

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**  
**INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA E IMUNOLOGIA**

**GLADSTONY DE OLIVEIRA SOUZA**

**DESENHO, PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE PROTEÍNA  
MULTIEPITÓPICA RECOMBINANTE PARA A PRODUÇÃO DE SORO ANTI-  
*MICRURUS CORALLINUS***

**Belo Horizonte**

**2023**

GLADSTONY DE OLIVEIRA SOUZA

**DESENHO, PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE PROTEÍNA  
MULTIEPITÓPICA RECOMBINANTE PARA A PRODUÇÃO DE SORO ANTI-  
*MICRURUS CORALLINUS***

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 em Bioquímica e Imunologia.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Chavez Olórtégui

Coorientadora: Dra. Clara Guerra Duarte

Belo Horizonte

2023

043

Souza, Gladstony de Oliveira.

Desenho, produção e caracterização de proteína multiepitópica recombinante para a produção de soro anti-Micrurus corallinus [manuscrito] / Gladstony de Oliveira Souza. – 2023.

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

Orientador: Prof. Dr. Carlos Chavez Olórtegui. Coorientadora: Dra. Clara Guerra Duarte.

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

1. Bioquímica e imunologia. 2. Antivenenos. 3. Cobras Corais. 4. Epitopos. I. Olórtegui, Carlos Delfin Chavez. II. Duarte, Clara Guerra. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. 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 GLADSTONY DE OLIVEIRA SOUZA.** Aos vinte e dois dias do mês de novembro de 2023 às 14:00 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 "Desenho, produção e caracterização de Proteína Multi-Epitópica recombinante para a produção de soro anti-Micrurus corallinus", requisito final para a obtenção do grau de Mestre em Bioquímica e Imunologia, área de concentração: Imunologia. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, Prof. Carlos Delfin Chávez Olórtégui, da Universidade Federal de Minas Gerais, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra ao candidato para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa do candidato. Logo após a Comissão se reuniu, sem a presença do candidato e do público, para julgamento e expedição do resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações: Dr. Flávio Almeida Amaral (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovado; Dr. Henrique Roman Ramos (Universidade Nove de Julho), aprovado; Dra. Clara Guerra Duarte - Coorientadora (FUNED), aprovado; Dr. Carlos Delfin Chávez Olórtégui - Orientador (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovado. Pelas indicações o candidato foi considerado:

- APROVADO  
 REPROVADO

O resultado final foi comunicado publicamente ao candidato 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, 22 de novembro de 2023.

Dr. Flávio Almeida Amaral (UFMG)

Dr. Henrique Roman Ramos (Universidade Nove de Julho)

Dra. Clara Guerra Duarte - Coorientadora (FUNED)

Dr. Carlos Delfin Chávez Olórtégui - Orientador (UFMG)

## AGRADECIMENTOS

A Deus, Dono de toda ciência, sabedoria e poder. Agradeço pelo dom da vida e o desfrutar da água da fonte da vida todos os dias. A Jesus, por seu amor divino que até aqui esteve comigo e À Nossa Senhora por suas orações e intercessões constantes.

Aos meus pais, Paulo e Maria José, pelo amor, zelo, educação, valores e virtudes, incentivo aos estudos e por todos os outros milhares de adjetivos aos quais sinto por vocês.

À Dra. Clara Guerra Duarte, pelos ensinamentos, puxões de orelha, conselhos, discussões, risadas e aprendizados diários. Você é o exemplo de pesquisador que eu quero ser um dia.

Ao Prof. Carlos Chavez Olórtegui por me ter aberto as portas da Pós-Graduação, ter seguido junto nesse caminho e nos próximos desafios que virão no Doutorado.

À Universidade Federal de Minas Gerais e ao Departamento de Bioquímica e Imunologia, em especial ao LABIMQ e seus alunos de Pós-Graduação e de Iniciação Científica, pelas risadas e ajudas nos experimentos.

À Fundação Ezequiel Dias, em especial aos Servidores e bolsistas de Iniciação Científica do Serviço de Toxinologia Molecular, pelo apoio técnico, infraestrutura e suporte diário na condução deste trabalho.

As agências de fomento, CNPQ, FAPEMIG e CAPES pelo fomento ao trabalho.

A todos aqueles que de alguma maneira tornaram este trabalho possível.

*“Eu quero apenas um vento forte, levar meu barco no rumo norte, e no caminho quero pescar, para dividir quando lá chegar.”*

**Roberto Carlos**

## RESUMO

Parte dos acidentes ofídicos brasileiros é causada por cobras corais e o tratamento específico é o Soro Antielapídico (SAEL), produzido contra o veneno das espécies *M. corallinus* e *M. frontalis*. A disponibilidade da peçonha de *M. corallinus* é escassa, impactando diretamente a cadeia de produção do SAEL no país. Este trabalho visa definir, produzir e validar uma Proteína Multi-Epitópica recombinante (PMER-cor) como imunógeno alternativo para substituir, ao menos em parte, o veneno de *M. corallinus* na produção do SAEL. Para atingir este objetivo, foi construída uma sequência composta por epítomos previamente validados e por novas sequências epitópicas mapeadas *in silico* das principais toxinas do veneno de *M. corallinus* – Toxinas de três dígitos e Fosfolipases do tipo A<sub>2</sub>. O gene que codifica este imunógeno foi clonado e transformado em cepas de *E. coli* BL21DE3. A PMER-cor foi expressa, purificada, caracterizada imuniquimicamente e utilizada na imunização de coelhos. Um grupo de animais foi inoculado com a PMER-cor para caracterização de seu potencial imunogênico; outro grupo foi imunizado com a PMER-cor substituindo a peçonha de *M. corallinus*, acrescida do veneno de *M. frontalis*; e no terceiro grupo foram administrados os venenos brutos, simulando a produção do SAEL. Foi visto que a PMER-cor é imunogênica, sem, no entanto, induzir proteção frente aos venenos brutos de *Micrurus* sp quando utilizada sozinha. Já a caracterização do soro produzido contra a PMER-cor juntamente com o veneno de *M. frontalis* demonstrou melhor desempenho preliminar em ensaios de neutralização da ação do veneno *in vitro* e *in vivo*. Apesar de não ser eficaz como um imunógeno substitutivo ao veneno de *M. corallinus*, após aperfeiçoamento da composição de epítomos e espaçadores, a PMER-cor poderia contribuir para a atualização biotecnológica da cadeia de produção do SAEL.

**Palavras-chave:** antiveneno; *Micrurus corallinus*; proteína multiepitópica

## ABSTRACT

A part of Brazilian snakebites are caused by coral snakes and the specific treatment against it is the use of Antielapitic antivenom (SAEL), produced against the venom of the species *M. corallinus* and *M. frontalis*. The availability of *M. corallinus* venom is low, which impacts directly the SAEL production chain in Brazil. This work aims to design, produce and validate a recombinant Multi-Epitopic Protein (PMER-cor) as an alternative immunogen to replace, at least in part, *M. corallinus* venom in the production of SAEL. To achieve this goal, a sequence composed of previously validated epitopes, including new epitopic sequences mapped *in silico* of the main toxins of *M. corallinus* venom (Three-digit toxins and Phospholipases of type A2), was constructed. The gene encoding this immunogen was cloned and transformed into *E. coli* BL21DE3. PMER-cor was expressed, purified, immunochemically characterized and used to immunize rabbits. A group of animals was inoculated with PMER-cor to characterize its immunogenic potential; another group was immunized with PMER-cor replacing *M. corallinus* venom, added to *M. frontalis* venom; and in the third group, the crude venom of the two species were administered, simulating the production of SAEL. As a result, PMER-cor was proven immunogenic, yet without inducing protection against the crude *Micrurus* sp venoms when used alone. The characterization of the antibodies produced against PMER-cor together with *M. frontalis* venom demonstrated better preliminary performance in neutralization assays of the *in vitro* and *in vivo* venom's action. Although PMER-cor has not proven to be effective as a substitute immunogen for *M. corallinus* venom, after improving the composition of epitopes and spacers used, it could contribute to the biotechnological update of the SAEL production chain.

**Keywords:** antivenom; *Micrurus corallinus*; multiepitopic protein



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ofidismo como problema de saúde pública mundial .....	14
Figura 2. Gráficos de notificações por ofidismo no Brasil de acordo com o SINAN na última década (2012-2022).....	16
Figura 3. Mapa de dispersão das corais verdadeiras pela América do Sul e Central.....	17
Figura 4. Gráficos de notificações por <i>Micrurus</i> sp no Brasil de acordo com o SINAN na última década (2012-2022).....	19
Figura 5. Proporção de toxinas 3FTx e PLA <sub>2</sub> nos venenos de <i>Micrurus</i> sp de acordo com estudos proteômicos.....	21
Figura 6. Produção do SAEL.....	27
Figura 7. Espécie <i>Micrurus corallinus</i> .....	29
Figura 8. Distribuição das <i>Micrurus corallinus</i> .....	29
Figura 9. Espécie <i>Micrurus corallinus</i> relatada nos casos reportados.....	32
Figura 10. Calendários de imunizações .....	49
Figura 11. Alinhamento das sequências de toxinas 3FTx de <i>M. corallinus</i> para escolha do mapeamento epitópico.....	55
Figura 12. Alinhamento das sequências de toxinas PLA <sub>2</sub> de <i>M. corallinus</i> para escolha do mapeamento epitópico.....	56
Figura 13. Mapeamento epitópico da toxina 3FTx Mcor0092 .....	57
Figura 14. Mapeamento epitópico da toxina 3FTx Mcor0094 .....	57
Figura 15. Mapeamento epitópico da toxina 3FTx Mcor0109 .....	58
Figura 16. Mapeamento epitópico da toxina 3FTx Mcor0120 .....	58
Figura 17. Mapeamento epitópico da toxina PLA <sub>2</sub> DN50226_c0_g1_i2 m.42791 .....	59
Figura 18. Mapeamento epitópico da toxina PLA <sub>2</sub> DN88788_c3_g1_i1 m.55704 .....	59
Figura 19. Mapeamento epitópico da toxina PLA <sub>2</sub> DN88788_c3_g1_i1 m.557061 .....	60
Figura 20. Toxinas 3FTx e PLA <sub>2</sub> do veneno de <i>M. corallinus</i> .....	60
Figura 21. Disposição dos epítomos no construto da PMEr-cor.....	61
Figura 22. PMEr-cor em sua estrutura terciária de acordo com o ColabFold...	62

Figura 23. Mapa do vetor pET-26b(+) com a sequência que codifica para a PMEr-cor .....	63
Figura 24. Transformação de bactérias <i>E. coli</i> BL21DE3 com o plasmídeo da PMEr-cor .....	64
Figura 25. PCR de colônia em gel de agarose 1%.....	64
Figura 26. Expressão em pequena escala da PMEr-cor .....	65
Figura 27. Purificação da PMEr-cor por coluna de afinidade .....	66
Figura 28. Caracterização da PMEr-cor .....	67
Figura 29. Reatividade dos soros produzidos ao longo das imunizações .....	68
Figura 30. ELISA frente aos venenos elapídicos de interesse em saúde .....	69
Figura 31. Reconhecimento da PMEr-cor por <i>Western Blot</i> , frente aos soros produzidos.....	70
Figura 32. <i>Western Blot</i> frente a alguns venenos elapídicos de interesse em saúde .....	70
Figura 33. ELISA dos peptídeos frente aos epítomos mapeados experimentalmente por Castro et al. (2015) .....	71
Figura 34. Ensaio de SPOT com os epítomos selecionados frente ao soro $\alpha$ -PMEr-cor .....	72
Figura 35. Ensaio de SPOT com os epítomos selecionados frente ao soro $\alpha$ -PMEr-cor + MfV.....	73
Figura 36. Ensaio de SPOT com os epítomos selecionados frente ao soro $\alpha$ -McV + MfV.....	74
Figura 37. Ensaio de SPOT com a sequência completa da PMEr-cor .....	75
Figura 38. Inibição da atividade fosfolipásica.....	80

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Peptídeos previamente validados. ....	40
Tabela 2. Ferramentas de predição de epítomos.....	41
Tabela 3. Parâmetros físico-químicos do estrutura da PMEr-cor.....	62
Tabela 4. Sequência de aminoácidos da PMEr-cor presentes na membrana de SPOT reconhecida pelo soro $\alpha$ -PMEr-cor.....	76
Tabela 5. Sequência de aminoácidos da PMEr-cor presentes na membrana de SPOT reconhecida pelo soro $\alpha$ -PMEr-cor + MfV Coelho A por SPOT.....	77
Tabela 6. Sequência de aminoácidos da PMEr-cor presentes na membrana de SPOT reconhecida pelo soro $\alpha$ -PMEr-cor + MfV Coelho B por SPOT.....	78
Tabela 7. Determinação da DL <sub>50</sub> para o veneno de <i>M. frontalis</i> .....	81
Tabela 8. Determinação da DL <sub>50</sub> para o veneno de <i>M. corallinus</i> . ....	82
Tabela 9. Ensaio de neutralização in vivo.....	83

## SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	14
1.1.	OFIDISMO NO MUNDO E NO BRASIL.....	14
1.2.	O GÊNERO <i>MICRURUS</i> .....	17
1.3.	COMPONENTES DO VENENO DE <i>MICRURUS</i> SP.....	20
1.3.1.	TOXINAS DE TRÊS DÍGITOS (3FT <sub>x</sub> ).....	22
1.3.2.	FOSFOLIPASES DO TIPO A <sub>2</sub> (PLA <sub>2</sub> ).....	23
1.3.3.	COMPONENTES MINORITÁRIOS.....	24
1.4.	TRATAMENTO PARA ACIDENTES ELAPÍDICOS.....	26
1.5.	<i>MICRURUS CORALLINUS</i> .....	29
1.5.1.	COMPOSIÇÃO DO VENENO DE <i>M. corallinus</i> .....	29
1.5.2.	ACIDENTES CAUSADOS POR <i>M. corallinus</i> .....	31
1.5.3.	IMUNÓGENOS PROPOSTOS À SUBSTITUIÇÃO DO VENENO DE <i>M. corallinus</i> .....	33
1.6.	PROTEINAS MULTIEPÍTÓPICAS RECOMBINANTES.....	34
2.0.	JUSTIFICATIVA.....	38
3.1.	OBJETIVOS.....	39
3.1.	GERAL.....	39
3.2.	ESPECÍFICOS.....	39
4.	MATERIAIS E MÉTODOS.....	40
4.1.	SELEÇÃO DE EPÍTOPOS.....	40
4.1.1	EPÍTOPOS PREVIAMENTE VALIDADOS.....	40
4.1.2	MAPEAMENTO <i>IN SILICO</i> DE NOVOS EPÍTOPOS.....	40
4.1.3	FERRAMENTAS DE MAPEAMENTO DE EPÍTOPOS.....	40
4.1.4	CRITÉRIOS PARA ESCOLHA DOS EPÍTOPOS SELECIONADOS (SCORE).....	41
4.2.	PRODUÇÃO DA PROTEÍNA MULTIEPÍTÓPICA RECOMBINANTE PARA REPRESENTAR O VENENO DE <i>M. CORALLINUS</i> (PMEr-cor).....	42
4.2.1.	CONSTRUÇÃO <i>IN SILICO</i> E SÍNTESE DO PLASMÍDEO.....	42
4.2.2.	TRANSFORMAÇÃO.....	42
4.2.2.1.	CONFIRMAÇÃO DA EFICIÊNCIA DA TRANSFORMAÇÃO VIA PCR DE COLÔNIA.....	43
4.2.2.2.	GEL DE AGAROSE.....	43
4.2.3.	DEFINIÇÃO DE CONDIÇÕES DE EXPRESSÃO DA PME <sub>r</sub> -cor (PEQUENA ESCALA).....	44
4.2.3.1	ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMINA (SDS-PAGE).....	45
4.2.4.	EXPRESSÃO DA PME <sub>r</sub> -cor EM MAIOR ESCALA.....	45

4.2.5.	LISE BACTERIANA .....	46
4.2.6.	PURIFICAÇÃO DA PMEr-cor.....	46
4.3.	CARACTERIZAÇÃO DA PMEr-cor .....	46
4.4.	PRODUÇÃO DE ANTICORPOS .....	47
4.4.1.	ANIMAIS, SOROS E VENENOS.....	47
4.4.2.	IMUNIZAÇÕES .....	48
4.5.	CARACTERIZAÇÃO DOS ANTICORPOS GERADOS .....	49
4.5.1.	ELISA INDIRETO.....	49
4.5.2.	WESTERN BLOT.....	50
4.5.3.	IMUNOENSAIO DE SPOT .....	51
4.5.3.1.	MEMBRANAS .....	51
4.5.3.2.	IMUNOENSAIOS.....	51
4.5.3.3.	ANÁLISE .....	52
4.6.	ATIVIDADE FOSFOLIPÁSICA .....	52
4.6.1.	DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE FOSFOLIPÁSICA <i>IN VITRO</i> .....	52
4.6.2.	ENSAIO DE INIBIÇÃO DA ATIVIDADE FOSFOLIPÁSICA COM OS ANTICORPOS PRODUZIDOS .....	52
4.7.	ATIVIDADE LETAL .....	53
4.7.1.	DETERMINAÇÃO DA DL <sub>50</sub> .....	53
4.7.2.	ENSAIO DE NEUTRALIZAÇÃO DA ATIVIDADE LETAL COM OS ANTICORPOS PRODUZIDOS .....	53
5.	RESULTADOS .....	54
5.1.	SELEÇÃO DE SEQUÊNCIAS A SEREM MAPEADAS .....	54
5.2.	SELEÇÃO DOS EPÍTOPOS.....	56
5.3.	PRODUÇÃO DA PROTEÍNA MULTIEPITÓPICA RECOMBINANTE PARA REPRESENTAR O VENENO DE <i>MICRURUS CORALLINUS</i> (PMEr-cor).....	61
5.4.	CARACTERIZAÇÃO ANTIGÊNICA DA PMEr-cor.....	66
5.5.	CARACTERIZAÇÃO DOS ANTICORPOS GERADOS .....	67
5.6.	INIBIÇÃO DAS ATIVIDADES FOSFOLIPÁSICAS.....	79
5.7.	ATIVIDADE LETAL DOS VENENOS DE <i>M. frontalis</i> E <i>M. corallinus</i> .....	81
5.8.	ENSAIO DE NEUTRALIZAÇÃO <i>IN VIVO</i> .....	82
6.	DISCUSSÃO.....	84
7.	CONCLUSÃO .....	91
8.	PERSPECTIVAS .....	92
9.	REFERÊNCIAS .....	93

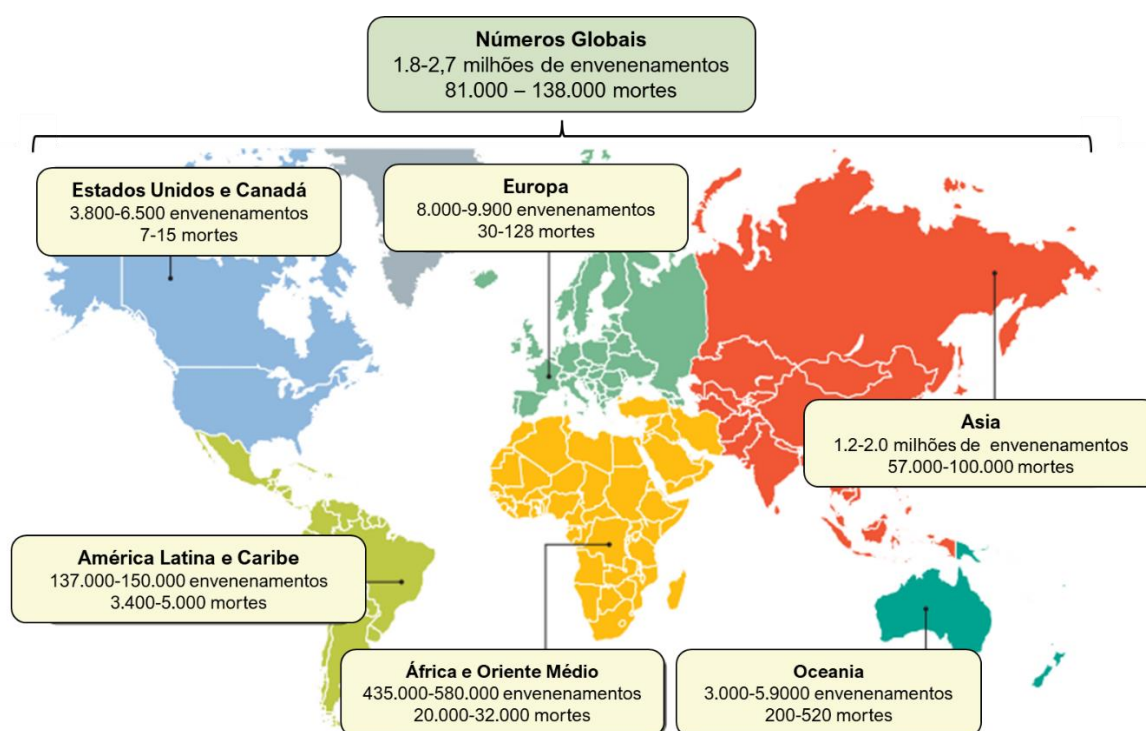
## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. OFIDISMO NO MUNDO E NO BRASIL

O ofidismo é um problema global de saúde pública (Figura 1), de grande proporção e complexidade, que merece atenção das autoridades de saúde nacionais e regionais. Essa condição afeta principalmente populações socioeconomicamente vulneráveis dos países que estão em desenvolvimento na África, Ásia, América Latina e Oceania (WHO, 2017).

Para se ter um panorama da situação mundial, WHO (2017) apresentou estimativas do impacto global do ofidismo. Como resultado, foi encontrado que o maior número de mordidas por serpentes encontra-se na Ásia, África, Oriente Médio, América Latina e Caribe. Foi estimado que anualmente ocorrem cerca de 2,7 milhões de envenenamentos e cerca de 138.000 mil mortes em todo o mundo (WHO, 2017).

**Figura 1. Ofidismo como problema de saúde pública mundial.** A maioria dos envenenamentos são notificados na Ásia, África e Oriente Médio e América Latina e Caribe.



**Fonte:** Adaptado de WHO, 2017.

Grande parte dos óbitos em decorrência de acidentes ofídicos advém da falta do antiveneno específico, do retardo na sua administração ou do uso incorreto do

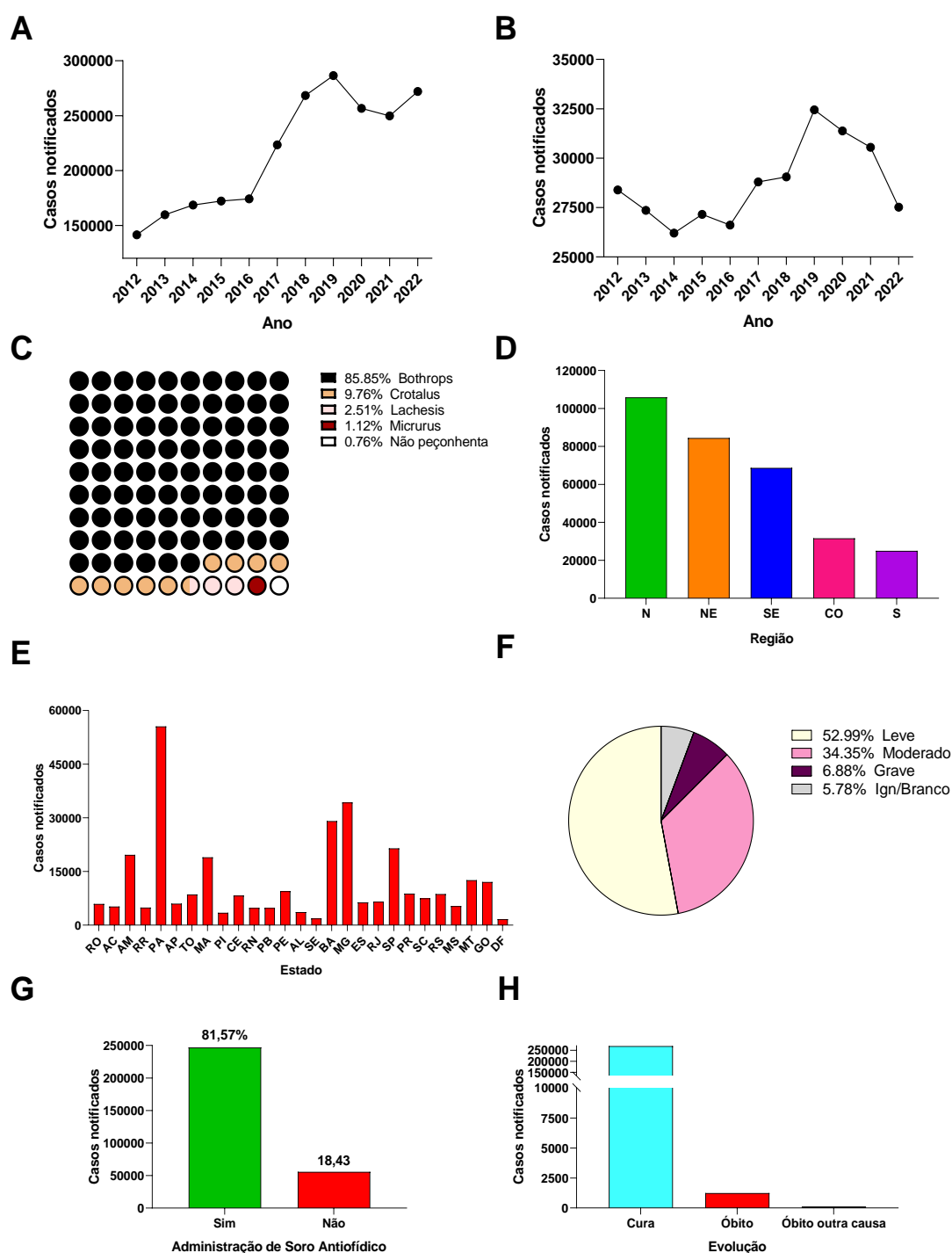
soro, somados também à falta de equipes de saúde capacitadas em seu reconhecimento, falta de soros antiofídicos seguros e eficazes em algumas partes do mundo, armazenamento inadequado e uma rede de frios inapropriada para armazenamento dos antivenenos (Isbister, 2010; Nogueira *et al.*, 2020).

No Brasil, o cenário não é diferente. Os acidentes ofídicos, assim como outros acidentes por animais peçonhentos, constituem um grande problema de interesse em saúde pública. Na última década, foi registrado um total acumulado de 2.374.077 casos notificados ao Ministério da Saúde brasileiro ocasionados por animais peçonhentos, com cerca de 220 mil casos anuais (SINAN, 2023), crescendo a cada ano (Figura 2A). Dentro dos acidentes por animais peçonhentos, o ofidismo se destaca com um total acumulado na última década de 315.623 mil casos registrados, em média 28 mil casos anuais (Figura 2B).

As principais responsáveis por esse elevado número de casos são as serpentes dos gêneros *Bothrops* sp (jararacas), *Crotalus* sp (cascaveis), *Lachesis* sp (surucucus) e *Micrurus* spp (cobras corais), representando respectivamente, cerca de 85,85%, 9,76%, 2,51% e 1,12% dos acidentes devidamente notificados ao SINAN (SINAN, 2023), representados na Figura 2C. Essas serpentes estão distribuídas por todas as regiões do Brasil (Figura 2D), principalmente na região Norte, sendo o Pará o estado com o maior número de acidentes ofídicos registrados, seguido de Minas Gerais e Bahia (Figura 2E).

No tocante à gravidade dos envenenamentos ofídicos, mais da metade desses acidentes são considerados leves. Aqueles considerados moderados a graves correspondem a 34,35% e 6,88%, respectivamente (Figura 2F). Nos acidentes ofídicos considerados moderados e graves faz-se necessário, de acordo com a avaliação clínica do paciente, a administração de soro antiofídico específico, sendo aplicado em 81,57% desses casos (Figura 2G). Entretanto, apesar dessa alta proporção de tratamento, vemos que ainda há um número considerável de mortes relacionadas com o envenenamento ofídico, justificando a gravidade do problema (Figura 2H). Todos esses dados foram retirados do Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN), disponível online e estão sujeitos a revisão.

**Figura 2. Gráficos de notificações por ofidismo no Brasil de acordo com o SINAN na última década (2012-2022).** **A** – Número de acidentes por animais peçonhentos; **B** – Número de acidentes por serpentes peçonhentas; **C** – Porcentagem de casos notificados por cada tipo de serpente peçonhenta; **D** – Número de casos notificados por ofidismo por região geográfica do Brasil; **E** – Número de casos notificados por ofidismo por Unidade Federativa do Brasil; **F** – Porcentagem de casos de ofidismo classificados de acordo com gravidade do envenenamento; **G** – Número de casos por ofidismo classificados por administração de soroterapia; **H** – Número de casos notificados por ofidismo classificado por evolução do caso.



**Fonte:** Elaborado pelo Autor com dados compilados do SINAN – 2023. Os dados estão sujeitos a revisão.



## 1.2. O GÊNERO *MICRURUS*

Apesar de representar o menor percentual (1-2%) dentre os quatro gêneros de serpentes responsáveis pela maioria dos envenenamentos no Brasil, as *Micrurus* desão serpentes de interesse relevante em saúde. A família Elapidae, a qual o gênero *Micrurus* pertence, é responsável pela maioria dos casos letais de envenenamento na África, Índia e Oceania, como é o caso dos acidentes envolvendo a africana Mamba Negra. Nas Américas, a família Elapidae conta com mais de 70 espécies. Seus membros são conhecidos como corais verdadeiras e estão divididos entre os gêneros *Micruroides*, *Leptomicrurus* e *Micrurus* (Di-Bernardo *et al.*, 2007; Campbell e Lamar, 2005), distribuídas principalmente entre os países: Argentina, Belize, Bolívia, Brasil, Colômbia, Costa Rica, Equador, El Salvador, Guiana Francesa, Guatemala, Guiana, Honduras, México, Nicarágua, Panamá, Paraguai, Peru, Suriname, Trinidad e Tobago, Uruguai e Venezuela, demonstrado na Figura 3 (OMS, 2023).

**Figura 3. Mapa de dispersão das corais verdadeiras pela América do Sul e Central.** Em amarelo a dispersão das *Micrurus* spp nas Américas.



**Fonte:** Organização Mundial de Saúde, 2023.

As serpentes do gênero *Micrurus spp* (micro = pequeno e urus = cauda) caracterizam-se principalmente por sua coloração aposemática viva e contrastante, apresentam anéis completos em torno do corpo e cores vivas (Di-Bernardo *et al.*, 2007). As corais são serpentes de pequeno porte, com espécimes variando de 60 cm a 1,50 metro em exemplares adultos (Serapicos e Merusse, 2002). As *Micrurus spp* possuem olhos pequenos, com pupila vertical, pescoço pronunciado e ossos fortes, adaptados para vida fossorial, com o corpo recoberto por escamas lisas (Mendes *et al.*, 2019)

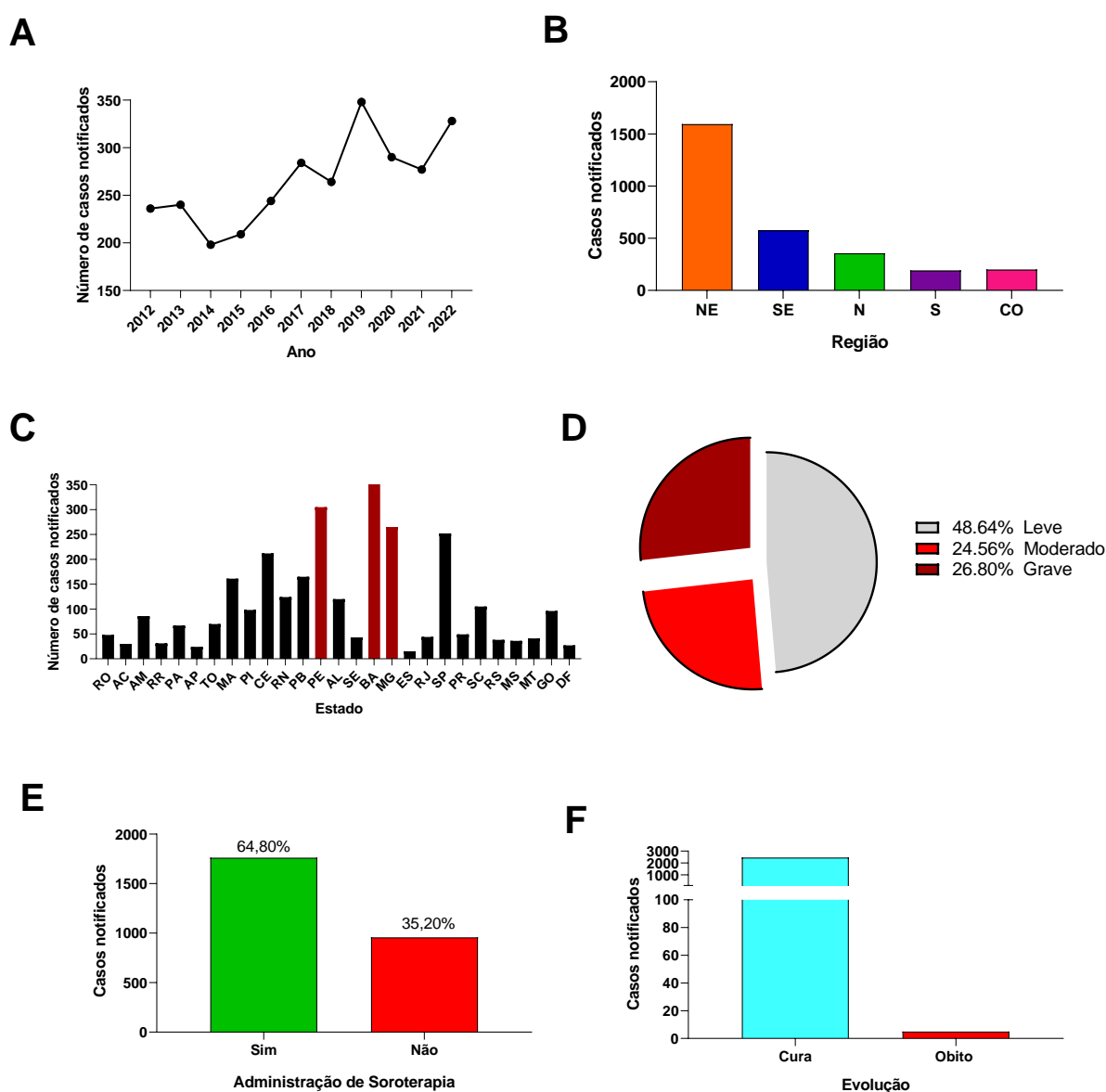
São serpentes de hábitos fossoriais ou semi-fossoriais, habitam a camada superficial do solo, e raramente emergem à superfície em busca de alimento. Como estratégia de defesa, utilizam o comportamento de contorcer bruscamente o corpo, esconder a cabeça e levantar a cauda enrolada, chamando desta forma a atenção do predador ou da presa para a cauda (Bisneto *et al.*, 2020; Moreira, 2010; Tanaka *et al.*, 2010). A dieta destas serpentes é composta principalmente por outras serpentes. No entanto, algumas espécies possuem hábitos alimentares bastante peculiares, podendo se alimentar de peixes (Aird, 2001; Oliveira *et al.*, 2023).

No Brasil, o gênero *Micrurus sp* é representado por 20 espécies: *Micrurus albicinctus*, *Micrurus averyi*, *Micrurus brasiliensis*, *Micrurus decoratus*, *Micrurus filiformis*, *Micrurus hemprichii*, *Micrurus mipartitus*, *Micrurus ornatissimus*, *Micrurus paraensis*, *Micrurus putumayensis*, *Micrurus silviae*, *Micrurus tricolor*, *Micrurus waehnerorum*, *Micrurus corallinus*, *Micrurus frontalis*, *Micrurus ibiboboca*, *Micrurus lemniscatus*, *Micrurus spixii*, *Micrurus altirostris*, *Micrurus surinamensis*, onde as sete últimas correspondem às mais comuns e importantes do ponto de vista da saúde pública (Nogueira *et al.*, 2020; Tanaka *et al.*, 2010).

De acordo com os dados do SINAN, na última década, foram notificados 2.919 acidentes ofídicos pelo gênero *Micrurus*, levando a uma média anual de 265 casos, com o número de envenenamentos crescendo a cada ano (Figura 4A). Destes, a região Nordeste concentrou o maior número de acidentes notificados (Figura 4B), sendo a Bahia o estado com mais casos notificados, seguido de Pernambuco e Minas Gerais (Figura 4C). A maior parte desses acidentes são considerados moderados e graves (Figura 4D), devido as características neurotóxicas das toxinas presente no veneno, necessitando da administração do soro antielapídico em mais de 60% desses

casos (Figura 4E). Quando administrado corretamente e em tempo hábil, o soro antielapídico leva a cura de praticamente todos os sinais e sintomas (Figura 4F). Todos esses dados foram retirados do Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN), disponível online e estão sujeitos à revisão.

**Figura 4. Gráficos de notificações por *Micrurus spp* no Brasil de acordo com o SINAN na última década (2012-2022).** **A** – Número de casos notificados por serpentes do tipo *Micrurus spp*; **B** – Número de casos notificados por região geográfica do Brasil; **C** – Número de casos notificados por Unidade Federativa do Brasil; **D** – Porcentagem de casos notificados classificados de acordo com a gravidade do envenenamento; **E** – Número de casos classificados por administração de soroterapia; **H** – Número de casos notificados classificado por evolução do caso



**Fonte:** Elaborado pelo Autor com dados compilados do SINAN – 2023. Os dados estão sujeitos a revisão.

### 1.3. COMPONENTES DO VENENO DE *MICRURUS SPP*

O veneno das cobras corais é uma mistura complexa e rica de substâncias, sendo um dos mais tóxicos venenos para o homem (Lomonte *et al.*, 2016). A maior parte do seus componentes tem baixa massa molecular e é absorvido rapidamente (Tanaka *et al.*, 2010). Destacam-se as ações cardiotóxica (Gutiérrez *et al.*, 1983), miotóxica (Cechini *et al.*, 2005), hemolítica e hemorrágica (Tanaka *et al.*, 2012) e neurotóxica (Barros *et al.*, 1994; Rojas *et al.*, 1983).

