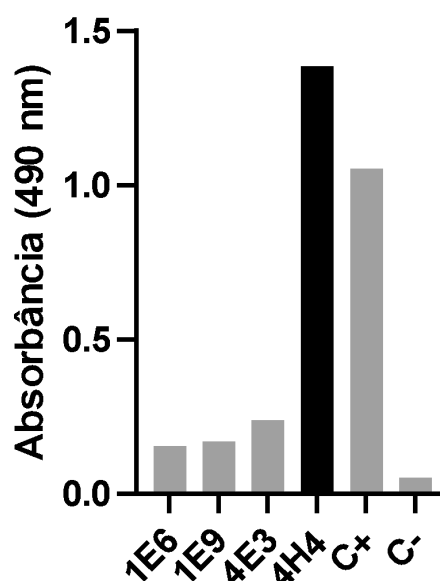


Figura 13: Screening dos sobrenadantes celulares dos hibridomas frente ao veneno de *B. atrox*. Avaliação da reatividade dos sobrenadantes celulares dos hibridomas contra o veneno de *B. atrox* por ELISA. Como anticorpo primário, foi utilizado os sobrenadantes celulares (100 µL) e, como anticorpo secundário, IgG anti-camundongo conjugado a HRP (1:10.000). A revelação foi feita utilizando OPD e determinada por meio de leitura no espectrofotômetro a 490 nm. Como controle positivo (C+), foi utilizado soro de camundongo imunizado contra o veneno de *B. atrox* em diluição 1:200 e, como controle negativo (C-), sobrenadante de cultura de células sp2/0 (100 µL).

5.1.1. Subclonagem de hibridomas

O hibridoma 4H4 foi submetido a uma diluição limitante para que, quando as células fossem plaqueadas, houvesse apenas 1 célula por poço. As células diluídas foram cultivadas e incubadas por 15 dias. Após este período, cada um dos poços foi analisado no microscópio, e aqueles em que se observou apenas uma colônia foram marcados. Os sobrenadantes celulares (100 µL) de todos os poços foram coletados e submetidos a um novo *screening* que resultou em treze subclones secretores de anticorpos monoclonais contra *B. atrox* (Figura 14). Destes, o subclone 4H4D11 foi o que melhor se adaptou para o cultivo celular. Portanto, foi expandido, e os anticorpos foram purificados a partir do sobrenadante celular utilizando coluna de proteína G (HiTrap Protein G HP - GE Healthcare), de acordo com as instruções do fabricante.

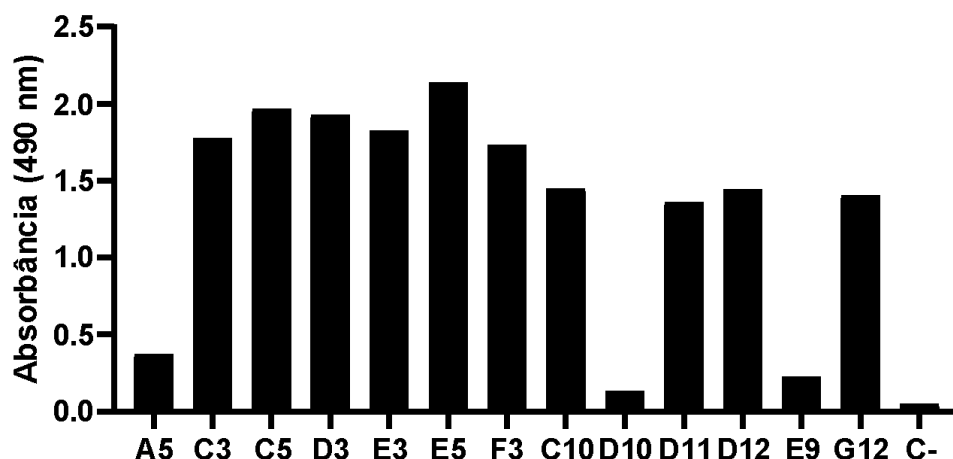


Figura 14: Avaliação da reatividade dos sobrenadantes celulares dos subclones (100 μ L contra *B. atrox*. Como anticorpo primário, foi utilizado os sobrenadantes celulares (100 μ L) e, como controle negativo (C-), sobrenadante de cultura de células sp2/0 (100 μ L). Como anticorpo secundário, IgG anti-camundongo conjugado a HRP (1:10.000). A revelação foi feita utilizando OPD e determinada por meio de leitura no espectrofotômetro a 490 nm.

Para confirmar a purificação dos anticorpos secretados pelo subclone 4H4D11, foi realizado um SDS-PAGE 10%. Em condições não-redutoras, é possível observar apenas uma banda de 150 kDa. Em condições redutoras, são observadas bandas de 50 kDa e 25 kDa, que correspondem respectivamente à cadeia pesada e leve de IgG (**Figura 15**).

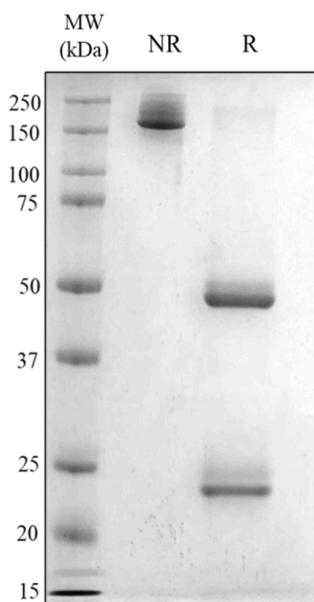


Figura 15: SDS-PAGE da purificação de anticorpos a partir do sobrenadante celular do clone 4H4D11. 10 μ g do material purificado do sobrenadante de cultura do subclone mAb 4H4D11 foi diluído em tampão de amostra (v/v) e aplicado em um gel de poli-acrilamida 10% e submetido a uma corrida a 120 V. As bandas foram coradas com *Coomassie blue*.

Em seguida, foi realizada a isotipagem de anticorpos monoclonais por meio do kit Isostrip (Roche). Para o ensaio, é utilizada uma tira de isotipagem contendo anticorpos anti-camundongo imobilizados, que correspondem a cada um dos isotipos de anticorpos murinos (IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3, IgM e IgA), além de anticorpos para as cadeias leve kappa e lambda. Assim, o anticorpo monoclonal foi rastreado de acordo com seu isotipo ao ser diluído no tubo de desenvolvimento. Quando a *strip* é inserida nesse tubo, a amostra flui, por ação capilar, até se ligar ao anticorpo anti-camundongo específico para o isotipo e para a cadeia leve do monoclonal testado, resultando no aparecimento de bandas nas regiões onde o reconhecimento ocorreu. Após a análise da tira, pode-se observar uma banda azul na região IgG1, indicando que o mAb pertence a esta subclasse (Figura 16).

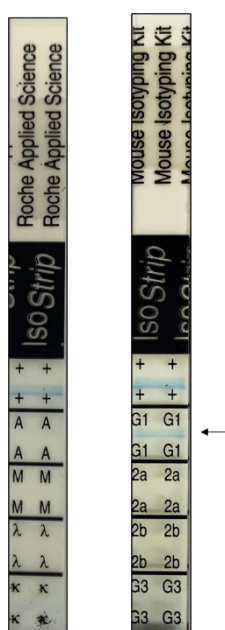


Figura 16: Isotipagem do anticorpo monoclonal 4H4D11. O ensaio foi realizado de acordo com as instruções do fabricante (Roche). O anticorpo purificado (1µg/mL) foi diluído em PBS 1% BSA. Em seguida, a strip foi inserida na solução. O resultado foi interpretado a partir do aparecimento de uma banda azul (seta à direita) na região correspondente ao isotipo ao qual o anticorpo monoclonal pertence.

5.2. Caracterização do anticorpo monoclonal

5.2.1. *Western blot*

Para auxiliar na identificação da molécula alvo reconhecida pelo mAb 4H4D11, foi feito, inicialmente, um *Western blot*. Para isto, as proteínas do veneno de *B. atrox* foram separadas por SDS-PAGE para, em seguida, serem transferidas para uma membrana de nitrocelulose para realização do *Western blot*.

Em ambas as condições em que o veneno foi aplicado (não-redutoras e redutoras), o monoclonal reconhece uma banda na faixa de 50 kDa e outra de aproximadamente 37 kDa (Figura 17), o que condiz com a massa molecular de

metaloproteases e serinoproteases.

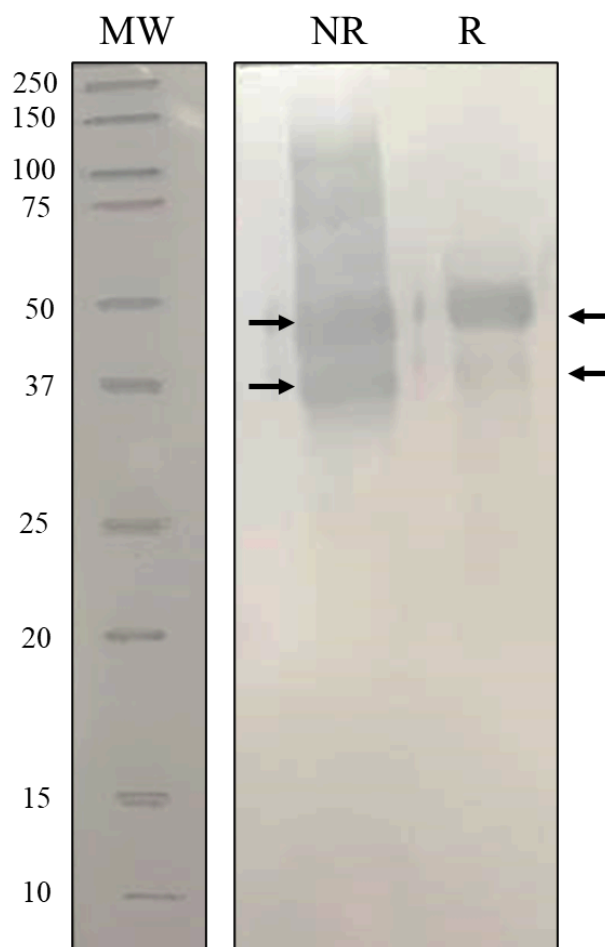


Figura 17: Imunorreatividade do mAb 4H4D11 frente ao veneno de *B. atrox* por *Western blot*. Veneno de *B. atrox* (10 μ g) e padrão de massa molecular (MW) foram submetidos a um SDS-PAGE 12,5%, sendo o veneno em condições não-redutoras (NR) e redutoras (R). Como anticorpo primário, foi utilizado 0,075 μ g/mL do anticorpo monoclonal. Como anticorpo secundário, IgG anti-camundongo conjugado a HRP (1:15.000). A ligação do anticorpo à proteína foi identificada pela incubação da membrana com IgG anti-camundongo conjugada a HRP seguida de revelação utilizando DAB e cloronaftol. As setas indicam as bandas identificadas pelo anticorpo monoclonal.

5.2.2. Imunorreatividade e reatividade cruzada

Para determinar a imunorreatividade e reatividade cruzada do mAb 4H4D11 contra o veneno de *B. atrox* e outros venenos botrópicos utilizados na produção dos soros antiveneno brasileiro e peruano, placas de 96 poços foram sensibilizadas com estes venenos. O resultado indica que, além do veneno de *B. atrox*, o mAb 4H4D11 é capaz de reconhecer todos os demais venenos testados. Entretanto, foi observado um reconhecimento relativamente inferior para *B. brazili*, *B. hyoprora* (utilizados na produção do antiveneno peruano) (Figura 18A) e *B. jararacussu* (utilizado na produção do antiveneno brasileiro) (Figura 18B). Por outro lado, o mAb não-relacionado (controle negativo) não foi capaz de reconhecer nenhum dos venenos testados.

Também foi avaliado o reconhecimento do mAb frente a venenos de *B. atrox* de gêneros e idades diferentes. Para isto, foi feito um ELISA utilizando o anticorpo na concentração de 0,05 µg/poço. O resultado indica que o reconhecimento do mAb segue um mesmo padrão para todos os venenos analisados neste ensaio (Figura 18C). Novamente, o mAb não-relacionado (controle negativo) não foi capaz de reconhecer nenhum dos venenos testados.

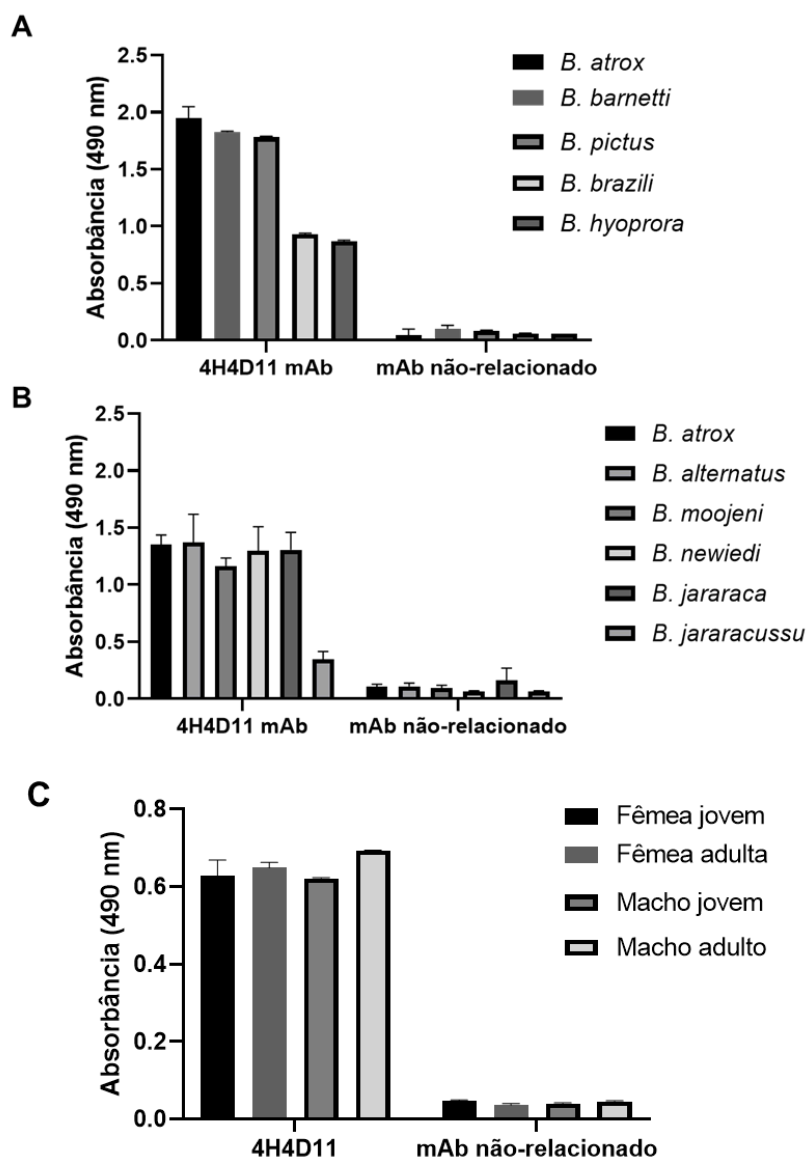
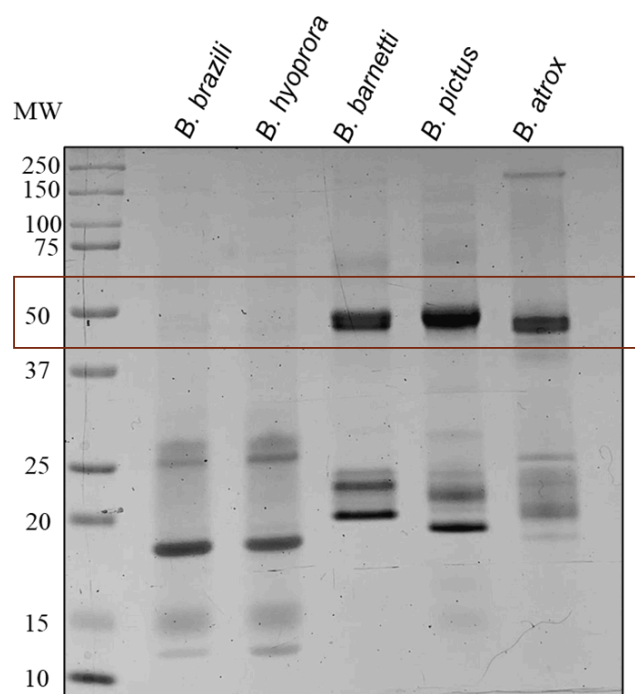


Figura 18: Reatividade cruzada do mAb 4H4D11 frente a diferentes venenos botrópicos. Placas de microtitulação foram sensibilizadas com 0,5 µg/poço de cada um dos venenos a serem testados. **(A)** Venenos utilizados para a fabricação do antiveneno peruano. **(B)** Venenos utilizados para a fabricação do soro antiveneno brasileiro. O mAb 4H4D11 e um mAb não-relacionado foram utilizados na concentração de 0,25 µg/poço. **(C)** Venenos de *B. atrox* de diferentes idades e gêneros. O mAb 4H4D11 e um mAb não-relacionado foram utilizados na concentração de 0,05 µg/poço. Como anticorpo secundário, foi utilizado IgG anti-camundongo conjugado a HRP (1:10.000). A revelação foi feita utilizando OPD e determinada por meio de leitura no espectrofotômetro a 490 nm.