O veneno das corais-verdadeiras produz bloqueio neuromuscular por dois mecanismos:

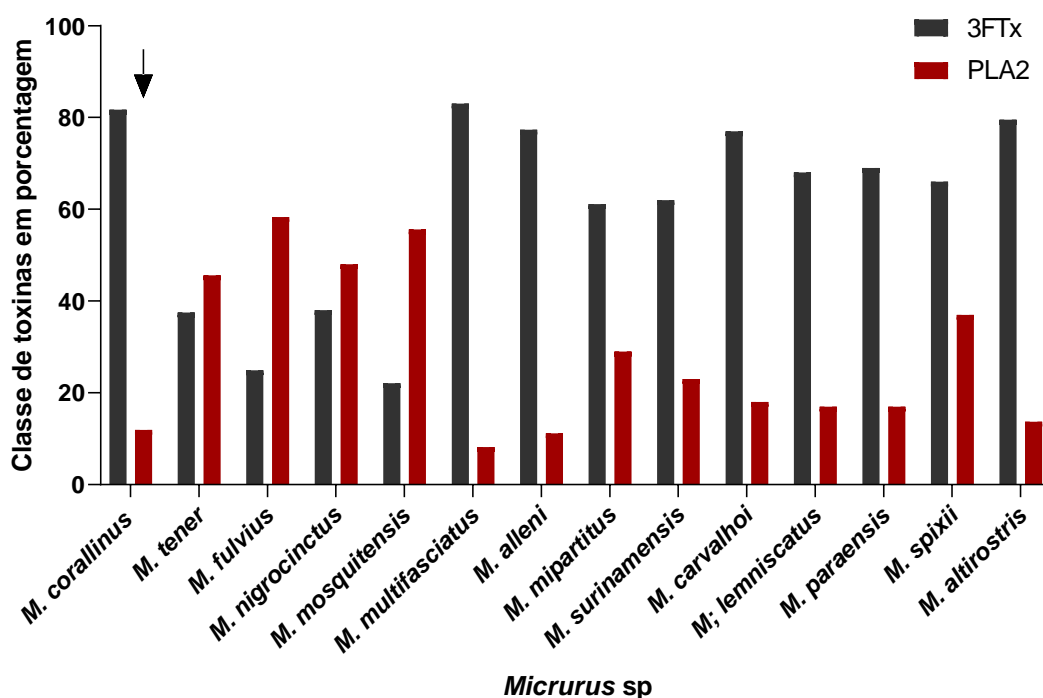
- I. bloqueio pré-sináptico: o veneno impede a liberação da acetilcolina. Esta ação é observada, por exemplo, no envenenamento causado pela espécie *M. corallinus* (Brazil, 1987; Sanchez *et al.*, 1992);
- II. bloqueio pós-sináptico: o veneno compete com a acetilcolina nos receptores colinérgicos das membranas pós-sinápticas. Esta ação foi observada nas serpentes das espécies *M. frontalis* e *M. lemniscatus* (Leite dos Santos *et al.*, 2012; Moreira, 2010).

Os venenos das *Micrurus spp* são uma complexa mistura de proteínas. Tanaka *et al.*, 2010 investigaram as propriedades tóxicas dos venenos de nove espécies de *Micrurus spp*: *M. frontalis*, *M. corallinus*, *M. hemprichii*, *M. spixii*, *M. altirostris*, *M. surinamensis*, *M. ibiboboca*, *M. lemniscatus* e *M. fulvius* e analisou a reatividade antigênica e o potencial neutralizante do SAEL contra esses venenos. Foi observado que os venenos testados continham níveis variados de atividade fosfolipásica, associada à neurotoxicidade do envenenamento por *Micrurus spp*. Os venenos de *M. ibiboboca*, *M. lemniscatus*, *M. fulvius*, *M. altirostris*, *M. spixii*, *M. frontalis*, *M. hemprichii* e *M. frontalis* apresentam intensa atividade fosfolipásica. Nas mesmas condições experimentais, os venenos de *M. corallinus* e *M. surinamensis* apresentaram, respectivamente, baixa e nenhuma atividade fosfolipásica. A atividade proteolítica dos venenos foi testada utilizando o peptídeo FRET como substrato e foi visto que os venenos de *M. ibiboboca*, *M. lemniscatus*, *M. fulvius*, *M. altirostris*, *M. spixii*, *M. corallinus*, *M. frontalis* e *M. hemprichii* apresentam atividade proteolítica neste substrato. No entanto, nenhuma atividade proteolítica pôde ser medida no veneno de *M. surinamensis*. A atividade da hialuronidase também foi analisada e mostrou que

esta atividade é elevada nos venenos de *M. lemniscatus*, *M. corallinus*, *M. hemprichii*, *M. corallinus*, *M. frontalis*. *M. ibiboboca*, *M. altirostris*, *M. surinamensis*, *M. frontalis* e *M. spixii*. Já o veneno de *M. fulvius* apresentou baixa atividade hialuronidásica.

A maior parte das toxinas presentes no veneno dessas serpentes pertencem à classe das neurotoxinas toxinas de três dígitos (3FTx) e fosfolipases do tipo A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>), demonstrado na Figura 5. Foi demonstrado que as 3FTx são muito diversas em termos de sequências, possivelmente tendo como alvo diferentes tipos de receptores, enquanto as PLA<sub>2</sub> são mais conservadas (Tanaka *et al.*, 2010). A alta expressão desses dois tipos de neurotoxinas é demonstrada pela presença de atividades pré e pós-sinápticas nos venenos de *Micrurus* (Tanaka *et al.*, 2010) e confirmada pela presença dessas toxinas em estudos proteômicos (Corrêa-Netto *et al.*, 2011).

**Figura 5. Proporção de toxinas 3FTx e PLA<sub>2</sub> nos venenos de *Micrurus spp* de acordo com estudos proteômicos.** A figura demonstra os venenos de *Micrurus spp* brasileiras e sua composição referente às toxinas 3FTx e PLA<sub>2</sub>. A seta destaca a espécie *M. corallinus*.



Fonte: Fernández *et al.*, 2015 adaptado.

### 1.3.1. TOXINAS DE TRÊS DÍGITOS (3FTx)

As toxinas de três-dígitos (3FTx) pertencem a uma superfamília de proteínas não enzimáticas encontradas no gênero *Micrurus spp* (Tan e Ponnudurai, 1992). Esta família de polipeptídeos não enzimáticos contém cerca de 60-74 resíduos de aminoácidos (Aird *et al.*, 2017). As três alças que se projetam da região central da sua estrutura se assemelham a três dedos estendidos da mão humana e daí o nome desta família de polipeptídeos (Kini, 2005).

A primeira 3FTx descoberta, a  $\alpha$ -bungarotoxina, foi publicada há quase 50 anos atrás por Chang *et al.*, (1963), sendo o trabalho mais citado na área, com mais de 400 citações (Utkin, 2013). Além disso, um grande número de outras 3FTx foram descobertas e novos membros desta família que possuem estruturas similares e diversas atividades biológicas estão surgindo constantemente (Utkin, 2019).

As 3FTx têm uma estrutura comum de três alças de fita beta que se estendem de um núcleo central contendo quatro ligações dissulfeto conservadas. Apesar de terem um arcabouço em comum, as 3FTx possuem classes diferentes, como muscarínicas, mióxicas, cardiotoxinas e neurotóxicas que se ligam a diferentes receptores/aceptores (Fry *et al.*, 2003; Kini, 2005; Rojas *et al.*, 1983). Alguns 3FTxs têm uma quinta ligação dissulfeto adicional no loop I ou no loop II. A quinta ligação dissulfeto no loop I torcee e empurra a ponta do laço em uma posição ortogonal apresentando fraca toxicidade e ligam-se ao nAChR periférico em concentrações micromolares. A quinta ligação dissulfeto na alça II introduz uma volta e a formação de um pequeno segmento helicoidal na ponta da alça, geralmente encontrada em neurotoxinas de cadeia longa.

Como exemplo de uma caracterização de uma 3FTx do veneno de *Micrurus spp*, Moreira *et al.*, (2010) isolaram e identificaram seis novas toxinas 3FTx do veneno de *M. frontalis*, denominadas Frontoxinas. As sequências de aminoácidos das seis Frontoxinas prevêm 4 ligações dissulfeto conservadas e similaridade estrutural com  $\alpha$ -neurotoxinas de cadeia curta previamente relatadas. As Frontoxinas IV e V contêm 10 cisteínas conservadas e compartilham alta similaridade com  $\alpha$ -neurotoxinas de cadeia longa, sugerindo que essas Frontoxinas poderiam bloquear os receptores nicotínicos de acetilcolina.

Várias 3FTx são usadas como ferramentas farmacológicas sofisticadas para estudar a função e a estrutura de seus alvos moleculares (Kini e Koh, 2020), expandindo as possibilidades para suas futuras aplicações, com perspectivas de serem transformadas em novas drogas e conhecimento de seus alvos e mecanismos moleculares (Hiremath *et al.*, 2023; Nagle *et al.*, 2003; Utkin, 2019).

### 1.3.2. FOSFOLIPASES DO TIPO A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>)

Centenas de espécies de serpentes venenosas, com grande variedade de presas, produzem venenos que contêm proporções variadas de toxinas pertencentes à família das PLA<sub>2</sub> (Oliveira *et al.*, 2022). As PLA<sub>2</sub> catalisam a hidrólise da ligação éster sn-2 dos fosfolípidios da membrana celular e são classificadas em 14 grupos, dos quais os tipos A1 e A2 estão presentes em venenos elapídeos e viperídeos (Aird *et al.*, 2017; Oliveira *et al.*, 2022).

São enzimas com massa molecular de 13–19 kDa, contendo 5–8 pontes dissulfeto e formam dímeros em solução aquosa (Kini, 2005). Nas membranas celulares, as PLA<sub>2</sub>s se dissociam e se ligam como monômeros com afinidade por regiões de membrana nas quais pelo menos 15% dos fosfolípidios são carregados negativamente (Gutiérrez e Lomonte, 2013; Oliveira *et al.*, 2022).

As PLA<sub>2</sub>s também podem ser divididas em isoformas ácidas e básicas, de acordo com o ponto isoelétrico, sendo as isoformas básicas com maior afinidade pela membrana e portanto, maior toxicidade, apesar do mecanismo catalítico das PLA<sub>2</sub>s ainda não estar claro (Aird *et al.*, 2017; Leão *et al.*, 2009). A atividade catalítica de algumas PLA<sub>2</sub>s depende de Ca<sup>2+</sup>, que estabiliza o estado de transição tetraédrico da reação. Um resíduo essencial de aspartato (Asp49) coordena o cofator Ca<sup>2+</sup>, cuja mutação torna a enzima inativa (Fletcher *et al.*, 1994).

Montecucco *et al.* (2008) elencaram algumas PLA<sub>2</sub> elapídicas que poderiam atuar especificamente no sistema nervoso periférico, paralisando a presa em período de tempo muito curto. Outras atingem tanto o sistema nervoso quanto o muscular, principalmente nos músculos esqueléticos, causando danos extensos. Outras PLA<sub>2</sub> de diversas serpentes do gênero *Micrurus* ainda exercem vários efeitos, como anticoagulação, ou afetam a agregação plaquetária, hipotensão, hemólise e edema (Kini e Chan, 1999).

Terra *et al.* (2015) observaram atividade leishmanicida contra *Leishmania amazonensis*, juntamente com atividade antiplasmódica contra *Plasmodium falciparum* no veneno bruto de *Micrurus spixii*, atividades até então inéditas para venenos de *Micrurus*. A possível responsável pelos efeitos observados, seria uma PLA<sub>2</sub> neurotóxica chamada MsPLA<sub>2</sub>-I. O sequenciamento N-terminal do fragmento apresentou 80% de similaridade com outras PLA<sub>2</sub> de *Micrurus altirostris*. Foi demonstrado que o veneno bruto de *M. spixii* e a MsPLA<sub>2</sub>-I poderiam ser promissores na exploração de moléculas com potencial microbicida.

Mais recentemente, Casais-e-Silva *et al.* (2016) isolaram do veneno de *M. lemniscatus* a Lemnitoxina, uma PLA<sub>2</sub> miotóxica de classe I. Foi demonstrado que a Lemnitoxina é altamente seletiva em seu direcionamento celular, sendo citotóxica para miotubos diferenciados *in vitro* e fibras musculares *in vivo*. A lemnitoxina não foi letal após injeção intravenosa em doses de até 2 mg em camundongos, evidenciando sua ausência de neurotoxicidade significativa. Ademais, a lemnitoxina apresentou efeito anticoagulante no plasma humano e atividade pró-inflamatória, pois induziu o edema de pata e a degranulação de mastócitos.

Todos esses trabalhos demonstram que a superfamília de toxinas PLA<sub>2</sub> possui uma variedade de funções celulares importantes. Os trabalhos neste campo continuam a se expandir com a descoberta de novas funções importantes para muitas dessas enzimas, podendo gerar descobertas de novas atividades de PLA<sub>2</sub>, bem como compreender o mecanismo e a função dessas enzimas (Eton e Lepore, 2008).

### 1.3.3. COMPONENTES MINORITÁRIOS

Aird *et al.* (2017) identificaram, através de análises transcriptômicas e proteômicas, diversas classes de toxinas que compõem os venenos de seis espécies de serpentes *Micrurus spp.* Dentre os componentes minoritários, podemos citar as L-aminoácido oxidases, Lectinas do tipo C, Metaloproteases, Fosfolipases B, peptídeos natriuréticos, waprinas, entre outros (Aird *et al.*, 2017)

As L-aminoácido oxidases (LAAO) são enzimas que convertem os L-aminoácidos em cetoácidos com liberação de peróxido de hidrogênio e amônia (Tan *et al.*, 2018) e possuem uma série de efeitos biológicos, como agregação plaquetária (Ponomarenko *et al.*, 2008; Tan e Ponnudurai, 1992), hemorragia, necrose e edema



(Pessatti *et al.*, 1995). Já foram descritas LAAOs nos venenos de *Micrurus spp*, como por exemplo a ML-LAAO, presente no veneno de *M. leminiscatus* (Soares *et al.*, 2020). A ML-LAAO é uma glicoproteína de 69 kDa que representa cerca de 2% do total de toxinas do veneno de *M. leminiscatus*.

Esta enzima exibiu atividade ótima em pH 8,5, apresentando alta especificidade para L-aminoácidos hidrofóbicos. A ML-LAAO bloqueou a agregação induzida por colágeno em plaquetas lavadas de uma maneira bastante fraca, e não inibiu a agregação plaquetária induzida pelo ADP no plasma rico em plaquetas. Além disso, esta enzima apresentou atividade antibacteriana *in vitro* contra *Staphylococcus aureus* (CIM/MBC de 0,39 µg/mL) e ação leishmanicida *in vitro* contra *Leishmania amazonensis* e *L. chagasi* (valores de IC<sub>50</sub> de 0,14 e 0,039 µg/mL, respectivamente). Estas atividades foram significativamente reduzidas pela catalase, sugerindo que a produção de peróxido de hidrogênio está envolvida nos efeitos produzidos (Soares *et al.*, 2020).

As Lectinas do tipo C (CTLs) são proteínas ligantes de carboidratos dependentes de Ca<sup>2+</sup>, compostas por duas subunidades ligadas covalentemente ( $\alpha$  e  $\beta$ ) que estão presentes em venenos de diversas serpentes, bem como em diversos organismos (Ogawa *et al.*, 2005). Nos venenos de serpentes são chamadas de Snaclec, e perderam sua capacidade de ligação a carboidratos, mas mantiveram a estrutura clássica das CTL (Eble, 2019; Ogawa *et al.*, 2005).

No trabalho de Rincon-Filho *et al.* (2019) uma CTL, chamada Ms-CTL, foi isolada do veneno de *M. surinamensis* e avaliada quanto ao seu efeito citotóxico. A Ms-CTL é uma proteína citotóxica de 23,461 kDa, conforme determinado por espectrometria de massa. Os resultados do trabalho indicaram que a incubação de células cardiomioblásticas H9c2 com a Ms-CTL levou a uma retração celular significativa e à formação de agregados celulares, conforme observado por imagens de microscopia de contraste de fase, e que o veneno bruto de *M. surinamensis* é altamente tóxico para células cardiomioblásticas H9c2 e menos ou não citotóxico para outras linhagens celulares, como HaCat, VERO e U373.

As Metaloproteases de Venenos de Serpentes (SVMPs) são enzimas que contribuem para a toxicidade dos venenos, sendo notórias por sua atividade hemorrágica, ativação de protrombina e coagulação do sangue (Markland e Swenson,

2013). Muitos venenos de serpentes contêm múltiplas formas de metaloprotease; no entanto, os venenos elapídicos tendem a ter 70% menos SVMPs em relação aos venenos viperídeos (Aird *et al.*, 2017). Segundo Aird *et al.* (2017), os venenos de *Micrurus spp* parecem conter predominantemente metaloproteases Tipo III, e neste trabalho foi relatada a presença de um transcrito compreendendo 614 resíduos, incluindo um peptídeo sinal de 20 resíduos de uma SVMP que produz uma proteína madura com uma massa de 66.657 kDa e um ponto isoelétrico previsto de 8,37.

As Fosfolipases B possuem cerca de 547-551 aminoácidos e aparentemente contribuem para a hidrólise da bicamada lipídica (Aird e da Silva, 1991). Os peptídeos natriuréticos atuam na regulação do balanço eletrolítico fisiológico e na homeostase do sangue (Rang e Dale, 2016), atuando no relaxamento da musculatura lisa e vasodilatação (Leão *et al.*, 2009). Estes componentes são menos estudados e não possuem caracterização específica para venenos de *Micrurus spp*.

As waprinas, pequenas toxinas com resíduos de cisteína formando quatro ligações dissulfeto, agem como inibidor Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>ATPase e com atividade antimicrobiana (Cecchini *et al.*, 2005). Apesar de não serem muito estudadas, foi descrita a presença dessas toxinas nos venenos de *Micrurus spp* (Aird *et al.*, 2017; Olamendi-Portugal *et al.*, 2018).

#### **1.4. TRATAMENTO PARA ACIDENTES ELAPÍDICOS**

O tratamento preconizado contra o envenenamento elapídico é a administração intravenosa de Soro Antielapídico – SAEL (Bucaretschi *et al.*, 2020). Porém, o sucesso deste tratamento depende da qualidade do soro administrado, do tempo entre o acidente e sua administração e da identificação da serpente envolvida no acidente (Isbister, 2010; Tavares-Neto, 2014).

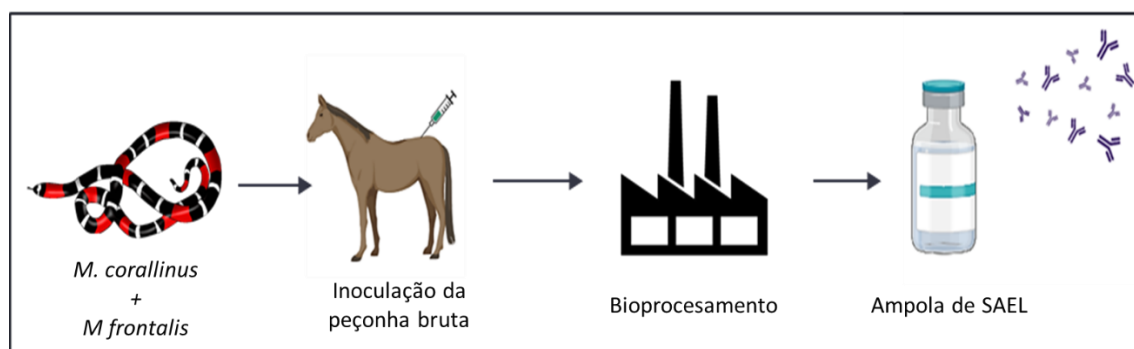
No Brasil, o SAEL é produzido através da hiperimunização de animais de grande porte (Silva Júnior *et al.*, 1991), como os cavalos, com o veneno das duas principais representantes das cobras corais encontradas, as *Micrurus corallinus* e *M. frontalis*, sendo, portanto, um soro bivalente (Figura 6). Neste processo, cavalos são hiperimunizados com a peçonha bruta destas duas espécies, de acordo com o esquema de imunização aplicado. Após o fim do ciclo de imunização, é feita uma sangria no animal para verificar se a titulação de anticorpos contra o antígeno foi

alcançada; caso não alcançada, o ciclo é repetido até alcançar a titulação de imunoglobulinas esperada.

Em seguida, é feita uma sangria nos animais, e a bolsa de plasma é coletada e submetida a várias etapas de bioprocessamento, nas quais o plasma do animal é tratado, para a obtenção de anticorpos IgG. Esses anticorpos IgG posteriormente são clivados por pepsina, onde a porção constante do anticorpo é retirada, e o produto gerado é um imunobiológico, constituído de anticorpos neutralizantes F(ab)2', prontos para uso (Carmo *et al.*, 2015).

Todo acidente elapídico deve ser considerado potencialmente grave, devido a rápida evolução do paciente para um possível quadro de insuficiência pulmonar, e o tratamento é baseado na administração de soro específico o mais precocemente possível (Andrade Filho, 2015). A dose preconizada em todos os casos é de 10 ampolas de soro antielapídico por via intravenosa. Pacientes que evoluírem com insuficiência respiratória deverão ser intubados e instituída a ventilação mecânica (Tavares-Neto, 2014).

**Figura 6. Produção do SAEL.** Cavalos são hiperimunizados com os venenos brutos de *M. corallinus* e *M. frontalis* para a produção do soro. Após sangria e coleta do plasma, as amostras são submetidas a etapas de bioprocessamento para obtenção dos anticorpos que constituirão as ampolas de SAEL utilizadas no tratamento.



**Fonte:** Elaborado pelo Autor, 2023.

Segundo Andrade Filho (2015), nos casos em que o veneno tenha ação exclusivamente pós-sináptica, está indicado o uso de droga anticolinesterásica, que leva ao aumento da acetilcolina na placa motora, diminuindo o efeito do veneno elapídico. O anticolinesterásico pode ser a fisostigmina na dose de 0,5 mg por via intravenosa a cada 30 minutos. Esse medicamento pode produzir efeitos muscarínicos (sialorreia, hipersecreção pulmonar e bradicardia). Por isto, deve se administrar

atropina (na dose de 1 mg), antes de cada administração de fisostigmina para prevenir estas manifestações.

Para evidenciar a importância do uso de antivenenos nos acidentes elapídicos, Coelho *et al.* (1992) reportaram um caso de acidente com um paciente do sexo masculino, 35 anos, atendido três horas após ser mordido no pé esquerdo por uma serpente desconhecida. Apresentou sintomas como vômitos, mialgia, ptose e midríase. Dezoito horas após o acidente, o paciente apresentou fasciculação generalizada, intensa mialgia, paralisia de membros inferiores, dor epigástrica, disfonia, visão turva e dificuldade respiratória. Com esses sintomas, foi definido que se tratava de um acidente elapídico. Devido a gravidade do caso e a indisponibilidade do soro antielapídico, foi administrado neostigmina em cinco injeções intravenosas de 0,5 mg em intervalos de trinta minutos, seguido de intervalos de acordo com a taxa de melhora da função respiratória do paciente. Cada administração foi precedida por 0,6 mg de sulfato de atropina quinze minutos antes, a fim de antagonizar os efeitos muscarínicos. Após as primeiras cinco doses, o paciente melhorou, então a neostigmina foi administrada em intervalos de duas horas. A partir deste momento, houve melhora geral com diminuição da ptose, mialgia, disfonia e midríase. O paciente, no entanto, ainda se queixava de visão turva e as fasciculações ainda estavam presentes. Após doze horas, a neostigmina foi administrada em intervalos de quatro horas durante um período de cinco dias. O paciente teve alta apenas no sétimo dia, sem sintomas.

Estudos recentes tem demonstrado a eficiência de uma pequena molécula que atua como um inibidor de fosfolipases, chamado Varespladib, em auxiliar nos casos de envenenamentos experimentais. Nos últimos anos, essa molécula tem demonstrado um potencial considerável como medida terapêutica auxiliar para apoiar a terapia antiveneno (Dashevsky *et al.*, 2021). Foi visto que o Varespladib e o seu pró-fármaco biodisponível por via oral (metil varespladib) inibiram significativamente a atividade de PLA<sub>2</sub> do veneno de *Micrurus fulvius*, com redução significativa nas atividades hemolítica, coagulante e miotóxica do veneno em porcos (Lewin *et al.*, 2018).

No trabalho de Silva-Carvalho *et al.* (2022) foi visto que a combinação de antiveneno e varespladib mostrou-se mais eficaz do que somente o antiveneno na atenuação do efeito sobre o tempo de tromboplastina parcial ativada e na prevenção

do aumento de leucócitos circulantes, somado ao efeito protetor sobre a função renal-hepática causados pela ação do veneno *Micrurus dumerilii carinicauda*. Quando avaliado o efeito cardíaco desse veneno e do veneno de *M. corallinus*, foi visto que o Varespladib ofereceu proteção mínima contra os efeitos cardíacos de ambos os venenos, quando testado sozinho, mas foi mais eficaz quando combinado com antiveneno (Gaspar *et al.*, 2023).

### 1.5. **MICRURUS CORALLINUS**

*Micrurus corallinus* (Figura 7) é uma das principais espécies de *Micrurus* do Brasil, geograficamente distribuída do norte do Uruguai até o nordeste brasileiro, habitando regiões de Mata Atlântica, Cerrado, Pampa e Caatinga. .

**Figura 7. Espécie *Micrurus corallinus*.** É uma serpente de coloração aposemática viva, composta por anéis nas cores vermelho, preto e branco.



Fonte: Mendes *et al.*, 2019

#### 1.5.1. **COMPOSIÇÃO DO VENENO DE *M. corallinus***

Estudos feitos para identificar as toxinas presentes no veneno de *M. corallinus* demonstraram uma composição complexa, apresentando toxinas com atividade cardiotoxica (Gaspar *et al.*, 2023), miotóxica (Cecchini *et al.*, 2005) e neurotóxica (da Silva Júnior *et al.*, 1991; Silva-Carvalho *et al.*, 2021). A peçonha demonstra ação pré e pós-sináptica, composta em sua maioria de toxinas de três dígitos (3FTx), e Fosfolipases A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>), componentes estes comuns a classe elapídica (Aird *et al.*, 2017; Corrêa-Netto *et al.*, 2011; Lomonte *et al.*, 2016).

Vários trabalhos demonstraram a complexidade da composição de toxinas presente no veneno desta espécie. Leão *et al.* (2009) em seu trabalho fizeram análises sobre o transcriptoma, utilizando a técnica de EST, da glândula de veneno de *M. corallinus*. Foi visto que a maioria dos transcritos correspondiam à toxinas, como esperado, e dentro das 10 classes de toxinas obtidas, as duas principais classes de toxinas encontradas eram as 3FTx e as PLA<sub>2</sub>s, representando 85% do total dos transcritos gerados. No entanto, outras 8 classes de toxinas foram anotadas, como Lectinas do tipo C, precursores de peptídeos natriuréticos, Metaloproteases e L-aminoácidos oxidases.

Corrêa-Netto *et al.* (2011) analisaram e compararam o proteoma de *M. corallinus* e *M. altirostris*. Em ambas as espécies, as 3FTx e as PLA<sub>2</sub> foram as famílias de toxinas mais abundantes e diversificadas. Para o veneno de *M. altirostris* foram encontradas 33 proteínas do tipo 3FTxs e 13 proteínas do tipo PLA<sub>2</sub> diferentes, representando, respectivamente, 79,5% e 13,7% do total de proteínas identificadas. Já para o veneno de *M. corallinus* foram identificadas 10 diferentes sequências de 3FTx (81,7% do proteoma do veneno) e 4 de PLA<sub>2</sub> (11,9% do proteoma do veneno). Os dados transcriptômicos forneceram as sequências de aminoácidos completas de 18 (*M. altirostris*) e 10 (*M. corallinus*) 3FTxs, e 3 (*M. altirostris*) e 1 (*M. corallinus*) novas sequências de PLA<sub>2</sub>. Além disso, o veneno de cada espécie continha membros únicos de famílias de toxinas menores, como SVMPS, Lectina do tipo C e L-aminoácido oxidases. O perfil de toxinas dos venenos de *M. altirostris* e *M. corallinus* encontrados no estudo de Corrêa-Netto *et al.* (2011) confirma as moléculas 3FTxs e PLA<sub>2</sub> como os principais atores do processo de envenenamento por essas serpentes. Em ambas as espécies, todas as 3FTxs principais e secundárias apresentaram maior similaridade com  $\alpha$ -neurotoxinas do tipo I, sugerindo que essas toxinas prejudicam a transmissão neuromuscular ao agir pós-sinápticamente nos receptores nicotínicos de acetilcolina, o que pode desempenhar o papel predominante no efeito neurotóxico que leva à paralisia periférica, parada respiratória e evoluir para a morte.

Já Aird *et al.* (2017) analisaram o transcriptoma, por metodologia de RNA-seq (Illumina), e proteoma das glândulas de veneno de seis espécies de *Micrurus spp* (*M. corallinus*, *M. lemniscatus carvalhoi*, *M. lemniscatus lemniscatus*, *M. paraensis*, *M. spixii spixii* e *M. surinamensis*). Os seis venenos diferem entre si e todos são majoritariamente compostos por 2 a 6 classes de toxinas que representam 91 a 99%

das transcrições de toxinas. O transcriptoma de *M. corallinus* demonstrou que a peçonha possui majoritariamente toxinas 3FTx e PLA<sub>2</sub>, sendo peptídeo natriurético do tipo C o próximo componente mais abundante, representando mais de 29,5% do transcriptoma, seguido por uma proteína semelhante à Lectina tipo C (3,4%), Lectina ligadora de galactose (3,4%) e uma Metaloprotease (2,1%).

### 1.5.2. ACIDENTES CAUSADOS POR *M. corallinus*

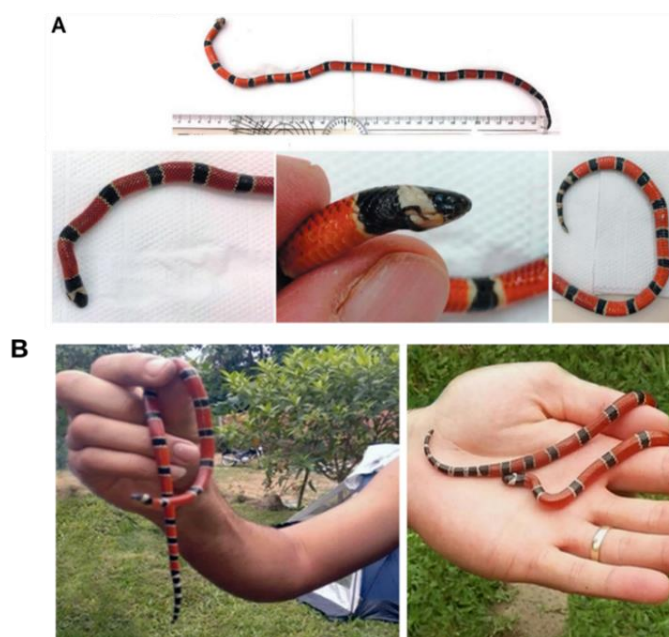
Muitos são os acidentes causados pelo gênero *Micrurus spp*, mas tratando-se especificamente dos acidentes com *M. corallinus*, foram reportados três relatos de casos na literatura sobre acidentes com esta serpente. Coelho *et al.* (1992) relata que um paciente do sexo masculino, 66 anos, foi acidentado com uma mordida no pé por uma *M. corallinus* devidamente identificada, de 84 cm, o qual apresentou os sintomas neurológicos característicos de um envenenamento elapídico. Dez ampolas de SAEL foram administradas por via endovenosa para neutralizar a peçonha circulante de *M. corallinus*, evidenciando a gravidade do envenenamento.

Strauch *et al.* (2018) relataram a imprudência em um acidente envolvendo um marinheiro, branco, de 28 anos, natural e residente em Cachoeiras de Macacu, RJ, que estava em um acampamento recreativo com um grupo de amigos quando avistou uma cobra no chão. Um biólogo presente no acampamento capturou o animal com as próprias mãos acreditando que se tratava de uma falsa cobra coral. Foi constatado por especialista que se tratava da espécie de *M. corallinus* (Figura 9A). O paciente foi picado aproximadamente às 13h e foi admitido no hospital de referência após 8 horas da mordida, apresentando manifestações neurológicas como ptose palpebral bilateral, diplopia, disfagia e parestesia de língua, além de lombalgia. Os sinais vitais estavam todos dentro da normalidade (temperatura corporal 36,7 °C, pressão arterial 110/70 mmHg, pulso 78 bpm e frequência respiratória 16 bpm). O paciente recebeu 100 mL (10 frascos) de SAEL, divididos em 50 mL cada administração, num intervalo de 40 minutos sem reação adversa. O paciente ficou sob observação na unidade de terapia intensiva por dois dias e após o quarto dia de hospitalização, foi liberado.

Bucarechi *et al.* (2020) relataram o acidente de dois homens saudáveis, que encontraram uma cobra coral em um pilha de lenha enquanto coletavam para um churrasco, em uma ilha fluvial perto de São José do Rio Pardo, no estado de São

Paulo, Brasil. Durante o churrasco, os dois homens consumiram uma quantidade considerável de bebida alcoólica e “brincaram” com a cobra, acreditando que estavam manuseando uma falsa cobra coral. Os dois homens foram mordidos com poucos minutos de diferença um do outro pela mesma serpente. A cobra foi identificada por um especialista como uma *M. corallinus* (Figura 9B) de pequeno porte, medindo 42 cm. Mesmo sendo pequena, a ação da peçonha foi extremamente neurotóxica, uma vez que os dois pacientes apresentaram os sinais miastênicos característicos. Foram administradas 9 ampolas do SAEL em cada paciente. Nenhum deles desenvolveu sinais de insuficiência respiratória e ambos receberam alta um dia após a internação, com melhora gradual da miastenia, mas ainda apresentando ptose palpebral. Como queixa comum durante o acompanhamento, ambos os pacientes relataram uma perda transitória do sabor salgado e doce que durou aproximadamente 3 a 4 semanas após a mordida pela serpente. Todos esses casos reportados evidenciam a neurotoxicidade da peçonha de *M. corallinus*, e o potencial risco de vida nos envenenamentos. A imprudência no manejo e a crença de que a maioria das cobras corais encontradas são espécimes de cobras corais falsas são os maiores responsáveis pelos acidentes relatados.

**Figura 9. Espécie *Micrurus corallinus* relatada nos casos reportados. A – *M. corallinus* descrita no acidente de Strauch *et al.* (2018); B – *M. corallinus* descrita no envenenamento reportado por Bucarechi *et al.* (2020). Adaptado.**



**Fonte:** Adaptado de Bucarechi *et al.* (2020) e Strauch *et al.* (2018).



### 1.5.3. IMUNÓGENOS PROPOSTOS À SUBSTITUIÇÃO DO VENENO DE *M. corallinus*

A busca por um imunógeno alternativo específico que pudesse substituir o veneno de *M. corallinus* é um desafio, mas alguns trabalhos foram propostos. Dentro das classes de 3FTx identificadas no trabalho de Leão *et al.* (2009), foram encontrados dois grupos mais abundantes dessas toxinas, que foram escolhidos como imunógenos alternativos ao veneno de *M. corallinus*. Cinco candidatos antigênicos foram selecionados por meio da análise do transcriptoma obtido e avaliada a viabilidade de imunização com o DNA desses candidatos. Como resultado, foi visto que esses candidatos produziram títulos de anticorpos em camundongos, no entanto, as amplitudes das respostas foram bastante baixas.

Em outro trabalho, para substituir o uso da peçonha de *M. corallinus*, Ramos *et al.* (2016) também mapearam potenciais epítomos de toxinas 3FTx e PLA<sub>2</sub> de *M. corallinus*. Porém, neste caso, as sequências mapeadas foram utilizadas para construir fitas de DNA multiepitópico para imunização genética de camundongos. Os resultados de seu trabalho demonstraram que o soro obtido do grupo de animais exclusivamente imunizado geneticamente não foi capaz de gerar anticorpos frente ao veneno. Entretanto, outro grupo de animais que foram geneticamente imunizados, mas com adição de doses de reforço da proteína recombinante resultante, levou a uma taxa de sobrevivência de 60% em ensaio de neutralização *in vivo*.

Não somente imunizações com DNA foram propostas. Dentre alguns imunógenos sugeridos na literatura, Castro *et al.* (2015) mapearam e sintetizaram nove epítomos referentes às principais toxinas pertencentes às famílias 3FTx e PLA<sub>2</sub> do veneno de *M. corallinus*, segundo o transcriptoma desse veneno publicado por Leão *et al.* (2009), que foram utilizados como imunógeno alternativo para a substituição do veneno bruto de *M. corallinus*. O uso de seus peptídeos como imunógenos foi capaz de gerar uma resposta humoral significativa. O soro  $\alpha$ -peptídeos obtido dos coelhos ainda demonstrou reatividade cruzada com o veneno de *M. frontalis* e *M. lemniscatus*. Castro *et al.* (2015) iniciaram nesse trabalho o que futuramente motivaria o condução desta presente dissertação, demonstrando o início de uma nova alternativa para a substituição do veneno de *M. corallinus*, através da utilização de epítomos sintéticos, na cadeia de produção do SAEL.

Mais tarde, Castro *et al.* (2019) imunizaram coelhos com os mesmos peptídeos sintéticos obtidos anteriormente, mas desta vez em conjunto com o veneno de *M. frontalis*, de forma a simular o esquema de imunização do SAEL já em uso. Essa estratégia demonstrou que o soro dos animais imunizados reconheceram por ELISA e *Western Blot* o veneno de *M. frontalis* e *M. corallinus*, utilizados na produção do SAEL, além de obter relevante reatividade cruzada com outras espécies de *Micrurus spp* testadas. Os anticorpos presentes nos soros destes animais também foram capazes de neutralizar a atividade fosfolipásica de PLA<sub>2</sub> dos dois venenos citados, e *in vivo*, foram capazes de gerar 100% de proteção em camundongos desafiados com o veneno de *M. corallinus* e 50% de proteção em camundongos desafiados com o veneno de *M. frontalis*.

Todas essas alternativas foram propostas, mas de fato, a falta da peçonha de *M. corallinus* ainda é um problema a ser superado. Um imunógeno alternativo que seja específico e eficaz motivaram este presente trabalho, e a busca por essa molécula é um desafio promissor.

## 1.6. PROTEÍNAS MULTIEPITÓPICAS RECOMBINANTES

Diferentes abordagens têm sido empregadas com o objetivo de desenvolver novos antivenenos contra os envenenamentos por animais peçonhentos. Destacam-se o uso de estratégias inovadoras de imunização, pequenas moléculas inibidoras contra toxinas enzimáticas, proteínas animais endógenas com capacidade de neutralização de toxinas, anticorpos monoclonais recombinantes e proteínas recombinantes (Laustsen, 2018).

Dentro das proteínas recombinantes, as proteínas multiepitópicas recombinantes são alternativas muito utilizadas em diversas áreas para retratar epítomos relevantes de um patógeno, secreção ou outro componente através da expressão de proteínas em sistemas heterólogos (Jafari e Mahmoodi, 2021; Kizhakedathil *et al.*, 2023; Tarrahimofrad *et al.*, 2021; Trujillo *et al.*, 2020).

Diversas são as proteínas multiepitópicas recombinantes já descritas na literatura, com diferentes finalidades. Dentre alguns exemplos, podemos citar Brito *et al.* (2020) que produziram vacinas quiméricas desenvolvidas por imunoinformática que conferiam proteção contra leishmaniose visceral experimental. Trujillo *et al.* (2020)

construíram uma proteína multiepitópica produzida em plantas contendo epítomos de antígenos de *E. coli*, *S. typhimurium* e *V. parahaemolyticus* e utilizados como imunógenos e o antígeno produzido em plantas induziu IgG específica (sistêmica) e respostas de IgA (mucosa) contra os epítomos. Mais recentemente, Ramos *et al.* (2023) selecionaram epítomos específicos de células B das proteínas Spike e do Nucleocapsídeo do vírus SARS-CoV-2, com o objetivo de produzir um novo antígeno quimérico recombinante, com finalidade diagnóstica. Os resultados mostraram que a proteína multiepitópica apresentou 83,7% de sensibilidade e especificidade de 100% ao usar amostras de soro e sensibilidade de 91,1% e especificidade de 100% usando amostras de urina, demonstrando que essa proteína, expressa em um sistema procariótico, com epítomos preditos *in silico*, poderia ser considerada como um marcador alternativo para diagnóstico da infecção por SARS-CoV-2. Esses trabalhos demonstram a efetividade de proteínas multiepitópicas em gerar resposta imune específica para os antígenos que as originaram nos animais testados, além de serem consideradas como fortes candidatas para vacinas e diagnósticos de doenças.