A fim de investigar o perfil eletroforético dos venenos e entender a diferença de reatividade observada no ELISA, foi realizado um SDS-PAGE 12,5% com cada um dos venenos testados no ELISA anterior. O resultado indica, de forma geral, que os venenos peruanos possuem um perfil protéico semelhante. Entretanto, os venenos que possuíram menor reatividade frente ao ELISA (*B. brazili* e *B. hyoprora*) não possuem uma banda muito aparente na faixa de 50 kDa (Fig 19A, caixa vermelha). Já os venenos utilizados no *pool* para a produção do antiveneno brasileiro apresentam maior variação entre si. E, de forma similar ao citado anteriormente, o veneno de *B. jararacussu*, que possui baixa reatividade no ELISA, também não possui uma banda aparente na faixa de 50kDa (Figura 19B, caixa vermelha).

A

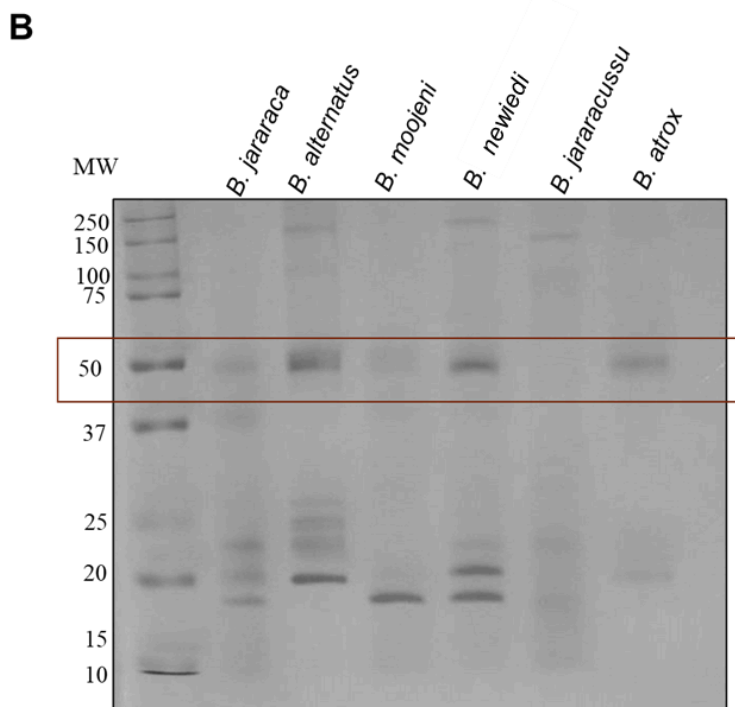


Figura 19: SDS-PAGE de diferentes venenos botrópicos. 10 µg de venenos utilizados na produção de antivenenos (A) peruano e (B) brasileiro foram diluídos em tampão de amostra (v/v), aplicados em um gel de poliacrilamida 12,5% e submetido a uma corrida a 120 V. A eletroforese dos venenos foi realizada sob condições não-redutoras. Em destaque, a faixa referente à 50 kDa do padrão de massa molecular (MW) em cada um dos venenos testados.

O padrão de reconhecimento do mAb 4H4D11 frente a outros gêneros de serpentes também foi analisado por ELISA. Para isto, a placa foi sensibilizada com veneno de *B. atrox*, *L. m. muta*, *M. frontalis* ou *C. d. terrificus*.

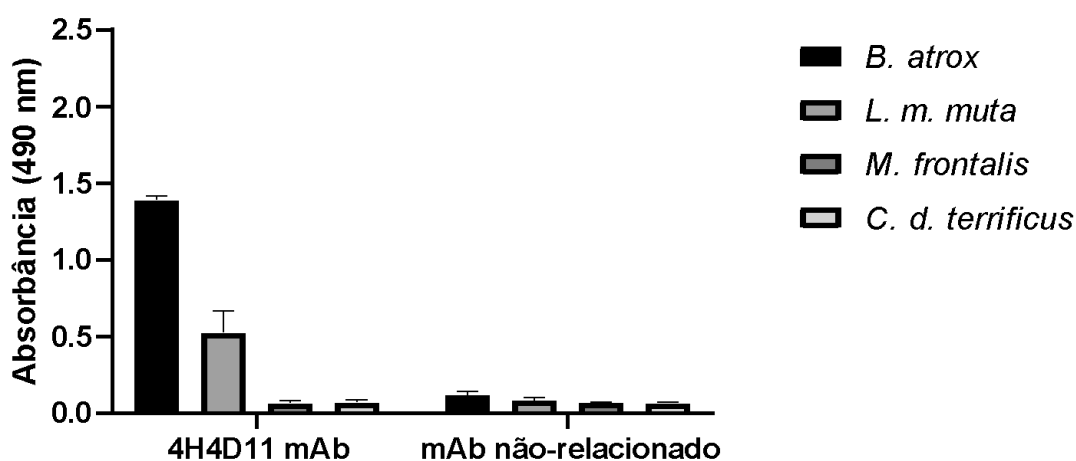


Figura 20: Reatividade cruzada do mAb 4H4D11 contra diferentes venenos ofídicos. Os poços foram sensibilizados com 0,5 µg/poço de veneno de *B. atrox*, *L. m. muta*, *M. frontalis* ou *C. d. terrificus*. O mAb 4H4D11 e um mAb não-relacionado foram utilizados na concentração de 0,25 µg/poço. Como anticorpo secundário, foi utilizado IgG anti-camundongo conjugado a HRP (1:10.000). A revelação foi feita utilizando OPD e determinada por meio de leitura no espectrofotômetro a 490 nm.

5.2.3. Mapeamento de epítomos lineares pelo método de Spot Síntese

No intuito de mapear os epítomos lineares reconhecidos pelo mAb, foi realizado um imunoenensaio de Spot síntese utilizando uma membrana de celulose contendo a sequência primária de uma metaloprotease e uma serinoprotease do veneno de *B. jararaca*, uma vez que estas proteínas estão presentes em grandes porcentagens e são conservadas entre as serpentes do gênero *Bothrops*.

O mAb 4H4D11 não foi capaz de reagir com os peptídeos presentes na sequência primária destas proteínas (Figura 21). Isso sugere que o reconhecimento das proteínas por este anticorpo requer que elas estejam em seu formato tridimensional, se tratando possivelmente de epítomos conformacionais.



Figura 21: Ensaio de Spot síntese em membrana contendo epítomos lineares de serinoprotease e metaloprotease P-III. Após o bloqueio, a membrana foi incubada com 1µg/mL do mAb 4H4D11, seguida por uma incubação com IgG anti-camundongo conjugado à fosfatase alcalina (1:2.000). A revelação do ensaio foi feita com a adição de uma solução de MTT, BCIP e MgCl₂. A sequência da Bothropasina (Uniprot O93523) refere-se aos spots de número 01 ao 193, e a serinoprotease (Uniprot Q9PTU8) do spot número 195 ao 302.

5.3. Fracionamento do veneno de *b. atrox*

Para testar a especificidade do mAb, foi realizado o fracionamento do veneno, na busca de uma fração de massa molecular correspondente à reconhecida pelo mAb 4H4D11 por *Western blot* (5.2.1.). Para isto, 200 mg de veneno diluído em tampão acetato de sódio e aplicados à coluna Sephacryl S-200 (Sigma-Aldrich) foram utilizados para performance de cromatografia de gel-filtração. O perfil cromatográfico revelou cinco picos (Figura 22), que foram denominados P1 a P5, respectivamente. As frações obtidas foram coletadas em volumes de 1mL.

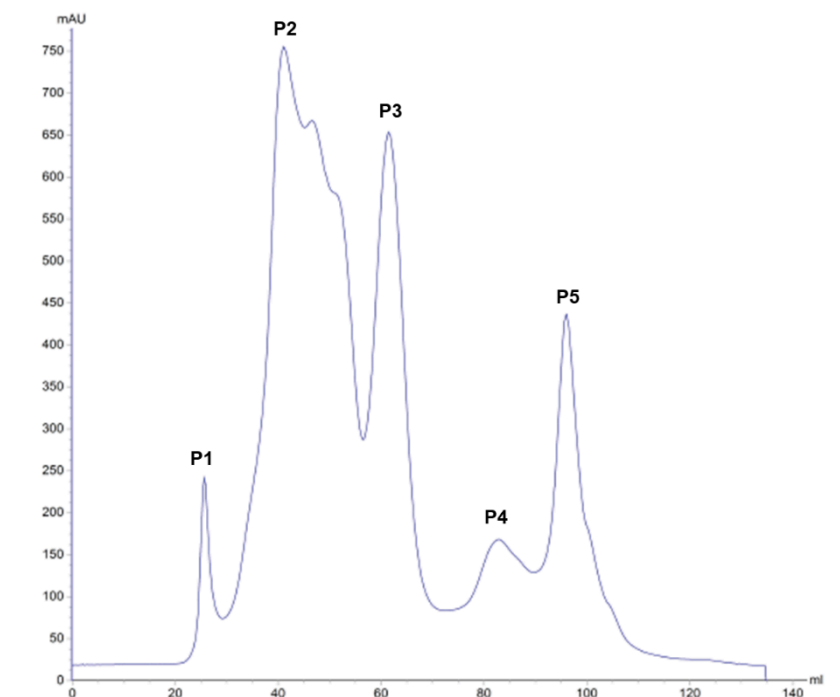


Figura 22: Perfil cromatográfico do fracionamento do veneno de *B. atrox*. O veneno de *B. atrox* (200 mg) foi aplicado a coluna HiPrep Sephacryl S-200 HR (Sigma-Aldrich) e a purificação foi realizada no cromatógrafo Akta Start (GE Healthcare). As proteínas foram eluídas com tampão acetato de sódio 50 mM e cloreto de sódio 0,3 M (pH 7.5). Os picos observados foram numerados P1-P5, respectivamente.

5.3.1. Ensaio de atividade caseinolítica

A investigação da presença de atividade proteolítica dos tubos coletados no fracionamento foi realizada por meio de um ensaio de atividade caseinolítica. É possível observar que o padrão de atividade caseinolítica tubo a tubo acompanha o padrão de fracionamento do veneno (Figura 23).

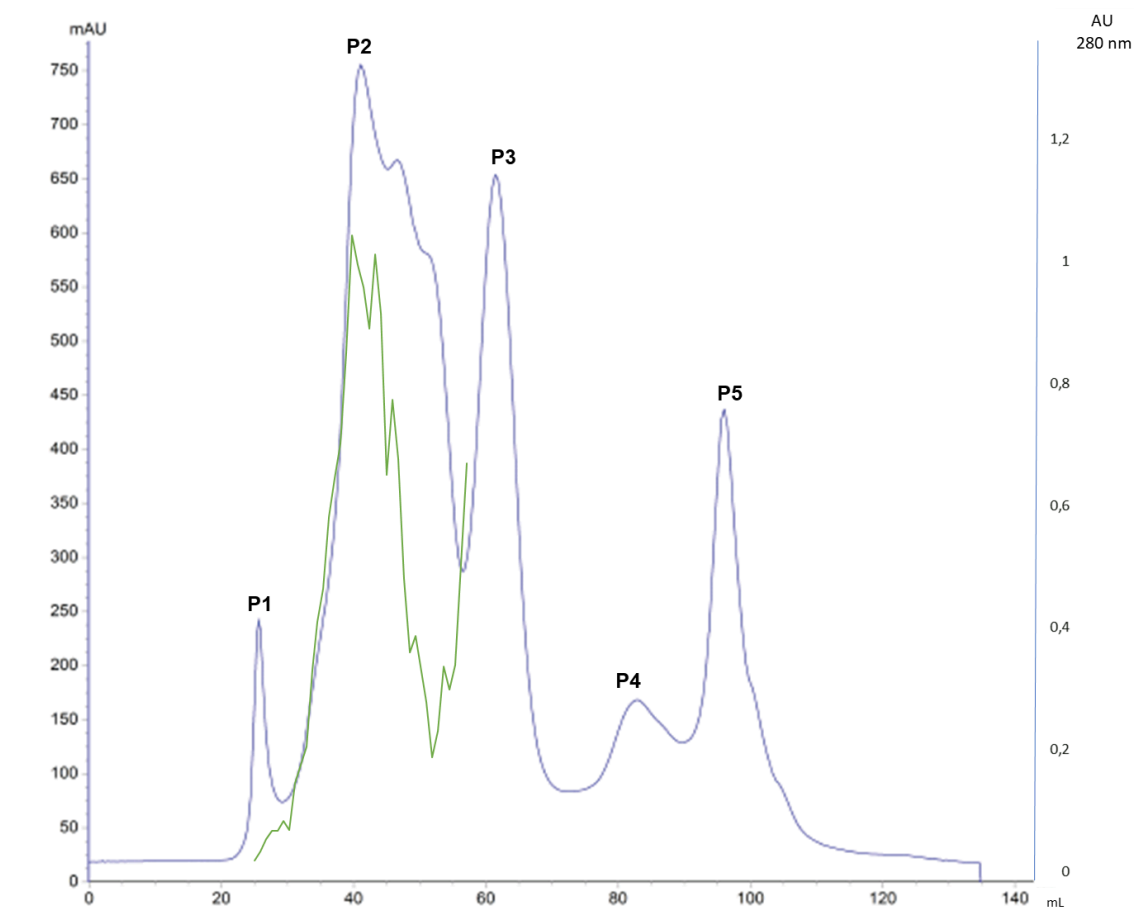


Figura 23: Perfil caseinolítico dos tubos coletados após purificação do veneno de *B. atrox* em coluna S-200. Para o ensaio, 25 μ L das amostras foram incubadas com caseína a 1%. Em seguida, o ensaio foi interrompido por meio da adição de ácido tricloroacético a 5%. As amostras foram centrifugadas e lidas no espectrofotômetro a 280 nm. **(Linha verde)** atividade caseinolítica tubo a tubo. **(Linha azul)** cromatografia do veneno. No eixo y à esquerda, os valores em mAU observados nos tubos durante a cromatografia. No eixo y à direita, os valores em AU observados para a atividade caseinolítica dos mesmos tubos.

Uma vez que os tubos da fração P2 apresentaram considerável atividade caseinolítica, foi feito um SDS-PAGE 12,5% para investigação da pureza e da massa molecular de cada uma das sub-frações (Figura 24). Uma vez que os tubos 22 e 23 apresentaram apenas uma banda na faixa de 50 kDa, provavelmente a mesma faixa reconhecida pelo mAb por *Western blot*, seu conteúdo proteico foi estimado por dosagem e os mesmos tubos foram utilizados para o ensaio de atividade fibrinogenolítica, a fim de investigar, mais uma vez, seu perfil proteolítico.

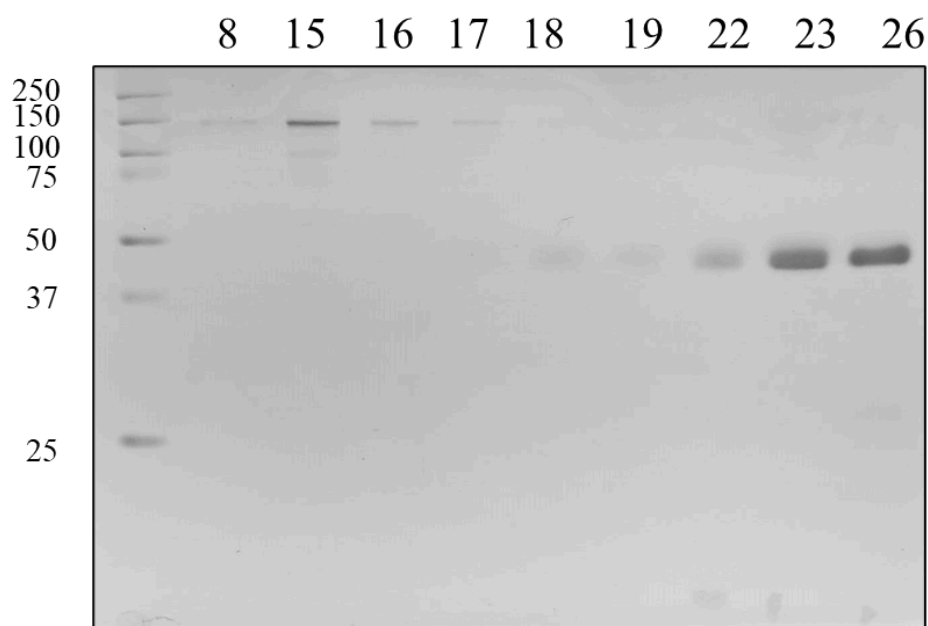


Figura 24: Perfil eletroforético dos tubos coletados na purificação do veneno de *B. atrox*. As amostras foram avaliadas em SDS-PAGE 12,5% em condições não-redutoras. Foram aplicados 15 μ L de cada uma das amostras e submetidas a uma corrida de 120 V por 1h. As bandas foram coradas com *Coomassie blue*.

5.3.2. Ensaio de atividade fibrinogolítica

Outra análise do efeito proteolítico foi feita por meio do ensaio de atividade fibrinogolítica, presente em algumas SVMPs. Para isso, foi testada uma amostra contendo o conteúdo dos tubos 22 e 23. Foi utilizado como substrato o fibrinogênio humano, uma proteína que possui três subunidades: $A\alpha$, $B\beta$, e γ .

Além da atividade caseinolítica, a amostra também possui atividade fibrinogolítica, uma vez que esta clivou totalmente as bandas $A\alpha$ e $B\beta$, e parcialmente a banda γ do fibrinogênio. O veneno, por sua vez, clivou totalmente as bandas $A\alpha$ e $B\beta$. (Figura 25).

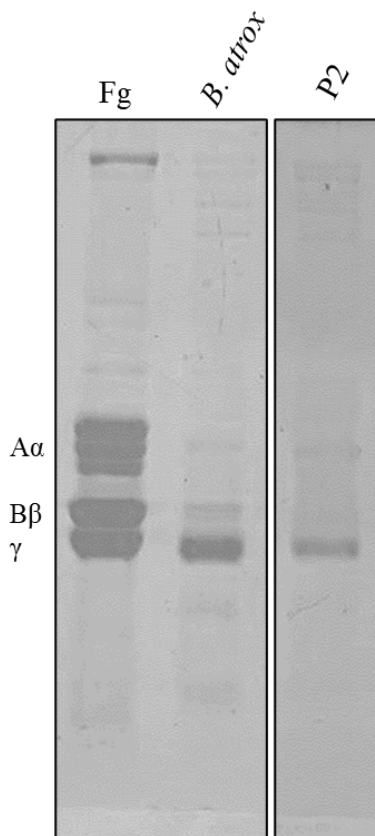


Figura 25: Ensaio de atividade fibrinogenolítica da fração P2 de *B. atrox*. SDS-PAGE 10% em condições redutoras caracterizando o perfil fibrinogenolítico do veneno de *B. atrox* e da fração P2. À esquerda, as cadeias A α , B β , e γ do fibrinogênio. (Fg) Fibrinogênio sem tratamento, como controle negativo. A segunda linha (*B. atrox*) mostra a degradação das cadeias A α e B β quando o fibrinogênio é tratado com 3 μ g do veneno por 1h. Na terceira linha (P2), a degradação do fibrinogênio quando tratado com 3 μ g da fração por 1h. As bandas foram coradas com *Coomassie blue*.

5.3.3. *Western blot*

Para compreender o reconhecimento do mAb 4H4D11 frente à fração P2, foi realizado um ensaio de *Western blot*. O resultado indica que o monoclonal é capaz de reconhecer uma banda de aproximadamente 50 kDa desta fração sob condições não-redutoras, e uma banda adicional de cerca de 25 kDa sob condições redutoras (Figura 26).

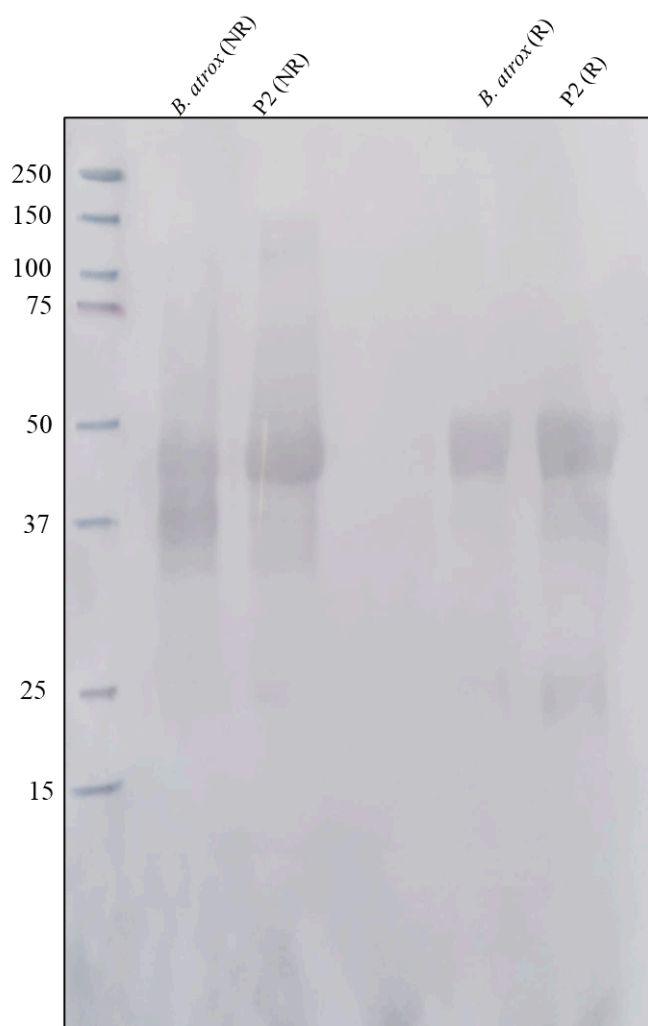


Figura 26: Imunorreatividade do mAb 4H4D11 frente à fração 2 de *B. atrox* por *Western blot*. Veneno de *B. atrox* e fração P2 (10 µg) foram submetidos a um SDS-PAGE 12,5% em condições não-redutoras (NR) e redutoras (R). Como anticorpo primário, foi utilizado 0,075 µg/mL do anticorpo monoclonal. Como anticorpo secundário, IgG anti-camundongo conjugado a HRP (1:15.000). A ligação do anticorpo à proteína foi identificada pela incubação da membrana com IgG anti-camundongo conjugada a HRP seguida de revelação utilizando DAB e cloronaftol.

5.4. Ensaios de neutralização

5.4.1. Ensaio de neutralização de atividade fibrinogenolítica *in vitro*

O potencial neutralizante do mAb 4H4D11 foi inicialmente avaliado por meio de um ensaio de neutralização da atividade fibrinogenolítica, utilizando como substrato o fibrinogênio humano. O resultado indica que o mAb 4H4D11 foi capaz de inibir parcialmente a atividade fibrinogenolítica das amostras testadas. Quando 100 µg deste anticorpo foi utilizado, ele inibe a clivagem das cadeias B β e γ do fibrinogênio incubado com o veneno de *B. atrox*. Por outro lado, quando incubado com a fração proteolítica P2, o anticorpo inibe a clivagem apenas da cadeia γ (Figura 27).

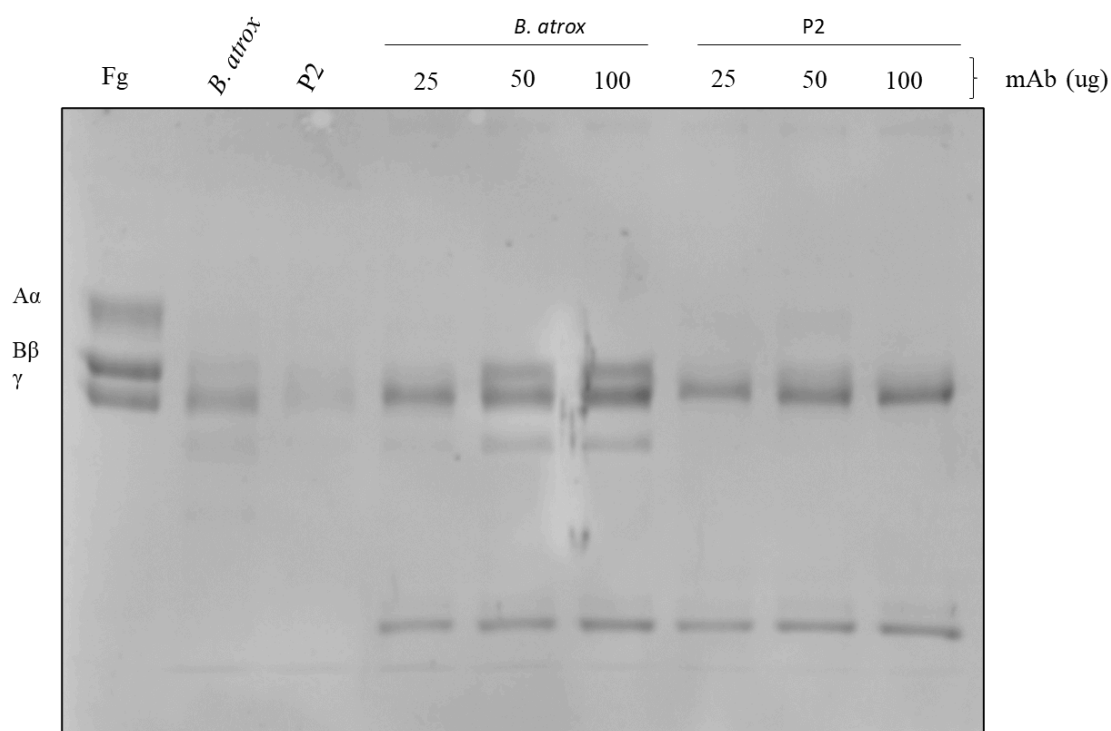


Figura 27: Neutralização da atividade fibrinogenolítica utilizando o mAb 4H4D11. SDS-PAGE 10% em condições redutoras. As cadeias A α , B β e γ do fibrinogênio (**Fg**) estão indicadas no controle negativo, na extremidade esquerda. Como controle positivo da degradação provocada no fibrinogênio, este foi pré-incubado por 1h com 3 μ g do veneno de *B. atrox* ou fração P2. Para a neutralização, 3 μ g do veneno ou fração foram pré-incubados com diferentes concentrações de mAb (25, 50 ou 100 μ g). As bandas foram coradas com *Coomassie blue*.

5.4.2. Ensaio de neutralização de atividade hemorrágica *in vivo*

Com o objetivo de analisar a capacidade de neutralização da atividade hemorrágica pelo mAb 4H4D11, foi realizado um ensaio hemorrágico *in vivo*. Neste ensaio, injetou-se em 4 animais/grupo, 10 μ g de veneno pré-incubado com 100 ou 150 μ g de mAb 4H4D11. Dois animais receberam apenas o veneno ou apenas PBS, e foram utilizados como controles positivo e negativo, respectivamente. O veneno induziu a formação de um halo de 1,3 cm na pele dos animais. Quando o veneno é incubado com o mAb, este anticorpo é capaz de neutralizar grande parte da atividade hemorrágica, uma vez que o tamanho do halo é reduzido em cerca de 75%, quando comparado ao controle positivo (Figura 28).

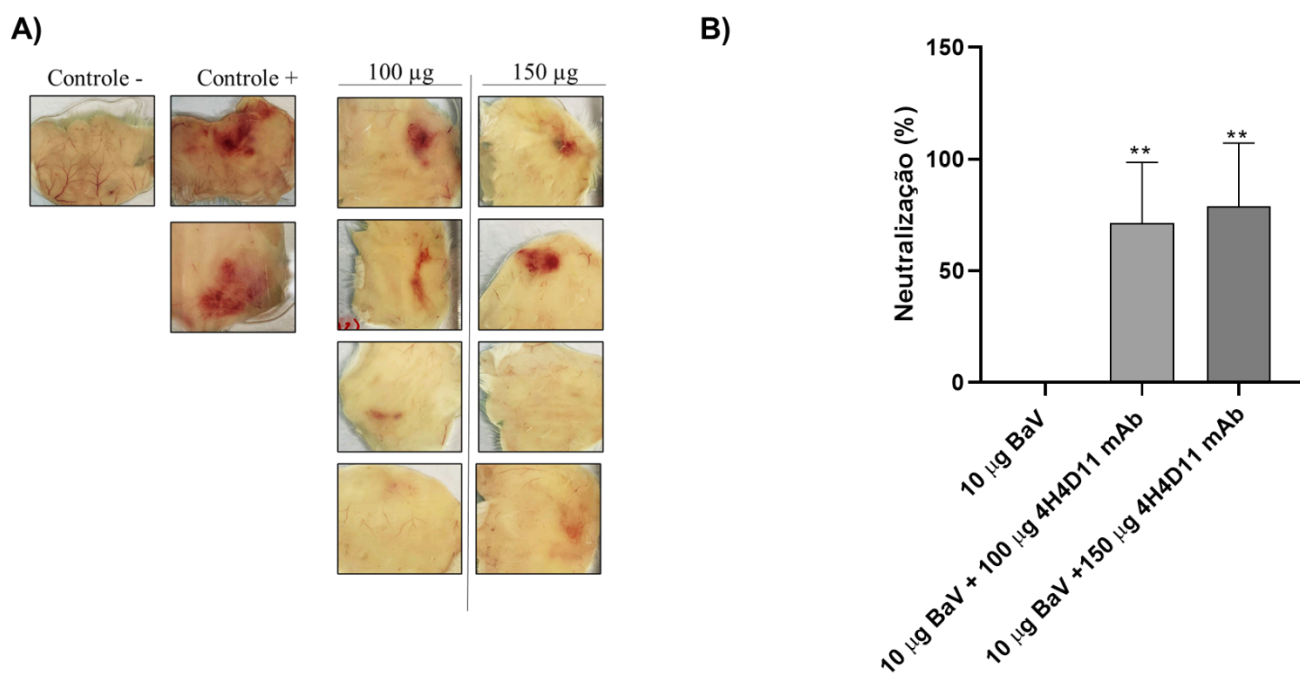


Figura 28: Neutralização da atividade hemorrágica utilizando o mAb 4H4D11. (A) Pele dos animais do controle negativo (PBS), controle positivo (PBS + *B. atrox*) e grupos teste (veneno incubado com 100 µg ou 150 µg de mAb). O veneno de *B. atrox* (10 µg) foi pré incubado com PBS, 100 µg ou 150 µg de mAb purificado e as amostras foram administradas via subcutânea em camundongos *Swiss*. 2 horas depois, os animais foram eutanasiados e o halo hemorrágico foi analisado e quantificado. **(B)** Cálculo da porcentagem de neutralização baseado no tamanho do halo hemorrágico. Para o cálculo, considerou-se 0% de neutralização a média dos diâmetros dos halos formados nos controles positivos (10 µg BaV).