Entretanto, tratando-se especificamente do uso de proteínas multiepitópicas em Toxinologia, ainda há um vasto campo a ser explorado. O uso de proteínas multiepitópicas recombinante tem demonstrado o potencial dessas moléculas como efetivos candidatos não tóxicos substitutivos aos venenos de animais peçonhentos, como aranhas e serpentes (Lima *et al.*, 2018; Molina Molina *et al.*, 2020) e demonstram a inovação das técnicas em produção de imunógenos alternativos.

Como exemplo da aplicação da técnica, uma proteína quimérica foi construída expressando três epítomos de LiD1, uma toxina dermonecrótica do veneno da aranha *Loxosceles intermedia*, no trabalho de Mendes *et al.* (2013). Foi demonstrado que a proteína quimérica (rCpLi) gerada é atóxica e a resposta de anticorpos produzida em coelhos contra o rCpLi foi eficiente. O soro  $\alpha$ -rCpLi produzido induziu boa proteção dermonecrótica e hemorrágica, e como conclusão, a rCpLi foi capaz de induzir respostas múltiplas de anticorpos neutralizantes nos coelhos testados.

Esta mesma proteína foi utilizada na imunização de cavalos (Figueiredo *et al.*, 2014), onde foi analisado o potencial de neutralização de soros obtidos pela imunização de cavalos com a rCpLi e rCpLi combinada com doses iniciais de veneno bruto das espécies *Loxosceles gaucho*, *Loxosceles laeta* e *L. intermedia* como

antígenos. Foi demonstrado por ELISA que os cavalos imunizados com três doses iniciais da mistura dos venenos brutos seguidas de nove doses de rCpLi geram anticorpos com a mesma reatividade daqueles produzidos apenas com os venenos das três espécies de *Loxosceles* sp. Os resultados dos ensaios de neutralização *in vivo* e *in vitro* mostraram que soros desses cavalos produzidos neste esquema combinado de imunógenos neutralizam a atividade dermonecrótica dos venenos de *Loxosceles* sp, e alguns desses soros são capazes de atender aos requisitos de potência necessários que poderiam permitir seu uso terapêutico em humanos. Além disso, a estratégia combinada de imunização utilizou aproximadamente 67% menos veneno de *Loxosceles* sp em comparação ao protocolo de imunização tradicional utilizado no Soro Anti-Loxosceles (SALOX).

Lima *et al.* (2018) adicionaram à composição da rCpLi sequências de epítomos do veneno da aranha *Loxosceles intermedia* derivados de metaloproteinases e hialuronidases, outras toxinas também importantes nos venenos loxoscélicos, e também de uma toxina dermonecrótica de *Loxosceles laeta*, gerando assim uma nova proteína multiepitópica recombinante derivada de toxinas loxoscélicas (rMEPLox) para melhor representar esse gênero na produção do SALOX. Ficou demonstrado que a rMEPLox não é tóxica, ao contrário dos venenos brutos utilizados na produção do SALOX, e que os anticorpos produzidos em coelhos contra esse antígeno apresentaram reatividade contra os venenos de *L. intermedia*, *L. laeta*, *L. gaucho* e *L. similis*. Os ensaios de neutralização *in vivo* e *in vitro* mostraram que os anticorpos  $\alpha$ -rMEPLox podem neutralizar eficientemente a atividade da esfingomielinase, hialuronidase e metaloprotease do veneno de *L. intermedia*.

Ademais, o trabalho com essa proteína multiepitópica recombinante gerou ainda desdobramentos e publicações no tocante à sua otimização em sistema heterólogo (Saavedra-Langer *et al.*, 2021) e a produção de anticorpos monoclonais específicos (Costa *et al.*, 2020) que poderiam ajudar o loxocelismo. Um outro trabalho utilizando uma proteína multiepitópica recombinante foi publicado por Molina Molina *et al.* (2020), composta por epítomos da Crotoxina (rMEPCtx). O soro  $\alpha$ -rMEPCtx apresentou reação cruzada com a Crotoxina e os venenos brutos de *Crotalus durissus terrificus*, *Crotalus durissus ruruima*, *C. durissus peruana* e *Bothrops jararaca* (em menor intensidade). Além disso, o soro  $\alpha$ -rMEPCtx foi capaz de neutralizar a atividade letal da Crotoxina.

As tecnologias de expressão recombinante, em especial as proteínas multiepitópicas recombinantes, poderiam revolucionar o campo dos antivenenos, fornecendo terapias mais seguras e eficazes, acessíveis aos sistemas de saúde do mundo em desenvolvimento (Bermúdez-Méndez *et al.*, 2018; Laustsen *et al.*, 2016). No entanto, para que tal avanço tecnológico aconteça, é necessário que mais esforços de investigação sejam direcionados para a este campo. Todas essas publicações referentes a rCpLi, e posteriormente à rMEPlox, motivaram e embasaram o *design* e a utilização da PMEr-cor como um possível candidato na substituição do veneno de *M. corallinus*, visto que a produção de proteínas multiepitópicas recombinantes vem contribuindo para este fim.

## 2.0. JUSTIFICATIVA

A disponibilidade de veneno de *M. corallinus* é escassa, devido às características morfológicas dessa espécie, que é de pequeno porte, somado a sensibilidade desta serpente quando mantida em cativeiro, e devido ao seus hábitos fossoriais, que dificultam a sua captura (Serapicos e Merusse, 2002; Tanaka *et al.*, 2010).

Com esses fatores, os centros de produção, como a Fundação Ezequiel Dias e o Instituto Butantan, encontram problemas na produção do soro antielapídico, devido à falta do seu veneno. As consequências deste problema podem acarretar diretamente na disponibilidade do SAEL nos hospitais (Fan *et al.*, 2019). Algum imunógeno que mimetizasse o veneno de *M. corallinus* na imunização para produção do SAEL poderia mitigar a problemática da extração e manutenção de *M. corallinus* nos planteis dos centros de produção.

Alguns imunógenos alternativos foram propostos, mas até o momento, não foi publicado o uso de uma proteína multiepitópica recombinante que pudesse mimetizar a complexidade das toxinas presentes no veneno de *M. corallinus* para a substituição dessa peçonha. Este imunógeno recombinante multiepitópico teria vantagens por ser uma imunização não tóxica, mais barata e com menor uso de veneno animal, minimizando os problemas relatados na produção do SAEL, além de melhor representar os toxinas mais importantes que agem no envenenamento, através de uma seleção rigorosa de epítomos lineares e conformacionais do veneno de *M. corallinus*.

As proteínas multiepitópicas recombinantes vem demonstrando ser efetivas em mimetizar venenos ofídicos e aracnídeos, além de estimular a produção de anticorpos neutralizantes que possam inibir as ações das toxinas nos casos de envenenamento experimental (Lima *et al.*, 2018; Mendes *et al.*, 2013; Molina Molina *et al.*, 2020). Isto posto, a tecnologia de produção de proteínas multiepitópicas recombinantes foi proposta como alternativa como imunógeno substitutivo ao veneno de *M. corallinus*, por agregar conceitos de inovação e tornar este imunógeno mais específico.

### 3.1. OBJETIVOS

#### 3.1. GERAL

Desenvolver e testar uma Proteína Multi-Epitópica recombinante (PMEr-cor) como imunógeno alternativo capaz de substituir o veneno da *M. corallinus* no processo de produção do Soro Antielapídico.

#### 3.2. ESPECÍFICOS

- Selecionar toxinas relevantes do veneno de *Micrurus corallinus* já descritas e realizar *in silico* o mapeamento de epítomos de células B em suas sequências;
- Desenhar uma proteína recombinante que contenha os epítomos selecionados;
- Expressar e caracterizar imunoquimicamente a proteína recombinante produzida;
- Avaliar e caracterizar os anticorpos específicos produzidos, através da imunização de animais experimentais;
- Verificar o potencial neutralizante dos anticorpos desenvolvidos em modelos *in vitro* e *in vivo*;

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1. SELEÇÃO DE EPÍTOPOS

#### 4.1.1 EPÍTOPOS PREVIAMENTE VALIDADOS

Para compor a proteína quimérica multiepitópica, foram escolhidos epítopos mapeados experimentalmente por Castro *et al.* (2015), sendo eles derivados das seguintes toxinas descritas por Leão *et al.* (2009), disponíveis na Tabela 1:

Tabela 1. Peptídeos previamente validados.

Peptídeos validados por Castro <i>et al.</i> (2015)	
Nome	Sequência
3FTx - Pep100	<sup>39</sup> PDDFTCVKKWEGGRRV <sup>55</sup>
3FTx - Pep039a	<sup>37</sup> TCPAGQKICFKKWKKG <sup>52</sup>
3FTx - Pep039b	<sup>67</sup> PKPKKDETIQCCTKNN <sup>79</sup>
3FTx - Pep604a	<sup>22</sup> LECKICNFKTCPTDELRH <sup>39</sup>
3FTx - Pep604b	<sup>54</sup> THRGLRIDRGCAATCPTVK <sup>72</sup>
3FTx - Pep599a	<sup>28</sup> RHASDSQTTTCLSGICYKK <sup>45</sup>
3FTx - Pep599b	<sup>58</sup> GCPQSSRGVKVDCMRDK <sup>75</sup>
PLA <sub>2</sub> - PepPLA2a	<sup>28</sup> NLINFQRMIQCTTRRS <sup>45</sup>
PLA <sub>2</sub> - PepPLA2b	<sup>119</sup> NCDRTAALCFGRAPYNKNN <sup>137</sup>

Fonte: Elaborado pelo Autor, 2023.

#### 4.1.2 MAPEAMENTO *IN SILICO* DE NOVOS EPÍTOPOS

Para complementar a construção da PMEr-cor, foram selecionadas outras toxinas publicadas por Leão *et al.* (2009), Correia-Neto *et al.* (2011) e Aird *et al.* (2017), que não haviam sido contempladas no mapeamento prévio realizado por Castro *et al.* (2015), e que pudessem ser relevantes para o mapeamento.

#### 4.1.3 FERRAMENTAS DE MAPEAMENTO DE EPÍTOPOS

Para a predição *in silico* dos epítopos de células B lineares e conformacionais presentes nas toxinas selecionadas, foram utilizadas as seguintes ferramentas de bioinformática, descritas na Tabela 2:



**Tabela 2. Ferramentas de predição de epítomos.** Foram utilizados preditores de epítomos lineares e conformacionais

<b>Ferramenta</b>	<b>Input</b>	<b>Tipo de epítopo</b>	<b>Referência</b>
<b>AAP</b>	sequência de aa	Linear	(Chen <i>et al.</i> , 2007)
<b>ABCPred</b>	sequência de aa	Linear	(Saha and Raghava, 2006)
<b>BCPred</b>	sequência de aa	Linear	(EL-Manzalawy <i>et al.</i> , 2008a)
<b>BepiPred 2.0</b>	sequência de aa	Linear	(Jespersen <i>et al.</i> , 2017)
<b>COBEPro</b>	sequência de aa	Linear	(Sweredoski and Baldi, 2009)
<b>FBCPred</b>	sequência de aa	Linear	(EL-Manzalawy <i>et al.</i> , 2008b)
<b>IEDB - Antigen sequence properties</b>	sequência de aa	Linear	(Chou and Fasman, 1978)
			(Emini <i>et al.</i> , 1985)
			(Karplus and Schulz, 1985)
			(Kolaskar and Tongaonkar, 1990)
	(Parker <i>et al.</i> , 1986)		
<b>Lbtope</b>	sequência de aa	Linear	(Singh <i>et al.</i> , 2013)
<b>SVMTrip</b>	sequência de aa	Linear	(Yao <i>et al.</i> , 2012)
<b>IBCE-EL</b>	sequência de aa	Linear	(Manavalan <i>et al.</i> , 2018)
<b>Ellipro</b>	Estrutura	Conformacional	(Ponomarenko <i>et al.</i> , 2008)
<b>DiscoTope 2.0</b>	Estrutura	Conformacional	(Kringelum <i>et al.</i> , 2012)
<b>Cbtope</b>	sequência de aa	Conformacional	(Ansari and Raghava, 2010)
<b>BePro (PEPITO)</b>	Estrutura	Conformacional	(Sweredoski and Baldi, 2008)
<b>SEPPA 3.0</b>	Estrutura	Conformacional	(Zhou <i>et al.</i> , 2019)

**Fonte:** Elaborado pelo Autor, 2023.

#### **4.1.4 CRITÉRIOS PARA ESCOLHA DOS EPÍTOPOS SELECIONADOS (SCORE)**

Para a seleção dos novos epítomos, além daqueles previamente mapeados e validados por Castro *et al.* (2015), para compor a PMEr-cor, levou-se em consideração a somatória de todas as predições bioinformáticas feitas, incluindo ambas as predições lineares e conformacionais.

Como cada algoritmo utilizado apresenta seus resultados de formas diferentes, convencionou-se atribuir um código binário para cada resíduo de aminoácido, sendo atribuído o valor de 1 para aqueles resíduos preditos como componentes de um

epítopo e 0 para os não preditos. Foi realizado o somatório desses valores para cada resíduo de aminoácido de cada toxina mapeada. Estabeleceu-se que a região que fosse mais frequentemente mapeada pelos diferentes algoritmos seria escolhida. Em caso de ambiguidade, mais de uma região foi selecionada.

## **4.2. PRODUÇÃO DA PROTEÍNA MULTIEPITÓPICA RECOMBINANTE PARA REPRESENTAR O VENENO DE *M. CORALLINUS* (PMEr-cor)**

### **4.2.1. CONSTRUÇÃO *IN SILICO* E SÍNTESE DO PLASMÍDEO**

Os epítopos escolhidos para compor a PMEer-cor foram adicionados *em tandem* separados por um espaçador contendo a sequência de aminoácidos GPGPG. Foi encontrado na literatura que o espaçador GPGPG entre os epítopos selecionados teria uma alta probabilidade de prevenir a formação de epítopos juncionais e, além disso, a presença deste espaçador entre 15–20 resíduos poderia criar estruturas terciárias em formato de alças que facilitaria, assim, a apresentação do imunógeno e seu melhor processamento no proteossoma (Livingston *et al.*, 2002).

A melhor disposição dos epítopos na PMEer-cor foram avaliadas de acordo com análises físico-químicas através da ferramenta Protparam do portal ExPASy. A sequência de nucleotídeos correspondente a sequência de aminoácidos determinada para a PMEer-cor foi otimizada para o uso de códons em *Escherichia coli* e sintetizado pela empresa GenScript, inserido em vetor de expressão pET 26b entre os sítios de restrição para as enzimas NcoI e XhoI, contendo gene de resistência para Canamicina e contendo cauda de histidina na extremidade C-terminal.

### **4.2.2. TRANSFORMAÇÃO**

Previamente, células de *E. coli* BL21DE3 foram tratadas com CaCl 50 mM e 150 µL dessas células foram mantidas em gelo para serem transformadas. A seguir, foi adicionado em cada tubo 100 ng do plasmídeo contendo o gene da PMEer-cor e incubado no gelo por 30-40 minutos. Os tubos foram então aquecidos em banho-maria à 42°C por 90 s e em seguida transferidos novamente para o banho de gelo por 2 min. Foi adicionado 500 µL de meio 2xTY estéril em tubos eppendorf de 1,5 ml, e todo o conteúdo de células do tubo anterior foi transferido para este, com a mistura deixada sob agitação por 60 min à 37°C na horizontal. Após, o conteúdo foi centrifugado a 5000 RPM por 2 min e descartado o sobrenadante. As células foram ressuspensas

em meio de cultura 2xTY e todo o conteúdo espalhado em placas com LB-ágar acrescido de canamicina 1µg/ml utilizando uma alça bacteriológica. As placas foram incubadas na estufa à 37°C por cerca de 16 h. Foi utilizado como controle negativo placas contendo antibiótico ampicilina e bactérias *E. coli* BL21DE3 não transformadas

#### **4.2.2.1. CONFIRMAÇÃO DA EFICIÊNCIA DA TRANSFORMAÇÃO VIA PCR DE COLÔNIA**

As colônias de bactérias transformadas que cresceram em meio contendo canamicina foram coletadas separadamente e foi feita uma Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) com o objetivo de confirmar a presença do inserto de interesse no plasmídeo bacteriano. Os clones selecionados foram isolados direto da placa (utilizando-se uma ponteira estéril) e inoculados em tubos contendo a mistura da PCR. Foram utilizados como primers iniciadores T7 *forward* e *reverse*. Para cada reação, foram utilizados 200 µM de dNTP, 0,2 µM de cada primer, 1 µL de Taq DNA polimerase em tampão. As reações foram realizadas em termociclador Thermo Fisher, utilizando o seguinte programa:

- Desnaturação inicial à 95 °C por 5 minutos e 30 ciclos de:
- Desnaturação a 95 °C por 1 minuto;
- Anelamento dos iniciadores a 55 °C por 1 minuto;
- Extensão a 72 °C por 1 minuto;
- Extensão final a 72 °C por 10 minutos

Após a PCR, os produtos foram avaliados através de eletroforese em gel de agarose 1 % em tampão TAE corado com brometo de etídio e o tamanho dos fragmentos gerados foi analisado por comparação com padrão de peso molecular.

#### **4.2.2.2. GEL DE AGAROSE**

Foi utilizada a concentração do gel de agarose de 1%. Foi pesado 0,5 gramas de agarose ultra PURE Gibco e adicionado em um erlenmeyer de 250 ml. Em seguida, foi acrescentada a solução Tampão de corrida TAE 1X sem brometo e agitado manualmente. Foi dissolvido a mistura no microondas por aproximadamente 1 minuto até que não fossem mais visualizadas partículas sólidas de gel. Após esfriar (cerca de 37°C), a agarose dissolvida foi despejada na cuba de eletroforese. Após a solidificação

do gel, foi removido o pente de formação das canaletas cuidadosamente e adicionado o restante do tampão de corrida TAE 1X sem brometo até cobrir todo o gel formado. As amostras foram aplicadas em volume final de 15  $\mu$ L e aplicado o padrão de peso molecular Thermo Scientific™ GeneRuler 1 kb DNA Ladder. O sistema foi fechado e aplicado 90V de diferença de potencial elétrico. A corrida foi encerrada 1 hora após a aplicação das amostras. Ao final, o gel foi cuidadosamente transferido para um recipiente contendo solução de brometo de etídio 0,5  $\mu$ g/mL ao abrigo da luz por 30 minutos. As bandas obtidas foram visualizadas e fotografadas usando o fotodocumentador Bio-Rad ChemiDoc™ Imaging system.

#### **4.2.3. DEFINIÇÃO DE CONDIÇÕES DE EXPRESSÃO DA PMEr-cor (PEQUENA ESCALA)**

Para verificar o perfil de expressão da PMEr-cor, foi feita uma expressão em pequena escala para definir qual o melhor tempo de indução e o melhor meio de cultura a ser utilizado. Para isso, uma colônia confirmadamente positiva com o inserto plasmidial foi selecionada e utilizada para o pré inóculo, em 20 mL de meio 2xYT suplementado com 10  $\mu$ g/mL de canamicina. O pré inóculo foi crescido por cerca de 16 horas a 37° C sob agitação a 180 RPM. A seguir, 200  $\mu$ L do pré inóculo foi aplicado em um tubo Falcon de 50 mL contendo 10 mL de meio 2xYT ou de meio Terrific Broth (TB), ambos suplementados com antibiótico canamicina na concentração de 50  $\mu$ g/mL. As culturas foram incubadas a 37°C sob agitação a 200 RPM e o crescimento foi controlado até a Densidade Óptica (OD) de 0,4 nm. As culturas foram então induzidas com IPTG em uma concentração final de 0,5 mM, prosseguida por um tempo total de 24 horas de indução sob agitação à 30°C. Foram retiradas alíquotas de 10  $\mu$ L no tempo 0 de indução, prosseguidas de 1 hora, 2 horas, 3 horas, 16 horas e 24 horas de indução, respectivamente. Foi acrescido às alíquotas tampão de amostra 2x (Tris HCl 100 mM pH 6,8, SDS 4%, azul de bromofenol 0,2%, glicerol 20%) e então submetidas à SDS-PAGE 15 % em tampão Tris-glicina (25 mM TrisHCl pH 8,3, 250 mM glicina, 0,1% SDS) a 120 V por 120 minutos, conforme detalhado em sessão abaixo (número 4.2.4.1). O gel foi corado por Coomassie Blue (0,25% Coomassie blue R 250, 50% metanol, 10% ácido acético) em temperatura ambiente e lavado várias vezes com solução descorante (50% metanol, 10% ácido acético), até visualização das bandas. As massas moleculares das proteínas foram confirmadas por comparação com padrões de massa molecular de proteínas.

#### **4.2.3.1 ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMINA (SDS-PAGE)**

Foi utilizado o sistema de gel de eletroforese desnaturante SDS-PAGE preparado em placas de vidro com dimensões de 10,0 x 8,0 x 0,2 cm, com espaçadores de 0,75 mm. O gel de separação foi constituído de 15% (v/v) de uma solução de acrilamida/bisacrilamida 29:1 (p/p); Tris-HCl 0,4 M pH 8,8; SDS 0,1% (p/v); 50 mM de persulfato de amônio (PSA) e 0,05% (v/v) de TEMED. O gel de concentração foi constituído de 4% (v/v) de acrilamida/bisacrilamida 29:1 (p/p); Tris-HCl 0,125 M, pH 6,8; SDS 0,1% (p/v); (PSA) 50 mM e TEMED 0,025% (v/v). O gel de separação foi preparado e colocado entre as placas de vidro, e ao se polimerizar foi preparado o gel de concentração que foi colocado sobre o gel de separação. As amostras foram misturadas ao tampão de amostra desnaturante 2x para SDS-PAGE (100 mM de Tris-HCl pH:6,8; 4% de SDS; 0,2% de Azul de Bromofenol; 10% de -mercaptoetanol; 20% de Glicerol) com redução, incubadas a 100°C durante 5 minutos e aplicadas no gel. A eletroforese foi realizada verticalmente com o tampão (0,3% Tris-HCl; 1,2% glicina e 0,1% de SDS) a 120 V durante 120 minutos. Após eletroforese, os géis foram revelados com a solução corante de Coomassie Blue (0,25% de Coomassie Blue, 45% de metanol, 9% ácido acético glacial) por 45 minutos (25°C) e lavados em solução descorante (45% metanol e 9% ácido acético glacial) até o desaparecimento da coloração de fundo e observação das bandas.

#### **4.2.4. EXPRESSÃO DA PMEr-cor EM MAIOR ESCALA**

Após a otimização dos melhores parâmetros de expressão em pequena escala, foi repetido o procedimento redimensionado para maior escala (1 litro). Uma colônia positiva foi selecionada e feito o pré inóculo, em 10 mL de meio 2xYT suplementado com 10 µg/mL de canamicina. O pré inóculo foi crescido por cerca de 16 horas a 37 °C sob agitação a 180 RPM e a seguir inoculada em 1 litro de meio TB suplementado com canamicina. A cultura foi incubada a 37 °C sob agitação de 200 RPM e o crescimento foi controlado até a Densidade Óptica (OD) de 0,4 nm. A cultura foi então induzida com IPTG em uma concentração final de 0,5 mM prosseguida por 16 horas de indução sob agitação a 30 °C. Após o período de indução, a cultura foi centrifugada a 3000 RPM, a temperatura ambiente por 20 minutos e o sobrenadante descartado.

#### 4.2.5. LISE BACTERIANA

As células contidas no *pellet* após indução foram ressuspensas em 20 mL de tampão de ligação (50 mM Tris; 500 mM NaCl; 20 mM imidazol; 5 mM MgSO<sub>4</sub>; pH 7,4) e em seguida o extrato foi submetido a 3 ciclos de congelamento em nitrogênio líquido e descongelamento a 37 °C em banho-maria. Após, receberam a adição de lisozima na concentração final de 100 µg/mL e deixadas em banho-maria de gelo por 30 minutos. Em seguida, o extrato foi submetido novamente a 3 ciclos de congelamento em nitrogênio líquido e descongelamento a 37 °C em banho-maria. Após isto, as bactérias foram sonicadas com 3 pulsos de 15 segundos cada, com potência de 40% em sonicador para a liberação total das proteínas citoplasmáticas. A suspensão foi então passada em filtro de 0,22 µm e centrifugada a 7000 RPM, 4 °C por 30 minutos.

#### 4.2.6. PURIFICAÇÃO DA PMEr-cor

O *pellet* do extrato foi ressuspensado em tampão de ligação (8M uréia; 50 mM Tris; 500 mM NaCl; 20 mM imidazol; 5 mM MgSO<sub>4</sub>; pH 7,4). As purificações foram feitas em ÄKTA pure (Cytiva) por cromatografia de afinidade utilizando coluna HisTrap™ HP 1 mL GE Healthcare. Após a passagem de todo o extrato na coluna, o mesmo tampão utilizado na etapa de lise é lentamente introduzido no sistema, retirando, assim, a uréia de toda a amostra antes da eluição. O tampão de eluição (20 mM fosfato de sódio; 500 mM NaCl; 500 mM imidazol; pH 7,4) foi aplicado na coluna em gradiente linear para obtenção da PMEr-cor. As frações purificadas foram analisadas por SDS-PAGE 15%

#### 4.3. CARACTERIZAÇÃO DA PMEr-cor

A reatividade antigênica da PMEr-cor foi determinada frente a diferentes anticorpos pelas técnicas de ELISA e *Western Blot*. Placas de ELISA (Corning) de 96 poços foram sensibilizadas com 100 µL por poço da PMEr-cor em uma concentração de 0,5 µg por poço em tampão carbonato (15 mM de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>; 35 mM de NaHCO<sub>3</sub>; pH da solução 9,6) e incubadas *overnight* a 4°C. As placas foram lavadas três vezes com solução de lavagem para ELISA (0,15 M de NaCl e 0,05% de Tween 20). Em seguida, as placas foram bloqueadas com 100 µl de solução de bloqueio (3% de leite em pó em tampão PBS 1X) e incubadas a 37 °C por 1 hora. Após 3 lavagens, a placa foi

incubada a 37 °C por 1 hora com as amostras dos soros: SAEL, proveniente da Fundação Ezequiel Dias ou do Instituto Butantan; soro  $\alpha$ -peptídeos produzidos por Castro *et al.* (2015), soros  $\alpha$ -*M. frontalis* e  $\alpha$ -*M. corallinus*, proveniente de trabalhos anteriores do grupo, soro pré-imune ou anticorpo monoclonal  $\alpha$ -his tag ProteinTech®, que serviram como controle negativo e positivo do ensaio, respectivamente. Os soros foram testados em diluição de 1:50 diluídos em tampão de incubação (0,1% de leite em pó em PBS e 0,05% de Tween 20). As placas foram lavadas 3 vezes com solução de lavagem e incubadas a 37°C por 1 hora com anticorpo  $\alpha$ -IgG de coelho (Sigma) ou  $\alpha$ -IgG de cavalo (Bethyl) conjugado a peroxidase e diluídos a 1:5.000 e 1:10.000, respectivamente, em tampão de incubação. As placas foram novamente lavadas 3 vezes e em seguida adicionado 100  $\mu$ l por poço de solução de substrato (SigmaFast OPD). A placa foi deixada 30 minutos abrigada da luz e a reação foi interrompida com 20  $\mu$ l por poço de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> diluído 1:20. Os valores de absorbância foram determinados no comprimento de onda de 492 nm em leitor Espectrofotômetro de Microplacas Multiskan Sky Thermo Scientific. Todas as amostras foram testadas em duplicata e em ao menos dois ensaios independentes. Os resultados foram expressos como médias e as barras de erro indicam o desvio padrão dos valores obtidos.

#### **4.4. PRODUÇÃO DE ANTICORPOS**

##### **4.4.1. ANIMAIS, SOROS E VENENOS**

Seis coelhos fêmeas albinos da raça Nova Zelândia com 4 meses de vida e pesando entre 1,8 a 2,2 kg foram mantidos no Biotério do Serviço de Controle Biológico da Fundação Ezequiel Dias. O protocolo de experimentação animal foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Fundação Ezequiel Dias, registrado sob o número CEUA 002/2021. O número de acesso do Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen) utilizado no trabalho é AF9579F.

Os venenos de *M. corallinus*, *M. frontalis* e *M. lemniscatus* foram cedidos gentilmente pelo Serviço de Animais Peçonhentos da Fundação Ezequiel Dias. Os venenos de *M. spixii*, *M. surinamensis*, *M. averyi* e *M. hemprichii* fazem parte do acervo de venenos ofídicos do Laboratório de Imunoquímica da UFMG. Todos os venenos foram ressuspensos em água ultrapura Milli-Q® IQ7003, aliquotados e etiquetados, dosados em relação ao seu conteúdo proteico utilizando o kit DC Protein

Assay ® (Biorad) e armazenados ao abrigo de luz em ultra-freezer a -80 °C até o momento do uso.

Os soros  $\alpha$ -PMEr-cor,  $\alpha$ -PMEr-cor + MfV e  $\alpha$ -McV + MfV foram gerados a partir deste trabalho. Os soros  $\alpha$ -peptídeos de Castro *et al.* (2015),  $\alpha$ -*M. corallinus*,  $\alpha$ -*M. frontalis* e soro Antielapídico Butantan fazem parte do acervo de soros antiofídicos do Laboratório de Imunoquímica da UFMG e foram devidamente aliquotados e identificados, sendo armazenados a -20°C em abrigo da luz. O Soro Antielapídico FUNED foi cedido gentilmente pela Diretoria Industrial da FUNED, sendo aliquotado, rotulado e armazenado a 4 °C até seu uso.

#### 4.4.2. IMUNIZAÇÕES

Foram definidos três grupos experimentais com dois indivíduos cada. O primeiro grupo de animais, chamado grupo PMEer-cor, recebeu como imunógeno a PMEer-cor para caracterização de seu potencial imunogênico; o segundo grupo, chamado Grupo PMEer-cor + MfV, foi imunizado com a PMEer-cor substituindo a peçonha de *M. corallinus*, acrescida do veneno de *M. frontalis*; e o terceiro grupo foi chamado de McV + MfV e foram administrados os venenos brutos das serpentes *M. corallinus* (McV) e *M. frontalis* (MfV), simulando a produção do SAEL, como controle. O grupo que recebeu apenas a PMEer-cor recebeu 100  $\mu$ g do imunógeno por dose. O grupo PMEer-cor + MfV recebeu 50  $\mu$ g da PMEer-cor + 50  $\mu$ g de veneno de *M. frontalis* por dose. O grupo McV + MfV recebeu 50  $\mu$ g de cada veneno por dose.

Cada grupo de animais experimentais receberau o imunógeno estipulado em ciclos de imunizações, de acordo com o protocolo utilizado pela FUNED para produção do soro antielapídico, que consistiam em:

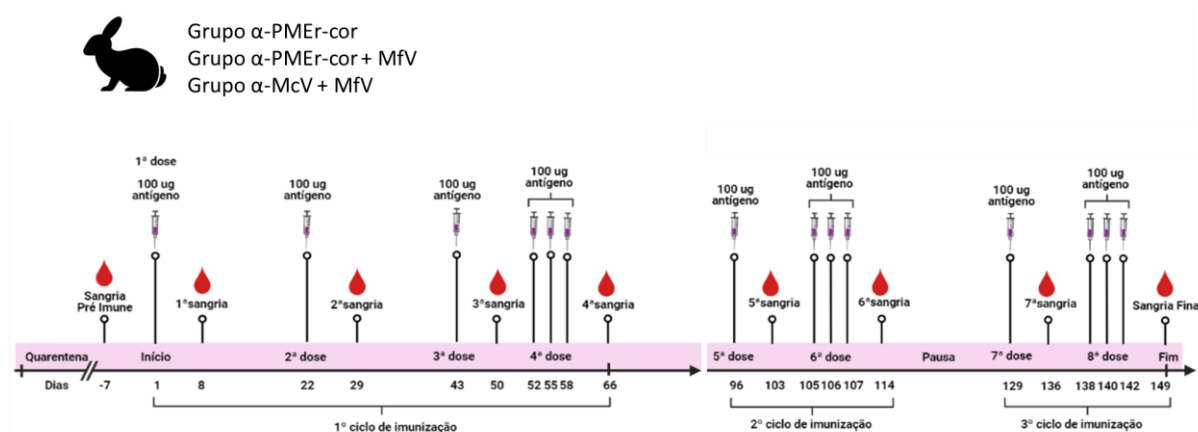
- O primeiro ciclo possui 4 doses de imunização em intervalos quinzenais, sendo que cada dose contém 100  $\mu$ g do imunógeno específico de cada grupo emulsificado em Montanide ISA™50, sendo a última dose, por sua vez, fracionada em 3 aplicações em dias intercalados contendo 30  $\mu$ g do imunógeno diluído em PBS 1X.
- Após cada dose de imunização, foi feita uma pequena sangria para avaliar a resposta imune gerada, através do lancetamento da veia marginal auricular dos



animais. Ao final do primeiro ciclo, se a resposta gerada não fosse atingida, se realizaria um novo ciclo de imunização, composto apenas por uma imunização com 100 µg de imunógeno emulsificado em Montanide ISA™50, seguida após 15 dias de 3 aplicações fracionadas de 30 µg do imunógeno diluído em PBS 1X.

Ao todo, foram utilizados 1 ciclo de imunização de base e mais dois ciclos de imunizações de reforço (Figura 10). Ao final do esquema de imunizações, todos os animais foram submetidos a sangria final para obtenção de sangue em tubo com ativador de coágulo por punção cardíaca após anestesia. A seguir, o sangue foi centrifugado à 4000 RPM a temperatura ambiente para obtenção do soro. O soro foi alíquotado, etiquetado e armazenado à 4°C até o momento do uso.

**Figura 10. Calendários de imunizações.** O esquema de imunização utilizado no trabalho seguiu o mesmo esquema convencional utilizado nos cavalos da produção do SAEL na Fundação Ezequiel Dias.



Fonte: Elaborado pelo Autor, 2023.

## 4.5. CARACTERIZAÇÃO DOS ANTICORPOS GERADOS

### 4.5.1. ELISA INDIRETO

Placas de ELISA Nunc Maxisorp de 96 poços foram sensibilizadas com 100 µL por poço com os venenos de *M. corallinus*, *M. frontalis* e a PMER-cor purificada, respectivamente, em concentração de 0,5 µg por poço (5 µg/mL) em tampão carbonato (15 mM de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>; 35 mM de NaHCO<sub>3</sub>; pH da solução 9,6) e incubados por cerca de 16 horas a 4°C. Em seguida, as placas foram bloqueadas com 100 µl de solução de bloqueio (3% de leite em pó em tampão salina fosfato-PBS) e incubadas a 37 °C por 1 hora. Após 3 lavagens com solução de lavagem, a placa foi incubada a

37 °C por 1 hora com as amostras dos soros produzidos em coelho:  $\alpha$ -PMEr-cor,  $\alpha$ -PMEr-cor + MfV ou  $\alpha$ -McV + MfV, respectivamente. Os soros foram testados em diluição de 1:1000, em tampão de incubação (0,1% de leite em pó em PBS e 0,05% de Tween 20). As placas foram lavadas 3 vezes e incubadas a 37 °C por 1 hora com anticorpo  $\alpha$ -IgG de coelho conjugado a peroxidase e diluído a 1:5.000, em tampão de incubação. As placas foram novamente lavadas 3 vezes e em seguida adicionado 100  $\mu$ l por poço de solução de substrato (SigmaFast OPD tablet - Sigma). A placa foi deixada 30 minutos abrigada da luz e a reação foi interrompida com 25  $\mu$ l por poço de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> diluído 1:20. Os valores de absorbância foram determinados no comprimento de onda de 492 nm em leitor Espectrofotômetro de Microplacas Multiskan Sky Thermo Scientific. Todas as amostras foram testadas em duplicata e foram realizados dois ensaios independentes. Os resultados foram expressos como médias e as barras de erro representam o desvio padrão dos valores obtidos.

#### **4.5.2. WESTERN BLOT**

As amostras contendo a PMEer-cor ou os venenos de *Micrurus spp* disponíveis no acervo do LABIMQ foram submetidos à SDS-PAGE conforme descrito no item 4.2.4.1 e em seguida transferidas para membrana de nitrocelulose 0,45  $\mu$ m Milipore, sob corrente de 24 V por cerca de 16 horas em tampão de transferência (Tris-base 250 mM, Glicina 1,92 M e água destilada q.s.p 500 mL). A seguir, a corrente foi alterada para 48 V por 1 hora para término da migração das amostras. Após, a membrana foi corada com corante Ponceau 1X para visualização das bandas transferidas. A seguir, a membrana foi cortada e acondicionada em recipientes individuais para testes dos diferentes soros.

A membrana foi bloqueada por 1h em solução de bloqueio (5% de leite em pó em tampão salina fosfato). A membrana foi lavada três vezes em PBS contendo 0,05% de Tween 20 por 5 minutos e incubada por uma hora em temperatura ambiente com as amostras de soros testadas em diluição de 1:100 em tampão de incubação (0,1% de leite em pó em PBS e 0,05% de Tween 20). A seguir, a membrana foi novamente lavada três vezes por 5 minutos, como anteriormente mencionado e adicionou-se o anticorpo  $\alpha$ -IgG de coelho conjugado a peroxidase e diluído a 1:5.000 em tampão de incubação por uma hora a temperatura ambiente. Após três lavagens de 5 minutos com 0,05% tween 20 a reação foi revelada pela adição de tablete com

diaminobenzidina (DAB) e 0,5 mg/mL de 4-cloronaftol, 10% de metanol e 0,042% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30%.

### **4.5.3. IMUNOENSAIO DE SPOT**

#### **4.5.3.1. MEMBRANAS**

Os epítomos selecionados que compõem a PMEr-cor foram sintetizados isoladamente em membrana de celulose, assim como foi sintetizada toda a sequência da PMEr-cor utilizando o aparelho de síntese automática ResPep SL (IntavisAG, Bioanalytical Instruments, Alemanha) seguindo o protocolo descrito por Laune *et al.* (2002). A síntese foi realizada pelo Prof. Dr. Ricardo Andrez Machado de Ávila, do Laboratório de Fisiopatologia Experimental da Universidade do Extremo Sul Catarinense (UNESC).

#### **4.5.3.2. IMUNOENSAIOS**

A imunodeteção dos anticorpos frente às membranas de SPOT construídas foi realizada pela metodologia de Laune *et al.* (2002) modificada. Previamente, as membranas contendo os peptídeos foram lavadas três vezes com TBS 1X pH 7.4 e incubadas por 16 horas em solução de bloqueio contendo 1 g de sacarose, 1,5 g de BSA em solução TBS 1X à temperatura ambiente. Após o bloqueio, as membranas foram lavadas três vezes com solução de TBS 1X contendo 0,05% de Tween 20 por 5 minutos e incubadas com os soros de interesse, por 90 minutos à temperatura ambiente na diluição 1:200 em solução de bloqueio. Posteriormente, três lavagens foram realizadas conforme descrito acima e o anticorpo  $\alpha$ -IgG de coelho conjugado à fosfatase alcalina foi adicionado em diluição 1:10.000 em tampão de bloqueio e mantido sob agitação por 60 minutos à temperatura ambiente. Foram realizadas duas lavagens com TBS/Tween 20 e outras duas lavagens subsequentes com CBS pH 7,0 por 10 minutos, respectivamente. Por fim, sob agitação constante, à temperatura ambiente, foi adicionado o substrato (MTT-BCIP, Sigma), durante 30 minutos, para revelação. Ao final dos ensaios, as membranas foram documentadas e, em seguida, submetidas a um tratamento de regeneração, para sua posterior reutilização. As membranas foram tratadas, respectivamente, com dimetilformamida (DMF), água Milli-Q®, reagente A (uréia 8M, 1% de SDS, 0.1% de 2-mercaptoetanol), reagente B (etanol/água/ácido acético nas proporções 50:40:10 vol/vol/vol), e metanol. Todas as

etapas citadas foram feitas três vezes durante 10 minutos. Ao final, a membrana seca foi armazenada à -20 °C ao abrigo da luz.

#### **4.5.3.3. ANÁLISE**

Após a adição da solução de MTT-BCIP, os *spots* reativos, ou seja, aqueles onde houve o reconhecimento pelos anticorpos frente aos peptídeos sintetizados na membrana, formam precipitados azulados. Onde não há o reconhecimento por parte dos anticorpos, o *spot* mantém-se incolor ou em leves cores de marrom. Após secas, as membranas são fotografadas e catalogadas para posterior análise utilizando o *software* ImageJ, quantificando o número de *pixels* por área determinada.

### **4.6. ATIVIDADE FOSFOLIPÁSICA**

#### **4.6.1. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE FOSFOLIPÁSICA *IN VITRO***

Para determinar a atividade fosfolipásica A<sub>2</sub> dos venenos de *Micrurus spp in vitro*, foi utilizado o protocolo de Marinetti (1965). Foi feita uma curva utilizando diferentes concentrações de cada veneno testado, para determinar a menor quantidade de veneno que degradasse os complexos de lecitina presentes na gema de ovo. Para isso, os venenos foram diluídos em solução salina 0,9% v/v e aplicados em placas de ELISA (Corning) 96 poços com fundo reto no volume final de 100 µl. Após, foi adicionado 100 µl de solução de emulsão de gema de ovo 2% em salina v/v e as placas foram imediatamente incubadas a 42 °C sob agitação no Thermo Scientific™ Multiskan SkyHigh Microplat Spectrophotometer. O ensaio durou 15 minutos com intervalo de leituras de 5 em 5 minutos para avaliar a degradação da emulsão de gema de ovo. Após, foi plotado um gráfico XY para determinar a linearidade da variação da velocidade máxima da enzima para escolha da menor concentração de veneno a ser utilizada.

#### **4.6.2. ENSAIO DE INIBIÇÃO DA ATIVIDADE FOSFOLIPÁSICA COM OS ANTICORPOS PRODUZIDOS**

Para a inibição da atividade fosfolipásica, foi adicionado às placas de ELISA (Corning) de 96 poços de fundo reto os venenos de *Micrurus spp* na concentração previamente definida, diluídos em 50 µL de solução salina 0,9% v/v. A seguir, foi adicionado o soro de interesse em diluição 1:10 no volume final de 100 µl por poço.

As placas foram então incubadas à 37 °C em estufa sob agitação por 60 minutos. Após, foi adicionado 100 µl de solução de emulsão de gema de ovo 2% v/v e as placas foram imediatamente incubadas à 42 °C sob agitação no Thermo Scientific™ Multiskan SkyHigh Microplate Spectrophotometer. O ensaio durou 30 minutos com intervalo de leituras de 5 em 5 minutos para avaliar a degradação da emulsão de gema de ovo. Os ensaios foram realizados em duplicatas e os resultados obtidos foram avaliados utilizando o *software* GraphPad Prism versão 8.0.

## 4.7. ATIVIDADE LETAL

### 4.7.1. DETERMINAÇÃO DA DL<sub>50</sub>

Para definir a DL<sub>50</sub> dos venenos de *M. corallinus* e *M. frontalis*, foram utilizados camundongos Swiss pesando entre 18 a 22 g com idade entre 6 a 8 semanas. Para determinar a DL<sub>50</sub>, foram feitos ensaios exploratórios com intervalos de doses de acordo com a literatura. Após a definição do intervalo, foram calculadas doses crescentes pela multiplicação da dose inicial estabelecida por um fator de 1,2. Os camundongos foram injetados por via intraperitoneal com 500 µL de uma solução contendo a dose de veneno de *M. corallinus* ou de *M. frontalis* estipulada em PBS-BSA 0.1%. A mortalidade dos animais foi contabilizada após 48 horas. A DL<sub>50</sub> foi definida de acordo com análise de Probitos.

### 4.7.2. ENSAIO DE NEUTRALIZAÇÃO DA ATIVIDADE LETAL COM OS ANTICORPOS PRODUZIDOS

Para verificar o potencial dos anticorpos produzidos em neutralizar a letalidade causada pelo veneno de *M. corallinus* e *M. frontalis*, foram estabelecidos grupos com quatro camundongos cada. Foram feitos 5 grupos, totalizando em 20 animais para cada veneno, contabilizando 40 animais para os dois ensaios. Os camundongos foram desafiados com quantidades de veneno equivalentes a 3 DL<sub>50</sub> (*M. corallinus* = 53,52 µg/animal e *M. frontalis* = 168,15 µg/animal), organizados em seis grupos com quatro animais cada, sendo eles:

- Grupo 1: recebeu o soro α-PMEr-cor
- Grupo 2: recebeu o soro α-PMEr-cor + MfV
- Grupo 3: recebeu o soro α-McV + MfV
- Grupo 4: recebeu o SAEL

- Grupo 5: recebeu o soro Pré-Imune
- Grupo 6: recebeu somente PBS

Para cada grupo, a concentração de veneno corresponde a 3 DL<sub>50</sub> foi diluída em PBS 1X - BSA 0,1% e acrescido de 400 uL de cada soro listado acima. O volume final injetado via intraperitoneal foi de 500 uL.

## 5. RESULTADOS

### 5.1. SELEÇÃO DE SEQUÊNCIAS A SEREM MAPEADAS

A partir de estudos publicados que descrevem análises transcriptômicas (Leão et al., 2009; Aird et al. 2017) e proteômicas (Corrêa-Neto et al., 2011), novas sequências de toxinas não contempladas pelo mapeamento experimental feito por Castro *et al.* (2015) foram selecionadas. A partir disso, compreendeu-se a oportunidade de prever novos epítomos que poderiam contribuir para melhorar a resposta produzida nos trabalhos anteriores, a fim de aumentar e melhor representar a diversidade de epítomos de toxinas 3FTx e PLA<sub>2</sub> do veneno desta serpente.

Para isso, as sequências completas descritas para cada classe de toxina obtidas nos trabalhos referenciados acima foram alinhadas entre si utilizando o programa ClustalOmega (Sievers et al., 2011) e analisadas quanto à sua similaridade. Tratando-se inicialmente das 3FTx, com base nos estudos dos transcritos de *Leão et al.* (2009) e de Aird *et al.* (2017) e na presença dessas toxinas contidas no veneno de *M. corallinus* através dos estudos proteômicos de Correia-Neto *et al.* (2011) (destacados com uma estrela vermelha na Figura 11), as toxinas Mcor0599, Mcor0543, Mcor0100, Mcor0039, Mcor0120, Mcor0092, Mcor0094, Mcor0604, Mcor0118 e Mcor0109 seriam as escolhidas para representarem a maior diversidade de sequências no veneno de *M. corallinus*, e também por essas toxinas serem validadas no trabalho de Corrêa-Neto *et al.* (2011).

As toxinas Mcor0100, Mcor599, Mcor0039 e Mcor0604 já haviam sido mapeadas por Castro *et al.* (2015). As toxinas Mcor0543 e Mcor0118 por serem muito similares a toxinas que já haviam sido mapeadas no trabalho anteriormente citado, foram eliminadas. Por fim, as novas sequências escolhidas para serem mapeadas *in silico* foram as sequências Mcor0120, Mcor0092, Mcor0094 e Mcor0109, destacadas nos retângulos vermelhos na figura 11.

**Figura 11. Alinhamento das seqüências de toxinas 3FTx de *M. corallinus* para escolha do mapeamento epitópico.** Em negrito, as toxinas mapeadas por Castro *et al.* (2015); a estrela vermelha representa a presença da toxina no estudo proteômico de Corrêa-Netto *et al.* (2011) e os retângulos vermelhos destacam as toxinas escolhidas para serem mapeadas.

```

MCOR0483  IVCYKRR--HASDSQTTTCL--SGI-CYKKITR----GSSRPEMGC--GCPQSSRGVKVDCCMRDKNG----
★MCOR0599  IVCYK-R--HASDSQTTTCL--SGI-CYKKITR----GSSRPEMGC--GCPQSSRGVKVDCCMRDKNG----
★MCOR0543  IVCYK-R--HASDSQTTTCL--SGI-CYKKITR----GISRPEMGC--GCPQSSRGVKVECCMRDKNG----
MCOR0598  IVCYK-R--HASDSQTTTCL--SGI-CYKKITR----GSSRPEMGC--GCPQSSRGVKVECCMRDKNG----
MCOR0117  IICYK-R--HASDSQTKTCL--SGI-CYKKYTR----GRYNPEMGC--GCPQSGRGVDVDCMRDKNG----
MCOR0444  IICYK-R--HASDSQTKTCL--SGICCYKKYTR----GRYNPEMGC--GCPQSGRGVDVDCMRDKNG----
★MCOR0100  LVCYTNV--LEPPGTLETCP--DDFTCVKKWEG----GGRRVTQYCSHACAI PASYEFVHCCQTDKNG----
MCOR0039  TKCLTKF--SPGLQTSQTC--PAGQKICFKKWKK----G-EKVSRCGAVTQPKPKKDETIQCCTKNNQNR----
★MCOR0120  LICLTHK--SAVFETTETCLPGLHKVCYKRWYM----G-SSVDAGCADTQPRNFPLEIVECCATDKQNR----
★MCOR0092  LICYNTM-----MOKVTC--PEGKDKCEKYAVP-VMRGKFFYSYOCSTSKCHE---GAYDVCCSTDLCNKSTG
DN34418  LICYVSM-----EGAKMTC--PEGKDLCEKYAVSYFHTGSIYFRWESSECHG---GIYNVCCSTDLCNHIPKSG
★MCOR0094  LFCDNSN--VPSIRTRKRC--LKNOKLCYKMTFFTPGFEGWTO-IKGCIHRCPSTPNEKYCCSTDNCI-----
MCOR0496  LECKICNFKTCPTDELRRH--ASGETICYKTFWNT-HRGLREIDRGAATQPTVKPGVNIICCKTDNQN-----
MCOR0152  LNKICNFKTCPTDELRRH--ASGETICYKTFWNT-HRGLR-IDRGAATQPTVKPGVNIICCKTDNQN-----
★MCOR0604  LECKICNFKTCPTDELRRH--ASGETICYKTFWNT-HRGLR-IDRGAATQPTVKPGVNIICCKTDNQN-----
MCOR0118  LECKICNFKTCPTDELRRH--ASGETICYKTFWNT-HRGLR-IDRGAATQPTVKPGVNIICCKTDNQN-----
MCOR0103  RKCYE----GEGTRKSVTC--PKGEKVCYTI FLVGPSPHPAKVLKWGCAASC PKVGLGARISCCSKDNQNSHR--
MCOR0105  RKCRI----GKDG FYSVTC--TEKENLCFTMFSA--RSPTQIIERGCASSCSS---RYMKCCSTDSCNG----
MCOR0109  LCCYV----GRDGFKEVTC--PEGENHCYTTAIT--ARPTYVIVRGCISSCSW----YYIKCCTTDCND----

```

\* \* \* \* \*

Fonte: Elaborado pelo Autor, 2023.

Este mesmo processo de seleção das seqüências de toxinas foi realizado para as PLA<sub>2</sub>, provenientes do trabalho de Aird. *et al.* (2017) e Leão *et al.* (2009) sendo classificadas em 4 clases de toxinas: hemotóxicas, muscarínicas, neurotóxicas e miotóxicas. Os grupos diferem na presença de cisteínas em sua composição e na sua função inferida. As seqüências disponíveis foram alinhadas utilizando o programa ClustalOmega (Sievers *et al.*, 2011) e analisadas quanto à sua similaridade. Somente uma seqüência de toxina PLA<sub>2</sub> de classe miotóxica havia sido mapeado por Castro *et al.* (2015), destacado em negrito na Figura 12. Portanto, como essa classe de toxina já havia sido contemplada, nenhuma outra seqüência desta classe foi escolhida para ser mapeada. Para melhor representar a diversidade de PLA<sub>2</sub>s do veneno de *M. corallinus*, foi selecionada a seqüência mais completa das outras classes de toxinas descrita por Aird *et al.* (2017).

Dessa forma, foram escolhidas as seqüências DN50226\_c0\_g1\_i2|m.42791, DN88788\_c3\_g4\_i1|m.55706 e DN88788\_c3\_g1\_i1|m.55704, classificadas como hemotóxica, muscarínica, neurotóxica, respectivamente, destacadas nos retângulos vermelhos na figura 12, que foram mapeadas *in silico* em busca de epítomos.

**Figura 12. Alinhamento das sequências de toxinas PLA<sub>2</sub> de *M. corallinus* para escolha do mapeamento epitópico.** Em negrito, a toxina mapeada por Castro *et al.* (2015); e os retângulos vermelhos destacam as toxinas escolhidas para serem mapeadas.

```

DN50226_c0_q1_i1|m.42790 -----NTRP--WVNFADYGYNYGGNSTAVDQLDRCCQTHYNYGSOAKDNPAKPIWDSPIVKSYSYTS--GGSLLTKDDNDEGALVWINDRSAAIIFAGAPFTEENYMEP---
H-DN50226_c0_q1_i2|m.42791 -----NTRP--WVNFADYGYNYGGNSTAVDQLDRCCQTHYNYGSOAKDNPAKPIWDSPIVKSYSYTS--GGLLTKGDNDEGAFVWINDRSAAIIFAGAPYNEONKGLDITE--
DN88514_c0_g1_i1|m.56880 TIHQFRMIECTNTRP--WVNFADYGYNYGGNSTAVDQLDRCCQTHYNYGSOAKDNPAKPIWDS-----
DN88514_c0_q2_i1|m.56881 TIHQFRMIECTNTRP--WVNFADYGYNYGGNSTAVDQLDRCCQTHYNYGSOAKDNPAKPIWDS-----
Mu-DN88788_c3_q4_i1|m.55706 TRYQFRMIECTANIRG--WVDFEYGYNYGSGGSTPVDELDRCCQAHNDNYEAEKVHGVKPLV----TFYLVDIT--GGKLTGKGNKTKQAFVWINDRVAANIIFAAPVNOBNVKGITON--
N-DN88788_c3_q1_i1|m.55704 NLYQFRMIECTNDQV--WSDYVYGYNYGSGGSTPVDELDRCCQAHNDNYEAEKVHGVKPLV----MFYSFERYLASDLESGNNTKGRNFVWINDRTATLIIILAAATYNNRNNHKIDPSEKQ
DN88788_c3_g4_i2|m.55708 TRYQFRMIECTANIRG--WVDFEYGYNYGSGGSTPVDELDRCCQAHNDNYEAEKVHGVKPLV----MFYSFERYLASDLESGNNTKGRNFVWINDRTATLIIILAAATYNNRNNHKIDPSEKQ
Q8AXW7 NLYQFRMIECTTRRS--AWDFNYGYNYGAGGSGT PVDELDRCCQVHDDYGAEEKYHRGSPKL----TLYTSTISSQTGSVTKDNGTKKAFVWINDRTAALIFGRAPYNNKNNINPNRER
DN94431_c13_g1_i1|m.27840 NLYQFRMIECTTRRY--AWDFNYGYNYGAGGSGT PVDELDRCCQVHDDYGAEEKYHRGSPKL----TLYTSTISSQTGSVTKDNGTKKAFVWINDRTAALIFGRAPYNNKNNINPNRER
M-DN88788_c3_g2_i1|m.55705 NLYQFRMIECTTRRY--AWDFNYGYNYGAGGSGT PVDELDRCCQVHDDYGAEEKYHRGSPKL----TLYTSTISSQTGSVTKDNGTKKAFVWINDRTAALIFGRAPYNNKNNINPNRER
DN96981_c7_g8_i1|m.47661 HLYQLNMIECTNTRH--WMSFRNYGYNYGSGGST PVDELDRCCQVHDKYDTAKVHGVKPSL----TLYSYDTS-----
DN90462_c2_g17_i1|m.55608 -----TKRS--VLAAMDYGYNYGSGGSTPVDELDRCCQVHDDYGAEEKYHRGSPKW----TLYSYDTS--EGQLTRKNDTRKDFVWINDRTAALIFAKAPYNNKNNINPNRER
: :***** .. * **:*:*:*:*:..:.*. * * *

```

Fonte: Elaborado pelo Autor, 2023.

## 5.2. SELEÇÃO DOS EPÍTOPOS

Uma vez que todas as sequências de toxinas de 3FTx e PLA<sub>2</sub> de *M. corallinus* foram determinadas, cada toxina foi individualmente submetida à predição de epítomos utilizando-se as ferramentas bioinformáticas para epítomos lineares e conformacionais, listadas na tabela 2 do tópico 4.1.3 “Ferramentas de mapeamento de epítomos” disposto no Material e Métodos deste trabalho.

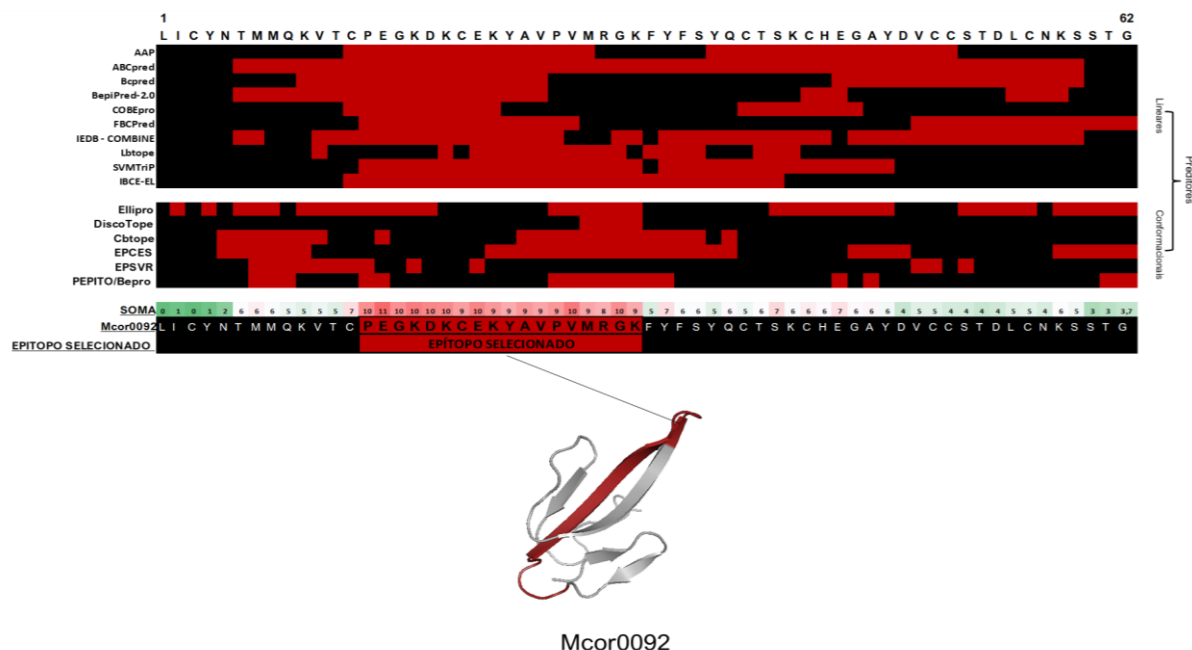
Para cada toxina submetida às ferramentas de predição, foi atribuído um valor de 0 para regiões não epitópicas (em preto, nas figuras abaixo), e 1 para regiões epitópicas (em vermelho, nas figuras abaixo), respectivamente, de acordo com os parâmetros de cada algoritmo.

Ao final das predições, foi feita a somatória de todos os valores atribuídos pelas ferramentas bioinformática em arquivo Excel. Para cada toxina selecionada, incluindo predições lineares e conformacionais, as regiões contemplando um espaço de 15 resíduos de aminoácidos com maior *score*, ou seja, aquelas que foram definidas como sequências epitópicas em mais predições, foram selecionadas para compor a PMEr-cor.

Uma vez localizada a região epitópica pelo *score*, as toxinas foram modeladas para visualização da sua estrutura tridimensional através do servidor I-TASSER, e os epítomos escolhidos foram ressaltados em vinho e em rosa claro, utilizando o programa PyMol, conforme destacado nas figuras abaixo:

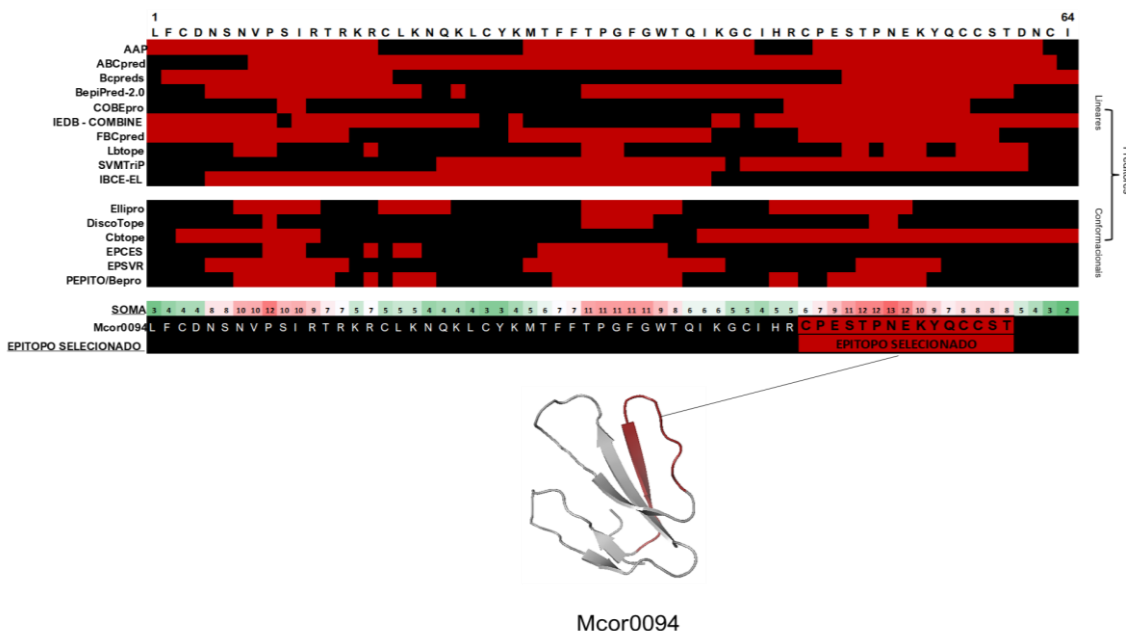


**Figura 13. Mapeamento epitópico da toxina 3FTx Mcor0092.** Em vermelho, destaca-se as regiões mapeadas por cada preditor linear e conformacional como possivelmente epitópica. Após somatória, a região com maior score foi definida como epítipo para compor a PMEr-cor.



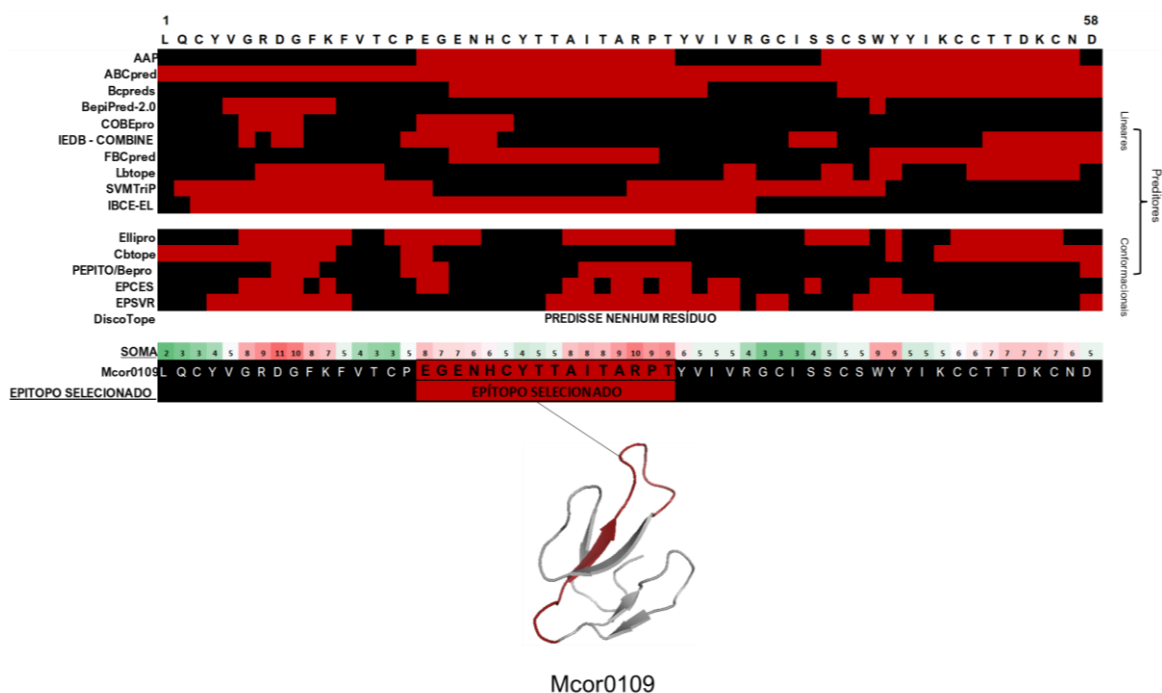
Fonte: Elaborado pelo Autor, 2023.

**Figura 14. Mapeamento epitópico da toxina 3FTx Mcor0094.** Em vermelho, destaca-se as regiões mapeadas por cada preditor linear e conformacional como possivelmente epitópica. Após somatória, a região com maior score foi definida como epítipo para compor a PMEr-cor.



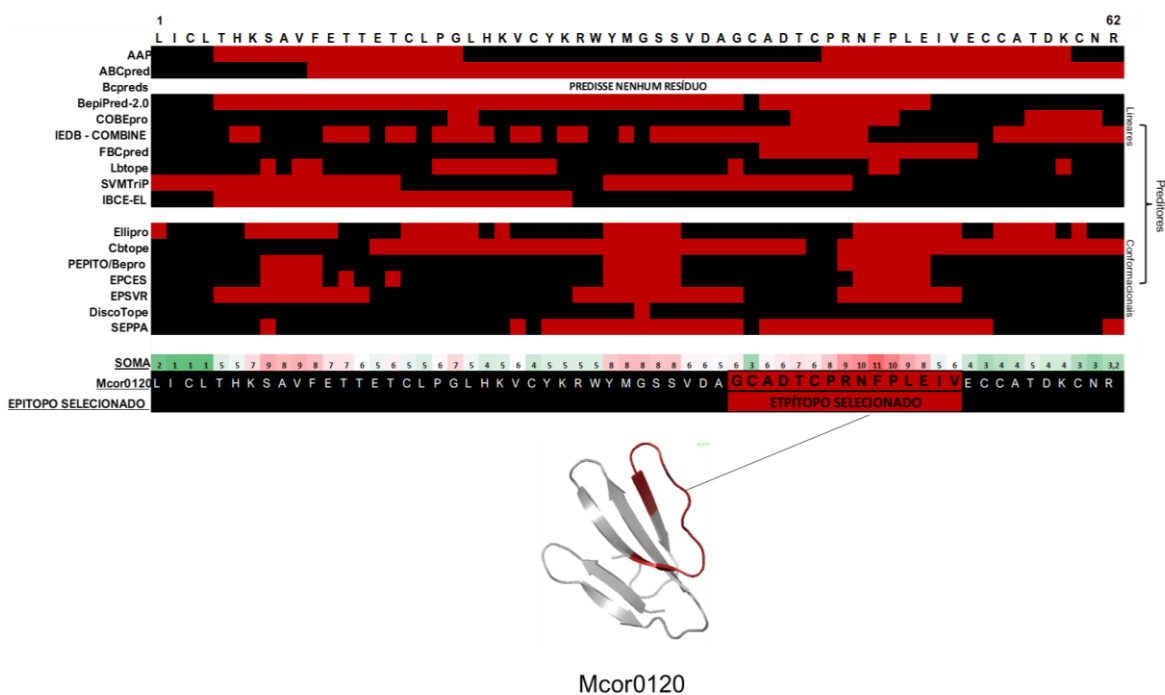
Fonte: Elaborado pelo Autor, 2023.

**Figura 15. Mapeamento epitópico da toxina 3FTx Mcor0109.** Em vermelho, destaca-se as regiões mapeadas por cada preditor linear e conformacional como possivelmente epitópica. Após somatória, a região com maior score foi definida como epítipo para compor a PMEr-cor.



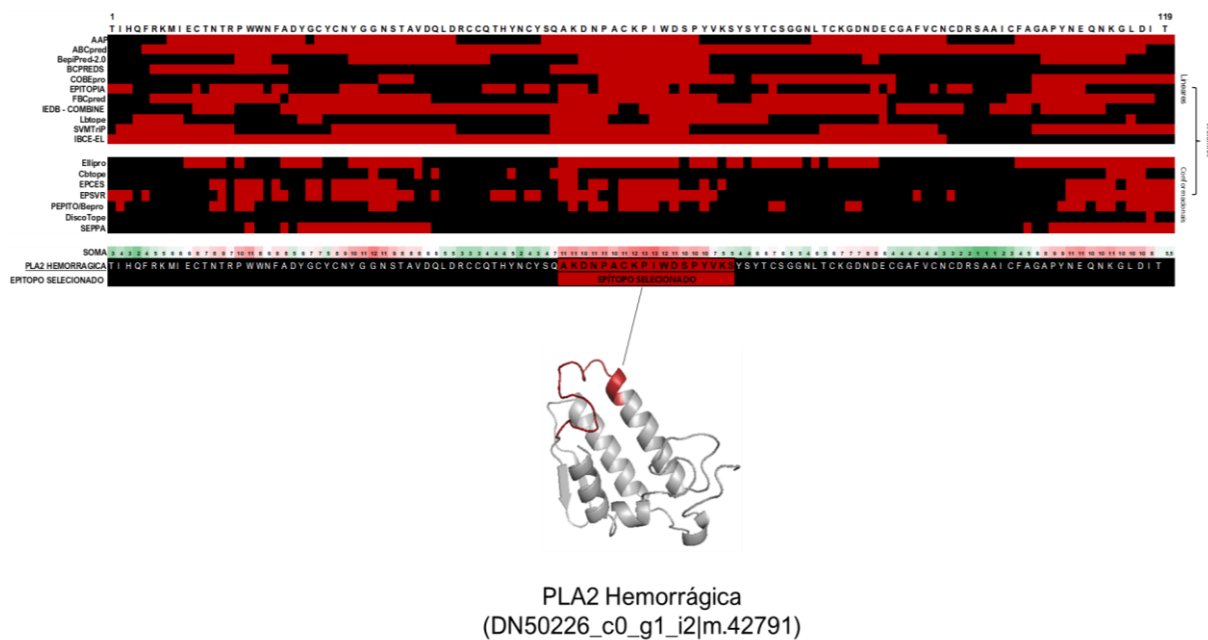
Fonte: Elaborado pelo Autor, 2023.

**Figura 16. Mapeamento epitópico da toxina 3FTx Mcor0120.** Em vermelho, destaca-se as regiões mapeadas por cada preditor linear e conformacional como possivelmente epitópica. Após somatória, a região com maior score foi definida como epítipo para compor a PMEr-cor.



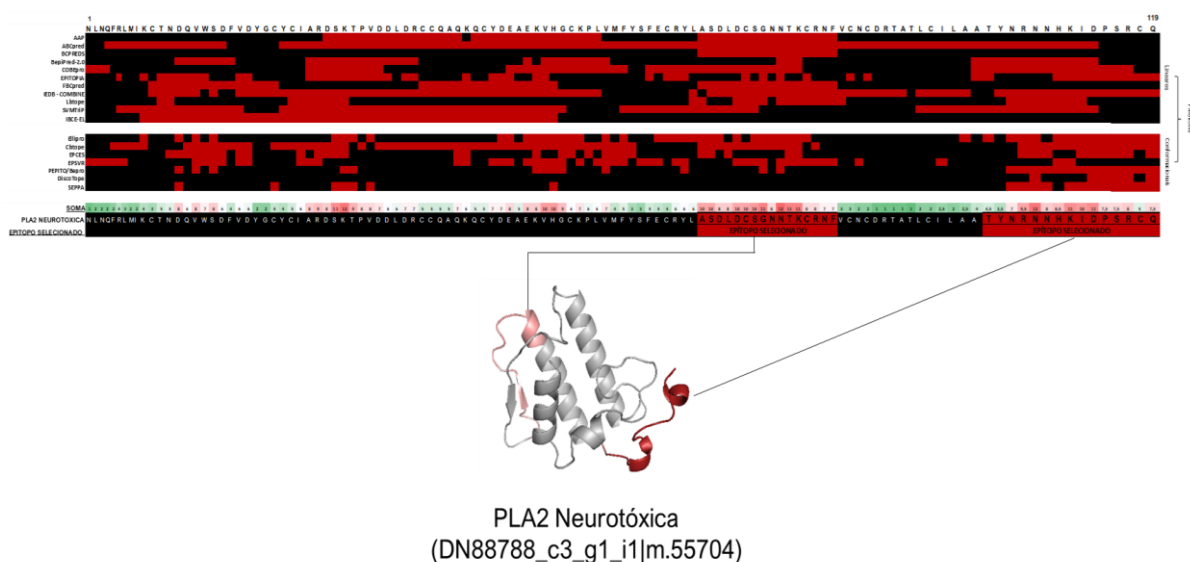
Fonte: Elaborado pelo Autor, 2023.

**Figura 17. Mapeamento epitópico da toxina PLA2 DN50226\_c0\_g1\_i2|m.42791.** Em vermelho, destaca-se as regiões mapeadas por cada preditor linear e conformacional como possivelmente epitópica. Após somatória, a região com maior score foi definida como epítipo para compor a PMEr-cor.



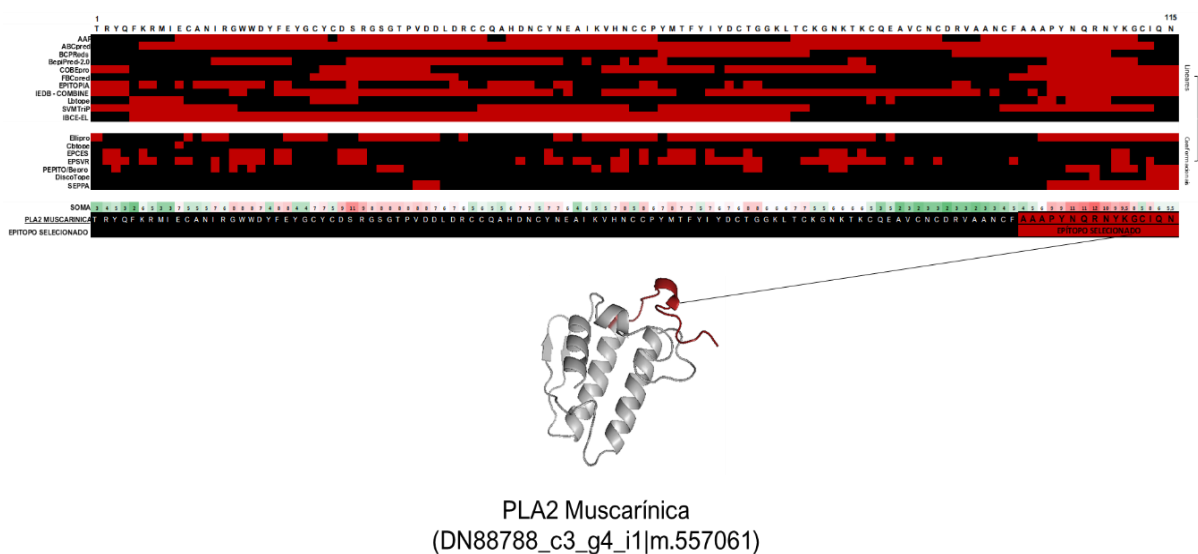
Fonte: Elaborado pelo Autor, 2023.

**Figura 18. Mapeamento epitópico da toxina PLA2 DN88788\_c3\_g1\_i1|m.55704.** Em vermelho, destaca-se as regiões mapeadas por cada preditor linear e conformacional como possivelmente epitópica. Após somatória, a região com maior score foi definida como epítipo para compor a PMEr-cor.



Fonte: Elaborado pelo Autor, 2023.

**Figura 19. Mapeamento epitópico da toxina PLA2 DN88788\_c3\_g1\_i1|m.557061.** Em vermelho, destaca-se as regiões mapeadas por cada preditor linear e conformacional como possivelmente epitópica. Após somatória, a região com maior score foi definida como epítipo para compor a PMEr-cor.

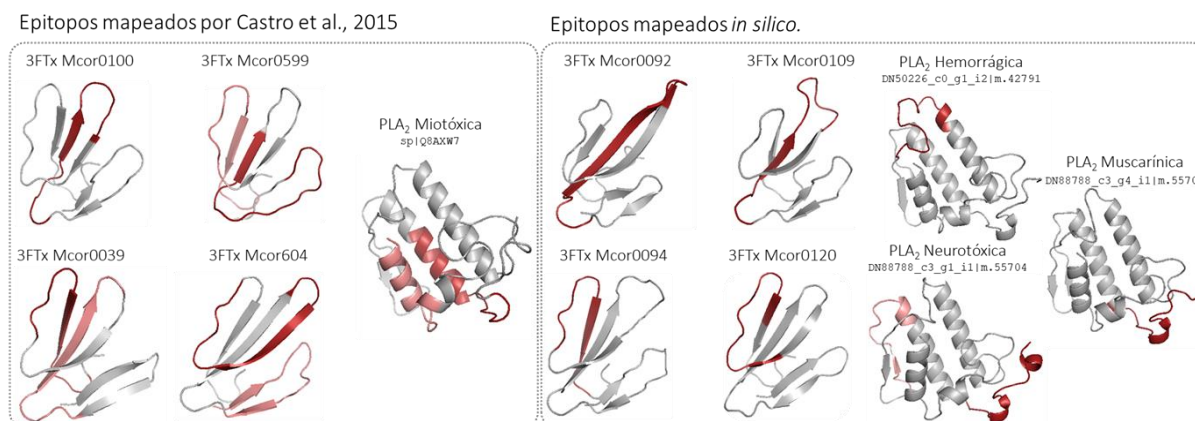


**Fonte:** Elaborado pelo Autor, 2023.

Para concluir todo o processo de seleção de epítipos, a PMEr-cor contou ainda com nove epítipos validados por Castro *et al.* (2015), conforme mostra a figura 20, acrescidos de mais oito epítipos mapeados *in silico* neste trabalho.