6. DISCUSSÃO

Acidentes causados por animais peçonhentos representam um importante problema de saúde pública em todo mundo. Destes, os acidentes ofídicos estão incluídos na lista de doenças tropicais negligenciadas e se destacam por apresentarem altas taxas de mortalidade e morbidade (CHIPPAUX, 2017).

No Brasil, dentre os 4 principais gêneros de interesse médico, as serpentes do gênero *Bothrops* se destacam por serem responsáveis pelo maior número de casos notificados. *B. atrox* é a maior causadora de acidentes na região amazônica (HUI WEN *et al.*, 2015), além de também habitar áreas desmatadas e ambientes urbanos (SAMPAIO *et al.*, 2016). Uma vez que o maior número dos acidentes com esta serpente acontece em locais de difícil acesso, o resgate e tratamento do acidentado podem ser prejudicados.

O envenenamento botrópico é caracterizado por três atividades fisiopatológicas principais: efeitos coagulantes, hemorrágicos e proteolíticos (SAMPAIO *et al.*, 2016). As metaloproteases são descritas como as principais responsáveis pelos efeitos hemorrágicos dos acidentes ofídicos (PATEL; KONG; HAMILTON, 2022). Análises transcriptômicas de glândulas de veneno indicam uma predominância principalmente de transcritos codificando metaloproteases (NEIVA *et al.*, 2009). O perfil proteômico do veneno de *B. atrox* também revela que as metaloproteases PIII são as toxinas mais abundantes (NÚÑEZ *et al.*, 2009).

Atualmente, o único tratamento recomendado pela OMS para acidentes ofídicos é a soroterapia. Apesar da sua eficácia na neutralização de sintomas sistêmicos, ainda existem adversidades em relação à produção, distribuição e utilização do soro antiveneno a serem solucionadas. Neste sentido, diversas alternativas ao antiveneno tradicional têm sido propostas e desenvolvidas, como a imunização de animais utilizando cDNA, peptídeos ou proteínas recombinantes, além da produção de anticorpos monoclonais direcionados às toxinas do veneno.

A metodologia de produção de anticorpos monoclonais é bem estabelecida por nosso grupo de estudos, onde já foram desenvolvidos mAbs contra diversas toxinas de venenos de animais peçonhentos, como serpentes, aranhas e escorpiões (ESTÊVÃO-COSTA *et al.*, 2000; Larissa M *et al.*, 2003; ALVARENGA, L M *et al.*, 2005; DIAS-LOPES *et al.*, 2014; SCHNEIDER, Francisco Santos; NGUYEN; CASTRO; COBO; MACHADO DE AVILA; FERREIRA; *et al.*, 2014; ALVARENGA,; COSTA *et al.*, 2020)

Considerando a problemática acerca dos acidentes ofídicos, o presente trabalho teve como objetivo a produção de anticorpos monoclonais contra toxinas do veneno de *B. atrox*, para contribuir com o desenvolvimento de um *pool* de anticorpos direcionados às toxinas do veneno, como tratamento alternativo à soroterapia tradicional.

Por sua importância epidemiológica e por não estar incluído no *pool* de venenos utilizado para produção do soro antibotrópico, o veneno de *B. atrox* foi escolhido como foco neste estudo e utilizado para imunização dos camundongos. Após 5 ciclos de imunização, o animal 5 se destacou por apresentar maior

reatividade contra *B. atrox* por ELISA (Figura 12) e suas células B foram fusionadas às células de mieloma murino (Sp2/0) para a geração de hibridomas. Essas células foram cultivadas em um meio de cultura seletivo e, em seguida, submetidas a um *screening*, por meio de um ELISA indireto, para seleção dos hibridomas secretores de anticorpos contra o veneno de *B. atrox*. Este ensaio revelou que, dentre os hibridomas cultivados, quatro foram capazes de produzir anticorpos de interesse (Figura 13). Uma vez que o hibridoma 4H4 foi o mais reativo, este foi submetido à subclonagem, por meio de uma diluição limitante.

Os subclones gerados a partir do hibridoma 4H4 foram submetidos a um novo *screening*, resultando em treze subclones secretores (Figura 14). Destes, o subclone 4H4D11 foi o que apresentou, além de uma reatividade favorável, uma maior expansão em cultura. Assim, o sobrenadante deste subclone foi coletado para ser purificado.

Os anticorpos presentes no sobrenadante celular foram purificados utilizando uma coluna de proteína G, que possui alta afinidade por anticorpos murinos e, em seguida, submetidos a um SDS-PAGE 10% para avaliação de seu perfil eletroforético. Em condições não-reduzidas, é apresentada uma banda na faixa de 150 kDa e, em condições reduzidas, são apresentadas duas bandas, sendo uma por volta de 50 kDa e outra de 25 kDa (Figura 15). Este resultado indica que o anticorpo em questão pode se tratar de uma imunoglobulina G, uma vez que estas proteínas possuem o mesmo perfil eletroforético observado no ensaio (ABBAS, 2015). Este resultado foi confirmado por meio da isotipagem do anticorpo, utilizando um kit de fluxo lateral, revelando que o mAb 4H4D11 pertence à subclasse IgG1 (Figura 16). Atualmente, o maior número de anticorpos monoclonais murinos, humanos ou humanizados aprovados para terapias são desta subclasse (WANG; MATHIEU; BREZSKI, 2018), principalmente devido à sua capacidade de induzir a função efetora e por possuir alta estabilidade quando comparada às outras subclasses de imunoglobulinas (BUSS *et al.*, 2012).

No intuito de investigar a proteína reconhecida pelo mAb 4H4D11, foi realizado um *Western blot* que revelou, sob condições redutoras e não-redutoras, o reconhecimento de proteínas de massa molecular de aproximadamente 50 e 37 kDa (Figura 17).

Dentre as principais toxinas presentes no veneno de *B. atrox*, a LAAO possui uma massa molecular de 67 kDa. A serinoprotease, 35 kDa. A galatrox, uma lectina do tipo C, possui 32 kDa. Já a metaloprotease PI possui uma massa de 22,9 kDa, e a fosfolipase do tipo A₂, 13,7 kDa (ALVES *et al.*, 2008; BHAT *et al.*, 2016; MENALDO *et al.*, 2015; MENDONÇA-FRANQUEIRO *et al.*, 2011). O perfil eletroforético da Batroxrhagina, a metaloprotease PIII predominante do veneno de *B. atrox*, por sua vez, revela uma banda de 50 kDa sob condições não-redutoras, além de uma banda adicional de cerca de 30 kDa sob condições redutoras (FREITAS-DE-SOUSA *et al.*, 2015), o que é similar aos resultados encontrados no presente estudo, no qual o mAb reconhece proteínas de aproximadamente 50 e 37 kDa.

Numa tentativa de identificar a proteína reconhecida por mAb 4H4D11, frações do veneno de *B. atrox* foram purificadas por meio de uma cromatografia de

exclusão molecular, resultando em cinco picos separados de acordo com o tamanho das proteínas (Figura 22). Este mesmo perfil cromatográfico foi observado no trabalho de Costal-Oliveira e colaboradores (2019), utilizando o veneno de *B. atrox* peruana. Em seguida, os tubos foram testados a fim de selecionar uma fração proteolítica, por meio do ensaio de atividade caseinolítica.

Uma vez que o pico P2 apresentou alta atividade proteolítica (Figura 23), os tubos coletados desta fração foram submetidos a um SDS-PAGE 12,5% que confirmou que este pico possui proteínas de massa molecular por volta de 50 kDa (Figura 24). Portanto, P2 foi utilizado num segundo ensaio proteolítico, para análise de sua atividade enzimática sobre o fibrinogênio. *B. atrox* e P2 clivaram totalmente as bandas A α e B β , e parcialmente a banda γ do fibrinogênio (Figura 25). A digestão proteolítica do fibrinogênio por *B. atrox* e pela P2 corrobora o descrito na literatura, que descreve a preferência de degradação das duas primeiras bandas tanto pelo veneno quanto pelas SVMPs de venenos botrópicos (DA SILVA, *et al.*, 2012; PATIÑO *et al.*, 2010; TORRES *et al.*, 2012). Uma vez que P2 degradou o fibrinogênio, há indícios da presença de metaloprotease neste pico. Ainda, no *Western blot* (Figura 26), o reconhecimento revela uma banda de mesma massa molecular reconhecida no veneno total, indicando que este anticorpo reconhece a fração P2 obtida a partir do fracionamento do veneno.

Em seguida, decidiu-se investigar os possíveis epítomos lineares reconhecidos por este monoclonal. Para isto, foi realizado um imunoenensaio de Spot síntese, utilizando uma membrana contendo a sequência primária de uma metaloprotease PIII e uma serinoprotease, ambas do veneno de *B. jararaca*. A membrana utilizada foi previamente produzida por nosso grupo e foi selecionada para o uso pois, apesar de ser composta por proteínas de uma serpente de uma espécie diferente, ambas pertencem ao mesmo gênero e suas proteínas são bem conservadas. Entretanto, o mAb não foi capaz de interagir com nenhum spot da membrana (Figura 21). Até o momento, poucos trabalhos relatam a interação entre anticorpos monoclonais e seus epítomos em metaloproteases. Aparentemente, anticorpos monoclonais contra SVMPs interagem, predominantemente, via estruturas conformacionais (Schneider *et al.*, 2014). Diante disso, acredita-se que o mAb 4H4D11 também reconhece esse tipo de estrutura. A estrutura de epítomos conformacionais é tipicamente resolvida por meio de cristalografia de raio-x ou eletromicroscopia (EM) (FRANCINO-URDANIZ, WHITEHEAD, 2021).

Também é importante ressaltar que a imunogenicidade de diferentes grupos de serpentes é altamente variável, o que pode resultar em antivenenos com perfil de reconhecimento e potenciais neutralizantes diversos. Em vista disso, é desejável que os antivenenos sejam capazes de neutralizar diferentes espécies (LEDSCGAARD *et al.*, 2018).

Neste sentido, foi avaliada a capacidade do monoclonal de reagir de forma cruzada com diferentes espécies. Além do veneno de *B. atrox*, o monoclonal reconhece todos os demais venenos botrópicos utilizados na produção dos soros antivenenos brasileiro e peruano. Este resultado reforça o encontrado no imunoenensaio de Spot síntese (Figura 21), uma vez que o anticorpo monoclonal

possui reconhecimento pelo veneno por ELISA, porém não reconhece epítomos lineares no Spot, ressaltando, mais uma vez, a possibilidade de que este anticorpo reconheça epítomos conformacionais.

Entretanto, o reconhecimento é consideravelmente reduzido quando testado contra os venenos de *B. brazili*, *B. hyoprora* e *B. jararacussu* (Figura 18). A partir do perfil eletroforético destes venenos (Figura 19), foi possível observar que aqueles que apresentaram menor reconhecimento pelo anticorpo não apresentam a banda de 50 kDa, reiterando a relevância desta faixa de massa molecular dos venenos no reconhecimento pelo mAb 4H4D11.

Para venenos de *B. atrox* de gêneros e idades variados, o reconhecimento do monoclonal seguiu o mesmo padrão de absorbância. Os perfis eletroforéticos dos *pools* de venenos de machos e fêmeas de *B. atrox* do trabalho de Hatakeyama e colaboradores (2020) mostram uma grande semelhança entre estes venenos, além de não serem observadas diferenças estatísticas entre as atividades proteolíticas do *pool* de machos e fêmeas, o que confirma a conservação dos componentes dos venenos produzidos por esta espécie, considerando o gênero da serpente. Entretanto, a análise da composição do veneno considerando a idade das serpentes não foi realizada neste trabalho.

Ainda avaliando a reatividade cruzada do monoclonal, este também foi testado contra os venenos dos principais gêneros de serpentes envolvidas em acidentes no Brasil. Dentre os outros três gêneros testados, o monoclonal reconhece apenas o veneno de *L. m. muta* (Figura 20). O perfil proteômico dos quatro gêneros revela que uma das principais disparidades entre eles está na porcentagem de metaloproteases em sua composição. Enquanto o veneno de *B. atrox* é composto por mais de 40% de metaloproteases (e destes 40%, mais de 70% são da classe P-III), o veneno de *L. m. muta* contém cerca de 30%. No entanto, a quantidade desta toxina nos venenos de *C. d. terrificus* e *M. frontalis* é inferior a 1% (HATAKEYAMA *et al.*, 2020; PLA *et al.*, 2013; SANZ *et al.*, 2019; TASIMA *et al.*, 2020), o que poderia explicar a falta de reconhecimento frente a estes venenos e embasaria a hipótese de que o mAb 4H4D11 trata-se de um anticorpo anti-metaloprotease P-III.

Sendo as SVMPs umas das principais enzimas envolvidas nos sintomas locais envolvendo distúrbios de coagulação, é crucial que o tratamento do paciente envolva a neutralização dos efeitos destas toxinas. No entanto, estudos relatam a ineficácia da soroterapia convencional ao neutralizar os efeitos locais do envenenamento (DA SILVA; TAVARES, 2012; GUTIÉRREZ *et al.*, 2009; SEGURA *et al.*, 2013). Desta forma, o desenvolvimento de anticorpos direcionados à neutralização dos efeitos locais seria de grande utilidade para o tratamento dos acidentados.

Para ser um bom candidato para fins terapêuticos, o anticorpo deve, não apenas reconhecer o antígeno alvo, mas também, neutralizar suas atividades biológicas (GOULET; ATKINS, 2020; LAUSTSEN *et al.*, 2018). Portanto, a fim de testar o potencial neutralizante deste anticorpo, foram realizados dois ensaios de neutralização. A princípio, avaliou-se a capacidade do monoclonal de neutralizar, *in vitro*, a atividade fibrinogenolítica observada anteriormente no veneno e em P2. Este

ensaio mostrou uma neutralização parcial da proteólise provocada pelo veneno, uma vez que 50 e 100 µg de IgG foram capazes de impedir a degradação da banda Bβ e γ do fibrinogênio incubado com *B. atrox*, e da cadeia γ quando incubado com a fração proteolítica P2 (Figura 27).

Para o segundo ensaio de neutralização, sobre a atividade hemorrágica *in vivo*, o anticorpo monoclonal alcançou uma neutralização de cerca de 70% da atividade do veneno de *B. atrox*. A neutralização da atividade hemorrágica *in vivo* já foi descrita para outros anticorpos monoclonais, como para a atroxlisina e mutalisina-II, metaloproteases P-I do veneno de *B. atrox* e *L. muta*, respectivamente (ESTÊVÃO-COSTA *et al.*, 2000; SCHNEIDER, Francisco Santos; NGUYEN; CASTRO; COBO; MACHADO DE AVILA; DE FERREIRA; *et al.*, 2014).