Ao total, a PMEr-cor possui 17 epítipos que possivelmente contemplam as principais toxinas do veneno de *M. corallinus*, com potencial a ser utilizada como um imunógeno alternativo.

**Figura 20. Toxinas 3FTx e PLA<sub>2</sub> do veneno de *M. corallinus*.** As toxinas escolhidas foram modeladas e os epítipos que constituem a PMEr-cor estão coloridos em vinho e rosa claro.

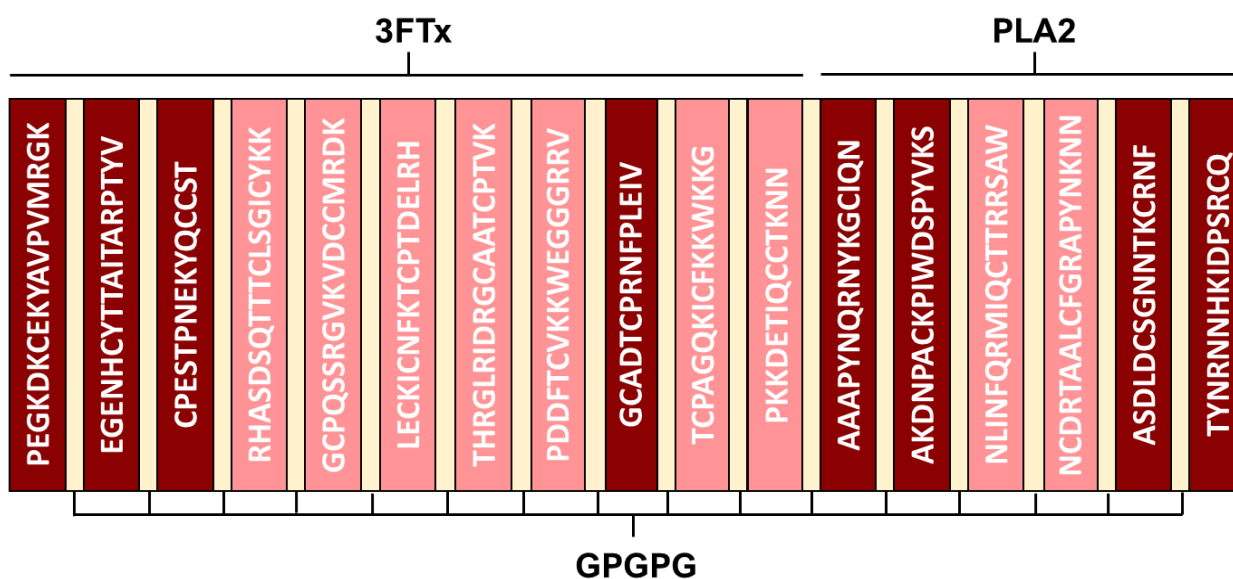


**Fonte:** Elaborado pelo Autor, 2023.

### 5.3. PRODUÇÃO DA PROTEÍNA MULTIEPITÓPICA RECOMBINANTE PARA REPRESENTAR O VENENO DE *MICRURUS CORALLINUS* (PMEr-cor)

Tendo em vista a seleção dos epítomos selecionados para compor a PMEer-cor, a ordem dos epítomos foi definida de acordo com parâmetros físico-químicos obtidos pela ferramenta Protparam do portal ExPASy e PepCalc, uma vez que diversos construtos foram analisados, intercalando os epítomos entre si para melhor dispô-los na PMEer-cor. Foi levado em consideração simultaneamente, a posição C-terminal e N-terminal de origem do epítomo na toxina da qual ele foi selecionado, uma vez que o resíduo N-terminal impacta diretamente na meia-vida prevista da proteína. A representação esquemática da PMEer-cor está representada na Figura 21, e os parâmetros físico-químicos para o melhor construto está demonstrado na tabela 3.

**Figura 21. Disposição dos epítomos no construto da PMEer-cor.** Em rosa, os epítomos validados por Castro *et al.* (2015) e em vinho os epítomos preditos. Unindo os epítomos, estão representados os espaçadores de glicina e prolina (GPGPG).



Fonte: Elaborado pelo Autor, 2023.

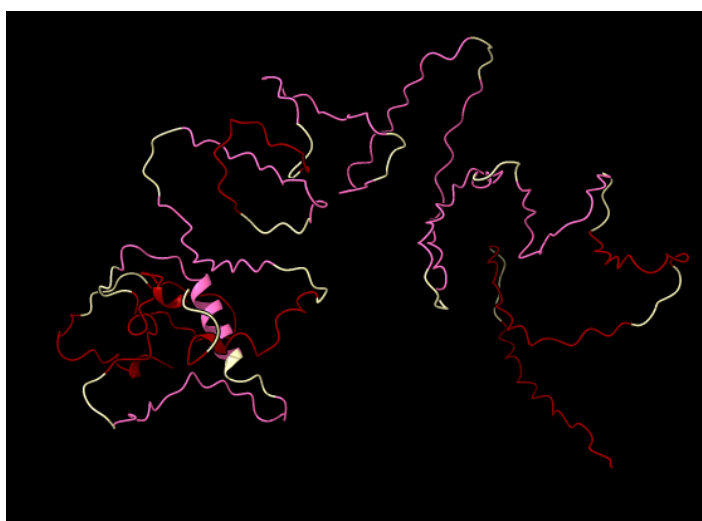
**Tabela 3. Parâmetros físico-químicos do estrutura da PMEr-cor.** As análises foram feitas através das ferramentas Protparam e PepCalc.

Análises Bioinformáticas	
<b>Análise PROTPARAM</b>	
Número de amino ácidos:	369
Peso molecular:	41402.13 g/mol
Ponto Isoelétrico teórico:	9.14
Meia-vida estimada:	> 20 horas (reticulócitos de mamíferos, in vitro)
	> 20 horas (levedura, in vitro)
	? (Eschericia coli, in vivo)
Índice de Estabilidade:	26.15 (Classificada como estável)
índice Alifático:	33.88
Índice de Hidropaticidade (GRAVY):	-0,874
<b>Análise PepCalc</b>	
Número de resíduos:	369
Peso molecular:	41402.13 g/mol
Coefficiente de extinção:	35560M-1cm-1
Ponto Isoelétrico teórico:	pH 8.61
Solubilidade estimada:	Boa solubilidade em água

**Fonte:** Elaborada pelo Autor.

De acordo com os resultados satisfatórios obtidos através dessas ferramentas, como meia vida, boa solubilidade e estabilidade, o chassi de expressão escolhido para a PMEr-cor foi bactérias *E. coli* BL21DE3 disponíveis no banco de células da Fundação Ezequiel Dias. A estrutura terciária da proteína foi predita pela ferramenta ColabFold, os epítomos selecionado foram destacados pelo *software* ChimeraX, conforme Figura 22.

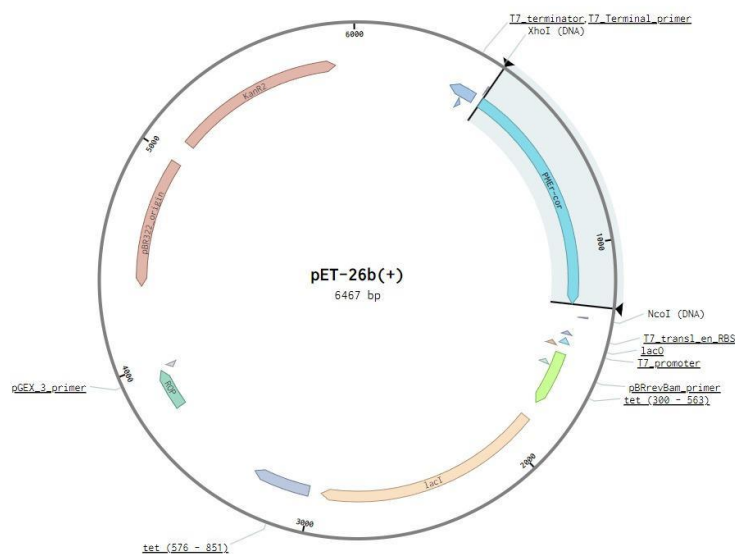
**Figura 22. PMEr-cor em sua estrutura terciária de acordo com o ColabFold.** Em rosa, os epítomos mapeadas por Castro *et al.* (2015); em vermelho as novas sequências epitópicas preditas e em bege os espaçadores de GPGPG.



**Fonte:** Elaborado pelo Autor, 2023.

A sequência do gene referente a PMEr-cor foi otimizada para expressão bacteriana, sintetizada e clonada em vetor pET 26-B, em NcoI – XhoI pela empresa GenScript. O mapa do vetor de expressão pode ser visualizado abaixo na Figura 23.

**Figura 23. Mapa do vetor pET-26b(+) com a sequência que codifica para a PMEr-cor.** O gene está inserido entre os sítios NcoI e XhoI, representado em azul.



**Fonte:** Elaborado pelo Autor, 2023.

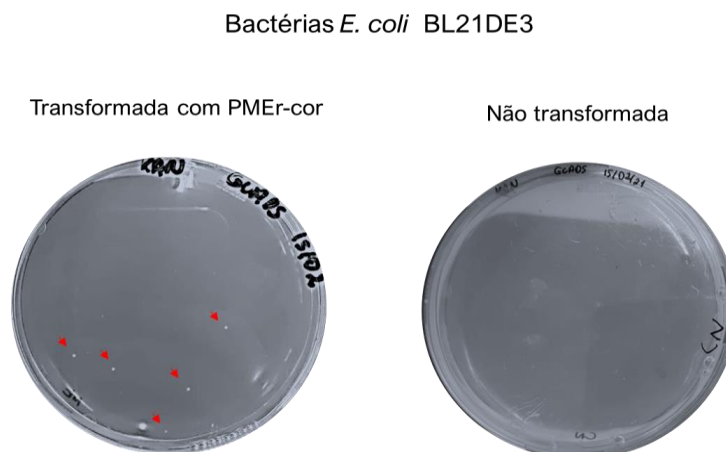
Bactérias *E. coli* BL21DE3 quimiocompetentes foram transformadas com o plasmídeo da PMEr-cor. Para verificar se o plasmídeo foi inserido na bactéria, todo o inóculo transformado foi semeado em placas de ágar-LB suplementado com antibiótico canamicina, uma vez que o plasmídeo inserido confere gene de resistência ao antibiótico citado, e caso a transformação tenha ocorrido de forma satisfatória, a bactéria crescerá no meio.

O mesmo não acontecerá no controle negativo, uma vez que as bactérias não foram transformadas, ou seja, não foi adicionado plasmídeo contendo o gene de resistência a canamicina, e, portanto, espera-se que elas não cresçam nas placas de ágar-LB suplementadas com canamicina por serem sensíveis ao antibiótico.

Isto posto, foi possível observar que cinco colônias isoladas cresceram na placa de bactérias transformadas com o plasmídeo da PMEr-cor (Figura 24), e que não

houve crescimento de colônias no controle negativo, corroborando para a satisfação do resultado.

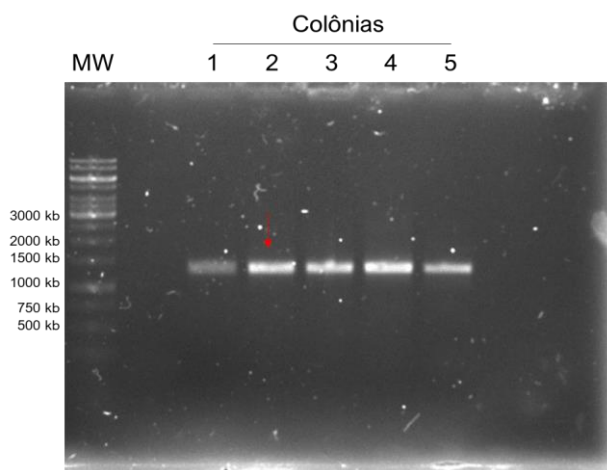
**Figura 24. Transformação de bactérias *E. coli* BL21DE3 com o plasmídeo da PMEr-cor.** As bactérias transformadas foram semeadas em placa (à esquerda). Como controle negativo, foi usado as células quimiocompetentes não transformadas, semeadas em placa (à direita). Ambas as placas continham agar LB suplementado com canamicina 50µg/mL. As setas vermelhas indicam as colônias de bactérias.



**Fonte:** Elaborado pelo Autor, 2023.

Das cinco colônias que cresceram na placa (Figura 24), todos os cinco clones eram positivos para o inserto do plasmídeo, pois apresentavam bandas de tamanho esperado em gel de agarose após a realização de PCR de colônia (Figura 25).

**Figura 25. PCR de colônia em gel de agarose 1%.** Observa-se cinco bandas coradas por brometo de etídeo na região de 1400 Kb, correspondentes ao inserto plasmidial em todas as colônias. Cada colônia foi denominada como 1, 2, 3, 4 e 5. A seta vermelha sinaliza a bactéria escolhida.



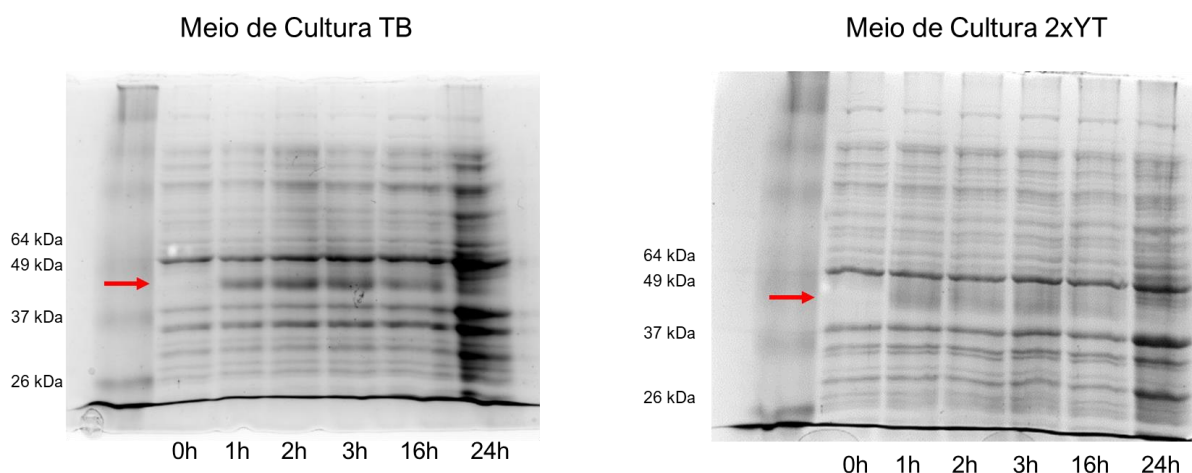
**Fonte:** Elaborado pelo Autor, 2023.



Uma vez transformada, para delimitar as melhores condições do crescimento da bactéria, como tempo de indução e qual meio de cultura utilizar, uma pequena escala de expressão foi feita para verificar maior rendimento de expressão da PMEr-cor (Figura 26). Cada inóculo cresceu no meio de cultura TB e 2XYT, respectivamente, e foram retiradas amostras nos tempos 0 hora, 1 hora, 2 horas, 3 horas, 16 horas e 24 horas após a indução por IPTG. Foi possível visualizar em gel de eletroforese o aumento de uma banda proteica entre 37 kDa e 50 kDa, possivelmente correspondente a PMEr-cor, já após 1h de indução.

Como não houve grandes diferenças na intensidade da banda nos tempos analisados, foi determinado o tempo de indução de 16 horas em meio de cultura TB como a melhor condição para expressão da PMEr-cor, levando em consideração o fluxo de trabalho, podendo assim, escalonar a produção para maior quantidade de proteína.

**Figura 26. Expressão em pequena escala da PMEr-cor.** Foram testados diferentes tempos de indução (0 h, 1 h, 2 h, 3 h, 16 h e 24 h), e o melhor meio de cultura a ser utilizado (2xTY ou TB). A seta vermelha indica a expressão da PMEr-cor.

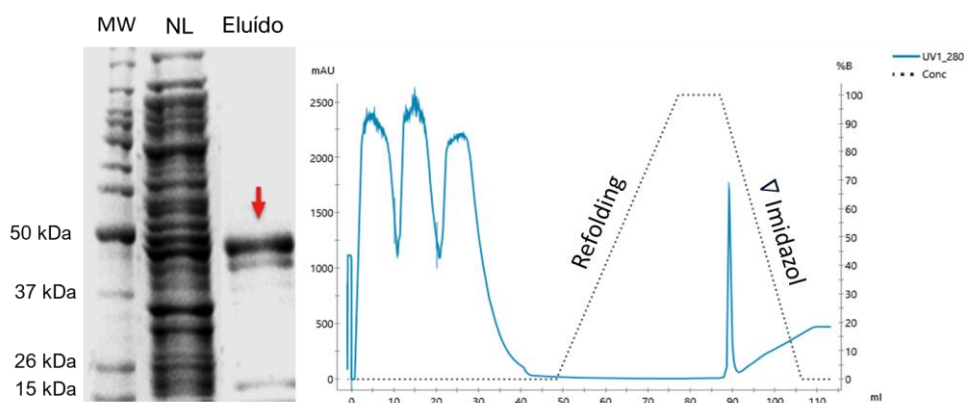


**Fonte:** Elaborado pelo Autor, 2023.

A PMEr-cor foi expressa em maior escala e purificada. Após a lise bacteriana, foi observado que a proteína encontrava-se tanto na porção solúvel quanto na fração insolúvel do extrato. Entretanto, após a purificação das duas condições, a proteína encontrada na fração solúvel do extrato degradava aproximadamente uma semana após armazenada em ultrafreezer, o que não acontecia com a proteína encontrada na fração insolúvel do extrato. Portanto, para dar continuidade ao projeto, foi decidido

utilizar a fração insolúvel para ser purificada. A Figura 27 mostra a eliminação da maioria das proteínas não relacionadas na canaleta não ligado, obtendo-se apenas a banda fruto da indução da expressão da PMEr-cor.

**Figura 27. Purificação da PMEr-cor por coluna de afinidade.** A PMEr-cor foi eluída e purificada por afinidade em coluna de níquel. Foi utilizado gradiente de imidazol para purificá-la. A seta vermelha indica a PMEr-cor na canaleta Eluído.



**Fonte:** Elaborado pelo Autor.

Após sua purificação, a proteína foi aliquoteada, armazenada em ultrafreezer -80 °C, para ser posteriormente caracterizada.

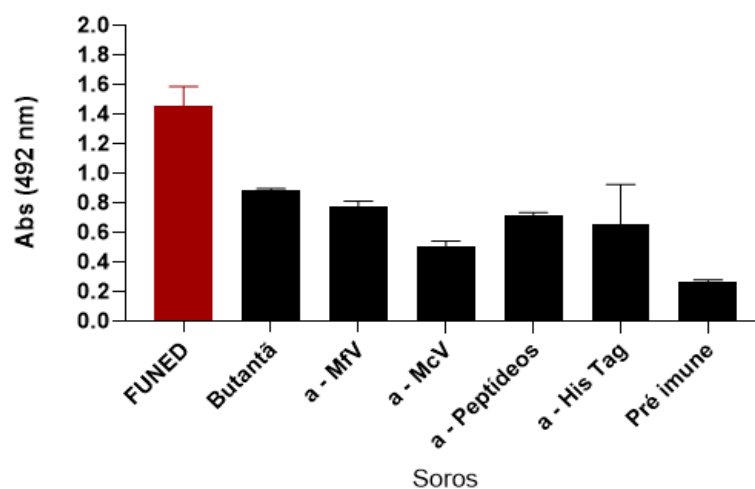
#### 5.4. CARACTERIZAÇÃO ANTIGÊNICA DA PMEr-cor

Para a caracterização antigênica da PMEr-cor, ensaios de ELISA foram realizados, nos quais a PMEr-cor foi utilizada para sensibilizar microplacas de 96 poços e a reatividade de soros hiperimunes  $\alpha$ -*Micrurus spp* do acervo do LABIMQ foi avaliada frente a essa proteína. Foram testados os soros de coelho  $\alpha$ -*M. corallinus* ( $\alpha$ -McV),  $\alpha$ -*M. frontalis* ( $\alpha$ -MfV), soro  $\alpha$ -peptídeos de Castro *et al.* (2015), soro antielapídico fabricado pelo Instituto Butantan ou Fundação Ezequiel Dias. O anticorpo monoclonal  $\alpha$ -his tag ProteinTech® serviu como controle positivo do ensaio e o soro pré imune como controle negativo. Todos os soros e anticorpos foram utilizados na diluição de 1:50.

Após a revelação, observou-se que a PMEr-cor foi reconhecida fortemente pelo soro antielapídico produzido pela Fundação Ezequiel Dias, o que pode indicar que os epítomos presentes na PMEr-cor, de fato, são representativos do veneno de *M. corallinus* e que podem ser capazes de estimular a resposta imune na produção desses anticorpos durante a produção do SAEL (Figura 28). Além disso, a PMEr-cor

foi também reconhecida pelo soro antielapídico produzido pelo Butantan, bem como pelos soros hiperimunizados contra o veneno de *M. corallinus*, demonstrando que a seleção de epítomos foi assertiva em representar o veneno em alguma medida.

**Figura 28. Caracterização da PMEr-cor.** Placas de ELISA foram sensibilizadas com 0,5 µg por poço da PMEr-cor *overnigh*. Após bloqueio, os soros hiperimunes foram aplicados em diluição 1:50. O soro Pré Imune foi utilizado como controle negativo do ensaio. Em vermelho, destaca-se o reconhecimento pelo SAEL produzido pela FUNED. IgG α-coelho (1:10.000), α-cavalo (1:10.000) e α-camundongo (1:5.000) foram utilizados como conjugado. O ensaio foi relevado pela adição de solução de substrato (SigmaFast OPD). Os ensaios foram demonstrado com média e desvio padrão.



Fonte: Elaborado pelo Autor, 2023.

## 5.5. CARACTERIZAÇÃO DOS ANTICORPOS GERADOS

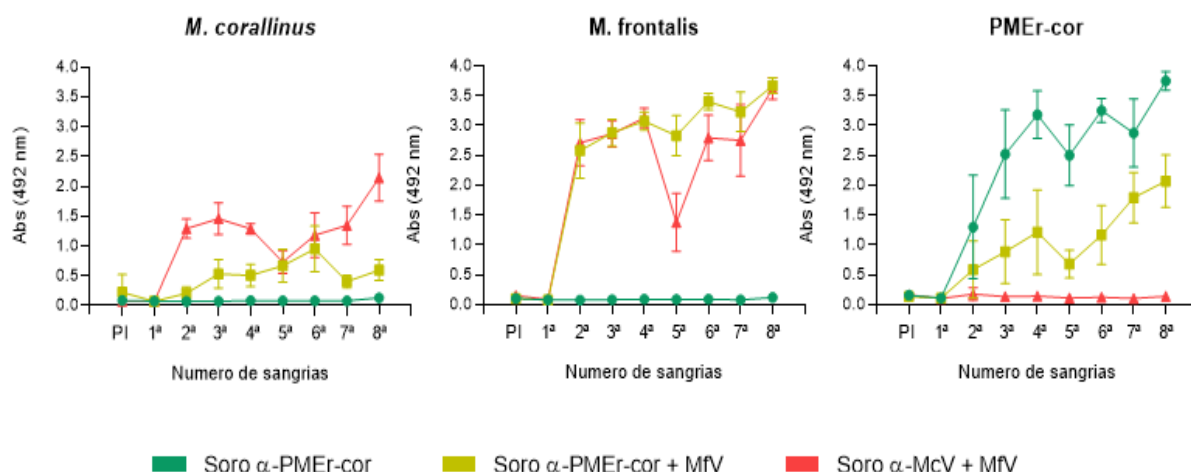
Os coelhos foram imunizados de acordo com o calendário de imunizações e com os imunógenos previamente descritos para cada grupo, e foram sangrados após 7 dias de cada imunização para o acompanhamento da resposta imune gerada, conforme Figura 29. Ao total, foram administradas 8 doses e o soro obtido destas sangrias foi testado por ELISA, no qual microplacas de 96 poços foram sensibilizadas com os venenos brutos de *M. corallinus* e *M. frontalis*. Os soros foram testados na diluição 1:1000. O anticorpo conjugado a peroxidase α-IgG de coelho Sigma ® foi testado em diluição 1:10.000.

Como resultados deste ensaio (Figura 29), foi visto que a PMEr-cor é imunogênica, ou seja, foi capaz de gerar anticorpos contra ela mesma, tanto no grupo imunizado somente contra a PMEr-cor, quanto no grupo imunizado com a PMEr-cor acrescida do veneno e *M. frontalis*. Já nas placas sensibilizadas com os venenos de

*M. corallinus* e *M. frontalis*, foi observado que o soro  $\alpha$ -PMEr-cor não foi capaz de reconhecer nenhum destes venenos, ao contrário dos soros  $\alpha$ -PMEr-cor + MfV e  $\alpha$ -McV + MfV, que reagiram contra ambos os venenos.

Nota-se que mesmo o grupo controle, o soro  $\alpha$ -McV + MfV, que recebeu os venenos das duas espécies, possui um padrão de reconhecimento menor na placa sensibilizada com o veneno de *M. corallinus* quando comparado ao padrão de reconhecimento na placa sensibilizada com *M. frontalis*.

**Figura 29. Reatividade dos soros produzidos ao longo das imunizações.** Placas de ELISA foram sensibilizadas com 0,5 $\mu$ g por poço com os venenos de *M. corallinus*, *M. frontalis* ou a proteína PMEr-cor, e testada a reatividade do soro de cada grupo na diluição 1:1000. IgG  $\alpha$ -coelho (1:10.000), foi utilizado como conjugado. O ensaio foi relevado pela adição de solução de substrato (SigmaFast OPD). Os ensaios foram demonstrado com média e desvio padrão.



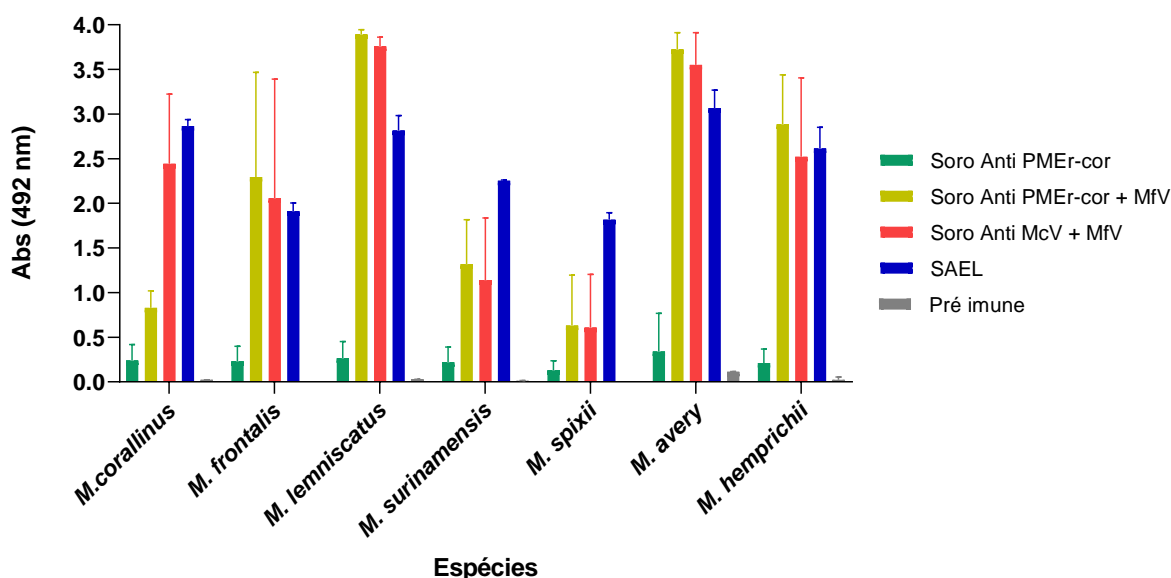
Fonte: Elaborado pelo Autor, 2023.

Além dos venenos de *M. corallinus* e *M. frontalis*, os soros hiperimunizados produzidos também foram testados frente a outros venenos elapídicos do acervo de venenos ofídicos do LABIMQ, para verificar a reatividade cruzada frente a esses outros venenos que não foram utilizados como imunógenos.

Através da técnica de ELISA, demonstrado na Figura 30, foi visto que o soro  $\alpha$ -PMEr-cor não foi capaz de reconhecer nenhum dos venenos testados, mas os soros hiperimunizados  $\alpha$ -PMEr-cor + MfV e  $\alpha$ -McV + MfV reconheceram todos os venenos testados no ensaio, em mesma proporção ou em proporção maior do que ao reconhecimento do controle positivo do ensaio (soro antielapídico produzido pela FUNED), demonstrando reatividade cruzada satisfatória, na diluição de 1:1000.

Ressalta-se que o único veneno para o qual a reatividade do soro  $\alpha$ -McV + MfV (que utiliza os dois venenos brutos como imunógeno, conforme a produção do SAEL) foi maior, foi para o veneno de *M. corallinus*, sendo que para todos os outros venenos a reatividade do soro  $\alpha$ -PMER-cor + MfV foi equiparável ou mais alta do que este controle.

**Figura 30. ELISA frente aos venenos elapídicos de interesse em saúde.** Placas de ELISA foram sensibilizadas com 0,5  $\mu$ g de cada veneno e os soros produzidos foram testados na diluição 1:1000. Como controle positivo, foi utilizado o SAEL e como controle negativo foi utilizado o Soro Pré Imune, na mesma diluição. IgG  $\alpha$ -coelho (1:10.000) foi utilizado como conjugado. O ensaio foi relevado pela adição de solução de substrato (SigmaFast OPD). Os ensaios foram demonstrado com média e desvio padrão.

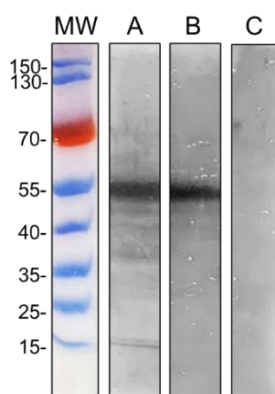


**Fonte:** Elaborado pelo Autor, 2023.

A reatividade dos soros produzidos também foi testada pela técnica de *Western Blot*, demonstrado na Figura 31 e Figura 32. Foi visto o reconhecimento da PMER-cor pelos soros  $\alpha$ -PMER-cor e  $\alpha$ -PMER-cor + MfV. Entretanto, não houve reatividade cruzada com o grupo controle, imunizado com os venenos brutos de *M. corallinus* e *M. frontalis*. Na Figura 32, novamente observa-se que o soro  $\alpha$ -PMER-cor não foi capaz de reconhecer nenhuma banda de proteínas presente nos venenos testados. Já o soro  $\alpha$ -PMER-cor + MfV e o soro  $\alpha$ -McV + MfV reconheceram uma gama satisfatória de proteínas, principalmente àquelas com massa molecular referente a toxinas do tipo PLA<sub>2</sub> e 3FTx, dos venenos de *M. corallinus* e *M. frontalis*, assim como de outras espécies de elapídeos de interesse em saúde.

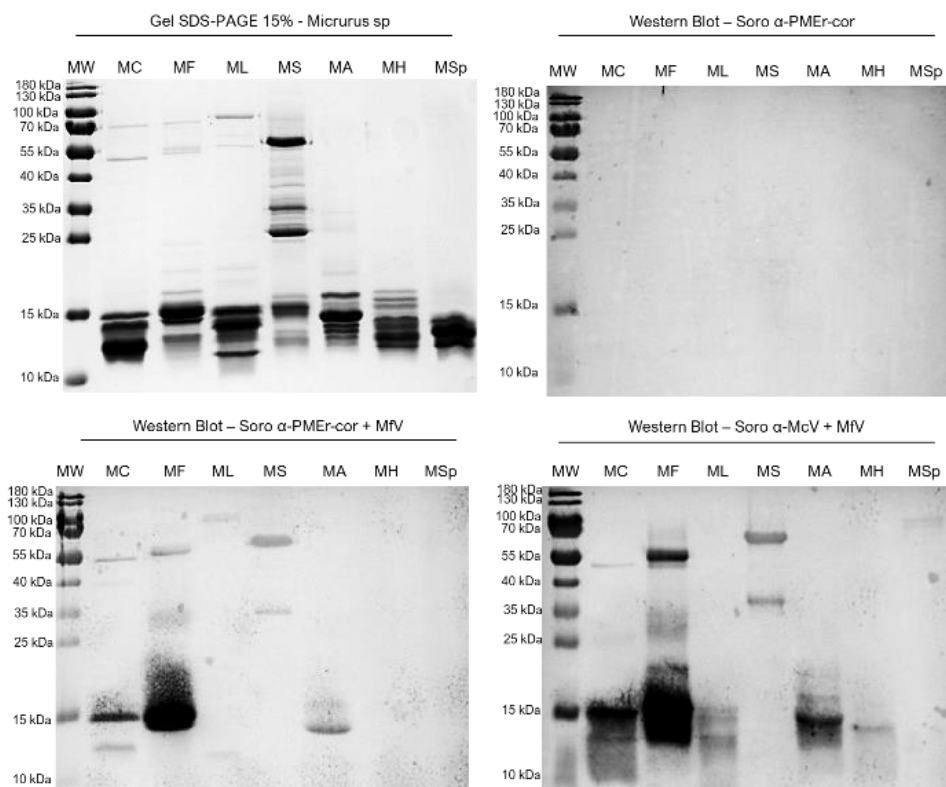
**Figura 31. Reconhecimento da PMEr-cor por Western Blot, frente aos soros produzidos.** Eletroforese em gel de poliacrilamida 15% com 20 µg da PMEr-cor foi realizado e a proteína transferida para membrana de nitrocelulose *overnight*. Após bloqueio com leite desnatado 5%, foram aplicados cada soro produzido na diluição 1:100. IgG α-coelho (1:10.000), foi utilizado como conjugado. A reação foi revelada pela adição de tablete de DAB, 4-cloronaftol e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30%. Os ensaios foram demonstrado com média e desvio padrão. Sendo: **A** – Soro α-PMEr-cor; **B** – Soro α-PMEr-cor + MfV e **C** – Soro α-McV + MfV.

Western Blot – PMEr-cor x Soros produzidos



Fonte: Elaborado pelo Autor, 2023.

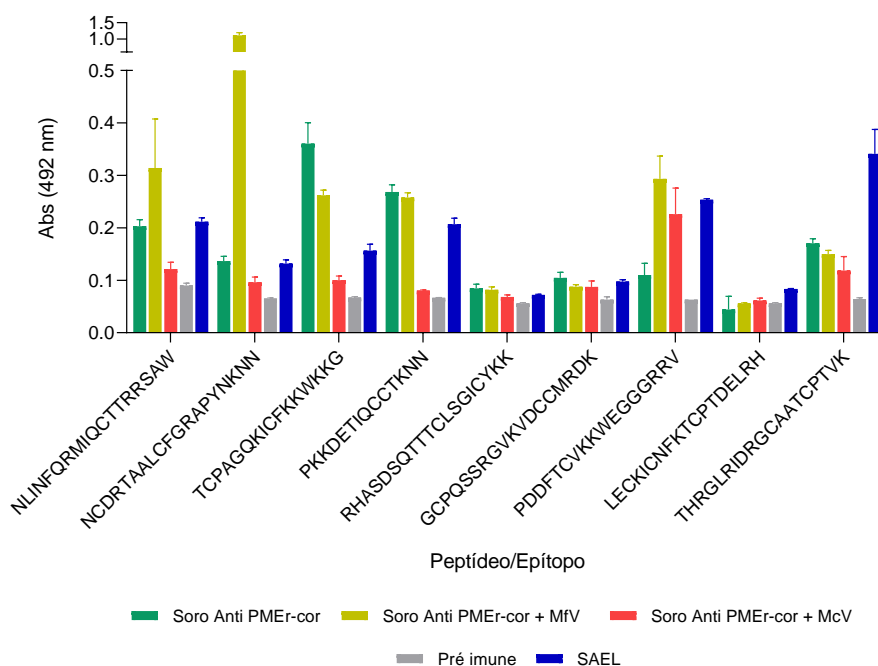
**Figura 32. Western Blot frente a alguns venenos elapídicos de interesse em saúde.** Eletroforese em gel de poliacrilamida 15% com 20 µg de cada veneno foi realizado e as proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose *overnight*. Após bloqueio, foram aplicados cada soro produzido na diluição 1:100. IgG α-coelho (1:10.000), foi utilizado como conjugado. A reação foi revelada pela adição de tablete de DAB, 4-cloronaftol e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30%. Os ensaios foram demonstrado com média e desvio padrão. Sendo: **MC** – *M. corallinus*; **MF** – *M. frontalis*; **ML** – *M. lemniscatus*; **MS** – *M. surinamensis*; **MA** – *M. averyi*; **MH** – *M. hemprichii*; **MSp** – *M. spixii*.



Fonte: Elaborado pelo Autor, 2023.

O reconhecimento gerado pelo soro  $\alpha$ -PMEr-cor + MfV e o soro  $\alpha$ -McV + MfV são relativamente similares. Para avaliar se esse reconhecimento em comum entre os dois soros se devia somente ao fato da presença do veneno de *M. frontalis* como parte do imunógeno ou se esse compartilhamento de reconhecimento estava sendo reforçado de alguma forma pela PMEer-cor, fizemos ensaios de ELISA, sensibilizando microplacas com peptídeos sintéticos do mapeamento de Castro *et al.* (2015), que compõem a quimera, e também foi sintetizada membranas de SPOT contendo os peptídeos derivados da sequência completa da PMEer-cor. No ELISA, foi observado que houve o reconhecimento de alguns epítomos pelo soro  $\alpha$ -PMEr-cor e também pelo soro  $\alpha$ -PMEr-cor + MfV, conforme Figura 33, demonstrando que houve um direcionamento da resposta imune na produção de anticorpos aos epítomos escolhidos para compor a PMEer-cor, e não somente ao veneno de *M. frontalis*. O reconhecimento dos peptídeos pelos soros que tiveram a PMEer-cor como imunógeno foram, em sua maioria, superior àquele do soro  $\alpha$ -McV + MfV.

**Figura 33. ELISA dos peptídeos frente aos epítomos mapeados experimentalmente por Castro *et al.* (2015).** Os peptídeos (10 $\mu$ g/poço) foram sensibilizados em placas de ELISA e foi testada a reatividade frente aos soros produzidos em diluição 1:100. O SAEL foi utilizado como controle positivo e o Soro Pré Imune como controle negativo. IgG  $\alpha$ -coelho (1:10.000), foi utilizado como conjugado. O ensaio foi relevado pela adição de solução de substrato (SigmaFast OPD). Os ensaios foram demonstrado com média e desvio padrão.