Os resultados deste trabalho indicam que o anticorpo monoclonal produzido se trata de um anticorpo anti-metaloprotease P-II ou P-III. Para a confirmação da classe da metaloprotease reconhecida pelo mAb 4H4D11, serão necessários estudos adicionais, como o sequenciamento das bandas reconhecidas por *Western blot* por espectrometria de massa. Este é o primeiro caso reportado de um monoclonal contra uma metaloprotease de uma classe diferente de P-I do veneno de *B. atrox* capaz de neutralizar a atividade hemorrágica *in vivo*. Considerando a neutralização da atividade hemorrágica por mAb 4H4D11, e seu reconhecimento de outros venenos botrópicos, além do veneno laquélico, é possível que este monoclonal também seja capaz de neutralizar a atividade hemorrágica destes venenos.

Ao contrário da metodologia tradicional para a produção de soros antivenenos, que segue sem grandes modificações a mais de cem anos, o desenvolvimento de anticorpos monoclonais por meio da técnica de hibridoma é capaz de garantir a geração de anticorpos neutralizantes idênticos e direcionados somente às toxinas responsáveis pelos sintomas do envenenamento (PARRAY *et al.*, 2020). Além disso, essa metodologia possibilita uma redução do uso de animais na produção de soros.

Uma das linhas seguidas por nosso grupo de pesquisa consiste no desenvolvimento de abordagens *animal-free* que reduzam ou substituam o uso de animais experimentais. Um exemplo é o trabalho de Lopes-de-Souza e colaboradores (2019), que desenvolveram um ensaio *in vitro* como uma possível alternativa para determinação da potência de soros antiveneno botrópico. Seguindo essa abordagem, a metodologia desenvolvida no presente trabalho possibilita uma redução do uso de animais na produção de antivenenos, uma vez que não é necessário manter os animais peçonhentos em cativeiro por grandes períodos, além de dispensar também o uso de cavalos para sua produção.

Em suma, este trabalho descreve a purificação e caracterização de um anticorpo monoclonal (mAb 4H4D11) que reconhece e neutraliza metaloproteases P-III, toxinas responsáveis por distúrbios hemorrágicos no envenenamento pela serpente *B. atrox*. O anticorpo produzido possui potencial para neutralização da hemorragia provocada por este veneno. Por meio dos resultados dos ensaios de reatividade cruzada também é possível inferir que o anticorpo possa neutralizar,

parcialmente, a hemorragia provocada por outros venenos botrópicos e laquéticos, auxiliando na melhoria do tratamento dos acidentes ofídicos.

7. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no presente trabalho descrevem a produção e caracterização de um anticorpo monoclonal direcionado à metaloproteases de *B. atrox*, com potencial para neutralização da atividade hemorrágica do veneno. Estes dados contribuem, junto a outros trabalhos já publicados por nosso grupo, para o desenvolvimento de um *pool* de anticorpos direcionados às principais toxinas do veneno botrópico, no intuito de arquitetar uma nova abordagem de antivenenos para o tratamento de acidentes causados por serpentes.

8. PERSPECTIVAS

As próximas etapas deste trabalho consistem na realização do sequenciamento do anticorpo monoclonal, para que este possa ser produzido de forma recombinante. Também pretende-se realizar a espectrometria de massa da banda reconhecida pelo monoclonal por *Western blot*, a fim de confirmar qual proteína este anticorpo reconhece. Outra importante contribuição futura para este trabalho consistirá na padronização dos ensaios de neutralização, utilizando venenos dos gêneros *Bothrops* e *Lachesis*, as frações purificadas por cromatografia e a proteína reconhecida pelo mAb 4H4D11.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. H. I. V. *Imunologia celular e molecular*. 7. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2012.

ADAMS, G. P.; WEINER, L. M. Monoclonal antibody therapy of cancer. **Nature biotechnology**, United States, vol. 23, no. 9, p. 1147–1157, Sep. 2005. <https://doi.org/10.1038/nbt1137>.

ALVARENGA, L. M.; MACHADO DE AVILA, R. A.; AMIM, P. R.; MARTINS, M. S.; KALAPOTHAKIS, E.; DE LIMA, M. E.; SANTOS, R. G.; GRANIER, C.; CHÁVEZ-OLÓRTEGUI, C. Molecular characterization of a neutralizing murine monoclonal antibody against *Tityus serrulatus* scorpion venom. **Toxicon: official journal of the International Society on Toxinology**, England, vol. 46, no. 6, p. 664–671, Nov. 2005. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2005.07.014>.

ALVARENGA, L. M.; MARTINS, M. S.; MOURA, J. F.; KALAPOTHAKIS, E.; OLIVEIRA, J. C.; MANGILI, O. C.; GRANIER, C.; CHÁVEZ-OLÓRTEGUI, C. Production of monoclonal antibodies capable of neutralizing dermonecrotic activity of *Loxosceles intermedia* spider venom and their use in a specific immunometric assay. **Toxicon: official journal of the International Society on Toxinology**, England, vol. 42, no. 7, p. 725–731, Dec. 2003. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2003.09.006>.

ALVES, R. M.; ANTONUCCI, G. A.; PAIVA, H. H.; CINTRA, A. C. O.; FRANCO, J. J.; MENDONÇA-FRANQUEIRO, E. P.; DORTA, D. J.; GIGLIO, J. R.; ROSA, J. C.; FULY, A. L.; DIAS-BARUFFI, M.; SOARES, A. M.; SAMPAIO, S. V. Evidence of caspase-mediated apoptosis induced by l-amino acid oxidase isolated from *Bothrops atrox* snake venom. **Comparative biochemistry and physiology. Part A, Molecular & integrative physiology**, United States, vol. 151, no. 4, p. 542–550, Dec. 2008. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2008.07.007>.

ANDREWS, R. K.; BOOTH, W. J.; GORMAN, J. J.; CASTALDI, P. A.; BERNDT, M. C. Purification of botrocetin from *Bothrops jararaca* venom. Analysis of the botrocetin-mediated interaction between von Willebrand factor and the human platelet membrane glycoprotein Ib-IX complex. **Biochemistry**, vol. 28, no. 21, p. 8317–8326, 17 Oct. 1989. DOI 10.1021/bi00447a009. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/bi00447a009>.

ANGULO, Y.; ESTRADA, R.; GUTIÉRREZ, J. Clinical and laboratory alterations in horses during immunization with snake venoms for the production of polyvalent (*Crotalinae*) antivenom. **Toxicon**, vol. 35, no. 1, p. 81–90, 1997. DOI [https://doi.org/10.1016/S0041-0101\(96\)00077-3](https://doi.org/10.1016/S0041-0101(96)00077-3). Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0041010196000773>.

ARAÚJO, H. P. de; LUCAS, E. P. R.; MOURA, W. C. de; FÁTIMA BARBOSA, C. de; RODRIGUES, R. J.; MORAIS, J. F.; ALMADA, J. Z.; GUIMARÃES, B. C.; ALMEIDA, A. E. C. C. de; BOLLER, M. A. A. Interlaboratory study for the establishment of Brazilian *Bothrops* Reference Venom and Antivenom for potency evaluation of *Bothrops* antivenom. **Biologicals**, vol. 49, p. 1–5, 2017. DOI

<https://doi.org/10.1016/j.biologicals.2017.08.006>. Disponível em:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S104510561730101X>.

ARLINGHAUS, F. T.; EBLE, J. A. C-type lectin-like proteins from snake venoms. **Toxicon**, vol. 60, no. 4, p. 512–519, 2012. DOI <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2012.03.001>. Disponível em:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0041010112000633>.

ATODA, H.; MORITA, T. A Novel Blood Coagulation Factor IX/Factor X-Binding Protein with Anticoagulant Activity from the Venom of *Trimeresurus flavoviridis* (Habu Snake): Isolation and Characterization1. **The Journal of Biochemistry**, vol. 106, no. 5, p. 808–813, 1 Nov. 1989. DOI [10.1093/oxfordjournals.jbchem.a122935](https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jbchem.a122935). Disponível em:
<https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jbchem.a122935>.

BALL, H. J.; FINLAY, D. Diagnostic application of monoclonal antibody (MAb)-based sandwich ELISAs. **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**, United States, vol. 104, p. 127–132, 1998. <https://doi.org/10.1385/0-89603-525-5:127>.

BARBOSA, L. G.; COSTA, T. R.; BORGES, I. P.; COSTA, M. S.; CARNEIRO, A. C.; BORGES, B. C.; SILVA, M. J. B.; AMORIM, F. G.; QUINTON, L.; YONEYAMA, K. A. G.; DE MELO RODRIGUES, V.; SAMPAIO, S. V.; RODRIGUES, R. S. A comparative study on the leishmanicidal activity of the L-amino acid oxidases BjuuLAAO-II and BmoolAAO-II isolated from Brazilian Bothrops snake venoms. **International journal of biological macromolecules**, Netherlands, vol. 167, p. 267–278, Jan. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.11.146>.

BARNAS, J. L.; LOONEY, R. J.; ANOLIK, J. H. B cell targeted therapies in autoimmune disease. **Current opinion in immunology**, vol. 61, p. 92–99, Dec. 2019. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2019.09.004>.

BEE, A.; THEAKSTON, R. D. G.; HARRISON, R. A.; CARTER, S. D. Novel in vitro assays for assessing the haemorrhagic activity of snake venoms and for demonstration of venom metalloproteinase inhibitors. **Toxicon**, vol. 39, no. 9, p. 1429–1434, 2001. [https://doi.org/10.1016/S0041-0101\(01\)00103-9](https://doi.org/10.1016/S0041-0101(01)00103-9).

BERMÚDEZ-MÉNDEZ, E.; FUGLSANG-MADSEN, A.; FØNS, S.; LOMONTE, B.; GUTIÉRREZ, J. M.; LAUSTSEN, A. H. Innovative immunization strategies for antivenom development. **Toxins**, vol. 10, no. 11, p. 1–37, 2018. <https://doi.org/10.3390/toxins10110452>.

BHAT, S. K.; JOSHI, M. B.; ULLAH, A.; MASOOD, R.; BILIGIRI, S. G.; ARNI, R. K.; SATYAMOORTHY, K. Serine proteinases from Bothrops snake venom activates PI3K/Akt mediated angiogenesis. **Toxicon**, vol. 124, p. 63–72, 2016. DOI <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2016.11.001>. Disponível em:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0041010116303257>.

BOCHNER, R. Paths to the discovery of antivenom serotherapy in France. **Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases**, vol. 22,

no. 1, p. 1–7, 2016. DOI 10.1186/s40409-016-0074-7. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1186/s40409-016-0074-7>.

BODE, W.; GOMIS-RÜTH, F. X.; STÖCKLER, W. Astacins, serralysins, snake venom and matrix metalloproteinases exhibit identical zinc-binding environments (HEXXHXXGXXH and Met-turn) and topologies and should be grouped into a common family, the “metzincins.” **FEBS Letters**, vol. 331, no. 1–2, p. 134–140, 1993. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(93\)80312-I](https://doi.org/10.1016/0014-5793(93)80312-I).

BOUKHALFA-ABIB, H. Hemorrhagic metalloproteinase , Cc HSM-III , isolated from *Cerastes cerastes* venom : Purification and biochemical characterization. no. October 2016, p. 1–10, 2017. <https://doi.org/10.1002/jbt.21899>.

BUSS, N. A. P. S.; HENDERSON, S. J.; MCFARLANE, M.; SHENTON, J. M.; DE HAAN, L. Monoclonal antibody therapeutics: history and future. **Current opinion in pharmacology**, England, vol. 12, no. 5, p. 615–622, Oct. 2012. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2012.08.001>.

BUSTILLO, S.; VELDE, A. C. Van De; MATZNER, V.; GAY, C. C.; LEIVA, L. C. Apoptosis induced by a snake venom metalloproteinase from *Bothrops alternatus* venom in C2C12 muscle cells. **Apoptosis**, vol. 22, no. 4, p. 491–501, 2017. <https://doi.org/10.1007/s10495-017-1350-x>.

CALVETE, J. J.; MARCINKIEWICZ, C.; MONLEÓN, D.; ESTEVE, V.; CELDA, B.; JUÁREZ, P.; SANZ, L. Snake venom disintegrins: evolution of structure and function. **Toxicon**, vol. 45, no. 8, p. 1063–1074, 2005. DOI <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2005.02.024>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0041010105000711>.

CAMACHO, E.; ESCALANTE, T.; REMANS, K.; GUTIÉRREZ, J. M.; RUCAVADO, A. Site mutation of residues in a loop surrounding the active site of a P[*sbnd*] snake venom metalloproteinase abrogates its hemorrhagic activity. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, vol. 512, no. 4, p. 859–863, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2019.03.152>.

CARDOSO, J. L.; FAN, H. W.; FRANÇA, F. O.; JORGE, M. T.; LEITE, R. P.; NISHIOKA, S. A.; AVILA, A.; SANO-MARTINS, I. S.; TOMY, S. C.; SANTORO, M. L. Randomized comparative trial of three antivenoms in the treatment of envenoming by lance-headed vipers (*Bothrops jararaca*) in São Paulo, Brazil. **The Quarterly journal of medicine**, England, vol. 86, no. 5, p. 315–325, May 1993.

CESAR, P. H. S.; BRAGA, M. A.; TRENTO, M. V. C.; MENALDO, D. L.; MARCUSSI, S. Snake Venom Disintegrins: An Overview of their Interaction with Integrins. **Current drug targets**, United Arab Emirates, vol. 20, no. 4, p. 465–477, 2019. <https://doi.org/10.2174/1389450119666181022154737>.

CHAVEZ-OLORTEGUI, C.; AMARA, D. A.; ROCHAT, H.; DINIZ, C.; GRANIER, C. In vivo protection against scorpion toxins by liposomal immunization. **Vaccine**, vol. 9, no. 12, p. 907–910, 1991. [https://doi.org/10.1016/0264-410X\(91\)90012-U](https://doi.org/10.1016/0264-410X(91)90012-U).

CHIPPAUX, J.-P. Snakebite envenomation turns again into a neglected tropical disease! **The journal of venomous animals and toxins including tropical diseases**, vol. 23, p. 38, 2017. <https://doi.org/10.1186/s40409-017-0127-6>.

CORDELL, J. Developing Monoclonal Antibodies for Immunohistochemistry. **Cells**, vol. 11, no. 2, Jan. 2022. <https://doi.org/10.3390/cells11020243>.

COSTA, T. G. F.; COSTAL-OLIVEIRA, F.; DE ASSIS, T. C. S.; LIMA, S. A.; MARTINS, C. A.; FINCO, A. B.; VEIGA, S. S.; SOCCOL, V. T.; MACHADO-DE-ÁVILA, R. A.; FIGUEIREDO, L. F. M.; MINOZZO, J. C.; KALAPOTHAKIS, E.; GUERRA-DUARTE, C.; ALVARENGA, L. M.; CHÁVEZ-OLÓRTEGUI, C. Engineered antigen containing epitopes from *Loxosceles* spp. spider toxins induces a monoclonal antibody (Lox-mAb3) against astacin-like metalloproteases. **International Journal of Biological Macromolecules**, vol. 162, p. 490–500, 2020. DOI <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.06.176>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0141813020336175>.