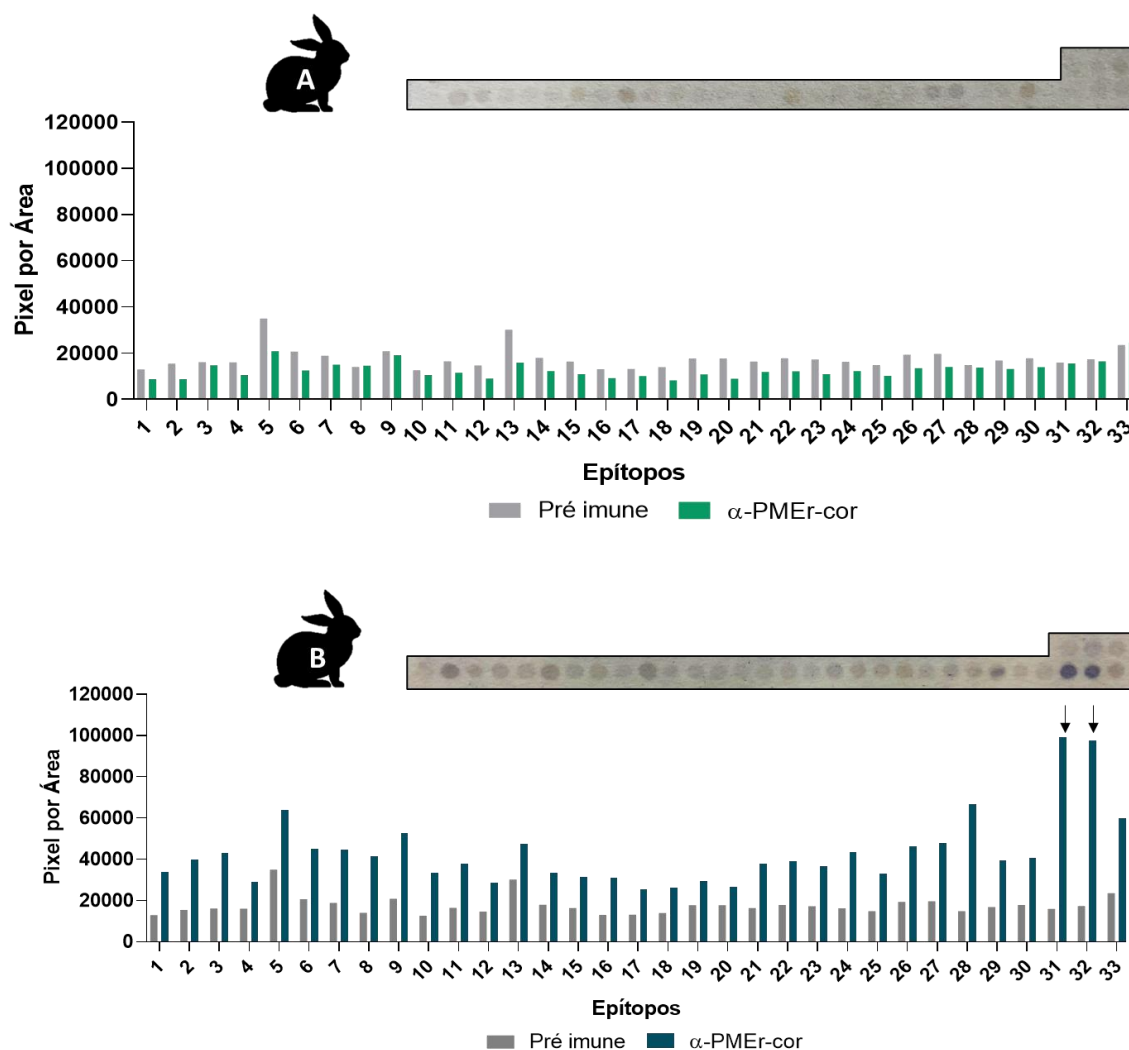


Fonte: Elaborado pelo Autor, 2023.



Na técnica de SPOT, analisando a membrana sintetizada com todos os epítomos presentes na PMEr-cor, demonstrado nas Figuras 34, 35 e 36, vimos que o perfil de reconhecimento entre os soros do grupo imunizado somente com a PMEr-cor, do grupo imunizado com a PMEr-cor + MfV e do grupo controle imunizado com os venenos brutos de *M. corallinus* e *M. frontalis* são diferentes, sendo o soro  $\alpha$ -PMEr-cor + MfV mais reativo em relação aos outros grupos imunizados.

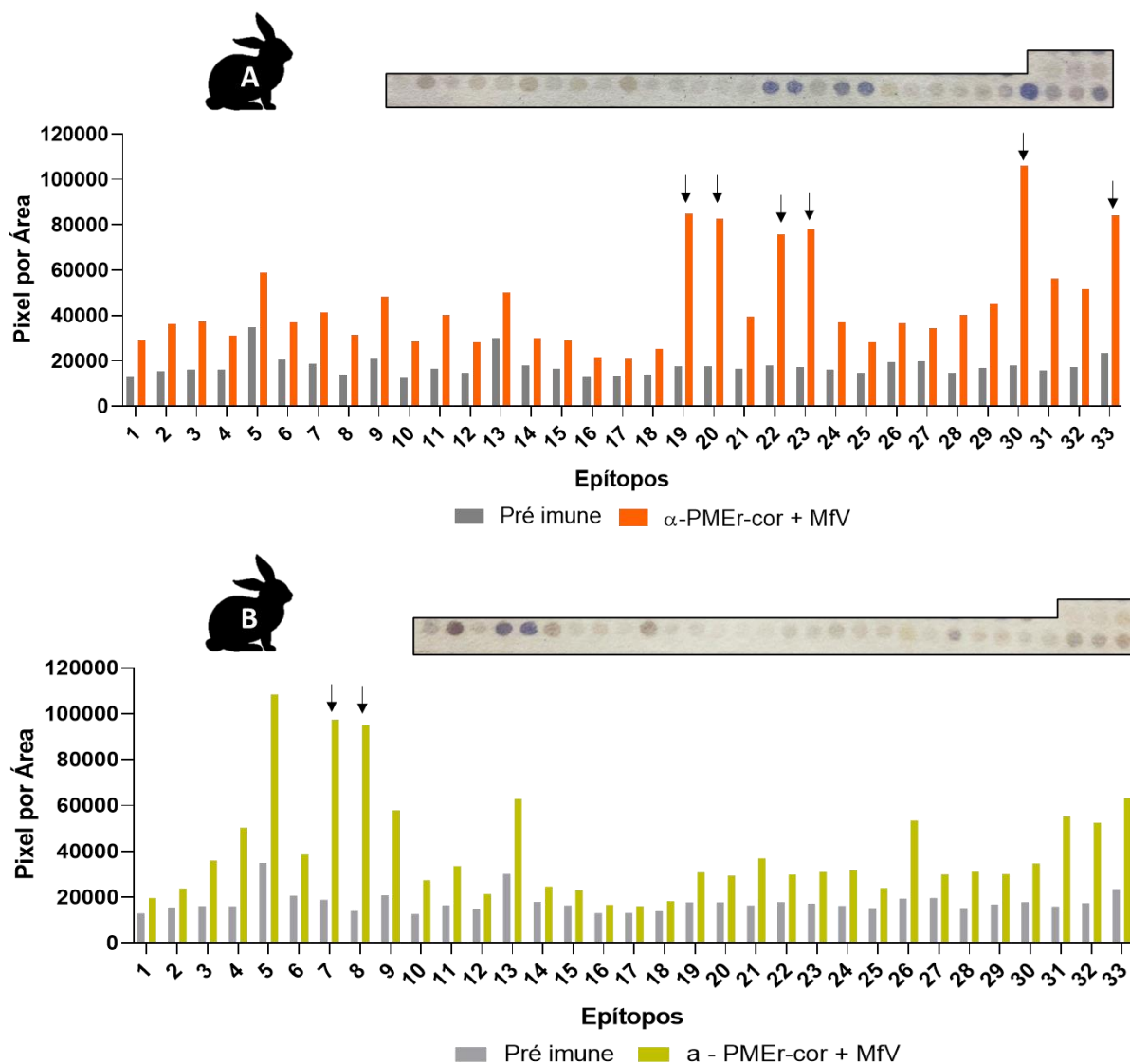
**Figura 34. Ensaio de SPOT com os epítomos selecionados frente ao soro  $\alpha$ -PMEr-cor.** A membrana foi bloqueada e após lavagens, foi aplicado o soro na diluição 1:200. O soro Pré Imune foi utilizado como controle negativo do ensaio (representado em cinza). Foi utilizado o anticorpo  $\alpha$ -IgG de coelho conjugado à fosfatase alcalina na diluição 1:10.000 como conjugado. A reatividade é representada pelos spots na coloração roxa, detectado utilizando MTT e BCIP. As setas indicam os spots mais reativos.



Fonte: Elaborado pelo Autor, 2023.

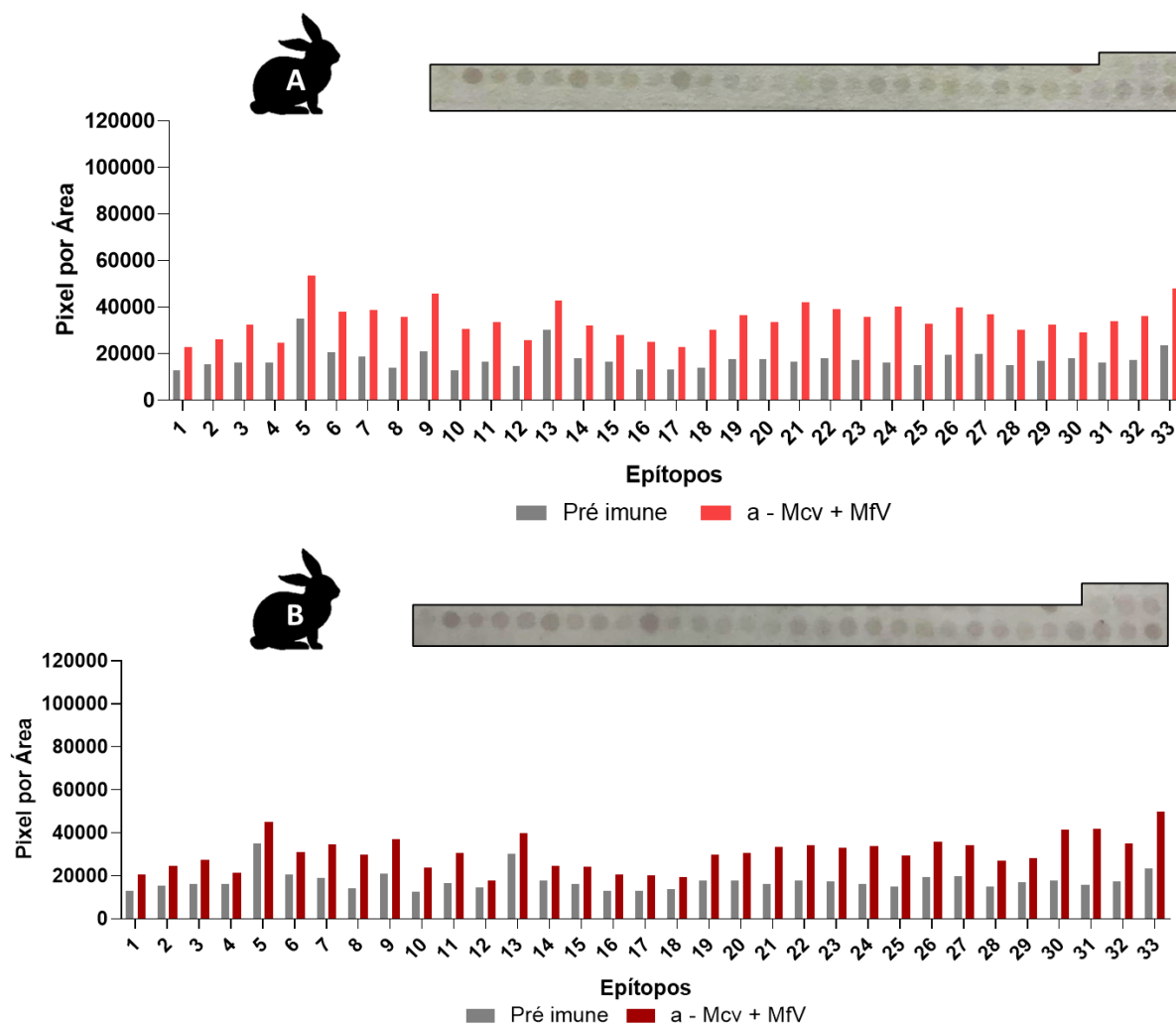


**Figura 35. Ensaio de SPOT com os epítomos selecionados frente ao soro  $\alpha$ -PMEr-cor + MfV.** A membrana foi bloqueada e após lavagens, foi aplicado o soro na diluição 1:200. O soro Pré Imune foi utilizado como controle negativo do ensaio (representado em cinza). Foi utilizado o anticorpo  $\alpha$ -IgG de coelho conjugado à fosfatase alcalina na diluição 1:10.000 como conjugado. A reatividade é representada pelos spots na coloração roxa, detectado utilizando MTT e BCIP. As setas indicam os spots mais reativos.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2023.

**Figura 36. Ensaio de SPOT com os epítomos selecionados frente ao soro  $\alpha$ -McV + MfV.** A membrana foi bloqueada e após lavagens, foi aplicado o soro na diluição 1:200. O soro Pré Imune foi utilizado como controle negativo do ensaio (representado em cinza). Foi utilizado o anticorpo  $\alpha$ -IgG de coelho conjugado à fosfatase alcalina na diluição 1:10.000 como conjugado. A reatividade é representada pelos spots na coloração roxa, detectado utilizando MTT e BCIP. As setas indicam os spots mais reativos.

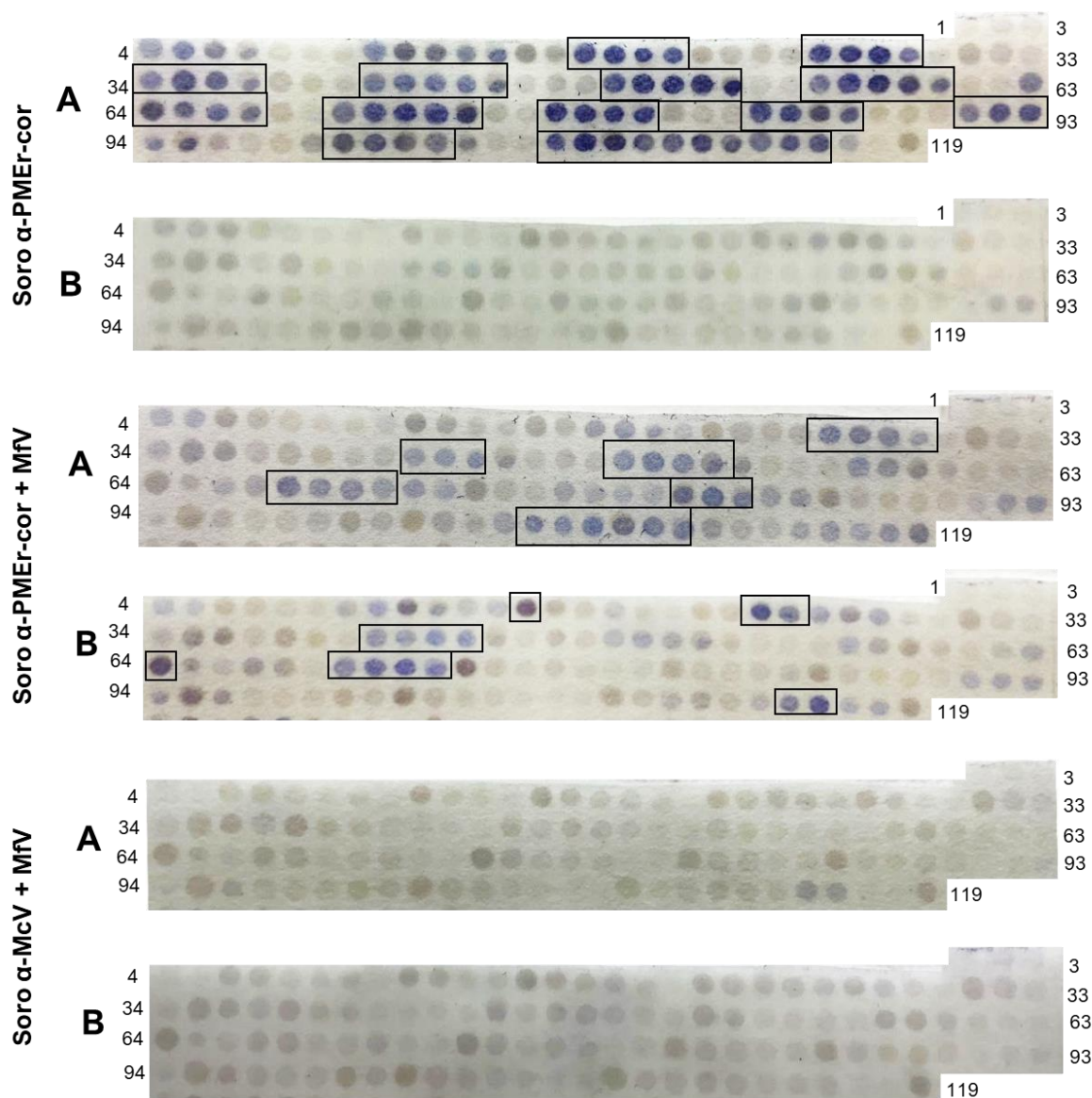


**Fonte:** Elaborado pelo Autor, 2023.

Através da metodologia de SPOT, outra membrana foi construída, demonstrada na Figura 37. Dessa vez, a membrana contemplou a sequência completa da PMEr-cor, incluindo seus espaçadores, sendo representada por peptídeos de 15 aminoácidos, com sequências sobrepostas em 12 resíduos, cobrindo toda a sequência da PMEr-cor, para verificar quais regiões da proteína os anticorpos estavam interagindo.

O soro do coelho A, pertencente ao grupo  $\alpha$ -PMER-cor, teve alto reconhecimento frente aos peptídeos sintetizados na membrana, o que não ocorreu no coelho B do mesmo grupo. Vimos também que os soros do grupo imunizado  $\alpha$ -PMER-cor + MfV reconheceram epítomos diferentes dos reconhecidos pelo soro  $\alpha$ -PMER-cor e também houve um padrão de reconhecimento distinto entre os coelhos deste mesmo grupo. Já para o soro  $\alpha$ -McV + MfV não houve reconhecimento de nenhum epítomo.

**Figura 37. Ensaio de SPOT com a sequência completa da PMER-cor.** A membrana foi bloqueada e após lavagens, foi aplicado individualmente cada soro produzido, em diluição 1:200. Foi utilizado o anticorpo  $\alpha$ -IgG de coelho conjugado à fosfatase alcalina na diluição 1:10.000. A reatividade é representada pelos *spots* na coloração roxa, detectado utilizando MTT e BCIP. Os retângulos em preto destacam os *spots* mais reativos de cada soro testado.



Analisando as sequências de aminoácidos dos epítomos mais fortemente reativos, representados pelos retângulos pretos na Figura 37, foi visto que o intenso reconhecimento do soro do grupo imunizado apenas contra a PMEr-cor foi direcionado majoritariamente ao espaçador GPGPG, estando ele presente no início, no meio ou no fim dos epítomos sintetizados na membrana, o que também foi verificado para o soro  $\alpha$ -PMEr-cor + MfV, representados na tabela 4, 5, e 6, respectivamente.

**Tabela 4. Sequência de aminoácidos da PMEr-cor presentes na membrana de SPOT reconhecida pelo soro  $\alpha$ -PMEr-cor.** A sequência de cada *spot* foi representada de acordo com sua intensidade no ensaio frente ao soro  $\alpha$ -PMEr-cor. Em cinza estão destacados os *spots* com maior intensidade de reatividade. Em negrito, está destacada a sequência do espaçador GPGPG. Em verde, está destacado o reconhecimento da região reconhecida sem o espaçador.

			Soro $\alpha$ -PMEr-cor					
Nr.	Sequência	Intensidade	Nr.	Sequência	Intensidade	Nr.	Sequência	Intensidade
1	P-E-G-K-D-K-C-E-K-Y-A-V-P-V-M	18.427	41	F-K-T-C-P-T-D-E-L-R-H-G-P-G-P	69.244	81	P-G-A-A-P-Y-N-Q-R-N-Y-K-G-C	44.333
2	K-D-K-C-E-K-Y-A-V-P-V-M-R-G-K	22.644	42	C-P-T-D-E-L-R-H-G-P-G-P-G-T-H	77.307	82	A-A-P-Y-N-Q-R-N-Y-K-G-C-I-Q-N	30.342
3	C-E-K-Y-A-V-P-V-M-R-G-K-G-P-G	18.924	43	D-E-L-R-H-G-P-G-P-G-T-H-R-G-L	72.791	83	Y-N-Q-R-N-Y-K-G-C-I-Q-N-G-P-G	25.871
4	Y-A-V-P-V-M-R-G-K-G-P-G-P-G-E	54.716	44	R-H-G-P-G-P-G-T-H-R-G-L-R-I-D	75.591	84	R-N-Y-K-G-C-I-Q-N-G-P-G-P-G-A	100.769
5	P-V-M-R-G-K-G-P-G-P-G-E-G-E-N	74.031	45	<b>P-G-P-G-T-H-R-G-L-R-I-D-R-G-C</b>	79.636	85	K-G-C-I-Q-N-G-P-G-P-G-A-K-D-N	106.373
6	R-G-K-G-P-G-P-G-E-G-E-N-H-C-Y	72.604	46	G-T-H-R-G-L-R-I-D-R-G-C-A-A-T	30.307	86	I-Q-N-G-P-G-P-G-A-K-D-N-P-A-C	99.591
7	G-P-G-P-G-E-G-E-N-H-C-Y-T-T-A	53.836	47	R-G-L-R-I-D-R-G-C-A-A-T-C-P-T	37.089	87	<b>G-P-G-P-G-A-K-D-N-P-A-C-K-P-I</b>	89.467
8	P-G-E-G-E-N-H-C-Y-T-T-A-I-T-A	21.640	48	R-I-D-R-G-C-A-A-T-C-P-T-V-K-G	29.178	88	P-G-A-K-D-N-P-A-C-K-P-I-W-D-S	43.440
9	G-E-N-H-C-Y-T-T-A-I-T-A-R-P-T	20.724	49	R-G-C-A-A-T-C-P-T-V-K-G-P-G-P	92.569	89	K-D-N-P-A-C-K-P-I-W-D-S-P-Y-V	44.004
10	H-C-Y-T-T-A-I-T-A-R-P-T-Y-V-G	25.124	50	A-A-T-C-P-T-V-K-G-P-G-P-G-P-D	113.302	90	P-A-C-K-P-I-W-D-S-P-Y-V-K-S-G	37.031
11	T-T-A-I-T-A-R-P-T-Y-V-G-P-G-P	69.413	51	C-P-T-V-K-G-P-G-P-G-P-D-D-F-T	118.711	91	K-P-I-W-D-S-P-Y-V-K-S-G-P-G-P	74.169
12	I-T-A-R-P-T-Y-V-G-P-G-P-G-C-P	90.516	52	V-K-G-P-G-P-G-P-D-D-F-T-C-V-K	125.084	92	W-D-S-P-Y-V-K-S-G-P-G-P-G-N-L	99.360
13	R-P-T-Y-V-G-P-G-P-G-C-P-E-S-T	87.507	53	<b>P-G-P-G-P-D-D-F-T-C-V-K-K-W-E</b>	131.578	93	P-Y-V-K-S-G-P-G-P-G-N-L-I-N-F	103.396
14	Y-V-G-P-G-P-G-C-P-E-S-T-P-N-E	79.076	54	G-P-D-D-F-T-C-V-K-K-W-E-G-G-G	21.658	94	K-S-G-P-G-P-G-N-L-I-N-F-Q-R-M	65.613
15	P-G-P-G-C-P-E-S-T-P-N-E-K-Y-Q	94.978	55	D-F-T-C-V-K-K-W-E-G-G-G-R-R-V	19.836	95	P-G-P-G-N-L-I-N-F-Q-R-M-I-Q-C	90.467
16	G-C-P-E-S-T-P-N-E-K-Y-Q-C-C-S	77.502	56	C-V-K-K-W-E-G-G-G-R-R-V-G-P-G	72.156	96	G-N-L-I-N-F-Q-R-M-I-Q-C-T-T-R	49.249
17	E-S-T-P-N-E-K-Y-Q-C-C-S-T-G-P	59.293	57	K-W-E-G-G-G-R-R-V-G-P-G-P-G-G	107.182	97	I-N-F-Q-R-M-I-Q-C-T-T-R-R-S-A	32.080
18	P-N-E-K-Y-Q-C-C-S-T-G-P-G-P-G	107.627	58	G-G-G-R-R-V-G-P-G-P-G-C-A-D	124.369	98	Q-R-M-I-Q-C-T-T-R-R-S-A-W-G-P	37.667
19	K-Y-Q-C-C-S-T-G-P-G-P-G-R-H-A	114.720	59	R-R-V-G-P-G-P-G-G-C-A-D-T-C-P	112.098	99	I-Q-C-T-T-R-R-S-A-W-G-P-G-P-G	48.876
20	C-C-S-T-G-P-G-P-G-R-H-A-S-D-S	110.084	60	<b>G-P-G-P-G-G-C-A-D-T-C-P-R-N-F</b>	90.631	100	T-T-R-R-S-A-W-G-P-G-P-G-N-C-D	87.173
21	T-G-P-G-P-G-R-H-A-S-D-S-Q-T-T	97.164	61	P-G-G-C-A-D-T-C-P-R-N-F-P-L-E	35.671	101	R-S-A-W-G-P-G-P-G-N-C-D-R-T-A	84.022
22	G-P-G-R-H-A-S-D-S-Q-T-T-T-C-L	48.613	62	C-A-D-T-C-P-R-N-F-P-L-E-I-V-G	30.480	102	<b>W-G-P-G-P-G-N-C-D-R-T-A-A-L-C</b>	76.351
23	R-H-A-S-D-S-Q-T-T-T-C-L-S-G-I	37.138	63	T-C-P-R-N-F-P-L-E-I-V-G-P-G-P	77.413	103	<b>G-P-G-N-C-D-R-T-A-A-L-C-F-G-R</b>	61.769
24	S-D-S-Q-T-T-T-C-L-S-G-I-C-Y-K	42.364	64	R-N-F-P-L-E-I-V-G-P-G-P-G-T-C	104.827	104	N-C-D-R-T-A-A-L-C-F-G-R-A-P-Y	58.867
25	Q-T-T-T-C-L-S-G-I-C-Y-K-K-G-P	43.280	65	P-L-E-I-V-G-P-G-P-G-T-C-P-A-G	87.893	105	R-T-A-A-L-C-F-G-R-A-P-Y-N-K-N	28.702
26	T-C-L-S-G-I-C-Y-K-K-G-P-G-P-G	112.942	66	I-V-G-P-G-P-G-T-C-P-A-G-Q-K-I	83.787	106	A-L-C-F-G-R-A-P-Y-N-K-N-N-G-P	26.884
27	S-G-I-C-Y-K-K-G-P-G-P-G-G-C-P	115.036	67	<b>P-G-P-G-T-C-P-A-G-Q-K-I-C-F-K</b>	81.471	107	F-G-R-A-P-Y-N-K-N-N-G-P-G-P-G	94.347
28	C-Y-K-K-G-P-G-P-G-G-C-P-Q-S-S	122.631	68	G-T-C-P-A-G-Q-K-I-C-F-K-K-W-K	39.462	108	A-P-Y-N-K-N-N-G-P-G-P-G-A-S-D	124.849
29	<b>K-G-P-G-P-G-G-C-P-Q-S-S-R-G-V</b>	82.493	69	P-A-G-Q-K-I-C-F-K-K-W-K-G-G	25.356	109	N-K-N-N-G-P-G-P-G-A-S-D-L-D-C	118.138
30	G-P-G-G-C-P-Q-S-S-R-G-V-K-V-D	24.609	70	Q-K-I-C-F-K-K-W-K-K-G-P-G-P	69.289	110	<b>N-G-P-G-P-G-A-S-D-L-D-C-S-G-N</b>	83.876
31	G-C-P-Q-S-S-R-G-V-K-V-D-C-C-M	51.547	71	C-F-K-K-W-K-K-G-P-G-P-G-P-K	94.071	111	<b>G-P-G-A-S-D-L-D-C-S-G-N-N-T-K</b>	85.609
32	Q-S-S-R-G-V-K-V-D-C-C-M-R-D-K	40.996	72	K-W-K-K-G-P-G-P-G-P-K-K-D-E	108.582	112	<b>A-S-D-L-D-C-S-G-N-N-T-K-C-R-N</b>	103.724
33	R-G-V-K-V-D-C-C-M-R-D-K-G-P-G	30.342	73	K-G-G-P-G-P-G-P-K-K-D-E-T-I-Q	105.956	113	L-D-C-S-G-N-N-T-K-C-R-N-F-G-P	80.818
34	K-V-D-C-C-M-R-D-K-G-P-G-P-G-L	71.027	74	<b>P-G-P-G-P-K-K-D-E-T-I-Q-C-C-T</b>	110.836	114	S-G-N-N-T-K-C-R-N-F-G-P-G-P-G	70.956
35	C-C-M-R-D-K-G-P-G-P-G-L-E-C-K	96.356	75	G-P-K-K-D-E-T-I-Q-C-C-T-K-N-N	36.569	115	N-T-K-C-R-N-F-G-P-G-P-G-T-Y-N	93.507
36	R-D-K-G-P-G-P-G-L-E-C-K-I-C-N	88.271	76	K-D-E-T-I-Q-C-C-T-K-N-N-G-P-G	23.524	116	C-R-N-F-G-P-G-P-G-T-Y-N-R-N-N	92.413
37	<b>G-P-G-P-G-L-E-C-K-I-C-N-F-K-T</b>	63.276	77	T-I-Q-C-C-T-K-N-N-G-P-G-P-G-A	114.071	117	F-G-P-G-P-G-T-Y-N-R-N-N-H-K-I	41.476
38	P-G-L-E-C-K-I-C-N-F-K-T-C-P-T	36.969	78	C-C-T-K-N-N-G-P-G-P-G-A-A-A-P	112.933	118	G-P-G-T-Y-N-R-N-N-H-K-I-D-P-S	27.240
39	E-C-K-I-C-N-F-K-T-C-P-T-D-E-L	38.018	79	K-N-N-G-P-G-P-G-A-A-A-P-Y-N-Q	110.458	119	T-Y-N-R-N-N-H-K-I-D-P-S-R-C-Q	64.547
40	I-C-N-F-K-T-C-P-T-D-E-L-R-H-G	28.093	80	<b>G-P-G-P-G-A-A-A-P-Y-N-Q-R-N-Y</b>	107.204			

Fonte: Elaborado pelo Autor, 2023.

**Tabela 5. Sequência de aminoácidos da PMEr-cor presentes na membrana de SPOT reconhecida pelo soro  $\alpha$ -PMEr-cor + MfV Coelho A por SPOT. A sequência de cada SPOT foi representada de acordo com sua intensidade no ensaio. Em cinza estão destacados os SPOT's com maior intensidade de reatividade. Em negrito, está destacado a sequência do espaçador GPGPG. Em verde está destacado o reconhecimento da região reconhecida sem o espaçador.**

			Soro $\alpha$ -PMEr-cor + MfV Coelho A					
Nr.	Sequência	Intensidade	Nr.	Sequência	Intensidade	Nr.	Sequência	Intensidade
1	P-E-G-K-D-K-C-E-K-Y-A-V-P-V-M	19.711	41	F-K-T-C-P-T-D-E-L-R-H-G-P-G-P	31.227	81	P-G-A-A-A-P-Y-N-Q-R-N-Y-K-G-C	94.702
2	K-D-K-C-E-K-Y-A-V-P-V-M-R-G-K	17.893	42	C-P-T-D-E-L-R-H-G-P-G-P-G-T-H	52.578	82	A-A-P-Y-N-Q-R-N-Y-K-G-C-I-Q-N	89.196
3	C-E-K-Y-A-V-P-V-M-R-G-K-G-P-G	17.364	43	D-E-L-R-H-G-P-G-P-G-T-H-R-R-G-L	53.916	83	Y-N-Q-R-N-Y-K-G-C-I-Q-N-G-P-G	73.720
4	Y-A-V-P-V-M-R-G-K-G-P-G-P-G-E	43.053	44	R-H-G-P-G-P-G-T-H-R-G-L-R-I-D	65.680	84	R-N-Y-K-G-C-I-Q-N-G-P-G-P-G-A	48.480
5	P-V-M-R-G-K-G-P-G-P-G-E-G-E-N	43.787	45	P-G-P-G-T-H-R-G-L-R-I-D-R-G-C	59.742	85	K-G-C-I-Q-N-G-P-G-P-G-A-K-D-N	55.956
6	R-G-K-G-P-G-P-G-E-G-E-N-H-C-Y	54.413	46	G-T-H-R-G-L-R-I-D-R-G-C-A-A-T	27.982	86	I-Q-N-G-P-G-P-G-A-K-D-N-P-A-C	65.907
7	G-P-G-P-G-E-G-E-N-H-C-Y-T-T-A	39.067	47	R-G-L-R-I-D-R-G-C-A-A-T-C-P-T	36.333	87	G-P-G-P-G-A-K-D-N-P-A-C-K-P-I	36.440
8	P-G-E-G-E-N-H-C-Y-T-T-A-I-T-A	25.107	48	R-I-D-R-G-C-A-A-T-C-P-T-V-K-G	29.609	88	P-G-A-K-D-N-P-A-C-K-P-I-W-D-S	39.160
9	G-E-N-H-C-Y-T-T-A-I-T-A-R-P-T	21.276	49	R-G-C-A-A-T-C-P-T-V-K-G-P-G-P	62.129	89	K-D-N-P-A-C-K-P-I-W-D-S-P-Y-V	36.813
10	H-C-Y-T-T-A-I-T-A-R-P-T-Y-V-G	23.182	50	A-A-T-C-P-T-V-K-G-P-G-P-G-P-D	77.831	90	P-A-C-K-P-I-W-D-S-P-Y-V-K-S-G	31.547
11	T-T-A-I-T-A-R-P-T-Y-V-G-P-G-P	22.747	51	C-P-T-V-K-G-P-G-P-G-P-D-F-T	66.427	91	K-P-I-W-D-S-P-Y-V-K-S-G-P-G-P	33.720
12	I-T-A-R-P-T-Y-V-G-P-G-P-G-C-P	66.444	52	V-K-G-P-G-P-G-P-D-D-F-T-C-V-K	74.702	92	W-D-S-P-Y-V-K-S-G-P-G-P-G-N-L	51.098
13	R-P-T-Y-V-G-P-G-P-G-C-P-E-S-T	48.533	53	<b>P-G-P-G-P-D-D-F-T-C-V-K-K-W-E</b>	58.431	93	P-Y-V-K-S-G-P-G-P-G-N-L-I-N-F	59.938
14	Y-V-G-P-G-P-G-C-P-E-S-T-P-N-E	31.867	54	G-P-D-D-F-T-C-V-K-K-W-E-G-G-G	28.742	94	K-S-G-P-G-P-G-N-L-I-N-F-Q-R-M	34.204
15	P-G-P-G-C-P-E-S-T-P-N-E-K-Y-Q	29.342	55	D-F-T-C-V-K-K-W-E-G-G-R-R-V	23.689	95	P-G-P-G-N-L-I-N-F-Q-R-M-I-Q-C	56.413
16	G-C-P-E-S-T-P-N-E-K-Y-Q-C-C-S	50.929	56	C-V-K-K-W-E-G-G-R-R-V-G-P-G	29.018	96	G-N-L-I-N-F-Q-R-M-I-Q-C-T-T-R	41.200
17	E-S-T-P-N-E-K-Y-Q-C-C-S-T-G-P	39.707	57	K-W-E-G-G-R-R-V-G-P-G-P-G-G	60.773	97	I-N-F-Q-R-M-I-Q-C-T-T-R-R-S-A	28.227
18	P-N-E-K-Y-Q-C-C-S-T-G-P-G-P-G	57.173	58	G-G-G-R-R-V-G-P-G-P-G-G-C-A-D	124.369	98	Q-R-M-I-Q-C-T-T-R-R-S-A-W-G-P	29.667
19	K-Y-Q-C-C-S-T-G-P-G-R-H-A	54.827	59	R-R-V-G-P-G-P-G-G-C-A-D-T-C-P	112.098	99	I-Q-C-T-T-R-R-S-A-W-G-P-G-P-G	35.093
20	C-C-S-T-G-P-G-P-G-R-H-A-S-D-S	48.409	60	<b>G-P-G-P-G-G-C-A-D-T-C-P-R-N-F</b>	90.631	100	T-T-R-R-S-A-W-G-P-G-P-G-N-C-D	53.840
21	T-G-P-G-P-G-R-H-A-S-D-S-Q-T-T	26.240	61	P-G-G-C-A-D-T-C-P-R-N-F-P-L-E	35.653	101	R-S-A-W-G-P-G-P-G-N-C-D-R-T-A	39.204
22	G-P-G-R-H-A-S-D-S-Q-T-T-T-C-L	48.618	62	C-A-D-T-C-P-R-N-F-P-L-E-I-V-G	36.573	102	W-G-P-G-P-G-N-C-D-R-T-A-A-L-C	60.124
23	R-H-A-S-D-S-Q-T-T-T-C-L-S-G-I	35.844	63	T-C-P-R-N-F-P-L-E-I-V-G-P-G-P	33.520	103	G-P-G-N-C-D-R-T-A-A-L-C-F-G-R	45.756
24	S-D-S-Q-T-T-T-C-L-S-G-I-C-Y-K	35.138	64	R-N-F-P-L-E-I-V-G-P-G-P-G-T-C	63.938	104	N-C-D-R-T-A-A-L-C-F-G-R-A-P-Y	41.107
25	Q-T-T-T-C-L-S-G-I-C-Y-K-K-G-P	38.493	65	P-L-E-I-V-G-P-G-P-G-T-C-P-A-G	45.111	105	R-T-A-A-L-C-F-G-R-A-P-Y-N-K-N	44.342
26	T-C-L-S-G-I-C-Y-K-K-G-P-G-P-G	77.751	66	I-V-G-P-G-P-G-T-C-P-A-G-Q-K-I	42.347	106	A-L-C-F-G-R-A-P-Y-N-K-N-W-G-P	75.591
27	S-G-I-C-Y-K-K-G-P-G-P-G-G-C-P	76.827	67	P-G-P-G-T-C-P-A-G-Q-K-I-C-F-K	48.893	107	F-G-R-A-P-Y-N-K-N-W-G-P-G-P-G	64.067
28	C-Y-K-K-G-P-G-P-G-G-C-P-Q-S-S	69.529	68	<b>G-T-C-P-A-G-Q-K-I-C-F-K-K-W-K</b>	86.911	108	A-P-Y-N-K-N-W-G-P-G-P-G-A-S-D	85.404
29	<b>K-G-P-G-P-G-G-C-P-Q-S-S-R-G-V</b>	48.778	69	<b>P-A-G-Q-K-I-C-F-K-K-W-K-K-G-G</b>	63.849	109	N-K-N-W-G-P-G-P-G-A-S-D-L-D-C	89.076
30	G-P-G-G-C-P-Q-S-S-R-G-V-K-V-D	26.302	70	Q-K-I-C-F-K-K-W-K-K-G-P-G-P	62.849	110	<b>N-G-P-G-P-G-A-S-D-L-D-C-S-G-N</b>	76.924
31	G-C-P-Q-S-S-R-G-V-K-V-D-C-C-M	53.818	71	C-F-K-K-W-K-K-G-P-G-P-G-P-K	51.004	111	<b>G-P-G-A-S-D-L-D-C-S-G-N-N-T-K</b>	77.124
32	Q-S-S-R-G-V-K-V-D-C-C-M-R-D-K	34.867	72	K-W-K-K-G-G-P-G-P-G-P-K-D-E	55.333	112	A-S-D-L-D-C-S-G-N-N-T-K-C-R-N	54.213
33	R-G-V-K-V-D-C-C-M-R-D-K-G-P-G	26.418	73	K-G-G-P-G-P-G-P-K-K-D-E-T-I-Q	44.036	113	L-D-C-S-G-N-N-T-K-C-R-N-F-G-P	36.133
34	K-V-D-C-C-M-R-D-K-G-P-G-P-G-L	42.382	74	P-G-P-G-P-K-K-D-E-T-I-Q-C-C-T	62.133	114	S-G-N-N-T-K-C-R-N-F-G-P-G-P-G	31.796
35	C-C-M-R-D-K-G-P-G-P-G-L-E-C-K	62.076	75	G-P-K-K-D-E-T-I-Q-C-C-T-K-N-N	35.076	115	N-T-K-C-R-N-F-G-P-G-P-G-T-Y-N	46.973
36	R-D-K-G-P-G-P-G-L-E-C-K-I-C-N	61.156	76	K-D-E-T-I-Q-C-C-T-K-N-N-G-P-G	28.058	116	C-R-N-F-G-P-G-P-G-T-Y-N-R-N-N	52.231
37	G-P-G-P-G-L-E-C-K-I-C-N-F-K-T	35.333	77	T-I-Q-C-C-T-K-N-N-G-P-G-P-G-A	46.516	117	F-G-P-G-P-G-T-Y-N-R-N-N-H-K-I	42.898
38	P-G-L-E-C-K-I-C-N-F-K-T-C-P-T	40.440	78	C-C-T-K-N-N-G-P-G-P-G-A-A-P	41.742	118	G-P-G-T-Y-N-R-N-N-H-K-I-D-P-S	59.951
39	E-C-K-I-C-N-F-K-T-C-P-T-D-E-L	40.067	79	K-N-N-G-P-G-P-G-A-A-P-Y-N-Q	37.058	119	<b>T-Y-N-R-N-N-H-K-I-D-P-S-R-C-Q</b>	81.098
40	I-C-N-F-K-T-C-P-T-D-E-L-R-H-G	30.271	80	G-P-G-P-G-A-A-P-Y-N-Q-R-N-Y	34.911			

Fonte: Elaborado pelo Autor, 2023.