COSTAL-OLIVEIRA, F.; STRANSKY, S.; GUERRA-DUARTE, C.; NAVES DE SOUZA, D. L.; VIVAS-RUIZ, D. E.; YARLEQUÉ, A.; SANCHEZ, E. F.; CHÁVEZ-OLÓRTEGUI, C.; BRAGA, V. M. M. L-amino acid oxidase from *Bothrops atrox* snake venom triggers autophagy, apoptosis and necrosis in normal human keratinocytes. **Scientific reports**, vol. 9, no. 1, p. 781, Jan. 2019. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-37435-4>.

CRUZ-TERAN, C.; TIRUTHANI, K.; MCSWEENEY, M.; MA, A.; PICKLES, R.; LAI, S. K. Challenges and opportunities for antiviral monoclonal antibodies as COVID-19 therapy. **Advanced drug delivery reviews**, vol. 169, p. 100–117, Feb. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2020.12.004>.

DA SILVA, I. M.; TAVARES, A. M. Comparative evaluation of adverse effects in the use of powder trivalent antivenom and liquid antivenoms in *Bothrops* snake bites. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brazil, vol. 45, no. 4, p. 523–525, 2012. <https://doi.org/10.1590/s0037-86822012000400022>.

DA SILVA, I. R. F.; LORENZETTI, R.; RENNÓ, A. L.; BALDISSERA, L.; ZELANIS, A.; SERRANO, S. M. de T.; HYSLOP, S. BJ-PI2, A non-hemorrhagic metalloproteinase from *Bothrops jararaca* snake venom. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, vol. 1820, no. 11, p. 1809–1821, 2012. DOI <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2012.07.011>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304416512002164>.

DALTRY, J. C.; WÜSTER, W.; THORPE, R. S. Diet and snake venom evolution. **Nature**, vol. 379, no. 6565, p. 537–540, 1996. DOI [10.1038/379537a0](https://doi.org/10.1038/379537a0). Disponível em: <https://doi.org/10.1038/379537a0>.

DE CASTRO, K. L. P.; LOPES-DE-SOUZA, L.; DE OLIVEIRA, D.; MACHADO-DE-ÁVILA, R. A.; PAIVA, A. L. B.; DE FREITAS, C. F.; HO, P. L.; CHÁVEZ-OLÓRTEGUI, C.; GUERRA-DUARTE, C. A Combined Strategy to Improve the Development of a Coral Antivenom Against *Micrurus* spp. **Frontiers in**

Immunology, vol. 10, 2019. DOI 10.3389/fimmu.2019.02422. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2019.02422>.

DESHPANDE, R. P.; MOTGHARE, V. M.; PADWAL, S. L.; PORE, R. R.; BHAMARE, C. G.; DESHMUKH, V. S.; PISE, H. N. Adverse drug reaction profile of anti-snake venom in a rural tertiary care teaching hospital. **Journal of Young Pharmacists**, vol. 5, no. 2, p. 41–45, 2013. DOI <https://doi.org/10.1016/j.jyp.2013.02.003>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0975148313000125>.

DIAS-LOPES, C.; FELICORI, L.; RUBRECHT, L.; COBO, S.; MOLINA, L.; NGUYEN, C.; GALÉA, P.; GRANIER, C.; MOLINA, F.; CHÁVEZ-OLORTEGUI, C. Generation and molecular characterization of a monoclonal antibody reactive with conserved epitope in sphingomyelinases D from *Loxosceles* spider venoms. **Vaccine**, Netherlands, vol. 32, no. 18, p. 2086–2092, Apr. 2014. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2014.02.012>.

DIAS, E. H. V.; DOS SANTOS PASCHOAL, T.; DA SILVA, A. P.; DA CUNHA PEREIRA, D. F.; DE SOUSA SIMAMOTO, B. B.; MATIAS, M. S.; SANTIAGO, F. M.; ROSA, J. C.; SOARES, A.; SANTOS-FILHO, N. A.; DE OLIVEIRA, F.; MAMEDE, C. C. N. BaltPLA2: A New Phospholipase A2 from *Bothrops Alternatus* Snake Venom with Antiplatelet Aggregation Activity. **Protein & Peptide Letters**, vol. 25, no. 10, p. 943–952, 2018. <https://doi.org/10.2174/0929866525666181004101622>.

DU, X.-Y.; CLEMETSON, K. J. Snake venom L-amino acid oxidases. **Toxicon: official journal of the International Society on Toxinology**, England, vol. 40, no. 6, p. 659–665, Jun. 2002. [https://doi.org/10.1016/s0041-0101\(02\)00102-2](https://doi.org/10.1016/s0041-0101(02)00102-2).

EDGAR, W.; PRENTICE, C. R. M. The proteolytic action of ancrod on human fibrinogen and its polypeptide chains. **Thrombosis Research**, vol. 2, no. 1, p. 85–95, 1973. DOI [https://doi.org/10.1016/0049-3848\(73\)90082-0](https://doi.org/10.1016/0049-3848(73)90082-0). Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0049384873900820>.

ESTÊVÃO-COSTA, M. I.; MARTINS, M. S.; SÁNCHEZ, E. F.; DINIZ, C. R.; CHÁVEZ-OLÓRTEGUI, C. Neutralization of the hemorrhagic activity of *Bothrops* and *Lachesis* snake venoms by a monoclonal antibody against mutalysin-II. **Toxicon: official journal of the International Society on Toxinology**, England, vol. 38, no. 1, p. 139–144, Jan. 2000. [https://doi.org/10.1016/s0041-0101\(99\)00134-8](https://doi.org/10.1016/s0041-0101(99)00134-8).

FEITOSA, E. S.; SAMPAIO, V.; SACHETT, J.; CASTRO, D. B. de; NORONHA, M. das D. N.; LOZANO, J. L. L.; MUNIZ, E.; FERREIRA, L. C. de L.; LACERDA, M. V. G. de; MONTEIRO, W. M. Snakebites as a largely neglected problem in the Brazilian Amazon: highlights of the epidemiological trends in the State of Amazonas. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brazil, vol. 48 Suppl 1, p. 34–41, 2015. <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0105-2013>.

FLORES, E.; RICHARDSON, M.; HELENA, L.; SANCHES, S.; YARLEQUE, A.; NILAND, S.; MARTINS, A.; ESTEVAO-COSTA, M. I.; ANDREAS, J. Biochimica et Biophysica Acta A novel fi brinolytic metalloproteinase , barnettlysin-I from *Bothrops*

barnetti (barnett ´ s pitviper) snake venom with anti-platelet properties. **BBA - General Subjects**, vol. 1860, no. 3, p. 542–556, 2016. DOI 10.1016/j.bbagen.2015.12.021. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbagen.2015.12.021>.

FORTHAL, D. N. Functions of Antibodies. **Microbiology spectrum**, United States, vol. 2, no. 4, p. AID-0019-2014, Aug. 2014. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.AID-0019-2014>.

FOX, J. W.; SERRANO, S. M. T. Timeline of key events in snake venom metalloproteinase research. **Journal of Proteomics**, vol. 72, no. 2, p. 200–209, 2009. DOI 10.1016/j.jprot.2009.01.015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2009.01.015>.

FRANCINO-URDANIZ, I. M.; WHITEHEAD, T. A. An overview of methods for the structural and functional mapping of epitopes recognized by anti-SARS-CoV-2 antibodies. **RSC Chemical Biology**, vol. 2, no. 6, p. 1580-1589, 2021. DOI 10.1039/D1CB00169H. Disponível em: <https://doi.org/10.1039/D1CB00169H>

FREITAS-DE-SOUSA, L. A.; AMAZONAS, D. R.; SOUSA, L. F.; SANT'ANNA, S. S.; NISHIYAMA, M. Y. J.; SERRANO, S. M. T.; JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO, I. L. M.; CHALKIDIS, H. M.; MOURA-DA-SILVA, A. M.; MOURÃO, R. H. V. Comparison of venoms from wild and long-term captive Bothrops atrox snakes and characterization of Batrotoxhagin, the predominant class PIII metalloproteinase from the venom of this species. **Biochimie**, France, vol. 118, p. 60–70, Nov. 2015. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2015.08.006>.

FRY, B. G.; ROELANTS, K.; CHAMPAGNE, D. E.; SCHEIB, H.; TYNDALL, J. D. A.; KING, G. F.; NEVALAINEN, T. J.; NORMAN, J. A.; LEWIS, R. J.; NORTON, R. S.; RENJIFO, C.; DE LA VEGA, R. C. R. The Toxicogenomic Multiverse: Convergent Recruitment of Proteins Into Animal Venoms. **Annual Review of Genomics and Human Genetics**, vol. 10, no. 1, p. 483–511, 28 Aug. 2009. DOI 10.1146/annurev.genom.9.081307.164356. Disponível em: <https://doi.org/10.1146/annurev.genom.9.081307.164356>.

FURTADO, M. de F. D.; CARDOSO, S. T.; SOARES, O. E.; PEREIRA, A. Pietro; FERNANDES, D. S.; TAMBOURGI, D. V.; SANT'ANNA, O. A. Antigenic cross-reactivity and immunogenicity of Bothrops venoms from snakes of the Amazon region. **Toxicon: official journal of the International Society on Toxinology**, England, vol. 55, no. 4, p. 881–887, Apr. 2010. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2009.12.014>.

GOULET, D. R.; ATKINS, W. M. Considerations for the Design of Antibody-Based Therapeutics. **Journal of pharmaceutical sciences**, vol. 109, no. 1, p. 74–103, Jan. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2019.05.031>.

GOYFFON, M.; CHIPPAUX, J. La découverte du séru antivenimeux. 1894. .

GUTIÉRREZ, J. M.; CALVETE, J. J.; HABIB, A. G.; HARRISON, R. A.; WILLIAMS, D. J.; WARRELL, D. A. Snakebite envenoming. **Nature reviews**.

Disease primers, England, vol. 3, p. 17063, Sep. 2017. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.63>.

GUTIÉRREZ, J. M.; ESCALANTE, T.; RUCAVADO, A.; HERRERA, C. Hemorrhage caused by snake venom metalloproteinases: A journey of discovery and understanding. **Toxins**, vol. 8, no. 4, 2016. <https://doi.org/10.3390/toxins8040093>.

GUTIÉRREZ, J. M.; LOMONTE, B.; LEÓN, G.; ALAPE-GIRÓN, A.; FLORES-DÍAZ, M.; SANZ, L.; ANGULO, Y.; CALVETE, J. J. Snake venomomics and antivenomics: Proteomic tools in the design and control of antivenoms for the treatment of snakebite envenoming. **Journal of proteomics**, Netherlands, vol. 72, no. 2, p. 165–182, Mar. 2009. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2009.01.008>.

GUTIÉRREZ, J. M.; PONCE-SOTO, L. A.; MARANGONI, S.; LOMONTE, B. Systemic and local myotoxicity induced by snake venom group II phospholipases A2: comparison between crotoxin, crotoxin B and a Lys49 PLA2 homologue. **Toxicon: official journal of the International Society on Toxinology**, England, vol. 51, no. 1, p. 80–92, Jan. 2008. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2007.08.007>.

GUTIÉRREZ, J. M.; RUCAVADO, A.; ESCALANTE, T.; DÍAZ, C. Hemorrhage induced by snake venom metalloproteinases: biochemical and biophysical mechanisms involved in microvessel damage. **Toxicon: official journal of the International Society on Toxinology**, England, vol. 45, no. 8, p. 997–1011, Jun. 2005. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2005.02.029>.

HAN, Y.-P.; LU, X.-Y.; WANG, X.-F.; XU, J. Isolation and characterization of a novel P-II class snake venom metalloproteinase from *Trimeresurus stejnegeri*. **Toxicon**, vol. 49, no. 7, p. 889–898, 2007. DOI <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2006.11.030>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0041010106004624>.

HARRISON, R. A.; MOURA-DA-SILVA, A. M.; LAING, G. D.; WU, Y.; RICHARDS, A.; BROADHEAD, A.; BIANCO, A. E.; THEAKSTON, R. D. Antibody from mice immunized with DNA encoding the carboxyl-disintegrin and cysteine-rich domain (JD9) of the haemorrhagic metalloprotease, Jararhagin, inhibits the main lethal component of viper venom. **Clinical and experimental immunology**, vol. 121, no. 2, p. 358–363, Aug. 2000. DOI [10.1046/j.1365-2249.2000.01287.x](https://doi.org/10.1046/j.1365-2249.2000.01287.x). Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10931154>.

HASSON, S. S. A. A. Generation of antibodies against disintegrin and cysteine-rich domains by DNA immunization: An approach to neutralize snake venom-induced haemorrhage. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, vol. 7, no. 3, p. 198–207, 2017. DOI [10.1016/j.apjtb.2016.12.015](https://doi.org/10.1016/j.apjtb.2016.12.015). Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2221169116311662>.

HATAKEYAMA, D. M.; TASIMA, L. J.; BRAVO-TOBAR, C. A.; SERINO-SILVA, C.; TASHIMA, A. K.; RODRIGUES, C. F. B.; AGUIAR, W. da S.; GALIZIO, N. da C.; DE LIMA, E. O. V.; KAVAZOI, V. K.; GUTIERREZ-MARÍN, J. D.; DE FARIAS, I. B.; SANT'ANNA, S. S.; GREGO, K. F.; DE MORAIS-ZANI, K.; TANAKA-AZEVEDO, A. M. Venom complexity of *Bothrops atrox* (common lancehead) siblings. **The journal**

of venomous animals and toxins including tropical diseases, vol. 26, p. e20200018, Oct. 2020. <https://doi.org/10.1590/1678-9199-JVATITD-2020-0018>.

HATI, R.; MITRA, P.; SARKER, S.; BHATTACHARYYA, K. K. Snake Venom Hemorrhagins. **Critical Reviews in Toxicology**, vol. 29, no. 1, p. 1–19, 1 Jan. 1999. DOI 10.1080/10408449991349168. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/10408449991349168>.

HIU, J. J.; YAP, M. K. K. Cytotoxicity of snake venom enzymatic toxins: Phospholipase A2 and L-amino acid oxidase. **Biochemical Society Transactions**, vol. 48, no. 2, p. 719–731, 2020. <https://doi.org/10.1042/BST20200110>.

HSU, C. C., WU, W. B., HUANG, T. F. A snake venom metalloproteinase, kistomin, cleaves platelet glycoprotein VI and impairs platelet functions. no. June, p. 1578–1585, 2008. <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2008.03071.x>.

HUI WEN, F.; MONTEIRO, W. M.; MOURA DA SILVA, A. M.; TAMBOURGI, D. V.; MENDONÇA DA SILVA, I.; SAMPAIO, V. S.; DOS SANTOS, M. C.; SACHETT, J.; FERREIRA, L. C. L.; KALIL, J.; LACERDA, M. Snakebites and scorpion stings in the Brazilian Amazon: identifying research priorities for a largely neglected problem. **PLoS neglected tropical diseases**, vol. 9, no. 5, p. e0003701, May 2015. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003701>.

IZIDORO, L. F. M.; SOBRINHO, J. C.; MENDES, M. M.; COSTA, T. R.; GRABNER, A. N.; RODRIGUES, V. M.; DA SILVA, S. L.; ZANCHI, F. B.; ZULIANI, J. P.; FERNANDES, C. F. C.; CALDERON, L. A.; STÁBELI, R. G.; SOARES, A. M. Snake venom L-amino acid oxidases: Trends in pharmacology and biochemistry. **BioMed Research International**, vol. 2014, 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/196754>.

JAMUNAA, A.; VEJAYAN, J.; HALIJAH, I.; SHARIFAH, S. H.; AMBU, S. Cytotoxicity of Southeast Asian snake venoms. **Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases**, vol. 18, no. 2, p. 150–156, 2012. <https://doi.org/10.1590/S1678-91992012000200004>.

JIN, J.; SIMMONS, G. Antiviral Functions of Monoclonal Antibodies against Chikungunya Virus. **Viruses**, vol. 11, no. 4, Mar. 2019. <https://doi.org/10.3390/v11040305>.

KINI, R. M. Structure-function relationships and mechanism of anticoagulant phospholipase A2 enzymes from snake venoms. **Toxicon: official journal of the International Society on Toxinology**, England, vol. 45, no. 8, p. 1147–1161, Jun. 2005. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2005.02.018>.

KÖHLER, G.; MILSTEIN, C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. **Nature**, England, vol. 256, no. 5517, p. 495–497, Aug. 1975. <https://doi.org/10.1038/256495a0>.

KONDO, H.; KONDO, S.; IKEZAWA, H.; OHSAKA, A. Studies on the quantitative method for determination of hemorrhagic activity of habu snake venom. **Japanese Journal of Medical Science and Biology**, vol. 13, p. 43–51, 1960.

<https://doi.org/10.7883/yoken1952.13.43>.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, England, vol. 227, no. 5259, p. 680–685, Aug. 1970. <https://doi.org/10.1038/227680a0>.

LALLOO, D. G.; THEAKSTON, R. D. G. Snake antivenoms. **Journal of toxicology. Clinical toxicology**, United States, vol. 41, no. 3, p. 227–277, 2003. <https://doi.org/10.1081/clt-120021113>.

LAUNE, D.; MOLINA, F.; FERRIÈRES, G.; VILLARD, S.; BÈS, C.; RIEUNIER, F.; CHARDÈS, T.; GRANIER, C. Application of the Spot method to the identification of peptides and amino acids from the antibody paratope that contribute to antigen binding. **Journal of immunological methods**, Netherlands, vol. 267, no. 1, p. 53–70, Sep. 2002. [https://doi.org/10.1016/s0022-1759\(02\)00140-0](https://doi.org/10.1016/s0022-1759(02)00140-0).

LAUSTSEN, Andreas H.; MARÍA GUTIÉRREZ, J.; KNUDSEN, C.; JOHANSEN, K. H.; BERMÚDEZ-MÉNDEZ, E.; CERNI, F. A.; JÜRGENSEN, J. A.; LEDSGAARD, L.; MARTOS-ESTEBAN, A.; ØHLENSCHLÆGER, M.; PUS, U.; ANDERSEN, M. R.; LOMONTE, B.; ENGMARK, M.; PUCCA, M. B. Pros and cons of different therapeutic antibody formats for recombinant antivenom development. **Toxicon**, vol. 146, p. 151–175, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2018.03.004>.

LAUSTSEN, Andreas Hougaard. Toxin synergism in snake venoms. **Toxin Reviews**, vol. 35, no. 3–4, p. 165–170, 2016. <https://doi.org/10.1080/15569543.2016.1220397>.

LEDSGAARD, L.; JENKINS, T. P.; DAVIDSEN, K.; KRAUSE, K. E.; MARTOS-ESTEBAN, A.; ENGMARK, M.; RØRDAM ANDERSEN, M.; LUND, O.; LAUSTSEN, A. H. Antibody Cross-Reactivity in Antivenom Research. **Toxins**, vol. 10, no. 10, Sep. 2018. <https://doi.org/10.3390/toxins10100393>.

LEE, M. L.; FUNG, S. Y.; CHUNG, I.; PAILLOOR, J.; CHEAH, S. H.; TAN, N. H. King cobra (*Ophiophagus hannah*) venom L-amino acid oxidase induces apoptosis in PC-3 cells and suppresses PC-3 solid tumor growth in a tumor xenograft mouse model. **International journal of medical sciences**, vol. 11, no. 6, p. 593–601, 2014. <https://doi.org/10.7150/ijms.8096>.

LIU, B.-S.; JIANG, B.-R.; HU, K.-C.; LIU, C.-H.; HSIEH, W.-C.; LIN, M.-H.; SUNG, W.-C. Development of a Broad-Spectrum Antiserum against Cobra Venoms Using Recombinant Three-Finger Toxins. **Toxins**, vol. 13, no. 8, Aug. 2021. <https://doi.org/10.3390/toxins13080556>.

LOMONTE, B.; GUTIÉRREZ, J. M. [Proteolytic activity of snake venoms of Costa Rica on casein]. **Revista de biología tropical**, Costa Rica, vol. 31, no. 1, p. 37–40, Jun. 1983.

LONGBOTTOM, J.; SHEARER, F. M.; DEVINE, M.; ALCOBA, G.; CHAPPUIS, F.; WEISS, D. J.; RAY, S. E.; RAY, N.; WARRELL, D. A.; RUIZ DE CASTAÑEDA, R.; WILLIAMS, D. J.; HAY, S. I.; PIGOTT, D. M. Vulnerability to snakebite envenoming: a

global mapping of hotspots. **The Lancet**, vol. 392, no. 10148, p. 673–684, 2018. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)31224-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)31224-8).

LOPES-DE-SOUZA, L.; COSTAL-OLIVEIRA, F.; STRANSKY, S.; FONSECA DE FREITAS, C.; GUERRA-DUARTE, C.; BRAGA, V. M. M.; CHÁVEZ-OLÓRTEGUI, C. Development of a cell-based in vitro assay as a possible alternative for determining bothropic antivenom potency. **Toxicon**, vol. 170, p. 68–76, 2019. DOI 10.1016/j.toxicon.2019.09.010. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S00410119304520>.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **The Journal of biological chemistry**, vol. 193, no. 1, p. 265–275, 1951. DOI 10.1016/s0021-9258(19)52451-6. Disponível em: [http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)52451-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9258(19)52451-6).

LU, X.; LU, D.; SCULLY, F. M.; KAKKAR, V. V. Snake Venom Metalloproteinase Containing a Disintegrin-like Domain, its Structure-activity Relationships at Interacting with Integrins. **Current Medicinal Chemistry - Cardiovascular & Hematological Agents**, vol. 3, no. 3, p. 249–260, 2005. DOI 10.2174/1568016054368205. Disponível em: <http://www.eurekaselect.com/article/35735>.

MAGALHÃES, S. F. V.; PEIXOTO, H. M.; DE ALMEIDA GONÇALVES SACHETT, J.; OLIVEIRA, S. S.; ALVES, E. C.; DOS SANTOS IBIAPINA, H. N.; MONTEIRO, W. M.; DE OLIVEIRA, M. R. F. Snakebite envenomation in the Brazilian Amazon: a cost-of-illness study. **Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, vol. 114, no. 9, p. 642–649, 1 Sep. 2020. DOI 10.1093/trstmh/traa005. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/trstmh/traa005>.

MALAUQUE, C. M. S.; GUTIÉRREZ, J. M. Snakebite envenomation in Central and South America. **Critical Care Toxicology**, no. October, p. 1–22, 2016. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-20790-2>.

MATSUI, T.; FUJIMURA, Y.; TITANI, K. Snake venom proteases affecting hemostasis and thrombosis. **Biochimica et Biophysica Acta - Protein Structure and Molecular Enzymology**, vol. 1477, no. 1–2, p. 146–156, 2000. [https://doi.org/10.1016/S0167-4838\(99\)00268-X](https://doi.org/10.1016/S0167-4838(99)00268-X).

MENALDO, D. L.; JACOB-FERREIRA, A. L.; BERNARDES, C. P.; CINTRA, A. C. O.; SAMPAIO, S. V. Purification procedure for the isolation of a P-I metalloprotease and an acidic phospholipase A2 from Bothrops atrox snake venom. **The journal of venomous animals and toxins including tropical diseases**, vol. 21, p. 28, 2015. <https://doi.org/10.1186/s40409-015-0027-6>.

MENDONÇA-FRANQUEIRO, E. de P.; ALVES-PAIVA, R. de M.; SARTIM, M. A.; CALLEJON, D. R.; PAIVA, H. H.; ANTONUCCI, G. A.; ROSA, J. C.; CINTRA, A. C. O.; FRANCO, J. J.; ARANTES, E. C.; DIAS-BARUFFI, M.; SAMPAIO, S. V. Isolation, functional, and partial biochemical characterization of galatrox, an acidic lectin from Bothrops atrox snake venom. **Acta biochimica et biophysica Sinica**, China, vol. 43, no. 3, p. 181–192, Mar. 2011. <https://doi.org/10.1093/abbs/gmr003>.

MILSTEIN, C. From the structure of antibodies to the diversification of the immune response. Nobel lecture, 8 December 1984. **Bioscience reports**, England, vol. 5, no. 4, p. 275–297, Apr. 1985. <https://doi.org/10.1007/BF01116899>.

MONTEIRO, W. M.; CONTRERAS-BERNAL, J. C.; BISNETO, P. F.; SACHETT, J.; MENDONÇA DA SILVA, I.; LACERDA, M.; GUIMARÃES DA COSTA, A.; VAL, F.; BRASILEIRO, L.; SARTIM, M. A.; SILVA-DE-OLIVEIRA, S.; BERNARDE, P. S.; KAEFER, I. L.; GRAZZIOTIN, F. G.; WEN, F. H.; MOURA-DA-SILVA, A. M. Bothrops atrox, the most important snake involved in human envenomings in the amazon: How venomics contributes to the knowledge of snake biology and clinical toxicology. **Toxicon: X**, vol. 6, p. 100037, 2020. DOI 10.1016/j.toxcx.2020.100037. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2590171020300151>.

MONTEIRO, W. M.; FARIAS, A. S. de; VAL, F.; NETO, A. V. S.; SACHETT, A.; LACERDA, M.; SAMPAIO, V.; CARDOSO, D.; GARNELO, L.; VISSOCI, J. R. N.; SACHETT, J.; WEN, F. H. Providing Antivenom Treatment Access to All Brazilian Amazon Indigenous Areas: “Every Life Has Equal Value”. **Toxins**, vol. 12, no. 12, Dec. 2020. <https://doi.org/10.3390/toxins12120772>.

MOURA-DA-SILVA, A. M.; BALDO, C. Toxicon Jararhagin , a hemorrhagic snake venom metalloproteinase from Bothrops jararaca. **Toxicon**, vol. 60, no. 3, p. 280–289, 2012. DOI 10.1016/j.toxicon.2012.03.026. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2012.03.026>.

MUNIZ, E. G.; MARIA, W. S.; ESTEVÃO-COSTA, M. I.; BUHRNHEIM, P.; CHÁVEZ-OLÓRTEGUI, C. Neutralizing potency of horse antiotherapeutic Brazilian antivenom against Bothrops snake venoms from the Amazonian rain forest. **Toxicon: official journal of the International Society on Toxicology**, England, vol. 38, no. 12, p. 1859–1863, Dec. 2000. [https://doi.org/10.1016/s0041-0101\(00\)00082-9](https://doi.org/10.1016/s0041-0101(00)00082-9).

NEGRIN, A.; BATTOCLETTI, M. A.; JUANENA, C.; MORAIS, V. Reports of Doses Administered and Adverse Reactions to Snake Antivenom Used in Uruguay in 2018. **Frontiers in Toxicology**, vol. 3, 2021. DOI 10.3389/ftox.2021.690964. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/ftox.2021.690964>.

NEIVA, M.; ARRAES, F. B. M.; DE SOUZA, J. V.; RÁDIS-BAPTISTA, G.; PRIETO DA SILVA, A. R. B.; WALTER, M. E. M. T.; BRIGIDO, M. de M.; YAMANE, T.; LÓPEZ-LOZANO, J. L.; ASTOLFI-FILHO, S. Transcriptome analysis of the Amazonian viper Bothrops atrox venom gland using expressed sequence tags (ESTs). **Toxicon: official journal of the International Society on Toxicology**, England, vol. 53, no. 4, p. 427–436, Mar. 2009. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2009.01.006>.

NELSON, P. N.; REYNOLDS, G. M.; WALDRON, E. E.; WARD, E.; GIANOPOULOS, K.; MURRAY, P. G. Monoclonal antibodies. **Molecular pathology: MP**, vol. 53, no. 3, p. 111–117, Jun. 2000. <https://doi.org/10.1136/mp.53.3.111>.

NOGUEIRA, C. C.; ARGÔLO, A. J. S.; ARZAMENDIA, V.; AZEVEDO, J. A.; BARBO, F. E.; BÉRNILS, R. S.; BOLOCHIO, B. E.; BORGES-MARTINS, M.; BRASIL-GODINHO, M.; BRAZ, H.; BUONONATO, M. A.; CISNEROS-HEREDIA, D. F.; COLLI, G. R.; COSTA, H. C.; FRANCO, F. L.; GIRAUDO, A.; GONZALEZ, R. C.; GUEDES, T.; HOOGMOED, M. S.; ... MARTINS, M. Atlas of Brazilian Snakes: Verified Point-Locality Maps to Mitigate the Wallacean Shortfall in a Megadiverse Snake Fauna. **South American Journal of Herpetology**, vol. 14, no. sp1, p. 1, 2020. <https://doi.org/10.2994/sajh-d-19-00120.1>.

NÚÑEZ, V.; CID, P.; SANZ, L.; LA, P. De; ANGULO, Y.; LOMONTE, B.; MARÍA, J.; CALVETE, J. J.; PICADO, I. C.; MICROBIOLOGÍA, F. De; RICA, U. D. C.; JOSÉ, S.; RICA, C. Snake venomics and antivenomics of Bothrops atrox venoms from Colombia and the Amazon regions of Brazil, Perú and Ecuador suggest the occurrence of geographic variation of venom phenotype by a trend towards paedomorphism. **Journal of Proteomics**, vol. 73, no. 1, p. 57–78, 2009. DOI 10.1016/j.jprot.2009.07.013. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jprot.2009.07.013>.

OLAIBA, O. T.; KARINA DOS SANTOS, P.; SELISTRE-DE-ARAUJO, H. S.; FERREIRA DE SOUZA, D. H. Snake Venom Metalloproteinases (SVMPs): A structure-function update. **Toxicon: X**, vol. 7, p. 100052, Sep. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.toxcx.2020.100052>.

OLIVEIRA, L.; COSTA, M. I. E.-; FLORES-ORTIZ, R.; EBLE, J. A. Biochimie antiplatelet activity and targeting capability toward glycoprotein GPIIb/IIIa and glycoprotein GPVI. vol. 184, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2021.01.016>.

PARRAY, H. A.; SHIVANGI, S.; SWEETY, S.; TRIPTI, S.; SHUBBIR, A.; CHANDRESH, S.; RAJESH, K. Hybridoma technology a versatile method for isolation of monoclonal antibodies, its applicability across species, limitations, advancement and future perspectives. **International immunopharmacology**, vol. 85, p. 106639, 2020. DOI 10.1016/j.intimp.2020.106639. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2020.106639>

PATEL, V.; KONG, E. L.; HAMILTON, R. J. Rattle Snake Toxicity. Treasure Island (FL): [s. n.], 2022.

PATIÑO, A. C.; PEREAÑEZ, J. A.; NÚÑEZ, V.; BENJUMEA, D. M.; FERNANDEZ, M.; RUCAVADO, A.; SANZ, L.; CALVETE, J. J. Isolation and biological characterization of Batx-I, a weak hemorrhagic and fibrinogenolytic PI metalloproteinase from Colombian Bothrops atrox venom. **Toxicon**, vol. 56, no. 6, p. 936–943, 2010. DOI 10.1016/j.toxicon.2010.06.016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2010.06.016>.

PLA, D.; SANZ, L.; MOLINA-SÁNCHEZ, P.; ZORITA, V.; MADRIGAL, M.; FLORES-DÍAZ, M.; ALAPE-GIRÓN, A.; NÚÑEZ, V.; ANDRÉS, V.; GUTIÉRREZ, J. M.; CALVETE, J. J. Snake venomics of Lachesis muta rhombeata and genus-wide antivenomics assessment of the paraspecific immunoreactivity of two antivenoms evidence the high compositional and immunological conservation across Lachesis.