**Tabela 6. Sequência de aminoácidos da PMEr-cor presentes na membrana de SPOT reconhecida pelo soro  $\alpha$ -PMEr-cor + MfV Coelho B por SPOT. A sequência de cada SPOT foi representada de acordo com sua intensidade no ensaio. Em cinza estão destacados os SPOT's com maior intensidade de reatividade. Em negrito, está destacado a sequência do espaçador GPGPG. Em verde está destacado o reconhecimento da região reconhecida sem o espaçador.**

			Soro $\alpha$ -PMEr-cor + MfV Coelho B					
Nr.	Sequência	Intensidade	Nr.	Sequência	Intensidade	Nr.	Sequência	Intensidade
1	P-E-G-K-D-K-C-E-K-Y-A-V-P-V-M	19.711	41	F-K-T-C-P-T-D-E-L-R-H-G-P-G-P	31.227	81	P-G-A-A-A-P-Y-N-Q-R-N-Y-K-G-C	47.004
2	K-D-K-C-E-K-Y-A-V-P-V-M-R-G-K	17.893	42	C-P-T-D-E-L-R-H-G-P-G-P-G-T-H	52.578	82	A-A-P-Y-N-Q-R-N-Y-K-G-C-I-Q-N	27.916
3	C-E-K-Y-A-V-P-V-M-R-G-K-G-P-G	17.364	43	D-E-L-R-H-G-P-G-P-G-T-H-R-G-L	53.916	83	Y-N-Q-R-N-Y-K-G-C-I-Q-N-G-P-G	23.662
4	Y-A-V-P-V-M-R-G-K-G-P-G-P-G-E	43.053	44	R-H-G-P-G-P-G-T-H-R-G-L-R-I-D	65.680	84	R-N-Y-K-G-C-I-Q-N-G-P-G-P-G-A	26.618
5	P-V-M-R-G-K-G-P-G-P-G-E-G-E-N	43.787	45	<b>P-G-P-G-T-H-R-G-L-R-I-D-R-G-C</b>	59.742	85	K-G-C-I-Q-N-G-P-G-P-G-A-K-D-N	32.729
6	R-G-K-G-P-G-P-G-E-G-E-N-H-C-Y	54.413	46	G-T-H-R-G-L-R-I-D-R-G-C-A-A-T	27.982	86	I-Q-N-G-P-G-P-G-A-K-D-N-P-A-C	61.382
7	G-P-G-P-G-E-G-E-N-H-C-Y-T-T-A	39.067	47	R-G-L-R-I-D-R-G-C-A-A-T-C-P-T	36.333	87	G-P-G-P-G-A-K-D-N-P-A-C-K-P-I	26.338
8	P-G-E-G-E-N-H-C-Y-T-T-A-I-T-A	25.107	48	R-I-D-R-G-C-A-A-T-C-P-T-V-K-G	29.609	88	P-G-A-K-D-N-P-A-C-K-P-I-W-D-S	31.138
9	G-E-N-H-C-Y-T-T-A-I-T-A-R-P-T	21.276	49	R-G-C-A-A-T-C-P-T-V-K-G-P-G-P	62.129	89	K-D-N-P-A-C-K-P-I-W-D-S-P-Y-V	29.800
10	H-C-Y-T-T-A-I-T-A-R-P-T-Y-V-G	23.182	50	A-A-T-C-P-T-V-K-G-P-G-P-G-P-D	77.831	90	P-A-C-K-P-I-W-D-S-P-Y-V-K-S-G	22.538
11	T-T-A-I-T-A-R-P-T-Y-V-G-P-G-P	22.747	51	C-P-T-V-K-G-P-G-P-G-P-D-D-F-T	66.427	91	K-P-I-W-D-S-P-Y-V-K-S-G-P-G-P	40.960
12	I-T-A-R-P-T-Y-V-G-P-G-P-G-C-P	66.444	52	V-K-G-P-G-P-G-P-G-P-D-D-F-T-C-V-K	74.702	92	W-D-S-P-Y-V-K-S-G-P-G-P-G-N-L	48.444
13	R-P-T-Y-V-G-P-G-P-G-C-P-E-S-T	48.533	53	<b>P-G-P-G-P-D-D-F-T-C-V-K-K-W-E</b>	58.431	93	P-Y-V-K-S-G-P-G-P-G-N-L-I-N-F	50.920
14	Y-V-G-P-G-P-G-C-P-E-S-T-P-N-E	31.867	54	G-P-D-D-F-T-C-V-K-K-W-E-G-G-G	28.742	94	K-S-G-P-G-P-G-N-L-I-N-F-Q-R-M	57.116
15	P-G-P-G-C-P-E-S-T-P-N-E-K-Y-Q	29.342	55	D-F-T-C-V-K-K-W-E-G-G-G-R-R-V	23.689	95	P-G-P-G-N-L-I-N-F-Q-R-M-I-Q-C	95.129
16	<b>G-C-P-E-S-T-P-N-E-K-Y-Q-C-C-S</b>	50.929	56	C-V-K-K-W-E-G-G-G-R-R-V-G-P-G	29.018	96	G-N-L-I-N-F-Q-R-M-I-Q-C-T-T-R	66.844
17	E-S-T-P-N-E-K-Y-Q-C-C-S-T-G-P	39.707	57	K-W-E-G-G-G-R-R-V-G-P-G-P-G-G	60.773	97	I-N-F-Q-R-M-I-Q-C-T-T-R-R-S-A	29.542
18	P-N-E-K-Y-Q-C-C-S-T-G-P-G-P-G	57.173	58	G-G-G-R-R-V-G-P-G-P-G-G-C-A-D	124.369	98	Q-R-M-I-Q-C-T-T-R-R-S-A-W-G-P	27.129
19	K-Y-Q-C-C-S-T-G-P-G-P-G-R-H-A	54.827	59	R-R-V-G-P-G-P-G-G-C-A-D-T-C-P	112.098	99	I-Q-C-T-T-R-R-S-A-W-G-P-G-P-G	29.644
20	C-C-S-T-G-P-G-P-G-R-H-A-S-D-S	48.409	60	<b>G-P-G-P-G-G-C-A-D-T-C-P-R-N-F</b>	90.631	100	T-T-R-R-S-A-W-G-P-G-P-G-N-C-D	50.618
21	T-G-P-G-P-G-R-H-A-S-D-S-Q-T-T	26.240	61	P-G-G-C-A-D-T-C-P-R-N-F-P-L-E	25.049	101	R-S-A-W-G-P-G-P-G-N-C-D-R-T-A	36.884
22	G-P-G-R-H-A-S-D-S-Q-T-T-T-C-L	48.618	62	C-A-D-T-C-P-R-N-F-P-L-E-I-V-G	35.196	102	W-G-P-G-P-G-N-C-D-R-T-A-A-L-C	85.582
23	R-H-A-S-D-S-Q-T-T-T-C-L-S-G-I	35.844	63	T-C-P-R-N-F-P-L-E-I-V-G-P-G-P	45.053	103	G-P-G-N-C-D-R-T-A-A-L-C-F-G-R	40.662
24	S-D-S-Q-T-T-T-C-L-S-G-I-C-Y-K	35.138	64	R-N-F-P-L-E-I-V-G-P-G-P-G-T-C	117.956	104	N-C-D-R-T-A-A-L-C-F-G-R-A-P-Y	29.671
25	Q-T-T-T-C-L-S-G-I-C-Y-K-K-G-P	38.493	65	P-L-E-I-V-G-P-G-P-G-T-C-P-A-G	58.800	105	R-T-A-A-L-C-F-G-R-A-P-Y-N-K-N	23.173
26	T-C-L-S-G-I-C-Y-K-K-G-P-G-P-G	77.751	66	I-V-G-P-G-P-G-T-C-P-A-G-Q-K-I	33.329	106	A-L-C-F-G-R-A-P-Y-N-K-N-N-G-P	19.773
27	S-G-I-C-Y-K-K-G-P-G-P-G-G-C-P	76.827	67	P-G-P-G-T-C-P-A-G-Q-K-I-C-F-K	61.524	107	F-G-R-A-P-Y-N-K-N-N-G-P-G-P-G	18.333
28	C-Y-K-K-G-P-G-P-G-G-C-P-Q-S-S	69.529	68	G-T-C-P-A-G-Q-K-I-C-F-K-K-W-K	54.951	108	A-P-Y-N-K-N-N-G-P-G-P-G-A-S-D	20.231
29	<b>K-G-P-G-P-G-G-C-P-Q-S-S-R-G-V</b>	48.778	69	P-A-G-Q-K-I-C-F-K-K-W-K-K-G-G	23.324	109	N-K-N-N-G-P-G-P-G-A-S-D-L-D-C	53.978
30	G-P-G-G-C-P-Q-S-S-R-G-V-K-V-D	26.302	70	Q-K-I-C-F-K-K-W-K-K-G-P-G-P-G	70.084	110	N-G-P-G-P-G-A-S-D-L-D-C-S-G-N	33.836
31	G-C-P-Q-S-S-R-G-V-K-V-D-C-C-M	53.818	71	C-F-K-K-W-K-K-G-G-P-G-P-G-P-K	98.382	111	G-P-G-A-S-D-L-D-C-S-G-N-N-T-K	39.458
32	Q-S-S-R-G-V-K-V-D-C-C-M-R-D-K	34.867	72	K-W-K-K-G-G-P-G-P-G-P-K-K-D-E	100.262	112	A-S-D-L-D-C-S-G-N-N-T-K-C-R-N	54.120
33	R-G-V-K-V-D-C-C-M-R-D-K-G-P-G	26.418	73	<b>K-G-G-P-G-P-G-P-K-K-D-E-T-I-Q</b>	71.449	113	L-D-C-S-G-N-N-T-K-C-R-N-F-G-P	36.747
34	K-V-D-C-C-M-R-D-K-G-P-G-P-G-L	42.382	74	<b>P-G-P-G-P-K-K-D-E-T-I-Q-C-C-T</b>	99.200	114	S-G-N-N-T-K-C-R-N-F-G-P-G-P-G	38.680
35	C-C-M-R-D-K-G-P-G-P-G-L-E-C-K	62.076	75	G-P-K-K-D-E-T-I-Q-C-C-T-K-N-N	30.938	115	<b>N-T-K-C-R-N-F-G-P-G-P-G-T-Y-N</b>	83.604
36	R-D-K-G-P-G-P-G-L-E-C-K-I-C-N	61.156	76	K-D-E-T-I-Q-C-C-T-K-N-N-G-P-G	19.373	116	<b>C-R-N-F-G-P-G-P-G-T-Y-N-R-N-N</b>	115.338
37	G-P-G-P-G-L-E-C-K-I-C-N-F-K-T	35.333	77	T-I-Q-C-C-T-K-N-N-G-P-G-P-G-A	27.716	117	F-G-P-G-P-G-T-Y-N-R-N-N-H-K-I	39.582
38	P-G-L-E-C-K-I-C-N-F-K-T-C-P-T	40.440	78	C-C-T-K-N-N-G-P-G-P-G-A-A-A-P	20.129	118	G-P-G-T-Y-N-R-N-N-H-K-I-D-P-S	44.938
39	E-C-K-I-C-N-F-K-T-C-P-T-D-E-L	40.067	79	K-N-N-G-P-G-P-G-A-A-A-P-Y-N-Q	18.191	119	T-Y-N-R-N-N-H-K-I-D-P-S-R-C-Q	63.031
40	I-C-N-F-K-T-C-P-T-D-E-L-R-H-G	30.271	80	G-P-G-P-G-A-A-A-P-Y-N-Q-R-N-Y	19.884			

Fonte: Elaborado pelo Autor, 2023.



## 5.6. INIBIÇÃO DAS ATIVIDADES FOSFOLIPÁSICAS

Os resultados obtidos através do ensaio de atividade fosfolipásica mostraram que todos os venenos testados do acervo de venenos de *Micrurus spp* exerceram atividade fosfolipásica e foram capazes de degradar os complexos de lecitinas presentes na emulsão de gema de ovo, porém em diferentes concentrações. Foi padronizado a menor concentração capaz de degradar esses complexos, sendo:

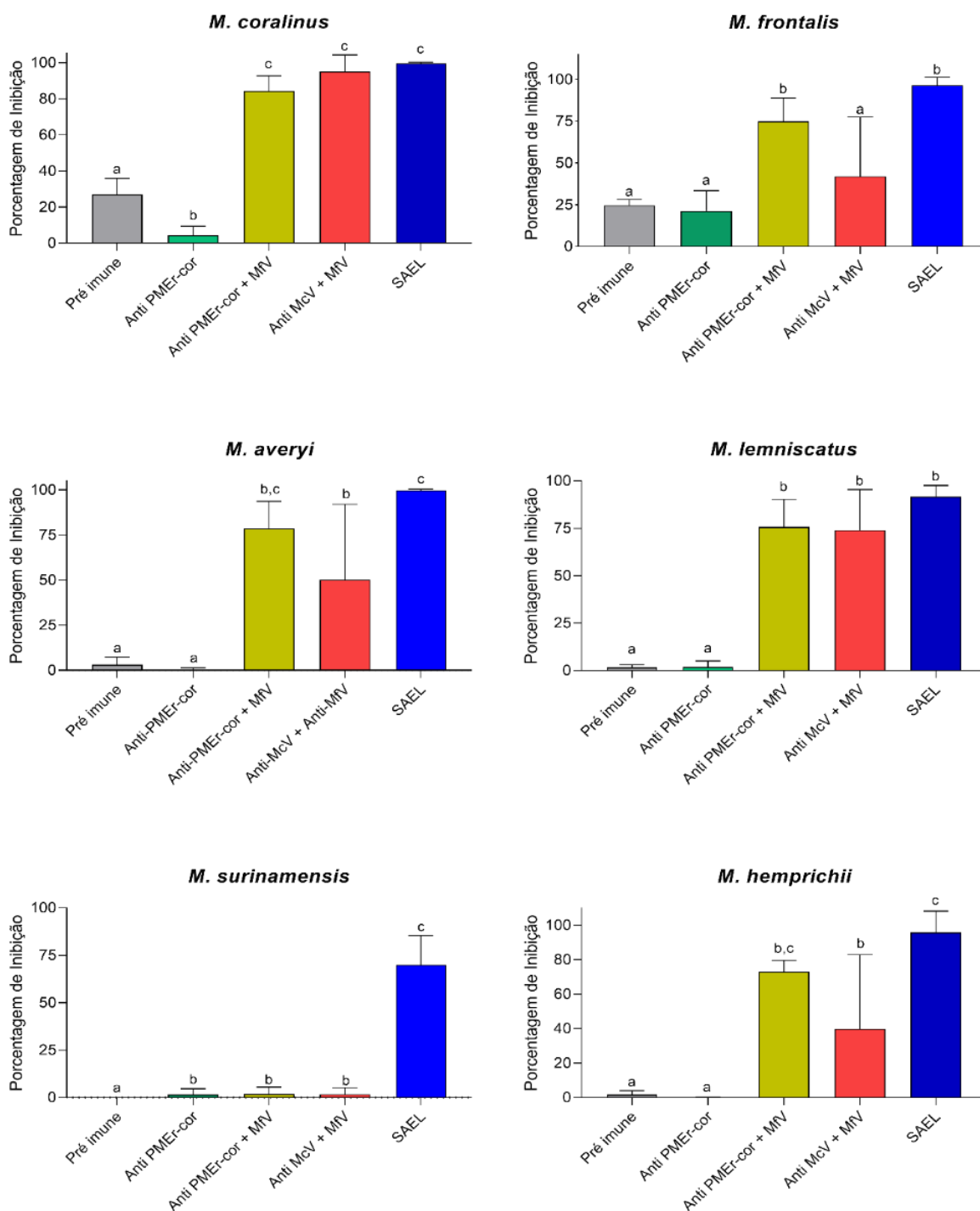
- *M. corallinus*: 40 µg por poço
- *M. frontalis*: 0,5 µg por poço
- *M. averyi*: 0,5 µg por poço
- *M. lemniscatus*: 10 µg por poço
- *M. surinamensis*: 30 µg por poço
- *M. hemprichii*: 0,5 µg por poço

Quando avaliada a inibição da atividade fosfolipásica (Figura 38) desses venenos pelos soros hiperimunes produzidos, na diluição de 1:20, vimos que o soro  $\alpha$ -PMEr-cor não foi capaz de inibir a ação de nenhum dos venenos testados. Já para o grupo imunizado com a PMEer-cor acrescida do veneno de *M. frontalis*, houve a inibição da maioria dos venenos testados, com exceção do veneno de *M. surinamensis*, onde não houve inibição da atividade fosfolipásica.

Além disso, nos resultados de inibição da atividade fosfolipásica frente aos venenos de *M. frontalis*, *M. avery* e *M. hemprichii*, a inibição pelo soro do grupo  $\alpha$ -PMEr-cor + MfV foi maior em comparação ao soro hiperimunizado com os venenos de *M. corallinus* e *M. frontalis*. Segundo as análises bioestatísticas aplicadas, no soro  $\alpha$ -PMEr-cor + MfV não há diferença significativa quando comparado ao SAEL nos venenos testados, exceto para o veneno de *M. surinamensis*, indicando que o soro é tão eficiente quanto o controle positivo utilizado no ensaio e mais eficiente do que o soro  $\alpha$ -McV + MfV em neutralizar a atividade fosfolipásica dos venenos testados.

**Figura 38. Inibição da atividade fosfolipásica.** Os venenos de *Micrurus spp* em concentração previamente definida foram diluídos em 50 µL de solução salina 0,9% v/v em placas de ELISA de 96 poços de fundo reto. A seguir, foi adicionado o soro de interesse em diluição 1:20 no volume final de 100 µl por poço. As placas foram então incubadas à 37 °C em estufa sob agitação por 60 minutos. Após, foi adicionado 100 µl de solução de emulsão de gema de ovo 2% v/v e as placas

foram imediatamente incubadas à 42 °C sob agitação. O SAEL e o Soro Pré Imune serviram como controle positivo e negativo do ensaio, respectivamente. Os resultados foram representados com média e desvio padrão. Letras diferentes (a, b e c) indicam diferença estatística significativa ( $p \leq 0,05$ ) por ANOVA one-way seguido do pós teste de Tukey.



Fonte: Elaborado pelo Autor, 2023.



### 5.7. ATIVIDADE LETAL DOS VENENOS DE *M. frontalis* E *M. corallinus*

A atividade letal dos venenos de *M. corallinus* e *M. frontalis* foi avaliada para determinação da DL<sub>50</sub> de cada veneno utilizado em camundongos Swiss com peso entre 18g a 22g separados em dois grupos com quatro animais cada, injetando via intraperitoneal, cinco concentrações crescentes dos venenos das duas espécies diluídos em solução PBS 1X-BSA 0,1%.

Para o veneno de *M. frontalis*, foram definidas as concentrações de veneno a serem testadas com base em ensaios exploratórios feitos previamente. A tabela 7 mostra a evolução final destes animais, observados por 48 horas:

**Tabela 7. Determinação da DL<sub>50</sub> para o veneno de *M. frontalis*.**

<b>Determinação de DL<sub>50</sub> – Veneno <i>M. frontalis</i></b>		
<b>Grupo</b>	<b>Qtd. Veneno</b>	<b>Nº de sobreviventes</b>
1	45,83 µg	1/4
2	55 µg	2/4
3	66 µg	3/4
4	79,2 µg	3/4
5	95,04 µg	4/4

**Fonte:** Elaborado pelo Autor, 2023.

A partir desses dados, foi determinada, a partir de cálculos realizados pelo método Probit, a DL<sub>50</sub> estimada para o veneno, a qual foi de 56,05 µg/animal.

Do mesmo modo, porém com outras concentrações de venenos estabelecidas, se determinou a atividade letal para o veneno de *M. corallinus*. A tabela 8 mostra a evolução final destes animais, observados por 48 horas.

Tabela 8. Determinação da DL<sub>50</sub> para o veneno de *M. corallinus*.

Determinação de DL <sub>50</sub> – Veneno <i>M. corallinus</i>		
Grupo	Qtd. Veneno	Nº de sobreviventes
1	7 µg	1/4
2	11,2 µg	1/4
3	17,92 µg	2/4
4	28,67 µg	4/4
5	45,88 µg	3/4

Fonte: Elaborado pelo Autor, 2023.

Apesar de ter sobrevivido 1 animal no grupo com a maior concentração de veneno, foi considerada a DL<sub>50</sub> calculada pelo *software*, uma vez que não havia veneno suficiente para repetir o ensaio. A DL<sub>50</sub> estabelecida foi de 17,84 µg/animal.

### 5.8. ENSAIO DE NEUTRALIZAÇÃO *IN VIVO*

Camundongos Swiss pesando aproximadamente 22g foram desafiados com 3DL<sub>50</sub> (*M. corallinus* = 53,52 µg/animal e *M. frontalis* = 168,15 µg/animal) e a neutralização da letalidade foi avaliada. O SAEL e o Soro Pré imune foram utilizados como controle positivo e negativo do ensaio, respectivamente. A tabela 9 mostra a evolução final dos animais observados por 48 horas.

**Tabela 9. Ensaio de neutralização *in vivo*.** Foi injetado 3DL<sub>50</sub> de cada antígeno via intraperitoneal e a morte foi contabilizada após 48 horas.

<i>M. corallinus</i> (3DL <sub>50</sub> /animal)			<i>M. frontalis</i> (3DL <sub>50</sub> /animal)		
Soro	Nº de sobreviventes	% de sobreviventes	Soro	Nº de sobreviventes	% de sobreviventes
Soro α-PMER-cor	1/4	25%	Soro α-PMER-cor	0/4	0%
Soro α-PMER-cor + MfV	2/4	50%	Soro α-PMER-cor + MfV	0/4	0%
Soro α-McV + MfV	4/4	100%	Soro α-McV + MfV	2/4	50%
SAEL	4/4	100%	SAEL	4/4	100%
Pré Imune	2/4	50%	Pré Imune	2/4	50%
PBS	0/4	0%	PBS	0/4	0%

**Fonte:** Elaborado pelo Autor, 2023.

Foi visto que para o veneno de *M. corallinus*, a taxa de proteção do soro α-PMER-cor, soro α-PMER-cor + MfV e α-McV e MfV foram de 25%, 50% e 100%, respectivamente. Já para o veneno de *M. frontalis*, não houve neutralização da atividade letal do veneno conferida pelos soros α-PMER-cor e soro α-PMER-cor + MfV, tendo uma proteção parcial de 50% conferida pelo soro α-McV e MfV. Em ambos os venenos, o soro Pré imune conferiu 50% de proteção inespecífica aos camundongos desafiados e o SAEL foi o único a proteger 100% dos animais nos dois grupos testados.

## 6. DISCUSSÃO

Os acidentes ofídicos são a segunda maior causa de acidentes envolvendo animais peçonhentos, de acordo com dados do SINAN (SINAN, 2023), e são considerados como um grave problema de saúde pública no Brasil e no mundo. Cerca de 5,8 bilhões de pessoas são afetadas, e aproximadamente 138 mil óbitos são registrados todos os anos no mundo, o que causa prejuízos socio-econômicos incalculáveis, segundo a Organização Mundial da Saúde (WHO, 2017). Desde 2017, esta condição foi classificada na categoria A da lista de Doenças Tropicais Negligenciadas e a OMS desenvolveu uma estratégia que almeja reduzir em 50% a mortalidade e a incapacidade causadas pelos envenenamentos ofídicos antes de 2030 (WHO, 2017).

O único tratamento específico para os casuos de ofidismo é a administração de Soro Antiofídico. Entretanto, toda a produção de antivenenos ainda é feita basicamente da mesma forma desde a sua idealização, e apresenta diversos problemas como já mencionado, seja na utilização dos cavalos como animais produtores, ou na extração de veneno e no manejo das serpentes utilizadas (Fan *et al.*, 2019; Fan e Monteiro, 2018; Miranda *et al.*, 2022).

A obtenção de proteínas recombinantes é um fator determinante em muitos estudos experimentais e, embora o sistema de expressão heteróloga seja muito difundido devido seu baixo custo e praticidade (Rosano *et al.*, 2019), para a área da Toxinologia, uma única proteína ser capaz de mimetizar um veneno tão complexo de uma serpente permanece um desafio.

Apesar das dificuldades, muito tem sido feito na área para contornar o problema da escassez ou substituição de venenos, com a produção de toxinas recombinantes e proteínas multiepitólicas a serem utilizadas como imunógenos (Kalapothakis *et al.*, 2002; Lima *et al.*, 2018; Mendes *et al.*, 2013; Molina Molina *et al.*, 2020) e também foi proposto para o veneno de *M. corallinus* (Castro *et al.*, 2015; de Castro *et al.*, 2019; Ramos *et al.*, 2016), trabalhos que motivaram esta dissertação.

Os dados presentes nesta dissertação mostram que a bioinformática agregada à tecnologia de produção de proteínas recombinantes são aliados e convergem para conferir robustez a um possível candidato para o desenvolvimento de imunógenos alternativos às toxinas biológicas presentes no veneno de *M. corallinus*.

Os resultados iniciais do trabalho, no tocante ao mapeamento *in silico* dos possíveis epítomos das toxinas de *M. corallinus*, demonstraram ser promissores para a composição da PMEr-cor. A predição *in silico* de epítomos é inovadora para a área, e foi possível agregar aos resultados de Castro *et al.* (2015), aos resultados de Leão *et al.* (2009) e Aird *et al.* (2017) juntamente com os resultados de Correa-Neto *et al.* (2011) para gerar a PMEr-cor com as sequências epítomicas que poderiam melhor representar a complexidade de toxinas presente no veneno de *M. corallinus*.

Por ser uma proteína multiepitópica, foi utilizado como espaçador entre os epítomos a sequência 'GPGPG', longamente utilizada como espaçador em proteínas quiméricas (De Brito *et al.*, 2020; Jafari and Mahmoodi, 2021; Kizhakedathil *et al.*, 2023; Livingston *et al.*, 2002; Ramos *et al.*, 2023; Tarrahimofrad *et al.*, 2021; Trujillo *et al.*, 2020). Esse espaçador, por ser rico em glicina, aumenta a solubilidade do construto, proporciona liberdade de atividade e alta acessibilidade e flexibilidade aos epítomos adjacentes, além de favorecer o processamento desses epítomos no proteossoma. Entretanto, como demonstrado nas Tabela 3, 4 e 5, foi visto que a escolha deste espaçador desfavoreceu a apresentação dos epítomos de *M. corallinus* escolhidos, uma vez que a produção de anticorpos policlonais foi mais direcionada para essa sequência de aminoácidos do que para as sequências epitópicas escolhidas. Esse direcionamento se deve possivelmente à imunogenicidade conferida ao espaçador 'GPGPG'.

Para corroborar essa hipótese, Tchernychev *et al.* (1997) concluíram em seu trabalho sobre anticorpos polireativos que a prolina está mais comumente presente em locais mais expostos em proteínas ubíquas, estando presente em *loops*, voltas, regiões N-terminais da primeira volta da alfa hélice, e assim, essas estruturas contendo prolina podem servir como epítomos "públicos" dependentes de conformação para ligação inespecífica de anticorpos com baixa afinidade. O trabalho de Tchernychev também acrescenta que motivos ricos em prolina estão presentes em vírus e bactérias patogênicas e, portanto, podem contribuir para a primeira linha de defesa contra invasores estrangeiros. Como a prolina é presente na maioria das proteínas em *loops* e voltas dessas proteínas nesses patógenos, o sistema imunológico pode reconhecer essas estruturas como autoantígenos e "marcá-las" para posterior processamento (Sachs, 1997).

Após seu *design* e construção, a PMEr-cor foi expressa e purificada (Figuras 25 e 26). A produção da PMEr-cor ganhou certo grau de dificuldade por ela se encontrar mais estável na porção insolúvel do lisado bacteriano, e apesar das análises físico-químicas apresentarem a PMEr-cor como solúvel, algum fator pode ter levado à formação de corpúsculos de inclusão que favoreceram a estrutura da PMEr-cor quanto a sua estabilidade.

Esta condição não foi limitante para o trabalho. É desejável que uma proteína seja expressa na porção solúvel do extrato, por demandar menos trabalho para posterior solubilização e purificação, mas ser expressa na porção insolúvel não impede que ela seja um imunógeno eficaz e que o resultado do trabalho seja alcançado, como demonstrado por Lima *et al.* (2018) e Ramos *et al.* (2016), que construíram proteínas recombinantes eficazes, mesmo sendo encontrada na porção insolúvel.

É válido ressaltar que a produção da PMEr-cor pode ser otimizada, utilizando outras cepas de *E. coli* como chassi de expressão, bem como outros meios de cultura suplementados, variação na temperatura e na concentração de IPTG utilizada, bem como no tempo de indução da proteína para uma expressão em maiores escalas (Saavedra-Langer *et al.*, 2021). Portanto, posteriores ensaios poderão ser realizados para refinar a expressão da PMEr-cor.

Uma vez produzida, a PMEr-cor foi utilizada como imunógeno alternativo ao veneno de *M. corallinus* nos animais em experimentação. Vale destacar que o esquema de imunização utilizado foi escolhido por ser similar ao utilizado na produção do SAEL na Fundação Ezequiel Dias, justificando-se o número total de doses, o número de doses a cada ciclo e o adjuvante utilizado no esquema de imunização (Figura 10), além da quantidade de imunógeno por peso do animal a ser inoculado.

É possível que a escolha desse esquema de imunização não foi ideal para a produção de anticorpos nos animais experimentais. Foram realizadas apenas 5 doses completas (100 µg de antígeno por dose em adjuvante Montanide) e outras 3 doses fracionadas em 3 aplicações seguidas (33 µg de antígeno por dose sem adjuvante) distribuídas nos 3 ciclos de imunização utilizados. Além da quantidade de imunógeno, que pode ter sido baixa.

No trabalho de Castro *et al.* (2015), a resposta humoral só foi detectada por ELISA após a 8ª dose do imunógeno. Molina Molina *et al.* (2020) construiu uma proteína recombinante com epítomos da Crotoxina e ao total foram administradas 7 doses do imunógeno. Lima *et al.* (2018) em seu trabalho com uma proteína multiepitópica representante do veneno de *Loxosceles* sp, inicialmente imunizou coelhos com 200 µg da proteína emulsificada em adjuvante Montanide. Após, foram administradas três doses de reforço em intervalo de duas semanas e após intervalo de três meses, os coelhos receberam mais três doses adicionais da proteína. Trabalhos do grupo ainda não publicados demonstram que a resposta imune frente a antígenos sintéticos deflagra a produção de anticorpos entre a 8ª e 12ª doses.

Todos esses trabalhos corroboram a ideia de que é necessária uma quantidade alta de doses para se iniciar a produção de anticorpos contra os imunógenos sintéticos, como a PMEr-cor, e que possivelmente, o número de doses administradas da PMEr-cor não foi suficiente para disparar a produção de IgG específicas para os epítomos nela contidos.

Um outro ponto muito importante a ser discutido é a imunogenicidade dos venenos de *Micrurus spp*, em especial o de *M. corallinus*. Foi visto que mesmo o grupo controle, aquele imunizado com o veneno de *M. corallinus* e *M. frontalis*, não obteve um título de anticorpos ligantes alto frente ao veneno de *M. corallinus* por ELISA (Figura 29). Além disso, apesar de reconhecerem proteínas do veneno de *M. corallinus* por *Western Blot* (Figura 31) e neutralizar *in vitro* e *in vivo* a atividade fosfolipásica e a letalidade desse veneno de maneira equiparada ao SAEL (Figura 37), o soro do grupo α-McV + MfV não foi capaz de reconhecer os epítomos selecionados originados do veneno de *M. corallinus* por SPOT (Figura 36). Isso poderia indicar que o veneno de *M. corallinus* não é um bom imunógeno para estar incluído em um *pool* de imunização contra as *Micrurus spp*, pois a sua imunogenicidade seria muito baixa.

Tanaka *et al.* (2010) já discutiram sobre a baixa imunogenicidade do veneno de *M. corallinus*, e seus dados mostram que o SAEL não é totalmente capaz de neutralizar as principais atividades tóxicas presentes nos venenos das espécies de *Micrurus* ocorrentes no país. Além disso, os autores sugerem que modificações no esquema de imunização, com inclusão de outros venenos na mistura antigênica, devem ocorrer para gerar um SAEL mais eficaz. Em outro trabalho de mesma autoria, Tanaka *et al.* (2016) investigaram as propriedades imunogênicas de venenos de

*Micrurus spp*, bem como a reatividade cruzada e o potencial de neutralização de soros experimentais monovalentes e polivalentes produzidos em diferentes espécies animais utilizando esses venenos para o estabelecimento de uma nova mistura antigênica para produção de um novo antiveneno mais eficiente. Foi visto que a maioria dos soros de camundongos monovalentes foi capaz de reconhecer, até certo ponto, os componentes de diferentes venenos *Micrurus spp.*, exceto o soro  $\alpha$ -*M. corallinus*, que somente foi capaz de identificar os componentes homólogos do próprio veneno. Isso corrobora a ideia de que o veneno de *M. corallinus* é um imunógeno fraco para reatividade cruzada entre venenos do mesmo gênero.

Proteínas de baixa massa molecular do veneno de uma serpente podem sofrer imunodepleção por IgGs presentes no antiveneno (Corrêa-Netto *et al.*, 2011). As 3FTxs, especialmente as neurotoxinas, são as toxinas elapídicas menos neutralizadas pelos antivenenos atuais (de la Rosa *et al.*, 2017). Além disso, Corrêa-Netto *et al.* (2011) também destacaram a baixa imunogenicidade dos venenos de *Micrurus spp*, em especial às toxinas 3FTx e PLA<sub>2</sub>. Em seu trabalho, o autor lembrou o fato que 3FTx e PLA<sub>2</sub> são imunógenos fracos, fato esse que pode resultar numa produção inadequada de anticorpos neutralizantes contra estas toxinas chave presentes nos venenos de *Micrurus spp*, em especial *M. corallinus*. Ciscotto *et al.* (2011) observou também que o veneno de *M. corallinus* não é o veneno mais eficaz para ser utilizado no SAEL. De acordo com seus dados, a substituição do veneno de *M. corallinus* pelo veneno de *M. ibiboboca* nos atuais protocolos de produção do SAEL poderia resultar em um antiveneno aprimorado, uma vez que o soro  $\alpha$ -*M. ibiboboca* produzido em seu trabalho foi capaz de reagir de forma cruzada de maneira mais eficiente com outras proteínas de diferentes venenos de *Micrurus spp*, quando comparado ao  $\alpha$ -*M. corallinus*.

No tocante aos imunoenaios de ELISA, foi visto que a PMEr-cor era reconhecida pelo SAEL (Figura 27), demonstrando que os epítomos escolhidos representavam de algum modo o veneno de *M. corallinus* utilizado na imunização dos cavalos para a produção do SAEL, e poderia servir como um possível imunógeno alternativo a este veneno.

Vimos pela metodologia de SPOT (Figura 33), que de fato alguns epítomos estavam sendo reconhecidos pelo soro  $\alpha$ -PMEr-cor e soro  $\alpha$ -PMEr-cor + MfV, mas pela mesma metodologia, foi possível observar que o havia um reconhecimento maior



direcionado às sequências de espaçadores 'GPGPG' em detrimento dos epítomos selecionados (Figura 33 e tabelas 4 e 5), mesmo quando suplementado com o veneno de *M. frontalis*.

É válido destacar que existem uma série de espaçadores utilizados na confecção de proteínas multiepitópicas. EAAAK é um espaçador rígido que fornece uma estrutura formadora de alfa hélices que aumenta a estabilidade das proteínas, mantendo uma distância constante entre os epítomos (Tarrahimofrad *et al.*, 2021). O espaçador AAY ajuda a formar epítomos de forma natural e evita a formação de epítomos juncionais, o que melhora a apresentação dos epítomos (Jafari e Mahmoodi, 2021). Já o espaçador HEYGAEALERAG pode fornecer a criação de um alvo de clivagem específico para sistemas de degradação proteassômica e lisossômica (Tarrahimofrad *et al.*, 2021). GSGSG é outro espaçador conhecido por fornecer flexibilidade estrutural à proteína sem interferir na sua função (Kumar *et al.*, 2021). O espaçador GG também pode ser utilizado para conferir maleabilidade à proteína (Lima *et al.*, 2018; Molina Molina *et al.*, 2020). O espaçador KK pode ajudar na apresentação espacial de cada epítomo aos anticorpos, evitando a indução de anticorpos na sequência de aminoácidos que resulta da ligação dos dois epítomos (Jafari e Mahmoodi, 2021; Tarrahimofrad *et al.*, 2021). Portanto, é válido avaliar a construção de uma nova PMEr-cor com outros espaçadores que possam melhor favorecer a apresentação desses epítomos.

Além de outros espaçadores, há a questão do adjuvante utilizado. Delahaut, (2017) alerta que a seleção do melhor adjuvante pode exigir a realização de um estudo preliminar comparando diferentes adjuvantes em combinação com o antígeno de interesse. Esse estudo não foi proposto para a PMEr-cor, uma vez que foi utilizado o adjuvante Montanide em outros projetos com experiências positivas do grupo (Felicori *et al.*, 2006; Kalapothakis *et al.*, 2002; Lima *et al.*, 2018; Molina Molina *et al.*, 2020), além de ser o adjuvante utilizado na rotina de produção do SAEL na FUNED.

Todos esses aspectos aqui discutidos podem ter contribuído para a baixa proteção nos ensaios de neutralização da atividade letal dos venenos de *M. corallinus* e *M. frontalis* (Tabela 8). Além disso, é válido destacar que houve uma proteção inespecífica conferida pelo soro pré imune no ensaio, e, portanto, necessita-se de uma nova realização do experimento para eliminar esta ocorrência. Entretanto, a própria escassez de venenos elapídicos que motivou esse trabalho também prejudicou a

execução das atividades previstas, uma vez que não foi possível obter veneno suficiente para repetir os testes de neutralização.

Juntos, os dados propostos por este trabalho demonstraram ser o início de uma possível alternativa à substituição do veneno de *M. corallinus*. Uma proteína multiepitópica contendo epítomos de várias toxinas do veneno de *M. corallinus* foi apresentada nesta dissertação, abrindo um novo panorama na pesquisa em busca de um substituto mais específico e principalmente diminuindo o uso do veneno no processo de produção do SAEL.

A implementação da PMEr-cor levaria à atualização da produção do SAEL, além de reduzir a demanda por veneno de *M. corallinus*, indo ao encontro do princípio denominado 3 Rs (*Reduction, Refinement, Replacement*), proposto por William Russell e Rex Burchque em 1959, e que ainda em 2023, permanece um desafio para a área de antivenenos.

## 7. CONCLUSÃO

- I. A PMEr-cor foi desenhada, construída, expressa em modelo procarioto e caracterizada por técnicas de imun química;
- II. A proteína foi imunogênica, ou seja, capaz de induzir a produção de anticorpos nos grupos imunizados, avaliados por técnicas de ELISA, *Western Blot* e SPOT;
- III. O grupo imunizado unicamente com a PMEr-cor não foi capaz de gerar anticorpos ligantes e neutralizantes contra o veneno de *M. corallinus*;
- IV. Os anticorpos  $\alpha$ -PMEr-cor + MfV foram capazes de reconhecer parcialmente o veneno de *M. corallinus*, demonstrado por ELISA e *Western Blot*, apesar de não gerar anticorpos neutralizantes contra este veneno;
- V. O soro PMEr-cor +MfV demonstrou um padrão de reconhecimento diferente do grupo controle no ensaio de SPOT, tendo um direcionamento maior dos anticorpos aos espaçadores presentes na PMEr-cor;
- VI. O soro PMEr-cor + MfV foi capaz de neutralizar *in vitro* a atividade fosfolipásica de ambos venenos de interesse e de outras espécies, sem, no entanto, inibir 100% da letalidade *in vivo*;
- VII. A PMEr-cor demonstrou indícios de ser um possível imunógeno substitutivo ao veneno de *M. corallinus*, ainda a ser aperfeiçoado;

## 8. PERSPECTIVAS

- Avaliar a composição e refinar a escolha dos epítomos presentes na PMEr-cor;
- Desenhar e produzir uma nova PMEr-cor com diferentes espaçadores;
- Avaliar outros tipos de adjuvantes para melhorar a resposta imune produzida;
- Verificar alternativas para otimizar sistemas de produção em larga escala da PMEr-cor.

## 9. REFERÊNCIAS

- Aird, S., 2001. Prey specificity, comparative lethality and compositional differences of coral snake venoms, *Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology*. [https://doi.org/10.1016/s1532-0456\(00\)00215-5](https://doi.org/10.1016/s1532-0456(00)00215-5)
- Aird, S.D., da Silva, N.J., Qiu, L., Villar-Briones, A., Saddi, V.A., Telles, M.P. de C., Grau, M.L., Mikheyev, A.S., 2017. Coralsnake venomomics: Analyses of venom gland transcriptomes and proteomes of six Brazilian taxa. *Toxins (Basel)*. 9, 1–64. <https://doi.org/10.3390/toxins9060187>
- Aird, S.D., da Silva, N.J.J., 1991. Comparative enzymatic composition of Brazilian coral snake (*Micrurus*) venoms. *Comp. Biochem. Physiol. B*. 99, 287–294. [https://doi.org/10.1016/0305-0491\(91\)90043-d](https://doi.org/10.1016/0305-0491(91)90043-d)
- Andrade Filho, 2015. ANÁLISE CLÍNICO-EPIDEMIOLÓGICA DE CASOS DE OFIDISMO ATENDIDOS EM UM HOSPITAL PÚBLICO ESTADUAL DE MINAS GERAIS DE 2003 A 201. Programa Pós-Graduação em Ciências da Saúde Infectol. e Med. Trop.
- Ansari, H.R., Raghava, G.P., 2010. Identification of conformational B-cell Epitopes in an antigen from its primary sequence. *Immunome Res*. 6, 6. <https://doi.org/10.1186/1745-7580-6-6>
- Barros, A.C.S., Fernandes, D.P., Ferreira, L.C. de L., Dos Santos, M.C., 1994. Local effects induced by venoms from five species of genus *Micrurus* spp. (coral snakes). *Toxicon* 32, 445–452. [https://doi.org/10.1016/0041-0101\(94\)90296-8](https://doi.org/10.1016/0041-0101(94)90296-8)
- Bermúdez-Méndez, E., Fuglsang-Madsen, A., Føns, S., Lomonte, B., Gutiérrez, J.M., Laustsen, A.H., 2018. Innovative immunization strategies for antivenom development. *Toxins (Basel)*. 10, 1–37. <https://doi.org/10.3390/toxins10110452>
- Bisneto, P.F., Alcântara, J.A., Mendonça da Silva, I., de Almeida Gonçalves Sachett, J., Bernarde, P.S., Monteiro, W.M., Kaefer, I.L., 2020. Coral snake bites in Brazilian Amazonia: Perpetrating species, epidemiology and clinical aspects. *Toxicon* 175, 7–18. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2019.11.011>

- Brazil, O.V., 1987. index.pdf. Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo 29, 119–126.
- Bucarechi, F., Borrasca-Fernandes, C.F., De Capitani, E.M., Hyslop, S., 2020. Consecutive envenomation of two men bitten by the same coral snake (*Micrurus corallinus*). Clin. Toxicol. 58, 132–135.  
<https://doi.org/10.1080/15563650.2019.1610568>
- Carmo, A.O., Chatzaki, M., Horta, C.C.R., Magalhães, B.F., Oliveira-Mendes, B.B.R., Chávez-Olórtegui, C., Kalapothakis, E., 2015. Evolution of alternative methodologies of scorpion antivenoms production. Toxicon 97, 64–74.  
<https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2015.02.007>
- Casais-e-Silva, L.L., Teixeira, C.F.P., Lebrun, I., Lomonte, B., Alape-Girón, A., Gutiérrez, J.M., 2016. Lemnitoxin, the major component of *Micrurus lemniscatus* coral snake venom, is a myotoxic and pro-inflammatory phospholipase A2. Toxicol. Lett. 257, 60–71. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2016.06.005>
- Castro, K.L., Duarte, C.G., Ramos, H.R., Machado De Avila, R.A., Schneider, F.S., Oliveira, D., Freitas, C.F., Kalapothakis, E., Ho, P.L., Chávez-Olortegui, C., 2015. Identification and characterization of B-cell epitopes of 3FTx and PLA2 toxins from *Micrurus corallinus* snake venom. Toxicon 93, 51–60.  
<https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2014.10.015>
- Cecchini, A.L., Marcussi, S., Silveira, L.B., Borja-Oliveira, C.R., Rodrigues-Simioni, L., Amara, S., Stábeli, R.G., Giglio, J.R., Arantes, E.C., Soares, A.M., 2005. Biological and enzymatic activities of *Micrurus* spp. (Coral) snake venoms. Comp. Biochem. Physiol. - A Mol. Integr. Physiol. 140, 125–134.  
<https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2004.11.012>
- Chen, J., Liu, H., Yang, J., Chou, K.-C., 2007. Prediction of linear B-cell epitopes using amino acid pair antigenicity scale. Amino Acids 33, 423–8.  
<https://doi.org/10.1007/s00726-006-0485-9>
- Chou, P.Y., Fasman, G.D., 1978. Prediction of the secondary structure of proteins from their amino acid sequence. Adv. Enzymol. 47, 455–468.  
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-397580-5.50041-7>

- Ciscotto, P.H.C., Rates, B., Silva, D.A.F., Richardson, M., Silva, L.P., Andrade, H., Donato, M.F., Cotta, G.A., Maria, W.S., Rodrigues, R.J., Sanchez, E., De Lima, M.E., Pimenta, A.M.C., 2011. Venomic analysis and evaluation of antivenom cross-reactivity of South American *Micrurus* species. *J. Proteomics* 74, 1810–1825. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2011.07.011>
- Coelho, L.K., Silva, E., Esposito, C., Zanin, M., 1992. Clinical Features and Treatment of Elapidae Bites: Report of Three Cases. *Hum. Exp. Toxicol.* 11, 135–137. <https://doi.org/10.1177/096032719201100213>
- Corrêa-Netto, C., Junqueira-de-Azevedo, I. de L.M., Silva, D.A., Ho, P.L., Leitão-de-Araújo, M., Alves, M.L.M., Sanz, L., Foguel, D., Zingali, R.B., Calvete, J.J., 2011. Snake venomomics and venom gland transcriptomic analysis of Brazilian coral snakes, *Micrurus altirostris* and *M. corallinus*. *J. Proteomics* 74, 1795–1809. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2011.04.003>
- 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., 2020. Engineered antigen containing epitopes from *Loxosceles* spp. spider toxins induces a monoclonal antibody (Lox-mAb3) against astacin-like metalloproteases. *Int. J. Biol. Macromol.* 162, 490–500. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.06.176>
- da Silva Júnior, N.J., Griffin, P.R., Aird, S.D., 1991. Comparative chromatography of Brazilian coral snake (*Micrurus*) venoms. *Comp. Biochem. Physiol. B.* 100, 117–126. [https://doi.org/10.1016/0305-0491\(91\)90093-s](https://doi.org/10.1016/0305-0491(91)90093-s)
- Dashevsky, D., Bénard-Valle, M., Neri-Castro, E., Youngman, N.J., Zdenek, C.N., Alagón, A., Portes-Junior, J.A., Frank, N., Fry, B.G., 2021. Anticoagulant *Micrurus* venoms: Targets and neutralization. *Toxicol. Lett.* 337, 91–97. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2020.11.010>
- De Brito, R.C.F., Ruiz, J.C., Cardoso, J.M. de O., Ostolin, T.L.V.D.P., Reis, L.E.S., Mathias, F.A.S., Aguiar-Soares, R.D. de O., Roatt, B.M., Corrêa-Oliveira, R., Resende, D. de M., Reis, A.B., 2020. Chimeric vaccines designed by

immunoinformatics-activated polyfunctional and memory T cells that trigger protection against experimental visceral leishmaniasis. *Vaccines* 8, 1–20.  
<https://doi.org/10.3390/vaccines8020252>

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., 2019. A combined strategy to improve the development of a coral antivenom against micrurus spp. *Front. Immunol.* 10, 1–13.  
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02422>

de la Rosa, G., Pastor, N., Alagón, A., Corzo, G., 2017. Synthetic peptide antigens derived from long-chain alpha-neurotoxins: Immunogenicity effect against elapid venoms. *Peptides* 88, 80–86. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2016.12.006>

Delahaut, P., 2017. Immunisation – Choice of host, adjuvants and boosting schedules with emphasis on polyclonal antibody production. *Methods* 116, 4–11.  
<https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2017.01.002>

Di-Bernardo, M., Borges-Martins, M., Da Silva, N.J., 2007. A new species of coralsnake (Micrurus: Elapidae) from southern Brazil. *Zootaxa* 26, 1–26.  
<https://doi.org/10.11646/zootaxa.1447.1.1>

Eble, J.A., 2019. Structurally robust and functionally highly versatile—C-type lectin (-related) proteins in snake venoms. *Toxins (Basel)*. 11.  
<https://doi.org/10.3390/toxins11030136>

EL-Manzalawy, Y., Dobbs, D., Honavar, V., 2008a. Predicting linear B-cell epitopes using string kernels. *J. Mol. Recognit.* 21, 243–255.  
<https://doi.org/10.1002/jmr.893>

EL-Manzalawy, Y., Dobbs, D., Honavar, V., 2008b. PREDICTING FLEXIBLE LENGTH LINEAR B-CELL EPITOPES. *Comput Syst Bioinforma. Conf.* 7, 121–132.

Emini, E.A., Hughes, J. V, Perlow, D.S., Boger, J., 1985. Induction of hepatitis A virus-neutralizing antibody by a virus-specific synthetic peptide. *J. Virol.* 55, 836–9.



- Fan, H.W., Monteiro, W.M., 2018. History and perspectives on how to ensure antivenom accessibility in the most remote areas in Brazil. *Toxicon* 151, 15–23. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2018.06.070>
- Fan, H.W., Natal Vigilato, M.A., Augusto Pompei, J.C., Gutiérrez, J.M., 2019. Situación de los laboratorios públicos productores de antivenenos en América Latina. *Rev. Panam. Salud Pública* 43, 1. <https://doi.org/10.26633/rpsp.2019.92>
- Felicori, L., Araujo, S.C., Machado de Ávila, R.A., Sanchez, E.F., Granier, C., Kalapothakis, E., Chávez-Olórtegui, C., 2006. Functional characterization and epitope analysis of a recombinant dermonecrotic protein from *Loxosceles intermedia* spider. *Toxicon* 48, 509–519. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2006.06.019>
- Felicori, L., Fernandes, P.B., Giusta, M.S., Duarte, C.G., Kalapothakis, E., Nguyen, C., Molina, F., Granier, C., Chávez-Olórtegui, C., 2009. An in vivo protective response against toxic effects of the dermonecrotic protein from *Loxosceles intermedia* spider venom elicited by synthetic epitopes. *Vaccine* 27, 4201–4208. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2009.04.038>
- Fernández, J., Vargas-Vargas, N., Pla, D., Sasa, M., Rey-Suárez, P., Sanz, L., Gutiérrez, J.M., Calvete, J.J., Lomonte, B., 2015. Snake venomomics of *Micrurus alleni* and *Micrurus mosquitensis* from the Caribbean region of Costa Rica reveals two divergent compositional patterns in New World elapids. *Toxicon* 107, 217–233. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2015.08.016>
- Figueiredo, L.F.M., Dias-Lopes, C., Alvarenga, L.M., Mendes, T.M., Machado-De-Ávila, R.A., McCormack, J., Minozzo, J.C., Kalapothakis, E., Chávez-Olórtegui, C., 2014. Innovative immunization protocols using chimeric recombinant protein for the production of polyspecific loxoscelic antivenom in horses. *Toxicon* 86, 59–67. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2014.05.007>
- Fletcher, 1994. Specificities of Asp49, 314–315.
- Fry, B.G., Wüster, W., Kini, R.M., Brusica, V., Khan, A., Venkataraman, D., Rooney, A.P., 2003. Molecular evolution and phylogeny of elapid snake venom three-finger toxins. *J. Mol. Evol.* 57, 110–129. <https://doi.org/10.1007/s00239-003->

2461-2

- Gaspar, M.Z., Yabunaka, A.C., Silva-Carvalho, R., Nascimento, C.U., Brinholi, R.B., Silva, E.O., Gerez, J.R., Silva, N.J., Torres-Bonilla, K.A., Hyslop, S., Pacagnelli, F.L., Floriano, R.S., 2023. Cardiac Effects of *Micrurus corallinus* and *Micrurus dumerilii carinicauda* (Elapidae) Venoms and Neutralization by Brazilian Coralsnake Antivenom and Varespladib. *Cardiovasc. Toxicol.* 23, 132–146. <https://doi.org/10.1007/s12012-023-09786-6>
- Gutiérrez, J.M., Lomonte, B., 2013. Phospholipases A2: Unveiling the secrets of a functionally versatile group of snake venom toxins. *Toxicon* 62, 27–39. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2012.09.006>
- Hiremath, K., Dodakallanavar, J., Sampat, G.H., Patil, V.S., Harish, D.R., Chavan, R., Hegde, H. V., Roy, S., 2023. Three finger toxins of elapids: structure, function, clinical applications and its inhibitors. *Mol. Divers.* <https://doi.org/10.1007/s11030-023-10734-3>
- Isbister, G.K., 2010. Antivenom efficacy or effectiveness: The Australian experience. *Toxicology* 268, 148–154. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2009.09.013>
- Jafari, E., Mahmoodi, S., 2021. Design, expression, and purification of a multi-epitope vaccine against *Helicobacter Pylori* based on Melittin as an adjuvant. *Microb. Pathog.* 157, 104970. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2021.104970>
- Jespersen, M.C., Peters, B., Nielsen, M., Marcatili, P., 2017. BepiPred-2.0: Improving sequence-based B-cell epitope prediction using conformational epitopes. *Nucleic Acids Res.* 45, W24–W29. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx346>
- Kalapothis, E., Araujo, S.C., De Castro, C.S., Mendes, T.M., Gomez, M.V., Mangili, O.C., Gubert, I.C., Chávez-Olórtegui, C., 2002. Molecular cloning, expression and immunological properties of LiD1, a protein from the dermonecrotic family of *Loxosceles intermedia* spider venom. *Toxicon* 40, 1691–1699. [https://doi.org/10.1016/S0041-0101\(02\)00201-5](https://doi.org/10.1016/S0041-0101(02)00201-5)
- Karplus, P.A., Schulz, G.E., 1985. Prediction of chain flexibility in proteins. *Naturwissenschaften* 72, 212–213. <https://doi.org/10.1007/bf01195768>

- Kini, R.M., 2005. Structure-function relationships and mechanism of anticoagulant phospholipase A2 enzymes from snake venoms. *Toxicon* 45, 1147–1161. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2005.02.018>
- Kini, R.M., Chan, Y.M., 1999. Accelerated evolution and molecular surface of venom phospholipase A2 enzymes. *J. Mol. Evol.* 48, 125–132. <https://doi.org/10.1007/PL00006450>
- Kini, R.M., Koh, C.Y., 2020. Snake venom three-finger toxins and their potential in drug development targeting cardiovascular diseases. *Biochem. Pharmacol.* 181, 114105. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2020.114105>
- Kizhakedathil, M.P.J., Saravanakumar, T., Anbarasu, S., Kallesh, S., Thiruvalluvan, V., 2023. Designing of Chimeric Vaccine against Canine Distemper Virus Targeting Hemagglutinin Protein. *Biointerface Res. Appl. Chem.* 13, 3–7. <https://doi.org/10.33263/BRIAC134.347>
- Kolaskar, A.S., Tongaonkar, P.C., 1990. A semi-empirical method for prediction of antigenic determinants on protein antigens. *FEBS* 276, 172–174.
- Kringelum, J.V., Lundegaard, C., Lund, O., Nielsen, M., 2012. Reliable B cell epitope predictions: impacts of method development and improved benchmarking. *PLoS Comput. Biol.* 8, e1002829. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1002829>
- Kumar, J., Qureshi, R., Sagurthi, S.R., Qureshi, I.A., 2021. Designing of Nucleocapsid Protein Based Novel Multi-epitope Vaccine Against SARS-COV-2 Using Immunoinformatics Approach. *Int. J. Pept. Res. Ther.* 27, 941–956. <https://doi.org/10.1007/s10989-020-10140-5>
- Lamar, C. e, 2005. The Venomous Reptiles of the Western Hemisphere. *Int. J. Toxicol.* 24, 187–188. <https://doi.org/10.1080/10915810590953446>
- Laune, D., Molina, F., Ferrières, G., Villard, S., Bès, C., Rieunier, F., Chardès, T., Granier, C., 2002. Application of the Spot method to the identification of peptides and amino acids from the antibody paratope that contribute to antigen binding. *J. Immunol. Methods* 267, 53–70. [https://doi.org/10.1016/S0022-1759\(02\)00140-0](https://doi.org/10.1016/S0022-1759(02)00140-0)

- Laustsen, A.H., 2018. Guiding recombinant antivenom development by omics technologies. *N. Biotechnol.* 45, 19–27. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2017.05.005>
- Laustsen, A.H., Solà, M., Jappe, E.C., Oscoz, S., Lauridsen, L.P., Engmark, M., 2016. Biotechnological trends in spider and scorpion antivenom development. *Toxins (Basel)*. 8. <https://doi.org/10.3390/toxins8080226>
- Leão, L.I., 2008. Análise Transcriptômica Das Glândulas De Veneno Da *Micrurus Corallinus* (Cobra-Coral) E Identificação De Candidatos Antigênicos Para Um Anti-Soro Alternativo. *Biologia (Bratisl)*.
- Leão, L.I., Ho, P.L., Junqueira-de-Azevedo, I. de L.M., 2009. Transcriptomic basis for an antiserum against *Micrurus corallinus* (coral snake) venom. *BMC Genomics* 10, 1–14. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-10-112>
- Leite dos Santos, G.G., Casais e Silva, L.L., Pereira Soares, M.B., Villarreal, C.F., 2012. Antinociceptive properties of *Micrurus lemniscatus* venom. *Toxicon* 60, 1005–1012. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2012.07.003>
- Lewin, M.R., Gilliam, L.L., Gilliam, J., Samuel, S.P., Bulfone, T.C., Bickler, P.E., Gutiérrez, J.M., 2018. Delayed LY333013 (oral) and LY315920 (intravenous) reverse severe neurotoxicity and rescue juvenile pigs from lethal doses of *micrurus fulvius* (eastern coral snake) venom. *Toxins (Basel)*. 10. <https://doi.org/10.3390/toxins10110479>
- Lima, S. de A., Guerra-Duarte, C., Costal-Oliveira, F., Mendes, T.M., Luís, L.F., Oliveira, D., de Avila, R.A.M., Ferrer, V.P., Trevisan-Silva, D., Veiga, S.S., Minozzo, J.C., Kalapothakis, E., Chávez-Olórtegui, C., 2018. Recombinant protein containing B-cell epitopes of different *Loxosceles* spider toxins generates neutralizing antibodies in immunized rabbits. *Front. Immunol.* 9. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00653>
- Livingston, B., Crimi, C., Newman, M., Higashimoto, Y., Appella, E., Sidney, J., Sette, A., 2002. A Rational Strategy to Design Multiepitope Immunogens Based on Multiple Th Lymphocyte Epitopes. *J. Immunol.* 168, 5499–5506. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.168.11.5499>

- Lomonte, B., Rey-Suárez, P., Fernández, J., Sasa, M., Pla, D., Vargas, N., Bénard-Valle, M., Sanz, L., Corrêa-Netto, C., Núñez, V., Alape-Girón, A., Alagón, A., Gutiérrez, J.M., Calvete, J.J., 2016. Venoms of *Micrurus* coral snakes: Evolutionary trends in compositional patterns emerging from proteomic analyses. *Toxicon* 122, 7–25. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2016.09.008>
- Manavalan, B., Govindaraj, R.G., Shin, T.H., Kim, M.O., Lee, G., 2018. iBCE-EL: A New Ensemble Learning Framework for Improved Linear B-Cell Epitope Prediction. *Front. Immunol.* 9. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01695>
- Marinetti, G. V., 1965. The action of phospholipase A on lipoproteins. *Biochim. Biophys. Acta (BBA)/Lipids Lipid Metab.* 98, 554–565. [https://doi.org/10.1016/0005-2760\(65\)90152-9](https://doi.org/10.1016/0005-2760(65)90152-9)
- Markland, F.S., Swenson, S., 2013. Snake venom metalloproteinases. *Toxicon* 62, 3–18. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2012.09.004>
- Mendes, G.F., Stuginski, D.R., Loibel, S.M.C., Morais-Zani, K. De, Da Rocha, M.M.T., Fernandes, W., Sant’anna, S.S., Grego, K.F., 2019. Factors that can influence the survival rates of coral snakes (*Micrurus corallinus*) for antivenom production. *J. Anim. Sci.* 97, 972–980. <https://doi.org/10.1093/jas/sky467>
- Mendes, T.M., Oliveira, D., Figueiredo, L.F.M., Machado-de-Avila, R.A., Duarte, C.G., Dias-Lopes, C., Guimarães, G., Felicori, L., Minozzo, J.C., Chávez-Olortegui, C., 2013. Generation and characterization of a recombinant chimeric protein (rCpLi) consisting of B-cell epitopes of a dermonecrotic protein from *Loxosceles intermedia* spider venom. *Vaccine* 31, 2749–2755. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2013.03.048>
- Miranda, A.L.S. de, Antunes, B.C., Minozzo, J.C., Lima, S. de A., Botelho, A.F.M., Campos, M.T.G., Chávez-Olortegui, C.D., Soto-Blanco, B., 2022. Clinical Effects of the Immunization Protocol Using *Loxosceles* Venom in Naïve Horses. *Toxins (Basel)*. 14. <https://doi.org/10.3390/toxins14050338>
- Molina Molina, D.A., Guerra-Duarte, C., Costal-Oliveira, F., Almeida Rocha, E., Rego Rodrigues, C., Machado-de-Ávila, R.A., Soccol, V.T., Chávez-Olortegui, C., 2020. Engineered protein containing crotoxin epitopes induces neutralizing

antibodies in immunized rabbits. *Mol. Immunol.* 119, 144–153.  
<https://doi.org/10.1016/j.molimm.2020.01.012>

Montecucco, C., Gutiérrez, J.M., Lomonte, B., 2008. Cellular pathology induced by snake venom phospholipase A2 myotoxins and neurotoxins: Common aspects of their mechanisms of action. *Cell. Mol. Life Sci.* 65, 2897–2912.  
<https://doi.org/10.1007/s00018-008-8113-3>

Moreira, K., 2010. ESTUDO DOS COMPONENTES PROTÉICOS DA PEÇONHA DA SERPENTE *Micrurus frontalis* ( SERPENTES : ELAPIDAE ) Brasília – DF ESTUDO DOS COMPONENTES PROTÉICOS DA PEÇONHA DA SERPENTE *Micrurus frontalis* ( SERPENTES : ELAPIDAE).

Moreira, K.G., Prates, M. V., Andrade, F.A.C., Silva, L.P., Beirão, P.S.L., Kushmerick, C., Naves, L.A., Bloch, C., 2010. Frontoxins, three-finger toxins from *Micrurus frontalis* venom, decrease miniature endplate potential amplitude at frog neuromuscular junction. *Toxicon* 56, 55–63.  
<https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2010.02.030>

Nagle, T., Berg, C., Nassr, R., Pang, K., 2003. The further evolution of biotech. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2, 75–79. <https://doi.org/10.1038/nrd989>

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., Giraud, A., Gonzalez, R.C., Guedes, T., Hoogmoed, M.S., Marques, O.A.V., Montingelli, G.G., Passos, P., Prudente, A.L.C., Rivas, G.A., Sanchez, P.M., Serrano, F.C., Silva, N.J., Strüssmann, C., Vieira-Alencar, J.P.S., Zaher, H., Sawaya, R.J., Martins, M., 2020. Atlas of Brazilian Snakes: Verified Point- Locality Maps to Mitigate the Wallacean Shortfall in a Megadiverse Snake Fauna. *South Am. J. Herpetol.* 14, 1. <https://doi.org/10.2994/sajh-d-19-00120.1>

Ogawa, T., Chijiwa, T., Oda-Ueda, N., Ohno, M., 2005. Molecular diversity and accelerated evolution of C-type lectin-like proteins from snake venom. *Toxicon* 45, 1–14. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2004.07.028>

Olamendi-Portugal, T., Batista, C.V.F., Pedraza-Escalona, M., Restano-Cassulini, R.,

- Zamudio, F.Z., Benard-Valle, M., Rafael de Roodt, A., Possani, L.D., 2018. New insights into the proteomic characterization of the coral snake *Micrurus pyrrhocryptus* venom. *Toxicon* 153, 23–31.  
<https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2018.08.003>
- Oliveira, A.L., Viegas, M.F., da Silva, S.L., Soares, A.M., Ramos, M.J., Fernandes, P.A., 2022. The chemistry of snake venom and its medicinal potential. *Nat. Rev. Chem.* 6, 451–469. <https://doi.org/10.1038/s41570-022-00393-7>
- Oliveira, D. de, Guerra-Duarte, C., Stransky, S., Scussel, R., Pereira de Castro, K.L., Costal-Oliveira, F., Aragão, M., Oliveira-Souza, G. de, Saavedra-Langer, R., Trevisan, G., Bonilla-Ferreira, C., Chávez-Olórtegui, C., Machado-de-Ávila, R.A., 2023. Toxic and antigenic characterization of Peruvian *Micrurus surinamensis* coral snake venom. *Toxicon* 225.  
<https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2023.107056>
- Parker, J.M.R., Guo, D., Hodges, R.S., 1986. New Hydrophilicity Scale Derived from High-Performance Liquid Chromatography Peptide Retention Data: Correlation of Predicted Surface Residues with Antigenicity and X-ray-Derived Accessible Sites. *Biochemistry* 25, 5425–5432. <https://doi.org/10.1021/bi00367a013>
- Ponomarenko, J., Bui, H., Li, W., Füsseder, N., Bourne, P.E., Sette, A., Peters, B., 2008. ElliPro : a new structure-based tool for the prediction of antibody epitopes. *BMC Bioinformatics* 8, 1–8. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-9-514>
- Ramos, F.F., Pereira, I.A.G., Cardoso, M.M., Bandeira, R.S., Lage, D.P., Scussel, R., Anastacio, R.S., Freire, V.G., Melo, M.F.N., Oliveira-da-Silva, J.A., Martins, V.T., Tavares, G.S. V., Vale, D.L., Freitas, C.S., Chaves, A.T., Caporali, J.F.M., Vassallo, P.F., Ravetti, C.G., Nobre, V., Fonseca, F.G., Christodoulides, M., Machado-de-Ávila, R.A., Coelho, E.A.F., Ludolf, F., 2023. B-Cell Epitopes-Based Chimeric Protein from SARS-CoV-2 N and S Proteins Is Recognized by Specific Antibodies in Serum and Urine Samples from Patients. *Viruses* 15, 1877.  
<https://doi.org/10.3390/v15091877>
- Ramos, H.R., Junqueira-de-Azevedo, I. de L.M., Novo, J.B., Castro, K., Duarte, C.G., Machado-de-Ávila, R.A., Chavez-Olortegui, C., Ho, P.L., 2016. A Heterologous

Multiepitope DNA Prime/Recombinant Protein Boost Immunisation Strategy for the Development of an Antiserum against *Micrurus corallinus* (Coral Snake) Venom. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 10, 1–19.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004484>

Rojas, E., Gutiérrez, J.O.S.M., Lomonte, B., Portilla, E., I, L.C., 1983. Local effects induced by coral snake venoms: Evidence of myonecrosis after experimental inoculations of venoms from five species from many elapds induce prominent myonecrosis in experimental animals . Several.

Rosano, G.L., Morales, E.S., Ceccarelli, E.A., 2019. New tools for recombinant protein production in *Escherichia coli*: A 5-year update. *Protein Sci.* 28, 1412–1422. <https://doi.org/10.1002/pro.3668>

Saavedra-Langer, R., Costa, T.G.F., Lima, S.A., Costal-Oliveira, F., Martins, C.A., Machado-de-Ávila, R.A., Minozzo, J.C., Soccol, V.T., Guerra-Duarte, C., Kalapothakis, E., Chávez-Olórtegui, C., 2021. A prokaryote system optimization for rMEPLox eSaavedra-Langer, R., Costa, T.G.F., Lima, S.A., Costal-Oliveira, F., Martins, C.A., Machado-de-Ávila, R.A., Minozzo, J.C., Soccol, V.T., Guerra-Duarte, C., Kalapothakis, E., Chávez-Olórtegui, C., 2021. A proka. *Int. J. Biol. Macromol.* 187, 66–75. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.07.042>

Sachs, L., 1997. The epitopes for natural polyreactive antibodies are rich in proline 94, 6335–6339.

Saha, S., Raghava, G.P.S., 2006. Prediction of continuous B-cell epitopes in an antigen using recurrent neural network. *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.* 65, 40–48. <https://doi.org/10.1002/prot.21078>

Sanchez, E.F., Freitas, T. V, Ferreira-Alves, D.L., Velarde, D.T., Diniz, M.R., Cordeiro, M.N., Agostini-Cotta, G., Diniz, C.R., 1992. Biological activities of venoms from South American snakes. *Toxicon* 30, 95–103.  
[https://doi.org/10.1016/0041-0101\(92\)90505-y](https://doi.org/10.1016/0041-0101(92)90505-y)

Serapicos, E. de O., Merusse, J.L.B., 2002. Variação de peso e sobrevivência de *Micrurus corallinus* sob diferentes condições de alimentação em biotério (Serpentes, Elapidae). *Iheringia. Série Zool.* 92, 105–109.



<https://doi.org/10.1590/s0073-47212002000400013>

Silva-Carvalho, R., Gaspar, M.Z., Quadros, L.H.B., Lobo, L.G.G., Giuffrida, R., Santarém, C.L., Silva, E.O., Gerez, J.R., Silva, N.J., Hyslop, S., Lomonte, B., Floriano, R.S., 2022. Partial efficacy of a Brazilian coral snake antivenom and varespladib in neutralizing distinct toxic effects induced by sublethal *Micrurus dumerillii carinicauda* envenoming in rats. *Toxicon* 213, 99–104.

<https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2022.04.014>

Silva-Carvalho, R., Gaspar, M.Z., Quadros, L.H.B., Lobo, L.G.G., Rogério, L.M., Santos, N.T.S., Zerbini, M.C., Santarém, C.L., Silva, E.O., Gerez, J.R., Silva, N.J., Lomonte, B., Rowan, E.G., Floriano, R.S., 2021. In vivo treatment with varespladib, a phospholipase A2 inhibitor, prevents the peripheral neurotoxicity and systemic disorders induced by *Micrurus corallinus* (coral snake) venom in rats. *Toxicol. Lett.* 356, 54–63. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2021.11.003>

SINAN, 2023. Manual\_SinanNet 2007.

Singh, H., Ansari, H.R., Raghava, G.P.S., 2013. Improved Method for Linear B-Cell Epitope Prediction Using Antigen's Primary Sequence. *PLoS One* 8, 1–8.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0062216>

Soares, T.G., Santos, J.L. dos, Alvarenga, V.G. de, Santos, J.S.C., Leclercq, S.Y., Faria, C.D., Oliveira, M.A.A., Bemquerer, M.P., Sanchez, E.O.F., de Lima, M.E., Figueiredo, S.G., Borges, M.H., 2020. Biochemical and functional properties of a new L-amino acid oxidase (LAAO) from *Micrurus lemniscatus* snake venom. *Int. J. Biol. Macromol.* 154, 1517–1527.

<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.11.033>

Strauch, M.A., Souza, G.J., Pereira, J.N., Ramos, T. dos S., Cesar, M.O., Tomaz, M.A., Monteiro-Machado, M., Patrão-Neto, F.C., Melo, P.A., 2018. True or false coral snake: Is it worth the risk? A *Micrurus corallinus* case report. *J. Venom. Anim. Toxins Incl. Trop. Dis.* 24, 1–5. <https://doi.org/10.1186/s40409-018-0148-9>

Sweredoski, M.J., Baldi, P., 2009. COBEpro: a novel system for predicting continuous B-cell epitopes. *Protein Eng. Des. Sel.* 22, 113–20.

<https://doi.org/10.1093/protein/gzn075>

- Sweredoski, M.J., Baldi, P., 2008. PEPITO: improved discontinuous B-cell epitope prediction using multiple distance thresholds and half sphere exposure. *Bioinformatics* 24, 1459–60. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btn199>
- Tan, K.K., Bay, B.H., Gopalakrishnakone, P., 2018. L-amino acid oxidase from snake venom and its anticancer potential. *Toxicon* 144, 7–13. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2018.01.015>
- Tan, N.H., Ponnudurai, G., 1992. The biological properties of venoms of some American coral snakes (Genus *Micrurus*). *Comp. Biochem. Physiol. B.* 101, 471–474. [https://doi.org/10.1016/0305-0491\(92\)90029-q](https://doi.org/10.1016/0305-0491(92)90029-q)
- Tanaka, G.D., Furtado, M.D.F.D., Portaro, F.C.V., Sant’Anna, O.A., Tambourgi, D. V., 2010. Diversity of *Micrurus* snake species related to their venom toxic effects and the prospective of antivenom neutralization. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 4, 1–12. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000622>
- Tanaka, G.D., Piddé-Queiroz, G., Furtado, M. de F.D., van den Berg, C., Tambourgi, D. V., 2012. *Micrurus* snake venoms activate human complement system and generate anaphylatoxins. *BMC Immunol.* 13. <https://doi.org/10.1186/1471-2172-13-4>
- Tanaka, G.D., Sant’anna, O.A., Marcelino, J.R., Lustoza Da Luz, A.C., Teixeira Da Rocha, M.M., Tambourgi, D. V., 2016. *Micrurus* snake species: Venom immunogenicity, antiserum cross-reactivity and neutralization potential. *Toxicon* 117, 59–68. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2016.03.020>
- Tarrhimofrad, H., Rahimnahal, S., Zamani, J., Jahangirian, E., Aminzadeh, S., 2021. Designing a multi-epitope vaccine to provoke the robust immune response against influenza A H7N9. *Sci. Rep.* 11, 1–22. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-03932-2>
- Tavares-Neto, J., 2014. Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos, *Revista Baiana de Saúde Pública.* <https://doi.org/10.22278/2318-2660.1996.v1.n2.a1256>
- Terra, A.L.C., Moreira-Dill, L.S., Simões-Silva, R., Monteiro, J.R.N., Cavalcante,

- W.L.G., Gallacci, M., Barros, N.B., Nicolete, R., Teles, C.B.G., Medeiros, P.S.M., Zanchi, F.B., Zuliani, J.P., Calderon, L.A., Stábeli, R.G., Soares, A.M., 2015. Biological characterization of the Amazon coral *Micrurus spixii* snake venom: Isolation of a new neurotoxic phospholipase A2. *Toxicon* 103, 1–11.  
<https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2015.06.011>
- Trujillo, E., Rosales-Mendoza, S., Angulo, C., 2020. A multi-epitope plant-made chimeric protein (LTBentero) targeting common enteric pathogens is immunogenic in mice. *Plant Mol. Biol.* 102, 159–169.  
<https://doi.org/10.1007/s11103-019-00938-3>
- Utkin, Y.N., 2019. Last decade update for three-finger toxins: Newly emerging structures and biological activities. *World J. Biol. Chem.* 10, 17–27.  
<https://doi.org/10.4331/wjbc.v10.i1.17>
- WHO, 2017. Snakebite envenoming, *Nature Reviews Disease Primers*.  
<https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.64>
- Yao, B., Zhang, L., Liang, S., Zhang, C., 2012. SVMTriP: A Method to Predict Antigenic Epitopes Using Support Vector Machine to Integrate Tri-Peptide Similarity and Propensity. *PLoS One* 7, e45152.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0045152>
- Zhou, C., Chen, Z., Zhang, L., Yan, D., Mao, T., Tang, K., Qiu, T., Cao, Z., 2019. SEPPA 3.0—enhanced spatial epitope prediction enabling glycoprotein antigens. *Nucleic Acids Res.* 47, W388–W394.  
<https://doi.org/10.1093/nar/gkz413>