Journal of proteomics, Netherlands, vol. 89, p. 112–123, Aug. 2013.
<https://doi.org/10.1016/j.jprot.2013.05.028>.

POWELL, R. Snake Venom. 2005. .

PRECIADO, L. M.; COMER, J.; NÚÑEZ, V.; REY-SÚAREZ, P.; PEREAÑEZ, J. A. Inhibition of a snake venom metalloproteinase by the flavonoid myricetin. **Molecules**, vol. 23, no. 10, p. 1–15, 2018.
<https://doi.org/10.3390/molecules23102662>.

QRIOUET, Z.; CHERRAH, Y.; SEFRIQUI, H.; QMICHOU, Z. Monoclonal Antibodies Application in Lateral Flow Immunochromatographic Assays for Drugs of Abuse Detection. **Molecules (Basel, Switzerland)**, vol. 26, no. 4, Feb. 2021.
<https://doi.org/10.3390/molecules26041058>.

RINCON-FILHO, S.; NAVES-DE-SOUZA, D. L.; LOPES-DE-SOUZA, L.; SILVANO-DE-OLIVEIRA, J.; BONILLA FERREYRA, C.; COSTAL-OLIVEIRA, F.; GUERRA-DUARTE, C.; CHÁVEZ-OLÓRTEGUI, C. Micurus surinamensis Peruvian snake venom: Cytotoxic activity and purification of a C-type lectin protein (Ms-CTL) highly toxic to cardiomyoblast-derived H9c2 cells. **International Journal of Biological Macromolecules**, vol. 164, p. 1908–1915, 2020. DOI 10.1016/j.ijbiomac.2020.08.033. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.08.033>.

ROUAULT, M.; RASH, L. D.; ESCOUBAS, P.; BOILARD, E.; BOLLINGER, J.; LOMONTE, B.; MAURIN, T.; GUILLAUME, C.; CANAAN, S.; DEREGNAUCOURT, C.; SCHRÉVEL, J.; DOGLIO, A.; GUTIÉRREZ, J. M.; LAZDUNSKI, M.; GELB, M. H.; LAMBEAU, G. Neurotoxicity and other pharmacological activities of the snake venom phospholipase A2 OS2: the N-terminal region is more important than enzymatic activity. **Biochemistry**, vol. 45, no. 18, p. 5800–5816, May 2006.
<https://doi.org/10.1021/bi060217r>.

SALAMA, W. H.; IBRAHIM, N. M.; EL HAKIM, A. E.; BASSUINY, R. I.; MOHAMED, M. M.; MOUSA, F. M.; ALI, M. M. I-Amino acid oxidase from Cerastes vipera snake venom: Isolation, characterization and biological effects on bacteria and tumor cell lines. **Toxicon: official journal of the International Society on Toxinology**, England, vol. 150, p. 270–279, Aug. 2018.
<https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2018.06.064>.

SAMPAIO, V.; DE ALMEIDA GONÇALVES SACHETT, J.; CAMPOS ALVES, E.; DA SILVA, V. C.; ALCÂNTARA DE LIMA, J. A.; DA SILVA, I. M.; DE LIMA FERREIRA, L. C.; BERNARDE, P.; FAN, H. W.; GUIMARÃES DE LACERDA, M. V.; MONTEIRO, W. M. Snakebites in the Brazilian Amazon: Current Knowledge and Perspectives. no. March, p. 73–99, 2016.
https://doi.org/10.1007/978-94-017-7438-3_61.

SANCHEZ, E. F.; FLORES-ORTIZ, R. J.; ALVARENGA, V. G.; EBLE, J. A. Direct Fibrinolytic Snake Venom Metalloproteinases Affecting Hemostasis: Structural, Biochemical Features and Therapeutic Potential. **Toxins**, vol. 9, no. 12, Dec. 2017.
<https://doi.org/10.3390/toxins9120392>.

SANZ, L.; DE FREITAS-LIMA, L. N.; QUESADA-BERNAT, S.; GRAÇA-DE-SOUZA, V. K.; SOARES, A. M.; CALDERÓN, L. de A.; CALVETE, J. J.; CALDEIRA, C. A. S. Comparative venomomics of Brazilian coral snakes: *Micrurus frontalis*, *Micrurus spixii spixii*, and *Micrurus surinamensis*. **Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology**, England, vol. 166, p. 39–45, Aug. 2019. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2019.05.001>.

SCHNEIDER, F. S.; NGUYEN, D. Le; CASTRO, K. L.; COBO, S.; MACHADO DE AVILA, R. A.; DE FERREIRA, N. A.; SANCHEZ, E. F.; NGUYEN, C.; GRANIER, C.; GALÉA, P.; CHÁVEZ-OLORTEGUI, C.; MOLINA, F. 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**, vol. 8, no. 4, p. 1–9, 2014. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002826>.

SCHNEIDER, F. S.; NGUYEN, D. Le; CASTRO, K. L.; COBO, S.; MACHADO DE AVILA, R. A.; FERREIRA, N. de A.; SANCHEZ, E. F.; NGUYEN, C.; GRANIER, C.; GALÉA, P.; CHÁVEZ-OLORTEGUI, C.; MOLINA, F. 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**, vol. 8, no. 4, p. e2826, Apr. 2014. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002826>.

SCHNEIDER, M. C.; MIN, K.-D.; HAMRICK, P. N.; MONTEBELLO, L. R.; RANIERI, T. M.; MARDINI, L.; CAMARA, V. M.; RAGGIO LUIZ, R.; LIESE, B.; VUCKOVIC, M.; MORAES, M. O.; LIMA, N. T. Overview of snakebite in Brazil: Possible drivers and a tool for risk mapping. **PLoS neglected tropical diseases**, vol. 15, no. 1, p. e0009044, Jan. 2021. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0009044>.

SCHROEDER, H. W. J.; CAVACINI, L. Structure and function of immunoglobulins. **The Journal of allergy and clinical immunology**, vol. 125, no. 2 Suppl 2, p. S41-52, Feb. 2010. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2009.09.046>.

SEGURA, álvaro; HERRERA, M.; VILLALTA, M.; VARGAS, M.; GUTIÉRREZ, J. M.; LEÓN, G. Assessment of snake antivenom purity by comparing physicochemical and immunochemical methods. **Biologicals**, vol. 41, no. 2, p. 93–97, 2013. DOI 10.1016/j.biologicals.2012.11.001. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biologicals.2012.11.001>.

SEGURA, A.; HERRERA, M.; VILLALTA, M.; VARGAS, M.; GUTIÉRREZ, J. M.; LEÓN, G. Assessment of snake antivenom purity by comparing physicochemical and immunochemical methods. **Biologicals: journal of the International Association of Biological Standardization**, England, vol. 41, no. 2, p. 93–97, Mar. 2013. <https://doi.org/10.1016/j.biologicals.2012.11.001>.

SERRANO, S. M. T.; MAROUN, R. C. Snake venom serine proteinases: sequence homology vs. substrate specificity, a paradox to be solved. **Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology**, England, vol. 45, no. 8, p. 1115–1132, Jun. 2005. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2005.02.020>.

SILVA-CARVALHO, R.; GASPAR, M. Z.; QUADROS, L. H. B.; LOBO, L. G. G.; ROGÉRIO, L. M.; SANTOS, N. T. S.; ZERBINATTI, M. C.; SANTARÉM, C. L.; SILVA, E. O.; GEREZ, J. R.; SILVA, N. J. J.; LOMONTE, B.; ROWAN, E. G.; FLORIANO, R. S. In vivo treatment with varespladib, a phospholipase A(2) inhibitor, prevents the peripheral neurotoxicity and systemic disorders induced by *Micrurus corallinus* (coral snake) venom in rats. **Toxicology letters**, Netherlands, vol. 356, p. 54–63, Mar. 2022. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2021.11.003>.

SILVA, A. M. da; BERNARDE, P. S.; ABREU, L. C. de. Accidents with poisonous animals in Brazil by age and sex. **Journal of Human Growth and Development**, vol. 25, p. 54–62, 2015. Disponível em: http://pepsic.bvsalud.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0104-1282201500010007&nrm=iso.

STÁBELI, R. G.; MARCUSSI, S.; CARLOS, G. B.; PIETRO, R. C. L. R.; SELISTRE-DE-ARAÚJO, H. S.; GIGLIO, J. R.; OLIVEIRA, E. B.; SOARES, A. M. Platelet aggregation and antibacterial effects of an l-amino acid oxidase purified from *Bothrops alternatus* snake venom. **Bioorganic & medicinal chemistry**, England, vol. 12, no. 11, p. 2881–2886, Jun. 2004. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2004.03.049>.

TAN, K. K.; BAY, B. H.; GOPALAKRISHNAKONE, P. L-amino acid oxidase from snake venom and its anticancer potential. **Toxicon: official journal of the International Society on Toxinology**, England, vol. 144, p. 7–13, Mar. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2018.01.015>.

TANJONI, I.; WEINLICH, R.; CLISSA, P. B.; FREITAS, M. S. De. Jararhagin , a snake venom metalloproteinase , induces a specialized form of apoptosis (anoikis) selective to endothelial cells. vol. 10, no. 4, p. 851–861, 2005.

TASIMA, L. J.; HATAKEYAMA, D. M.; SERINO-SILVA, C.; RODRIGUES, C. F. B.; DE LIMA, E. O. V; SANT'ANNA, S. S.; GREGO, K. F.; DE MORAIS-ZANI, K.; SANZ, L.; CALVETE, J. J.; TANAKA-AZEVEDO, A. M. Comparative proteomic profiling and functional characterization of venom pooled from captive *Crotalus durissus terrificus* specimens and the Brazilian crotalic reference venom. **Toxicon: official journal of the International Society on Toxinology**, England, vol. 185, p. 26–35, Oct. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2020.07.001>.

TASOULIS, T.; ISBISTER, G. K. A Review and Database of Snake Venom Proteomes. **Toxins**, vol. 9, no. 9, Sep. 2017. <https://doi.org/10.3390/toxins9090290>.

THE LANCET. Snake-bite envenoming: a priority neglected tropical disease. **The Lancet**, vol. 390, no. 10089, p. 2, 2017. DOI 10.1016/S0140-6736(17)31751-8. Disponível em: [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)31751-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(17)31751-8).

TOKARNIA, C. H.; PEIXOTO, P. V. A importância dos acidentes ofídicos como causa de mortes em bovinos no Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, vol. 26, no. 2, p. 55–68, 2006. <https://doi.org/10.1590/S0100-736X2006000200001>.

TORRES, F. S.; RATES, B.; GOMES, M. T. R.; SALAS, C. E.; PIMENTA, A. M. C.; OLIVEIRA, F.; SANTORO, M. M.; DE LIMA, M. E. Bmoo FIBMP-I: A New

Fibrinogenolytic Metalloproteinase from Bothrops moojeni Snake Venom. **ISRN toxicology**, vol. 2012, p. 673941, 2012. <https://doi.org/10.5402/2012/673941>.

WANG, X.; MATHIEU, M.; BREZSKI, R. J. IgG Fc engineering to modulate antibody effector functions. **Protein & cell**, vol. 9, no. 1, p. 63–73, Jan. 2018. <https://doi.org/10.1007/s13238-017-0473-8>.

WHO. WHO Guidelines for the Production, Control and Regulation of Snake Antivenom Immunoglobulins. no. October, p. 17–21, 2016.

WILLIAMS, D.; GUTIÉRREZ, J. M.; HARRISON, R.; WARRELL, D. A.; WHITE, J.; WINKEL, K. D.; GOPALAKRISHNAKONE, P. The Global Snake Bite Initiative: an antidote for snake bite. **The Lancet**, vol. 375, no. 9708, p. 89–91, 2010. DOI 10.1016/S0140-6736(09)61159-4. Disponível em: [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(09\)61159-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(09)61159-4).

YAMAGUCHI, Y.; SHIMOHIGASHI, Y.; CHIJIWA, T.; NAKAI, M.; OGAWA, T.; HATTORI, S.; OHNO, M. Characterization, amino acid sequence and evolution of edema-inducing, basic phospholipase A2 from Trimeresurus flavoviridis venom. **Toxicon: official journal of the International Society on Toxinology**, England, vol. 39, no. 7, p. 1069–1076, Jul. 2001. [https://doi.org/10.1016/s0041-0101\(00\)00250-6](https://doi.org/10.1016/s0041-0101(00)00250-6).

ZHANG, H.-L.; XU, S.-J.; WANG, Q.-Y.; SONG, S.-Y.; SHU, Y.-Y.; LIN, Z.-J. Structure of a cardiotoxic phospholipase A(2) from Ophiophagus hannah with the “pancreatic loop”. **Journal of structural biology**, United States, vol. 138, no. 3, p. 207–215, Jun. 2002. [https://doi.org/10.1016/s1047-8477\(02\)00022-9](https://doi.org/10.1016/s1047-8477(02)00022-9).

ZHU, L.; YUAN, C.; CHEN, Z.; WANG, W.; HUANG, M. Expression, purification and characterization of recombinant Jerdonitin, a P-II class snake venom metalloproteinase comprising metalloproteinase and disintegrin domains. **Toxicon**, vol. 55, no. 2, p. 375–380, 2010. DOI doi.org/10.1016/j.toxicon.2009.08.016. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0041010109004395>.

10. ANEXOS

10.1. Links dos artigos publicados em periódicos durante o mestrado

“Proteomic and toxinological characterization of Peruvian pitviper *Bothrops brazili* (-jergón shushupe-), venom”

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0041010120302476?via%3>

[Dihub](#)

Carolina Rego Rodrigues; Denis Alexis Molina Molina; **Thamyres C. Silva de Assis**; Camila Liberato; Marcella N. Melo-Braga; César Bonilla Ferreyra; Javier Cárdenas; Fernanda Costal-Oliveira; Clara Guerra-Duarte; Carlos Chávez-Olórtegui

“Engineered antigen containing epitopes from *Loxosceles* spp. Spider toxins induces a monoclonal antibody (Lox-mAb3) against astacin-like metalloproteases”

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0141813020336175?via%3>

[Dihub](#)

Tamara G.F. Costa, Fernanda Costal-Oliveira, **Thamyres C.S. de Assis**, Sabrina A. Lima, Christina A. Martins, Alessandra B. Finco, Sílvio S. Veiga, Vanete T. Soccol, Ricardo A. Machado-de-Ávila, Luís F.M. Figueiredo, João C. Minozzo, Evanguedes Kalapothakis, Clara Guerra-Duarte, Larissa M. Alvarenga, Carlos Chávez-Olórtegui.

“Mesenchymal Stromal Cell-Based Therapies as Promising Treatments for Muscle Regeneration After Snakebite Envenoming. *Frontiers in Immunology*”

<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2020.609961/full>

Eduardo Sanchez-Castro; Cecilia Pajuelo-Reyes; Rebeca Tejedo; Bárbara Soria-Juan; Rafael Tapia-Limonchi; Etelvina Andreu; Ana B. Hitos; Franz Martin; Gladys M. Cajuana; Clara Guerra-Duarte; **Thamyres C. Silva de Assis**; Francisco J. Bedoya; Bernat Soria; Carlos Chávez-Olórtegui; Juan R. Tejedo.

10.2. Depósito de pedido de patente

“Composição imunogênica contra a atividade necrótica local de venenos ofídicos e usos.”

Data de depósito: 22/12/2021

Número de protocolo: BR1020210260513

Inventores: Carlos Delfin Chávez Olórtegui; Denis Alexis Molina Molina;

Thamyres Caroline Silva de Assis; Carolina Rego Rodrigues; Dayane Lorena Naves de Souza; Caroline Felipe Bonfim; Raissa Medina Santos; Tamara Gabriela Fernandes Costa; Ricardo Andrez Machado de Ávila